

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Bojana B. Vidović

**UTICAJ SUPLEMENTACIJE  
ALFA-LIPONSKOM KISELINOM NA  
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA I  
ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE KOD  
OBOLELIH OD SHIZOFRENIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Bojana B. Vidović

**THE EFFECT OF ALPHA-LIPOIC ACID  
SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE  
STRESS MARKERS AND ANTIOXIDATIVE  
DEFENSE IN PATIENTS WITH  
SCHIZOPHRENIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**MENTORI:**

**Dr Brižita Đorđević, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

**Dr Srđan Milovanović, docent**  
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

---

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Slavica Spasić, redovni profesor u penziji**  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

**Dr Ivanka Miletić, profesor *emeritus***  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

**Dr Ivan Stanković, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

U Beogradu, \_\_\_\_\_

*Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Brižiti Đorđević na velikoj pomoći, savetima i ohrabrenjima tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, kao i na nesebičnoj podršci koju mi pruža tokom naše dugogodišnje saradnje.*

*Neizmernu zahvalnost upućujem i mentoru, doc. dr Srđanu Milovanoviću na pomoći i podršci tokom izrade doktorske disertacije, a pre svega na ukazanom velikom poverenju.*

*Prof. emeritus Ivanki Miletić najsrdačnije se zahvaljujem na znanju i iskustvu koje mi nesebično prenosi tokom svih godina naše saradnje, podsticajima i prijateljskim savetima.*

*Zahvaljujem se prof. dr Ivanu Stankoviću na stručnim savetima i podršci.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Slavici Spasić na saradnji i pruženoj mogućnosti da najveći deo eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije uradim na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević i doc. dr Aleksandri Stefanović na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, statističke obrade, tumačenja i publikovanja dobijenih rezultata. Veliko hvala koleginicama dipl. farm. Jasmini Ivanišević, kao i dipl. farm–med. biohemičarima Milici Miljković i Tamari Gojković, kao i ostalim zaposlenim na Katedri za medicinsku biohemiju na svesrdnoj podršci i srdačnoj radnoj atmosferi.*

*Zahvaljujem se prof. dr Draganu Manojloviću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, kao i master hemičaru Sandri Škrivanj na razumevanju i pomoći u realizaciji dela eksperimentalnog rada.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Katarini Ilić na pruženoj podršci, ličnoj i profesionalnoj, tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Želela bih da se zahvalim svim kolegama Katedre za bromatologiju koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svim ispitanicima bez čijeg dobrovoljnog učešća izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.*

*Posebno se zahvaljujem doc. dr Nikoli Milašinoviću na nesebičnom angažovanju i prijateljskoj podršci u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Od sveg srca se zahvaljujem doc. dr Slavici Filipić na iskrenom prijateljstvu i podršci u trenucima kada je to bilo neophodno.*

*U znak zahvalnosti za bezgraničnu ljubav, bezrezervnu podršku i razumevanje, ovaj rad posvećujem mojim najmilijima, bratu i roditeljima.*

# **Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije**

## **Rezime**

U odnosu na opštu populaciju, oboleli od shizofrenije imaju kraći životni vek i povećani rizik za razvoj somatskih pratećih bolesti. Visoka prevalenca metaboličkog sindroma u shizofreniji predstavlja značajan faktor rizika za razvoj koronarne bolesti i dijabetes melitusa tip 2. Iako su odnosi između metaboličkog sindroma i shizofrenije kompleksni i još uvek nedovoljno proučeni, pretpostavlja se da oksidativni stres predstavlja mehanizam koji ima integrativnu ulogu kako u razvoju metaboličkog sindroma, tako i njegovih komplikacija. Zbog toga su ciljevi ovog istraživanja bili da se odrede parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije i zdravih ispitanika, kao i da se ispita nivo oksidativnog stresa u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma kod obolelih od shizofrenije. Iako rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na izmenjenu enzimsku antioksidativnu aktivnost, redukovani nivo neenzimskih antioksidanasa, kao i povećani stepen lipidne peroksidacije, ograničen je broj studija koje ukazuju na mogućnost modulacije oksidativno-stresnog statusa u shizofreniji primenom antioksidanasa.

Suplementacija dijetarnim antioksidansima može pružiti značajnu podršku endogenom antioksidativnom zaštitnom sistemu u prevenciji oksidativnih oštećenja, kao i regulaciji redoks osetljivih signalnih puteva. Uzimajući u obzir činjenicu da se alfa-liponska kiselina smatra jednim od najsnažnijih antioksidanasa, njenu sposobnost da prolazi krvno-moždanu barijeru i povećava nivo endogenih antioksidanasa, posebno glutaciona, koji predstavlja glavni endogeni antioksidans u centralnom nervnom sistemu, kao i potencijalne pozitivne metaboličke efekte, pretpostavljeno je da suplementacija alfa-liponskom može imati potencijalno povoljne efekte kao dodatak antipsihotičnoj terapiji kod klinički stabilnih pacijenata sa shizofrenijom.

U istraživanju je učestvovalo ukupno 60 pacijenata sa shizofrenijom, oba pola, starosti od 18 do 60 godina, u stabilnoj fazi bolesti. Kontrolna grupa je obuhvatila 60 zdravih ispitanika, sličnih godina i pola. Ispitivanjem uticaja suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, obuhvaćena je grupa od 18 obolelih od shizofrenije, kao i grupa od 38 zdravih ispitanika.

Analiza parametara oksidativnog stresa pokazala je značajno veći stepen lipidne peroksidacije, ali i veći stepen neenzimske antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost enzima paraoksonaza 1 (PON1) je bila značajno niža u grupi pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu. Nije uočena razlika u aktivnosti enzima superoksid dismutaza (SOD), kao i u vrednostima prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) između ispitivanih grupa. Koncentracija bakra u plazmi bila je veća kod obolelih od shizofrenije u odnosu na kontrolnu grupu, dok se koncentracije cinka i selena u plazmi nisu značajno razlikovale. Ispitivanjem nivoa oksidativnog stresa u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma, utvrđen je veći stepen lipidne peroksidacije, ali i veći nivo totalnog antioksidativnog statusa (TAS), kao i veća koncentracija selena, kod pacijenata sa metaboličkim sindromom u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na grupu pacijenata sa shizofrenijom bez metaboličkog sindroma. Dobijeni rezultati su pokazali značajnu korelaciju između parametara oksidativno stresnog statusa i pojedinačnih komponenata metaboličkog sindroma u grupi pacijenata sa shizofrenijom.

Uticao suplementacije alfa-liponskom kiselinom se ispoljio na smanjenje parametara oksidativnog stresa kod zdravih ispitanika, ali nije dovela do smanjenja oksidativnog oštećenja kod obolelih od shizofrenije. Međutim, suplementacija alfa-liponskom kiselinom dovela je do pozitivnih metaboličkih efekata, poboljšanja nivoa glukoze i povećanja koncentracija adiponektina, kod pacijenata sa shizofrenijom. Utvrđene razlike u koncentracijama i aktivnostima parametara endogene antioksidativne zaštite tokom suplementacije alfa-liponskom kiselinom kod zdravih ispitanika, ukazuju na potencijalne rizike dugotrajne suplementacije antioksidansima.

**Ključne reči:** oksidativni stres, antioksidativna zaštita, alfa-liponska kiselina, shizofrenija

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Hemija hrane i dijetetskih proizvoda

**UDK broj:** 616. 895. 8 : [ 577. 16 : 546. 21 ] (043.3)

# **The effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia**

## **Abstract**

Patients with schizophrenia have a reduced life expectancy and increased rates of physical illness compared with the general population. Metabolic syndrome is highly prevalent in individuals with schizophrenia and conveys a significantly increases risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. Although it may not be the main cause, increasing evidence indicate that oxidative stress may play an integral role in the pathogenesis of metabolic syndrome, as well as the pathogenesis of metabolic syndrome-related conditions. In recent years there has been an increasing interest in the oxidative stress in the schizophrenia. However, up to now, there have been no studies investigating the association between oxidative stress status and metabolic syndrome in schizophrenia. Therefore, the objectives of this study were to determine the presence of metabolic syndrome and evaluate the oxidative stress status, as well as possible associations amongst them in schizophrenic patients.

Recent years, increasing interest exists in using nonenzymatic antioxidants as adjunctive or supplements to prevent oxidative damage and to improve some of the psychopathology and treatment-related side effects of antipsychotic drugs. Alpha-lipoic acid is recognized as a powerful antioxidant. The ability of alpha-lipoic acid to cross the blood-brain barrier and increases levels of endogenous antioxidants, especially glutathione, who presents a major endogenous antioxidant in the brain, may have particular importance for schizophrenia.

The study group consisted of 60 patients with schizophrenia and 60 sex- and age-matched healthy controls. Eighteen medicated patients with schizophrenia and 38 healthy subjects (control group) received daily supplements of alpha-lipoic acid (500 mg/day) for three months.

Analysis of oxidative stress parameters showed significantly higher lipid peroxidation and higher plasma total antioxidant status in patients with schizophrenia than in the control group. In contrast, their PON1 activity was lower compared to control subjects. There were no significant differences between the patients and controls when plasma superoxide dismutase activity and serum prooxidant-antioxidant balance levels were compared.

Plasma copper concentrations were significantly higher in schizophrenic patients than in control subjects. Plasma selenium and zinc concentrations were higher in patients with schizophrenia, but not statistically significant. Schizophrenia patients with metabolic syndrome had significantly higher lipid peroxidation and higher plasma total antioxidant status, as well as higher selenium concentrations, than patients without metabolic syndrome. Our results demonstrated that oxidative stress parameters are associated with metabolic risk factors in patients with schizophrenia.

Our results have shown strong antioxidant activity of alpha lipoic acid against lipid peroxidation and oxidative damage proteins in healthy subjects. The supplementation with alpha lipoic acid improved glucose and adiponectine levels but not enough to prevented oxidative damage in schizophrenia.

Our results indicated that long term supplementation with high doses of antioxidants may be risk in healthy subjects, owing to their potential to react with beneficial concentrations of reactive oxygen species normally present at physiological conditions that are required for optimal cellular functioning.

**Key words:** oxidative stress, antioxidative defense, alpha-lipoic acid, schizophrenia

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific topic:** Chemistry of food and dietary products

**UDK number:** 616. 895. 8 : [ 577. 16 : 546. 21 ] (043.3)



1. UVOD.....	1
1.1. Shizofrenija.....	3
1.1.1. Shizofrenija, somatske bolesti i metabolički sindrom.....	6
1.2. Oksidativni stres.....	8
1.2.1. Slobodni radikali.....	8
1.2.2. Antioksidativna zaštita.....	11
1.2.2.1. Antioksidativni enzimi.....	12
1.2.2.2. Neenzimski antioksidansi.....	15
1.2.3. Fiziološka uloga slobodnih radikala.....	17
1.2.4. Oksidativna oštećenja biomolekula.....	18
1.2.5. Metode za određivanje oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	19
1.3. Oksidativni stres u shizofreniji. ....	21
1.3.1. Parametri oksidativnog stresa u shizofreniji.....	23
1.3.2. Parametri antioksidativne zaštite u shizofreniji.....	24
1.3.3. Oksidativni stres, metabolički sindrom i shizofrenija.....	27
1.4. Suplementacija antioksidansima u shizofreniji.....	29
1.5. Alfa-liponska kiselina.....	31
1.5.1. Hemijska struktura i fiziološke uloge alfa-liponske kiseline.....	31
1.5.2. Dijetarni izvori.....	32
1.5.3. Bioraspoloživost i metabolizam alfa-liponske kiseline.....	33
1.5.4. Bezbednost suplementacije alfa-liponskom kiselinom.....	35
1.5.5. Antioksidativna uloga alfa-liponske kiseline ....	35
1.5.5.1. Neutralizacija slobodnih radikala.....	36
1.5.5.2. Heliranje metalnih jona.....	36
1.5.5.3. Interakcija sa ostalim antioksidansima.....	37
1.5.5.4. Regulatorna uloga alfa-liponske kiseline ....	39
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	41
3. ISPITANICI I METODE.....	43
3.1. Ispitanici.....	44
3.2. Dizajn studije.....	44
3.3. Metode.....	46
3.3.1. Antropometrijska merenja.....	46
3.3.2. Određivanje biohemijskih parametara.....	46

3.3.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	47
3.3.3.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS).....	47
3.3.3.2. Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP).....	48
3.3.3.3. Određivanje nivoa superoksid anjon radikala u plazmi.....	48
3.3.4. Određivanje parametara antioksidativne zaštite.....	49
3.3.4.1. Određivanje ukupnog sadržaja sulfihidrilnih grupa (SH grupa).....	49
3.3.4.2. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS) .....	49
3.3.4.3. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaza (SOD) .....	50
3.3.4.4. Određivanje aktivnosti enzima paraoksonaza 1 (PON1).....	51
3.3.4.5. Određivanje mikrolemenata u plazmi metodom induktivno spregnute plazma-masene spektrofotometrije (ICP-MS).....	52
3.3.5. Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB).....	53
3.3.6. Određivanje koncentracije adipokina.....	54
3.3.6.1. Određivanje koncentracije leptina.....	54
3.3.6.2. Određivanje koncentracije adiponektina.....	54
3.4. Statistička obrada podataka.....	55
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	56
4.1. Poređenje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa shizofrenijom.....	57
4.2. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma kod pacijenata sa shizofrenijom.....	61
4.2.1. Korelacije između parametara oksidativno-stresnog statusa sa pojedinačnim komponentama metaboličkog sindroma u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa shizofrenijom.....	67
4.2.2. Poređenje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u shizofreniji u zavisnosti od stepena udruženosti komponenti metaboličkog sindroma.....	71

4.3.	Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	75
4.3.1.	Opšti podaci o ispitanicima.....	75
4.3.2.	Antropometrijski i osnovni biohemijski parametri.....	76
4.3.3.	Parametri oksidativnog stresa.....	80
4.3.4.	Parametri antioksidativne zaštite.....	82
4.3.5.	Prooksidativno-antioksidativni balans.....	89
4.3.6.	Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na koncentracije leptina i adiponektina kod pacijenata sa shizofrenijom.....	90
5.	DISKUSIJA.....	91
5.1.	Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije.....	92
5.2.	Ispitivanje nivoa oksidativnog stresa u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma kod pacijenata sa shizofrenijom.....	97
5.3.	Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije i zdravih ispitanika.....	103
6.	ZAKLJUČCI.....	109
7.	LITERATURA.....	112

## LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

**8-OhdG**-8-hidroksi-2-deoksiguanozin

**ABTS** - azinobis-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina

**AMPK** - adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza

**ANOVA** - analiza varijanse

**AOPP** - (eng. *advanced oxidation protein products*)-produkti uznapredovale oksidacije proteina

**ARE** - (eng. *antioxidant response element*)

**ATP** - (eng. *adenosine-5'-triphosphate*)- adenzin- trifosfat

**CAT** - (eng. *catalase*)-katalaza

**CGI** - (eng. *clinical global impression*)- opšti klinički utisak

**CNS** - centralni nervni sistem

**DHLA** - (eng. *dihydrolipoic acid*) –dihidroliponska kiselina

**DMSO** - dimetilsulfoksid

**DNK** - dezoksiribonukleinska kiselina

**DTNB** – dinitro-ditio-benzojeva kiselina

**DZOazna** - diazooksazonazna

**ELISA** - (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)-enzimski imunosorbent test

**ESR** - elektron spin rezonantna spektroskopija

**EDTA**- etilendiaminotetrasirćetna kiselina

**FRAP** - (eng. *ferric reducing ability plasma*)-test sposobosti redukcije feri jona

**GPx** - glutation peroksidaza

**GR** - glutation reduktaza

**GSH** - redukovani glutation

**GSSG** - oksidovani glutation

**GST** - glutation-S-transferaza

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - vodonik peroksid

**HDL** - (eng. *high density lipoprotein*)-lipoprotein velike gustine

**HNE** - hidroksi-nonenal

**HO<sup>•</sup>** - hidroksilni radikal

**HOCl** - hipohlorna kiselina

**HOO<sup>•</sup>** - hidroperoksil radikal

**ICP-MS** - (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*)-induktivno spregnuta plazma- masena spektrofotometrija

**IMHP** - izopropil-metil--hidroksipirimidin

**IDF** - (eng. *International Diabetes Federation*)-Međunarodno udruženje za dijabetes

**ITM** - indeks telesne mase

**Keap1** - (eng. *Kelch ECH Associating Protein 1*)

**KVB** - kardiovaskularne bolesti

**LA** - (eng. *alpha lipoic acid*)-alfa-liponska kiselina

**LDL** - (eng. *low density lipoprotein*)-lipoprotein male gustine

**LOOH<sup>•</sup>** - lipidni hidroperoksid

**MAO** - monoamino oksidaza

**MDA** - malondialdehid

**MetS** - metabolički sindrom

**MKB** - međunarodna klasifikacija bolesti

**NAC** - (eng. *N-acetylcysteine*)- N-acetilcistein

**NADPH** - redukovani nikotinamid-adenin –dinukleotid fosfat

**NBT** - (eng. *nitro blue tetrazolium*)-nitrobluetetrazolijum

**NMDA** - N-metil-D-aspartat receptor

**NO** - azot-monoksid, azot (II)-oksid

**NOS** – (eng. *nitric oxide synthase*) - endotelna azot oksid sintaza

**Nrf2** - (eng. *NF-E2 related factor 2*)-nuklearni faktor Nrf2

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - superoksidni anjon

**ONOO<sup>-</sup>** - peroksinitrit

**ORAC** - (eng. *oxygen radical absorbance capacity*)- kapacitet apsorpcije radikala kiseonika

**PAB** - prooksidativno-antioksidativni balans

**Poazna**- paraoksonazna

**PLA2** - (eng. *phospholipase A2*)-fosfolipaza A2

**PUFA** - (eng. *polyunsaturated fatty acid*)-polinezasičene masne kiseline

**PON** - paraoksonaza

**Prx** - peroksiredoksini

**RNS** - (eng. *reactive nitrogen species*)- reaktivne vrste azota

**RO<sup>•</sup>** - alkoksil radikal

**ROO<sup>•</sup>** - peroksil radikal

**ROS** - (eng. *reactive oxygen species*)-reaktivne vrste kiseonika

**SH** – sulfhidrilne grupe

**SHZ** - shizofrenija

**SOD** - superoksid dismutaza

**TAS** - (eng. *total antioxidant status*)-totalni antioksidativni status

**TBA** - (eng. *thiobarbituric acid*)-tiobarbiturna kiselina

**TBKRS** - tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance

**TCF7L2** - (eng. *transcription factor 7 like-2*)

**TEAC** - (eng. *trolox equivalent antioxidant capacity*)- troloks ekvivalentni antioksidativni kapacitet

**TG** - trigliceridi

**TMB** - tetrametilbenzidin

**TNF- $\alpha$**  - (eng. *tumor necrosis factor- $\alpha$* )-faktor tumorske nekroze alfa

**TrxR** - tioredoksin reduktaza

# **1. UVOD**

Poslednjih decenija, značajnim napretkom nauke o hrani i ishrani, utvrđeno je da se optimalnom ishranom može postići dobro zdravlje organizma i preventivno uticati na razvoj mnogih hroničnih bolesti. U tom smislu, dijetarne intervencije potenciranjem ili eliminacijom određenih nutrijenata ili namirnica iz ishrane, kao i primenom određenih nutrijenata u koncentrovanom obliku, u formi dijetetskih suplemenata, dobijaju sve više na značaju.

Uloga oksidativnog stresa u shizofreniji intenzivno se proučava poslednjih godina. Najveći broj istraživanja u ovoj oblasti usmeren je na utvrđivanje odnosa oksidativnog stresa i antioksidativnih zaštitnih mehanizama u akutnoj psihotičnoj epizodi i tokom faze stabilizacije, sa posebnim interesovanjem za potencijalnu modulatornu ulogu antipsihotičnih lekova. Takođe, pretpostavlja se da poremećaj oksido-redukcionih procesa u stabilnoj fazi može uticati na kliničku sliku, tok i ishod shizofrenije.

U odnosu na opštu populaciju, oboleli od shizofrenije imaju kraći životni vek i povećani rizik za razvoj somatskih pratećih bolesti. Visoka prevalenca metaboličkog sindroma u shizofreniji predstavlja značajan faktor rizika za razvoj koronarne bolesti i dijabetes melitusa tip 2. Iako su odnosi između metaboličkog sindroma i shizofrenije kompleksni i još uvek nedovoljno proučeni, pretpostavlja se da oksidativni stres predstavlja mehanizam koji ima integrativnu ulogu kako u razvoju metaboličkog sindroma, tako i njegovih komplikacija.

Rezultati nekoliko kliničkih studija ukazuju na pozitivne efekte antioksidanasa kao dodataka postojećoj terapiji, kako na poboljšanje kliničke slike, tako i na ublažavanje ekstrapiramidalnih i metaboličkih neželjenih efekata antipsihotika. Suplementacija dijetarnim antioksidansima može pružiti značajnu podršku endogenom antioksidativnom zaštitnom sistemu u prevenciji oksidativnih oštećenja, kao i regulaciji redoks osetljivih signalnih puteva.

Potrebna su sveobuhvatna istraživanja odnosa između shizofrenije, metaboličkog sindroma i oksidativnog stresa, kao i istraživanja efikasnosti i bezbednosti suplementacije antioksidansima.



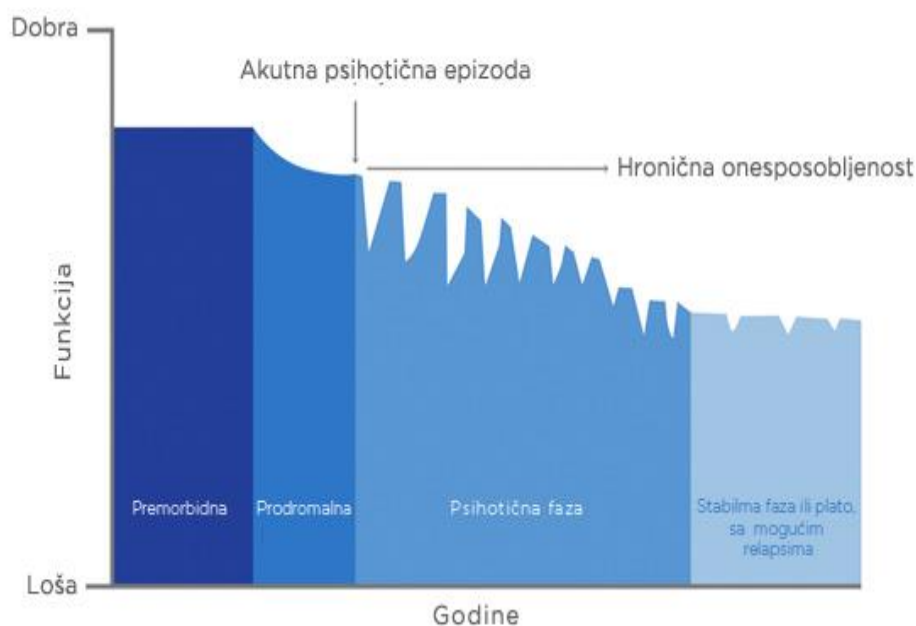
## 1.1. Shizofrenija

Naziv shizofrenija potiče od grčkih reči „*schizo*“ što označava „rascep“ i „*phrenos*“-duša (1). Ovo oboljenje predstavlja hronični, teški i onesposobavajući psihijatrijski poremećaj koji utiče na percepciju, mišljenje, afekt i ponašanje. U osnovi shizofrenije nalazi se niz neurofizioloških, neurohemijskih i psiholoških poremećaja (2) koji nastaju kao rezultat kompleksnih interakcija genetskih i faktora spoljašnje sredine (3).

Prema rezultatima epidemioloških studija, shizofrenija se javlja u 1% opšte populacije (4) i ubraja se u deset vodećih uzorka invalidnosti u svetu (5). Prvi simptomi shizofrenije uobičajeno se javljaju u kasnoj adolescenciji ili ranom odraslom dobu. Stope oboljevanja slične su kod muškaraca i žena, s tim što poremećaj počinje prosečno 5 godina ranije kod osoba muškog pola (6). Simptomi shizofrenije često se dele na: pozitivne i negativne. Pozitivni simptomi uključuju halucinacije i sumanute ideje, javljaju se u oko 90% pacijenata (7). Negativni simptomi kao što su apatija, gubitak energije, siromaštvo govora, smetnje na planu motivacije i volje, emocionalna praznina, socijalno povlačenje, su manje uočljivi i često perzistiraju i nakon povlačenja pozitivnih simptoma (8). Takođe, mogu biti prisutni i afektivni (potištenost, osećaj bezizlaznosti, često i suicidalnost), motorni kao i kognitivni simptomi koji se ogledaju u poremećaju pažnje, pamćenja ili apstraktnog mišljenja.

Terminom shizofrenija obuhvaćena je relativno heterogena grupa kliničkih oblika ove bolesti. U zavisnosti od simptoma koji dominiraju kliničkom slikom, prema kriterijumima Desete revizije Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB 10) razlikuje se više oblika shizofrenije (F20): paranoidna, hebefrena, katatona, nediferencirana, postshizofrena depresija, rezidualna, obična, druga i neoznačena shizofrenija.

Shizofrenija najčešće počinje postepeno. Pojavi psihotičnih simptoma prethodi *prodromalni period* (sindrom atenuisane psihoze), koji se odlikuje poremećajima u ličnom i socijalnom funkcionisanju, i traje između 2 i 5 godina. *Akutna psihotična epizoda* odlikuje se prisustvom pozitivnih simptoma, sumanutih misli i halucinacija, kao i dezorganizovanim ponašanjem. U *fazi stabilizacije* (tokom narednih 6 meseci, uz terapiju) dolazi do postepenog povlačenja izraženih psihotičnih simptoma. Kod dela pacijenata mogu i dalje biti prisutni negativni simptomi, slični onima koji su postojali tokom prodromalnog perioda. Tokom *stabilne faze bolesti* kod dela pacijenata (20-30%) nema dominantnog ispoljavanja simptoma akutne faze, dok su kod značajnog broja bolesnika prisutni negativni i rezidualni pozitivni simptomi, koji ne variraju značajno u pogledu intenziteta. U većini slučajeva, shizofrenija je hronična rekurentna bolest, koja se karakteriše izmenama akutnih epizoda i delimičnih ili kompletnih remisija, s dugoročnim propadanjem kognitivnih i emocionalnih funkcija (9).



**Slika 1.** Klinički tok shizofrenije (modifikovano prema: [http://primarypsychiatry.com/wp-content/uploads/import/0406PP\\_RTM\\_S1.jpg](http://primarypsychiatry.com/wp-content/uploads/import/0406PP_RTM_S1.jpg))

Od otkrića prvih antipsihotika 50-tih godina XX veka, farmakološka terapija predstavlja osnovu lečenja shizofrenije (10). Antipsihotici, lekovi koji se koriste u tretmanu shizofrenije i drugih psihotičnih stanja, uobičajeno se dele na dve klase: antipsihotike prve generacije (klasični antipsihotici) i antipsihotike druge generacije (atipični antipsihotici). Antipsihotici prve generacije deluju neselektivnom blokadom dopaminskih D2 receptora koja se odvija u svim dopaminskim putevima u centralnom nervnom sistemu. Tako, blokadom D2 receptora u mezolimbickom putu, klasični antipsihotici ostvaruju terapijsku efikasnost u tretmanu pozitivnih psihotičnih simptoma, dok blokada D2 receptora u nigrostrijatnom putu dovodi do izraženih ekstrapiramidalnih neželjenih efekata, a u tuberoinfundibularnom putu do porasta prolaktina. Smatra se da klasični antipsihotici uzrokuju kognitivna oštećenja i da nisu efikasni u lečenju negativnih simptoma.

Za razliku od antipsihotika prve generacije, druga generacija antipsihotika izaziva delimičnu dopaminsku blokadu, uz brzu disocijaciju leka od dopaminskih receptora, čime su ekstrapiramidalni efekti u značajnoj meri redukovani. Mehanizam delovanja antipsihotika druge generacije pored dopaminskih D2 uključuje i blokadu serotoninskih 5-HT<sub>2A</sub> receptora a smatra se da postoje i drugi mehanizmi atipičnosti, poput agonističkog delovanja na 5-HT<sub>1A</sub>, dejstvo na druge dopaminergičke (npr. D<sub>4</sub> receptore) i glutamatergičke receptore. Navedeni receptorski profil povećao je efikasnost atipičnih antipsihotika na širi spektar simptoma-jednako su efikasni prema pozitivnim simptomima kao i klasični antipsihotici (11,12), a dugo se smatralo da deluju i na negativne i kognitivne simptome efikasnije od klasičnih antipsihotika (13,14). Antipsihotici druge generacije su efikasniji u prevenciji relapsa i za većinu pacijenata su lekovi prvog izbora (15). Izuzetak je klopazin, koji ima veću efikasnost na pozitivne simptome u odnosu na klasične antipsihotike, zbog čega se njegova primena ograničava na pacijente koji nisu reagovali na druge lekove, osim kod osoba sa shizofrenijom koji su pod suicidalnim rizikom, kada je klopazin prva linija izbora (16).

Uprkos značajnom napretku farmakoterapije, procenjuje se da tek oko 20-30% bolesnika povoljno reaguje na lekove te nastavlja životom kao pre početka bolesti, u oko 20-30% i dalje su umereno izraženi simptomi shizofrenije, a u oko 40-60% bolesnika shizofrenija značajno smanjuje kvalitet života (17). To ukazuje i na potrebu drugih terapijskih opcija i rehabilitacijskih postupaka.

### 1.1.1. Shizofrenija, somatske bolesti i metabolički sindrom

Oboleli od shizofrenije imaju veću stopu smrtnosti i kraći životni vek u odnosu na opštu populaciju. Osim suicida i iznenadne smrti, povećanom mortalitetu u shizofreniji, značajno doprinose i somatska prateća oboljenja, prvenstveno kardiovaskularne bolesti (KVB), ali i gastrointestinalna, respiratorna, endokrina i infektivna oboljenja (18). Pacijenti sa shizofrenijom imaju dva puta veću smrtnost od KVB (19), kao i veću prevalencu kardiovaskularnih faktora rizika u odnosu na opštu populaciju (20). Povećani rizik od KVB pacijenata sa shizofrenijom dovodi se u vezu sa genetskim faktorima, neželjenim dejstvima antipsihotika, kao i lošim životnim navikama (pušenje, neadekvatna ishrana, fizička neaktivnost) (21-23).

Farmakološka terapija shizofrenije je povezana sa razvojem metaboličkih poremećaja kao što su gojaznost, dislipidemija i insulinska rezistencija (24,25). Iako su ovi poremećaji posebno izraženi tokom terapije antipsihoticima druge generacije, naročito klopazinom i olanzapinom, njihova povećana učestalost kod pacijenata sa shizofrenijom uočena je još u XIX veku (26). Veliki broj istraživanja ukazuje da pacijenti u prvoj psihotičnoj epizodi imaju izmenjenu toleranciju na glukozu, insulinsku rezistenciju, kao i povećanu distribuciju viscelarnog masnog tkiva u poređenju sa zdravim ispitanicima (27,28). Takođe, postoje dokazi povećane incidence intolerancije na glukozu i dijabetes melitusa tip 2 kod bliskih srodnika osoba sa shizofrenijom (29,30). Novija istraživanja, ukazuju da je shizofrenija povezana sa alelom TCF7L2 (engl. *Transcription factor 7 like-2*) koji povećava rizik od razvoja dijabetesa (31). Ovi rezultati podržavaju hipotezu da su metabolički faktori rizika i razvoj dijabetesa kod osoba sa shizofrenijom genetski determinisani.

Pored navedenih, za nastanak metaboličkih poremećaja u shizofreniji značajan faktor je i unutrašnji stres, koji podrazumeva hiperaktivnost hipotalamusno-hipofizno-adrenalne osovine i povećanje nivoa kortizola, koji je važan činilac poremećaja glikoregulacije i izmenjenog telesnog sastava (32).

Povećani rizik od KVB u shizofreniji u odnosu na opštu populaciju, može se delimično objasniti i lošim životnim navikama, kao što su neadekvatna ishrana, pušenje, zloupotreba alkohola i sedentarni način života (33).

Ishrana obolelih od shizofrenije se karakteriše povećanim unosom šećera i masti, a niskim unosom dijetnih vlakana (34,35). U odnosu na opštu populaciju, osobe sa shizofrenijom konzumiraju značajno manje voća, povrća, mleka i mlečnih proizvoda (33), a značajno više punomasnih proizvoda, slatkiša i hidrogenizovanih masti (36). Veliki broj pacijenata sa shizofrenijom su pušači. Osim toga, nivo fizičke aktivnosti je značajno manji kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na opštu populaciju (37).

Poslednjih desetak godina postoji sve veće interesovanje za istraživanje udruženosti abdominalne gojaznosti, dislipidemije, hipertenzije i intolerancije glukoze, u sklopu metaboličkog sindroma (MetS) koji se smatra prediktorom nastanka i rane smrtnosti od KVB. Od prvih rezultata Heiskanen-a i saradnika 2003. godine, MetS u shizofreniji je tema velikog broja istraživanja (38). Dosadašnja istraživanja nedvosmisleno ukazuju na visoku prevalencu MetS kod obolelih od shizofrenije. Rizik od MetS u shizofreniji je i do 4 puta veći u odnosu na opštu populaciju (39) i smatra se da se javlja u oko 1/3 pacijenata sa shizofrenijom (40). Najmanja incidenca je kod mlađih, osoba koje nisu na medikamentoznoj terapiji a najčešća kod hroničnih i dugotrajno lečenih bolesnika (41).

## 1.2. Oksidativni stres

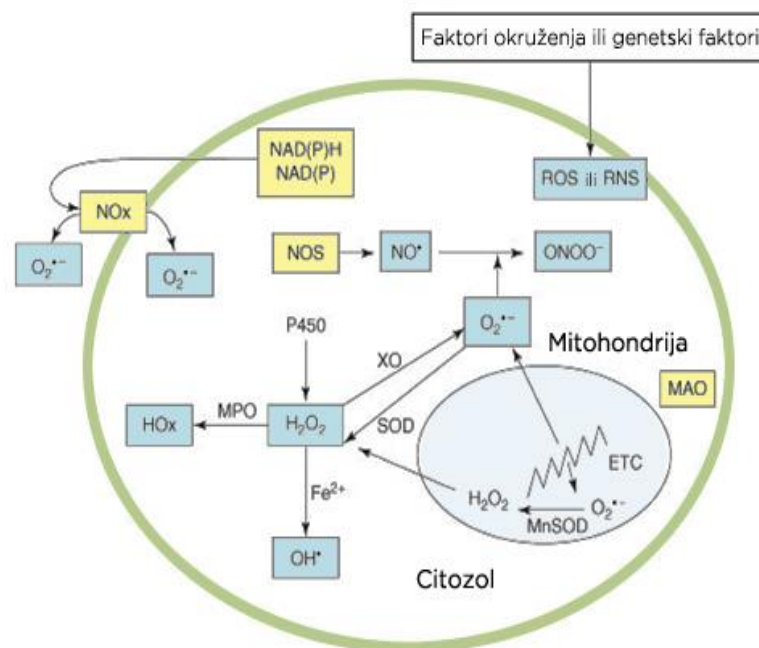
Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa koji nastaje zbog prekomernog stvaranja slobodnih radikala, koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjem elektronskom omotaču (42). Prisustvo nesparenih elektrona čini ovu klasu jedinjenja vrlo nestabilnim i veoma reaktivnim. Usled težnje da postignu elektronsku stabilnost, slobodni radikali reaguju sa susednim molekulima, dovode do njihove oksidacije i otpočinju lanac radikalskih reakcija, koje za posledicu imaju strukturna i funkcionalna oštećenja biomolekula i/ili promenu signalne transdukcije i ekspresije gena, koji doprinose brojnim patološkim procesima u organizmu (43).

### 1.2.1. Slobodni radikali

Reaktivne vrste kiseonika (ROS, eng. *reactive oxygen species*) i reaktivne vrste azota (RNS, eng. *reactive nitrogen species*) se u organizmu stvaraju tokom uobičajenih ćelijskih procesa i pri niskim koncentracijama imaju fiziološku funkciju, dok u visokim koncentracijama ispoljavaju štetan efekat po zdravlje (44). Povećanju količine slobodnih radikala u organizmu mogu značajno doprineti i faktori sredine (UV zračenje, jonizujuće zračenje, aerozagađenje), duvanski dim, izloženost toksičnim materijama, unos masne hrane, kao i upotreba nekih lekova.

U ROS se ubrajaju slobodni radikali kiseonika: superoksidni anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\bullet}$ ), alkoksil radikal ( $RO^{\bullet}$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\bullet}$ ), hidroperoksil radikal ( $HOO^{\bullet}$ ), kao i neradikalne vrste: vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hipohlorna kiselina ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), singlet kiseonik ( ${}^1O^2$ ). U grupu RNS se ubrajaju slobodno radikalne vrste kao što su azot monooksidni radikal ( $NO^{\bullet}$ ) i azot dioksidni radikal ( $NO_2^{\bullet}$ ), kao i neradikalne vrste: azotasta kiselina ( $HNO_2$ ), nitrozil katjon ( $NO^+$ ), nitroksilni anjon ( $NO^-$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) i dr.

Slobodni radikali produkuju se u organizmu, enzimskim i neenzimskim katalizovanim reakcijama, uglavnom u mitohondrijama, ali i u peroksizomima, mikrozmima, ćelijskim membranama i membranskim vezanim enzimima (ciklooksigenaze i lipooksigenaze) (45).



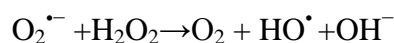
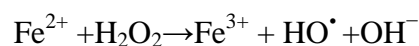
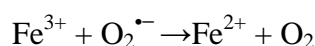
**Slika 2.** Stvaranje slobodnih radikala u ćeliji (preuzeto i modifikovano prema Praticò D. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2008)

Najznačajniji izvor stvaranja ROS u organizmu je proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Kod sisara 90% ukupno udahnutog molekuskog kiseonika ( $O_2$ ) dospeva u mitohondrije, gde se tokom ćelijskog disanja, odvija četvero-elektronska redukcija  $O_2$  do  $H_2O$ , a energija oslobođena u toku transporta elektrona koristi se za sintezu adenozin trifosfata (ATP). Usled slabih veza između elektrona i odgovarajućih enzima (prenosioca elektrona), dolazi do „curenja“ elektrona i stvaranja ROS. Tokom ćelijskog disanja 1-5% kiseonika ne podleže potpunoj redukciji do  $H_2O$ , već dovodi do sinteze superoksidnog anjona ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) i hidroksilnog radikala ( $HO^{\bullet}$ ) (46).

U organizmu, slobodni radikali se produkuju i u brojnim enzimskim reakcijama koje uključuju: nikotinamid adenin nukleotid (NADPH) oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin-oksidaze, azot oksid sintaze, lipoksigenaze, ciklooksigenaze i mijeloperoksidaze.

**Superoksidni anjon** ( $O_2^{\bullet -}$ ) nastaje u svim aerobnim ćelijama jednovalentnom redukcijom molekulskog kiseonika u respiratornom lancu u mitohondrijama. U endoplazmatskom retikulumu, superoksidni anjon ( $O_2^{\bullet -}$ ) generiše se u reakcijama katalizovanim oksidazama i dejstvom NADPH-citohrom P-450 reduktaze, koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika, steroida i lipida. Osim toga, u stvaranju  $O_2^{\bullet -}$  učestvuje i ksantin oksidaza, flavoprotein koji katalizuje poslednji stupanj degradacije purinskih baza, tj. prevođenje hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu. Fagocitna NADPH oksidaza je odgovorna za stvaranje  $O_2^{\bullet -}$  u aktiviranim makrofagama i neutrofilima. Superoksidni anjon može nastati i oksidacijom hemoglobina i mioglobina u methemoglobin i metmioglobin. Takođe,  $O_2^{\bullet -}$  nastaje i pri autooksidaciji flavina, pterina, kateholamina, kao i delovanjem spoljašnjih agenasa kao što je zračenje ili delovanjem citostatika (47). U fiziološkim uslovima  $O_2^{\bullet -}$  ne izaziva štetne efekte jer ga enzim superoksid dismutaza transformiše u manje aktivan vodonik peroksid.

**Vodonik peroksid** ( $H_2O_2$ ) je najstabilniji međuproizvod redukcije molekulskog kiseonika (48). S obzirom da nema nesparenih elektrona, ubraja se u grupu neradikalnih kiseoničnih vrsta. Najveće količine  $H_2O_2$  stvaraju se u peroksizomima pod dejstvom oksidaza. Takođe, nastaje i dismutacijom  $H_2O_2$  pomoću enzima superoksid dismutaze. Stvara se i u reakcijama autoksidacije askorbata, glutationa, tiola i kateholamina (49). U reakciji  $H_2O_2$  sa metalima koji imaju promenjivu valencu (gvožđe, bakar, mangan i dr) dolazi do stvaranja veoma reaktivnog **hidroksilnog radikala** ( $HO^{\bullet}$ ) iz  $H_2O_2$  i  $O_2^{\bullet -}$ , Fentonovom i Haber-Weissovom reakcijom:



Ovi procesi odigravaju se u mitohondrijama, mikrozosomima i peroksizomima.



Vodonik peroksid, u prisustvu jona gvožđa i bakra, daje i veoma reaktivan **hipohloritni jon** (OCl<sup>-</sup>) uz učešće enzima mijeloperoksidaze koga sekretuju neutrofili i monociti. Ova reakcija je značajna za uništavanje mikroorganizama, ali i za nastanak oštećenja povezanih sa aktivacijom fagocita, odnosno inflamacijom (50).

**Azot monoksid** (NO) nastaje u gotovo svim ćelijama, oksidacijom L-arginina u prisustvu azot oksid sintaze (NOS) (51). Postoje tri izooblika: NOS I (nNOS-nervna), NOS II (eNOS-endotelna), i NOS III (iNOS-inducibilna). U fiziološkim uslovima NO je neophodan za odvijanje procesa signalizacije, regulacije i zaštite organizma. U imunološkim i inflamatornim procesima, u makrofagama i ćelijama drugih tkiva, stvara se iNOS koja povećava sintezu NO, koji zatim reaguje sa  $O_2^{\bullet-}$  i stvara visoko reaktivni **peroksinitritni anjon** (ONOO<sup>-</sup>). NO ostvaruje najveći broj toksičnih efekata, delovanjem ONOO<sup>-</sup>, ili preko njegovih metabolita, u koje spadaju HO<sup>•</sup> i radikal **azot dioksida** (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), kao i **peroksinitritna kiselina** (ONOOH).

### 1.2.2. Antioksidativna zaštita

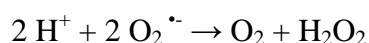
Antioksidativni zaštitni sistem nastao je tokom evolutivnog razvoja, kako bi organizme zaštitio od štetnog dejstva slobodnih radikala. Prema definiciji Halliwell-a iz 1995. godine terminom antioksidansi obuhvaćene su „sve supstance koje u malim koncentracijama u poređenju sa supstratom koji se oksidiše, mogu da spreče ili značajno odlože njegovu oksidaciju“ (52). Nešto kasnije antioksidansi definisani su kao "supstance koje mogu da spreče, odlože ili poprave oksidativna oštećenja ciljne molekule“ (53), odnosno kao „supstance koje direktno neutrališu ROS ili indirektno, indukuju endogene antioksidativne zaštitne sisteme ili sprečavaju stvaranje ROS (54).

Antioksidansi na osnovu porekla, mogu biti endogeni, koji se proizvode u organizmu, i egzogeni, koji se unose putem dijetarnih izvora. Endogeni antioksidansi se u zavisnosti od prirode i načina delovanja mogu podeliti na: enzime, neenzimske proteinske (npr. feritin, metalotioneini), odnosno niskomolekularne antioksidanse (npr. glutation, bilirubin) (55).

### 1.2.2.1. Antioksidativni enzimi

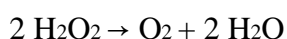
Uloga enzima antioksidativne zaštite zasniva se na biotransformaciji reaktivnih slobodnih radikala u manje reaktivna jedinjenja, kao i u obezbeđivanju dovoljne količine redukcionih ekvivalenata u ćeliji, neophodnih za prevenciju razvoja oksidativnog stresa (56). Od primarnih enzima antioksidativne zaštite najznačajniji su:

**Superoksid dismutaza** (SOD)-metaloenzim koji katalizuje reakciju dismutacije superoksidnog anjona ( $O_2^{\cdot -}$ ) u vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i  $O_2$ , prema sledećoj reakciji :



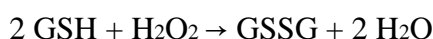
Kod ljudi, postoje tri različite izoenzimske forme superoksid dismutaze: Cu,ZnSOD (SOD1) koja se nalazi u citozolu, MnSOD (SOD2) koja je lokalizovana u mitohondrijama i ekstracelularna ECSOD (SOD3) .

**Katalaza** (CAT) prevodi vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) do molekularnog kiseonika i vode, i na taj način sprečava njegovu difuziju u druge delove ćelije:



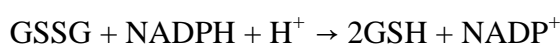
S obzirom da je ova reakcija dvostepena i zahteva vezivanje dva molekula  $H_2O_2$  za katalazu, od značaja je u uslovima povećane produkcije  $H_2O_2$  (57). Katalaza je intracelularni enzim koji je lokalizovan u peroksizomima osim kod eritrocita gde se nalazi u citozolu (58). Ovaj enzim za aktivan centar ima vezane četiri subjedinice koje sadrže hem grupu ( $Fe^{3+}$ -protoporfirin).

**Glutation peroksidaza** (GPx) je selenoprotein koji ima ulogu da redukuje niske koncentracije  $H_2O_2$  i lipidne hidroperoksido do alkohola i vode, prema sledećim reakcijama:



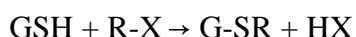
Kod ljudi postoje 4 različite Se-zavisne glutacione peroksidaze. GPx1 je najzastupljenija forma i lokalizovana je intracelularno, u citozolu i mitohondrijama. GPx2 se nalazi u citozolu ćelija gastrointestinalnog trakta, dok je GPx3 enzim lokalizovan u ekstracelularnim tečnostima organizma. GPx4 se nalazi u citozolu i membranama, a ima jedinstvenu sposobnost da pored H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redukuje fosfolipidne hidroperoksidi i peroksidi holesterola. Aktivnost GPx povezana je sa oksidacijom glutaciona (59).

**Glutacion reduktaza (GR)** katalizuje redukciju oksidovanog glutaciona, uz učešće koenzima NADPH, koji nastaje u reakcijama pentoza-fosfatnog puta.

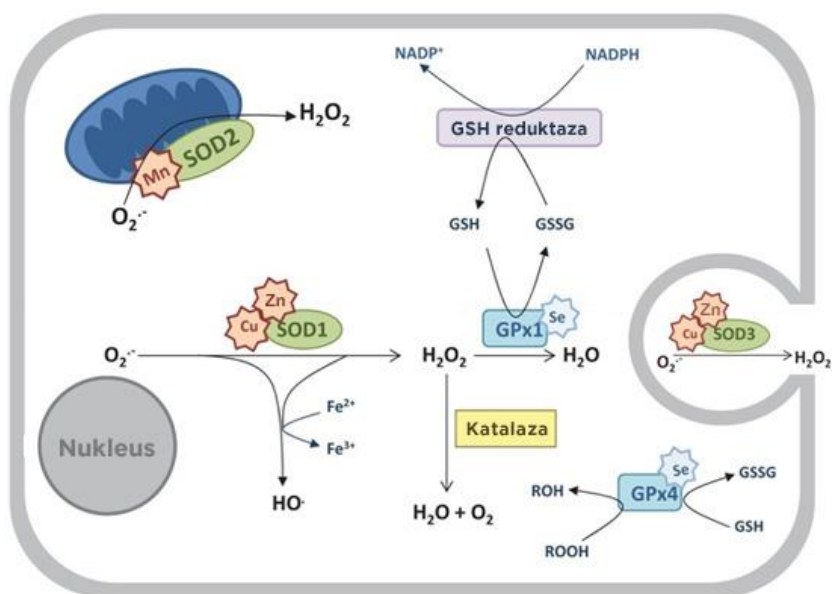


Obzirom da je ovaj enzim odgovoran za regeneraciju redukovanog glutaciona (GSH), osim za procese antioksidativne zaštite, značajan je i za održavanje redoks potencijala ćelije.

**Glutacion-S-transferaza (GST)** predstavlja enzim faze II biotransformacije. Ovaj enzim je uključen u brojne procese detoksifikacije, tako što katalizuje reakciju konjugacije GSH sa različitim ksenobioticima, kao i sa produktima koji nastaju oksidativnim oštećenjima biomolekula (oksidativno modifikovane DNK, lipidni hidroperoksidi i produkti terminalne faze lipidne peroksidacije).



**Peroksiredoksini (Prx)** su grupa selen-nezavisnih peroksidaza, koje katalizuju redukciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organskih hidroperoksida, kao i peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>). Pored antioksidativne uloge, peroksiredoksini učestvuju i u procesima ćelijske signalizacije, proliferacije, diferencijacije i apoptoze (55).



**Slika 3.** Antioksidativni enzimi i njihovi kofaktori, supstrati i lokalizacija (59)

**Tioredoksin reduktaza** (TrxR) je selen-zavisni flavoprotein koji zajedno sa polipeptidom tioredoksinom ima značajnu ulogu u održavanju redoks statusa ćelije i regulaciji redoks osetljivih signalnih puteva. Tioredoksin deluje i kao kofaktor za metionin sulfoksid reduktazu, enzim koji je uključen u reparaciju oštećenih proteina.

**Enzim paraoksonaza** učestvuje u procesima razlaganja lipidnih produkata koji nastaju oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina. U organizmu ovaj enzim javlja se u tri oblika: PON1, PON2 i PON3. PON1 je kalcijum zavisna esteraza koja se sintetise u jetri i transportuje u cirkulaciji vezana za HDL čestice. PON1 ima važnu ulogu u prevenciji ateroskleroze, jer je pokazano da sprečava oksidativnu modifikaciju LDL, ali i HDL čestica uzrokovanih slobodnim radikalima (60). PON2 je intracelularni enzim koji se nalazi u različitim tkivima, a najviše u mozgu, jetri i testisima, a slobodnog ga nema u cirkulaciji (61). Smatra se da sprečava formiranje  $O_2^{\bullet -}$  u mitohondrijama interakcijom sa koenzimom  $Q_{10}$ . PON3 je najmanje proučavani enzim ove familije, poznato je da se takođe transportuje vezan za HDL čestice ali se pretpostavlja da ima različitu supstratnu specifičnost u poređenju sa PON1 (62).

### 1.2.2.2. Neenzimski antioksidansi

Neenzimski antioksidansi mogu biti endogenog ili egzogenog porekla, a u zavisnosti od afiniteta i rastvorljivosti u lipidima, dele se na lipo- i hidrosolubilne. Ova osobina određuje mesto njihovog delovanja. Liposolubilni antioksidansi su lokalizovani u ćelijskim membranama i lipoproteinima (vitamini E, A,  $\beta$ -karoten, koenzim Q<sub>10</sub>). Hidrosolubilni antioksidansi nalaze se u citozolu, odnosno ekstracelularnom prostoru (vitamin C, GSH, mokraćna kiselina i brojna druga jedinjenja (albumin, transferin, ceruloplazmin, feritin, bilirubin)).

#### *Endogeni neenzimski antioksidansi*

Grupa neenzimskih antioksidanasa obuhvata: proteine koji vezuju metale sa promenjivom valencom, polipeptide i niskomolekularne antioksidanse.

Minerali sa promenjivom valencom, kao što su bakar i gvožđe, imaju esencijalnu ulogu u organizmu. Ovi mikroelementi predstavljaju kofaktore velikog broja enzima, koji su uključeni u energetske metabolizam, transport kiseonika, kao i antioksidativnu zaštitu organizma. Međutim, u nevezanom obliku, ispoljavaju prooksidativno delovanje višestrukim mehanizmima: stvaranjem reaktivnog HO<sup>•</sup> (Fenton-ovom reakcijom), ubrzavanjem razgradnje lipidnih hidroperoksida (LOOH<sup>•</sup>) do LO<sup>•</sup> i LOO<sup>•</sup>, kao i autooksidacijom malih molekula (npr. vitamin C, kateholamini) koja je takođe praćena produkcijom slobodnih radikala. Značajnu ulogu u heliranju metala sa promenjivom valencom, imaju proteini (feritin, ceruloplazmin i dr.), kao i metalotioneini koji se generišu tokom oksidativnog oštećenja. Osim toga, albumini i drugi proteini, zahvaljujući sulfhidrilnim (-SH) grupama doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme nespecifičnim vezivanjem slobodnih radikala.

U grupu polipeptidnih neenzimskih antioksidanasa ubraja se već pomenuti tioredoksin, ali i glutaredoksini i sulfiredoksini, koji deluju kao disulfid reduktaze i od značaja su za održavanje redoks statusa ćelije.

**Glutation** (GSH) je tripeptid ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin) koji se u ćeliji nalazi kao tiol u redukovanom obliku (GSH) i u znatno manjoj količini kao disulfid, oksidovani oblik (GSSG). Glutation je kofaktor u reakcijama koje katalizuje GPx i GST; može da reaguje sa HO<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup> i ROO<sup>•</sup>, a učestvuje i u regeneraciji endogenih antioksidanasa (vitamin C i E) (55) .

**Bilirubin** je krajnji produkt metabolizma hemoproteina. Ima snažni antioksidativni efekat protiv  $\text{ROO}^\bullet$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Mokraćna kiselina** je značajan fiziološki antioksidans, koji značajno doprinosi u ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme. Smatra se da direktno deluje na singlet kiseonik,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^\bullet$  i ozon. Takođe, formira stabilne komplekse sa  $\text{Fe}^{3+}$ . Na ovaj način smatra se da mokraćna kiselina inhibira  $\text{Fe}^{3+}$  katalizovanu oksidaciju vitamina C i lipidnu peroksidaciju (63).

**Koenzim Q<sub>10</sub>** je endogeno jedinjenje koje je esencijalno za sintezu ATP i uglavnom je lokalizovan u mitohondrijalnim membranama. Pored uloge u energetskom metabolizmu, koenzim Q<sub>10</sub> deluje i kao antioksidans, direktno neutrališe  $\text{ROO}^\bullet$  ili indirektno regeneriše antioksidativne vitamine C i E.

### *Dijetarni antioksidansi*

**Vitamin E** je liposolubilni vitamin koji obuhvata 8 različitih strukturnih izomera tokoferola i tokotrienola, od kojih  $\alpha$ -tokoferol ima najsnažniju antioksidativnu aktivnost. Najznačajnija uloga vitamina E je sprečavanje lipidne peroksidacije ćelijskih i subćelijskih membrana. U ovoj reakciji tokoferol reaguje sa lipidnim radikalima, pri čemu nastaje tokoferoksi radikal, koji se, u prisustvu drugih antioksidanasa (vitamin C, glutationa,  $\alpha$ -liponska kiselina ili koenzim Q<sub>10</sub>), može redukovati u polazni, biološki aktivan tokoferol oblik (46).

**Vitamin C**, askorbinska kiselina, je hidrosolubilni vitamin koji pruža zaštitu od oksidativnog oštećenja u ekstracelularnoj tečnosti i citoplazmi. Ima sposobnost da direktno neutrališe ROS ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{LOO}^\bullet$  i  $\text{RO}^\bullet$ ). Takođe, regeneriše vitamin E i GSH i produžava njihovo delovanje. Poznato je da vitamin C u većim količinama doprinosi povećanom oslobađanju Fe iz apoferritina. Indirektno, u prisustvu jona prelaznih metala ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) može povećati stvaranje  $\text{HO}^\bullet$  i ispoljiti prooksidativno delovanje.

**$\beta$ -karoten** je liposolubilni antioksidans iz grupe karotenoida, lokalizovan uglavnom u ćelijskim membranama. Predstavlja prekursor vitamina A.  $\beta$ -karoten reaguje sa slobodnim radikalima (singletnim kiseonikom i lipidnim peroksidima) i štiti membrane od lipidne peroksidacije. Iako imaju slabije izražen antioksidativni efekat od vitamina E,  $\beta$ -karoten i vitamin A, sinergistički deluju sa vitaminom C i E u zaštiti ćelija od oksidativnog oštećenja (64). Osim  $\beta$ -karotena, značaj imaju i ostali karotenoidi (likopen, lutein, zeaksantin,

astaksantin) čije uloge u antioksidativnoj zaštiti organizma poslednjih godina intenzivno se istražuju.

**Flavonoidi** su velika grupa polifenolnih jedinjenja, koji su široko rasprostranjeni u namirnicama biljnog porekla. Prema rezultatima *in vitro* studija, antioksidativna aktivnost flavonoida zasniva se na inhibiciji aktivnosti prooksidativnih enzima ili vezivanju prooksidativnih metalnih jona. Takođe, imaju sposobnost da neutrališu ROS kao što su  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  kao i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (46).

**Minerali**, kao što su selen i cink, iako nemaju direktno antioksidativno delovanje, ulaze u sastav velikog broja antioksidativnih enzima. Pretpostavljeni mehanizmi antioksidativnog dejstva cinka obuhvataju zaštitu  $-\text{SH}$  grupa proteina i enzima od oksidativnog oštećenja, kao i smanjenje prelaznim metalima indukovane produkcije  $\text{HO}^\bullet$ . Dodatno, cink dovodi do indukcije sinteze drugih antioksidanasa, kao što su metalotioneini (65).

### 1.2.3. Fiziološka uloga slobodnih radikala

Poznato je da osim što predstavljaju sporedne produkte nastale tokom aerobnog metabolizma u ćelijama, ROS imaju i brojne fiziološke uloge u organizmu. ROS kao signalni molekuli, učestvuju u procesima proliferacije, apoptoze i aktivaciji transkriptornih faktora za ekspresiju gena. Na ovaj način ROS učestvuju u vaskularnoj ćelijskoj signalizaciji, uključujući aktivaciju endotelne azot oksid sintaze i stimulaciju oslobađanja hemotaktičkih agenasa i faktora rasta, zatim modulaciji koncentracije intracelularnog kalcijuma, kao i aktivaciji transkriptornih faktora za  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  i proteinske kinaze. Produkcija  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HOCl}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  u aktiviranim fagocitima je od značaja u zaštiti od infekcija.  $\text{H}_2\text{O}_2$  deluje kao intracelularni glasnik. Određene količine  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  su neophodne za aktivaciju signalnih puteva koje fenomenom hormeze omogućavaju adaptaciju i povećanje otpornosti organizma (66).  $\text{NO}$  je esencijalan za relaksaciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, adheziju leukocita, agregaciju trombocita, angiogenezu, održavanje vaskularnog tonusa (67). U nervnom sistemu,  $\text{NO}$  je uključen u procese: neurotransmisije, neuromodulacije, patogenezu bola, regulaciju unosa hrane, termoregulaciju, mikrocirkulaciju, a u aktiviranim makrofagama je značajan medijator imunog odgovora (68).

#### 1.2.4. Oksidativna oštećenja biomolekula

Oksidativni stres kao posledica povećane produkcije ROS i/ili smanjene efikasnosti antioksidativne zaštite smatra se da učestvuje u patogenezi velikog broja bolesti, kao i u procesu starenja. Prema slobodno radikalskoj teoriji starenja, tokom godina dolazi do slabljenja kapaciteta endogene antioksidativne zaštite organizma usled genetski programirane redukcije u sintezi endogenih antioksidanasa, kao i smanjene apsorpcije dijetarnih antioksidanasa, što dodatno potencira štetno delovanje ROS (69). Oštećenja ćelija u stanjima povećanog oksidativnog stresa vezana su za reakcije neneutralisanih ROS sa lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama i ugljenim hidratima.

Lipidna peroksidacija je niz lančanih slobodno radikalskih reakcija koje dovode do oksidacije polinezasićenih masnih kiselina (engl. *Polyunsaturated fatty acid*-PUFA) koje ulaze u sastav bioloških membrana čime dolazi do promene fluiditeta, smanjenja održavanja koncentracionog gradijenta, povećanja permeabilnosti i inflamacije. Prvi korak u inicijaciji lipidne peroksidacije predstavlja izdvajanje atoma vodonika iz membranskih PUFA pri čemu nastaje lipidni radikal ( $L^{\bullet}$ ). U daljim procesima, dolazi do lančanih slobodno radikalskih reakcija (propagacija) u kojima dolazi do stvaranja peroksil radikala i lipidnih hidroperoksida. Završni proizvodi lipidne peroksidacije su: malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi nonenal (4-HNE). MDA može da reaguje sa slobodnim amino-grupama proteina i nukleinskim kiselinama i da dodatno ošteti ćelije (70). 4-hidroksi nonenal, je toksičan i inhibira rast ćelija, modifikuje metabolizam lipoproteina i podstiče razvoj ateroskleroze.

Povećana produkcija ROS dovodi do oksidativne modifikacije transportnih i strukturnih proteina, kao i inhibicije aktivnosti enzima. Modifikacija proteina je uglavnom inicirana reakcijama sa  $HO^{\bullet}$  tokom koje oksidovani aminokiselinski bočni lanci formiraju protein-protein unakrsne veze. Osim toga, ROS mogu dovesti do fragmentacije proteina (71). Takođe, blokira se i proteoliza pri čemu dolazi do akumulacije oksidovanih proteinskih produkata.

Permanentna modifikacija genetskog materijala usled oksidativnog oštećenja poznato je da predstavlja prvi korak u mutagenезi, karcinogenезi i starenju. Oksidativni stres može izazvati različita oštećenja DNK, uključujući prekide jednog ili oba lanca, razmene sestrinskih hromatida, DNK-DNK i DNK-protein unakrsno povezivanje i modifikaciju baza (72).



### 1.2.5. Metode za određivanje oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Slobodni radikali su veoma reaktivni i imaju kratak poluživot, što zajedno sa niskom koncentracijom, značajno otežava njihovo određivanje u biološkom materijalu. Direktno određivanje slobodnih radikala obuhvata metode elektron-spin rezonantne (ESR) spektroskopije, koje se zasnivaju na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona. Najčešće se za određivanje slobodnih radikala koristi „spin-trapping“ metoda koja podrazumeva dodatak određenih jedinjenja, tzv. „spin-trap“-ova (hvatača radikala) pri čemu se formiraju relativno stabilni radikali „spin adukti“, pogodni za detekciju ESR spektroskopijom (73). Zbog potencijalne toksičnosti hemijskih supstanci koje se koriste u ovim metodama, njihova primena je uglavnom ograničena za određivanje koncentracije slobodnih radikala u *in vitro* i *ex vivo* istraživanjima, kao i *in vivo* studijama na eksperimentalnim životinjama.

Za procenu stepena oksidativnog stresa, najčešće se koriste indirektno metode, koje se zasnivaju na određivanju oksidovanih produkata lipida, proteina i DNK molekula i/ili aktivnosti parametara antioksidativne zaštite.

Procena stepena lipidne peroksidacije može se izvršiti određivanjem statusa PUFA, koncentracije primarnih (lipidni hidroperoksidi, konjugovani dieni) i sekundarnih produkata lipidne peroksidacije (MDA, 4-HNE, F2-izoprostani). Najčešće korišćeni parametar za procenu lipidne peroksidacije je MDA, koji se može odrediti kolorimetrijskom metodom (tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance (TBKRS) testom) ili selektivnijom HPLC metodom. Određivanje F2-izoprostana, koji nastaje oksidacijom arahidonske kiseline (8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub>), smatra se da predstavlja pouzdan metod za procenu stepena endogene lipidne peroksidacije.

Najčešće korišćene metode za procenu stepena oksidativnog oštećenja proteina obuhvataju određivanje koncentracija: slobodnih SH grupa, nitrotirozina i karbonilnih grupa, kao i produkata uznapredovale oksidacije proteina (engl. *Advanced oxidation protein products-AOPP*).

Određivanje štetnog delovanja slobodnih radikala na DNK, najčešće se vrši određivanjem 8-hidroksi-2- deoksiguanozin (8-OHdG) nukleotida koji nastaje oksidacijom guanina, a određuje se iz urina i u krvi. Takođe, određuju se i oksidovane baze (5-OH citozin, 8-OH adenzin, 8-OH guanozin o timidin glikol) komet esejom (74).

Procena efikasnosti endogene antioksidativne zaštite organizma najčešće se vrši određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima, uglavnom SOD, GPx i CAT, koji predstavljaju prvu liniju odbrane, i/ili određivanjem koncentracije antioksidativnih vitamina (A, C i E), karotenoida i tiolnih jedinjenja, koji sadrže slobodne SH grupe, od kojih je najznačajniji glutation.

Odnos redukovanog i oksidovanog glutationa (GSH/GSSH) se koristi za procenu ćelijske redoks ravnoteže. Pokazano je da u fiziološkim uslovima odnos GSH/GSSG prelazi 100, dok u različitim modelima oksidativnog stresa ovaj odnos iznosi svega 1-10 (75).

Takođe, razvijeno je više metoda koje se koriste za merenje ukupne antioksidativne aktivnosti plazme/seruma, kao što su test sposobnosti redukcije feri jona (engl. *Ferric reducing ability plasma-FRAP*), troloks ekvivalentni antioksidativni kapacitet (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity- TEAC*), totalni antioksidativni status (engl. *Total antioxidant status-TAS*) ili kapacitet apsorpcije radikala kiseonika (engl. *Oxygen radical absorbance capacity -ORAC*) (76).

Određivanjem vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) omogućava se istovremeno određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a time i mera postojeće ravnoteže između njih (77).

### 1.3. Oksidativni stres u shizofreniji

Od 50-tih godina XX veka kada je pretpostavljeno da oksidativna oštećenja mogu imati ulogu u patofiziologiji shizofrenije (78) izvršena su brojna istraživanja u ovoj oblasti. Ograničeni broj *post mortem* analiza moždanog tkiva i cerebroskinalne tečnosti, kao i veliki broj studija zasnovan uglavnom na određivanju aktivnosti antioksidativnih enzima i stepena lipidne peroksidacije u perifernim tkivima, ukazuje na izmenjeni oksidativno-stresni status pacijenata sa shizofrenijom. Iako ne predstavlja glavni uzrok, pretpostavlja se da oksidativni stres može značajno uticati na klinički tok i terapijski ishod shizofrenije. Oksidativna oštećenja neurona mogu doprineti razvoju brojnih kliničkih karakteristika shizofrenije, kao što su prominentni negativni simptomi, neurokognitivni deficit, ekstrapiramidalni simptomi i tardivna diskinezija (79).

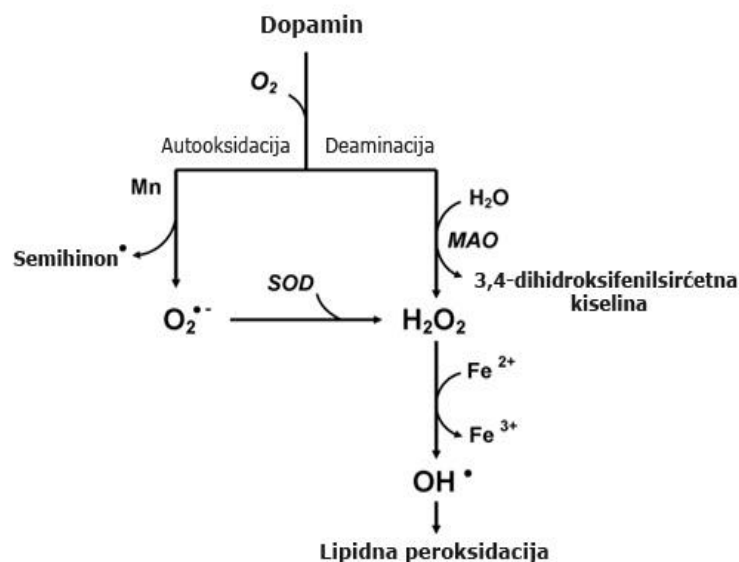
U prilog ovim pretpostavkama, bitna je činjenica da je mozak organ koji je veoma osetljiv na oksidativna oštećenja. Iako ljudski mozak čini svega 2% telesne težine, za normalno funkcionisanje koristi oko 20% ukupnog kiseonika (80). Intenzivna aerobna metabolička aktivnost neurona odvija se u cilju sinteze ATP-a koji je neophodan za aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aza i održavanje akcionog potencijala, kao i za sintezu neurotransmitera. Rezultati studija na animalnim modelima shizofrenije, kao i nekoliko kliničkih studija ukazuju na postojanje mitohondrijalne disfunkcije u shizofreniji (81-83).

Neki delovi centralnog nervnog sistema, posebno bazalne ganglije (substancija nigra, globus palidus i putamen) sadrže značajne količine gvožđa, što ih čini posebno osetljivim na oksidativni stres. Najveći deo deponovanog gvožđa u mozgu nalazi se u sastavu feritina, a male količine i u hemosiderinu. Gvožđe ulazi u sastav hemoglobina, citohroma, ne-hem proteina u respiratornom lancu, kao i tirozin- i triptofan hidrosilaza. Transferin donosi gvožđe preko krvno-moždane barijere. Oštećenjem nervnog tkiva oslobađa se „katalitičko“ gvožđe koje učestvuje u produkciji reaktivnog  $\text{HO}^{\bullet}$  (84).

Povećana osetljivost moždanih struktura na oksidativni stres povezana je i sa visokim sadržajem PUFA, pre svega arahidonske kiseline i dokozaheksaenske kiseline, koje su veoma osetljive na delovanje slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija dovodi do strukturnih i funkcionalnih poremećaja bioloških membrana. Završni produkti lipidne peroksidacije, kao što su MDA i 4-HNE, dovode do daljih oštećenja. 4-HNE posebno je citotoksičan za neurone jer povećava intracelularnu koncentraciju kalcijuma, dovodi do inaktivacije transportera za glutamat i oštećenja neurofilamentnih proteina (79).

Neuroni i astrociti su veoma metabolički aktivne ćelije, u kojima se generiše velika količina intracelularnog vodonika i  $H_2O_2$ . Monoamin oksidaze (MAO) produkuju  $H_2O_2$  i aldehide, dok enzimi kao što su ciklooksigenaze i lipooksigenaze produkuju organske perokside (85). Takođe, visoka oksigenacija dovodi do povećane autooksidacije neurotransmitera (86).

Smatra se da značajne količine ROS u shizofreniji nastaju kao posledica intenzivnog metabolizma dopamina (87). Dopamin ima dihidrohinonsku strukturu i može se neenzimski oksidovati do o-hinona, pri čemu dolazi do redukcije kiseonika do  $H_2O_2$ . S druge strane, enzimska oksidativna deaminacija dopamina pomoću MAO takođe dovodi do formiranja  $H_2O_2$  i 3,4-dihidroksifenilsirćetne kiseline (Slika 4). Autooksidacijom, kao i metabolizmom dopamina, produkuje se  $H_2O_2$ , koji dalje u prisustvu gvožđa, dovodi do stvaranja toksičnog  $HO^\bullet$ .



**Slika 4.** Autooksidacija i oksidativna deaminacija dopamina (79)

Daljim progresivnim gubitkom dopamina, intenzivira se metabolički obrt dopamina u preostalim neuronima i ubrzava nakupljanje njegovih oksidovanih metaboličkih produkata, što dovodi do smanjenja endogenih rezervi GSH i modifikacije SH grupa receptorskih proteina. Mitochondrije su posebno osetljive na povećane koncentracije dopamina i njegovih toksičnih metabolita, obzirom da je MAO lokalizovana sa spoljašnje strane mitohondrijalne

membrane. Visoke koncentracije dopamina dovode do ireverzibilne inhibicije kompleksa I respiratornog lanca i promene potencijala membrane mitohondrija.

Neki istraživači smatraju da je prekomerna stimulacija N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora posredovana slobodnim radikalima kao što su  $O_2^{\cdot-}$  i NO (88,89). Aktivacija NMDA receptora glutatom, stimuliše fosfolipazu A2 (PLA2) koja dovodi do oslobađanja arahidonske kiseline, što može povećati produkciju ROS. Gubitak arahidonske kiseline, bilo aktivacijom PLA2 ili lipidnom peroksidacijom, negativnom povratnom spregom može dovesti do poremećaja glutamatergičke neurotransmisije, koji je jedan od pretpostavljenih mehanizama u patofiziologiji shizofrenije. Oslobađanje dopamina smanjeno je pri niskim koncentracijama NO, dok je povećano pri visokim. Slično je i sa noradrenalinom.

Aktivacijom različitih formi NOS u centralnom nervnom sistemu, dolazi do generisanja NO, koji dalje vodi do formiranja veoma toksičnog peroksinitrita ( $ONOO^{\cdot-}$ ). U fiziološkim uslovima, NO i njegovi metaboliti reaguju sa tiolima, i grade stabilne S-nitrozotiole. Gegg i saradnici su utvrdili kompenzatorno povećanje GSH u astrocitima izloženim NO (90). Međutim, reakcije GSH sa NO su kompetitivne sa aktivnošću GPx koja razlaže vodonik-peroksid.

Uprkos velikoj osetljivosti i podložnosti za oksidativna oštećenja, mozak ima relativno nizak nivo antioksidativne zaštite. Za razliku od astrocita, neuroni imaju veoma nisku aktivnost katalaze kao i aktivnost sistema GSH/GPx/GR. Najznačajnije komponente antioksidativne zaštite su peroksi- i tioredoksini, koji su, međutim, nedovoljno efikasni u hroničnim stanjima povećane produkcije  $H_2O_2$  u neuronima (84).

### **1.3.1. Parametri oksidativnog stresa u shizofreniji**

Rezultati velikog broja studija ukazuju na poremećaj metabolizma fosfolipida i ćelijske signalizacije kod pacijenata sa shizofrenijom (91-93). Utvrđene su smanjene koncentracije PUFA u fosfolipidima plazme (94,95), eritrocitima (96,97), trombocitima (98), fibroblastima kože (99) i postmortalnim tkivima mozga (94,100,101). Jedan od predloženih mehanizama koji dovodi do poremećaja statusa PUFA u shizofreniji, odnosi se na oksidativnim stresom i inflamacijom posredovanu aktivaciju PLA2 koja je odgovorna za razgradnju membranskih fosfolipida (102).

Povećani nivoi MDA (ili TBARS) su utvrđeni kod hroničnih pacijenata sa shizofrenijom, koji su na terapiji (103-108), ali i kod pacijenata u prvoj epizodi shizofrenije koji nisu uzimali antipsihotične lekove (109,110). Takođe, utvrđene su i značajno veće koncentracije 4-HNE kod pacijenata sa shizofrenijom (105, 111). Zatim, utvrđene su povećane koncentracije lipidnih peroksida u cerebrospinalnoj tečnosti (112) i trombocitima (113), kao i povećane koncentracije izoprostana u urinu pacijenata sa shizofrenijom (114).

Relativno mali broj studija ukazuje na oksidativna oštećenja ostalih biomolekula u shizofreniji. Povećana oksidativna/nitrativna modifikacija proteina je utvrđena u plazmi i trombocitima pacijenata sa shizofrenijom (115,116). Studija Jorgensen i saradnika iz 2013. godine je pokazala za 20% povećanu ekskreciju 8-okso-7,8-dihidrodeoksiguanozina i 8-okso-7,8-dihidroguanozina, kao markera oksidativnog oštećenja DNK, odnosno RNK kod pacijenata sa shizofrenijom, u odnosu na kontrolnu grupu (117).

### **1.3.2. Parametri antioksidativne zaštite u shizofreniji**

Rezultati dosadašnjih studija, generalno, ukazuju na izmenjenu aktivnost antioksidativnog zaštitnog sistema kod pacijenata sa shizofrenijom, iako su rezultati o promenama pojedinačnih parametara, naročito enzimske antioksidativne zaštite veoma nedosledni.

Tako je utvrđeno da je aktivnost SOD, koja predstavlja prvu liniju odbrane protiv ROS, smanjena (118-121), povećana (122-124) ili nepromenjena (125) u shizofreniji. Različiti rezultati su dobijeni i za aktivnost GPx (110, 126-128), kao i za CAT, za čiju aktivnost je utvrđeno da je smanjena (120, 122) ili povećana (126) kod pacijenata sa shizofrenijom, u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi heterogeni rezultati, ukazuju da promene u enzimskoj antioksidativnoj zaštiti u shizofreniji mogu odražavati razlike u intenzitetu oksidativnog stresa, kao i adaptivne mehanizme antioksidativne zaštite u odnosu na klinički tok shizofrenije (129-131). Prema literaturnim podacima, utvrđene razlike u aktivnostima antioksidativnih enzima u shizofreniji uglavnom se objašnjavaju težinom kliničke slike, specifičnostima primenjene terapije ili dužinom bolesti (132).

Pazvantoglu i saradnici su pokazali da je antioksidativni kapacitet plazme u negativnoj korelaciji sa težinom simptoma shizofrenije, ali ne i sa dužinom bolesti (133). Takođe, utvrđeno je da se aktivnost antioksidativnih enzima razlikuje između različitih podtipova shizofrenije: SOD i GPx aktivnosti su bile značajno niže kod pacijenata sa paranoidnom i rezidualnom shizofrenijom, u odnosu na dezorganizovani tip shizofrenije i kontrolnu grupu (104).

U studiji Raffa i saradnika utvrđeno je da su aktivnosti SOD, CAT kao i koncentracije GSH, niže kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu. Među shizofrenim pacijentima, aktivnosti SOD i CAT su dodatno značajno snižene kod pacijenata koji nisu uzimali lekove u odnosu na grupu koja je na antipsihotičnoj terapiji. Ovi istraživači su pretpostavili da smanjene koncentracije GSH i aktivnosti antioksidativnih enzima u pacijenata sa shizofrenijom nisu posledica terapije antipsihoticima i da se parametri antioksidativne zaštite mogu smatrati biološkim markerima težine bolesti (120). Rezultati smanjene aktivnosti SOD i GPx u prvoj psihotičnoj epizodi, prethodno su publikovani i od strane Dadeech i saradnika (110). Rezultati ovih studija su u suprotnosti sa pretpostavkom da antipsihotici mogu dodatno pogoršati oksidativni stres u shizofreniji (134-136).

Osim razlika u zavisnosti od primene terapije, postoje i kontroverze u vezi sa nivoom oksidativnog stresa kod pacijenata lečenim klasičnim, odnosno atipičnim antipsihoticima. Neki istraživači su utvrdili da hronična terapija haloperidolom, ali ne i atipičnim antipsihoticima (risperidon, klozapin ili olanzapin) uzrokuje oksidativni stres, uz smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima i povećanje lipidne peroksidacije (135). Međutim, postoje literaturni podaci koji ukazuju da hronična terapija haloperidolom dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije u cerebralnom korteksu (137), kao i da dugotrajna terapija klozapinom dovodi do smanjenja aktivnosti GPx u plazmi (138). Drugi istraživači su pretpostavili da je izraženi oksidativni stres u pacijenata na terapiji klozapinom primarno povezan sa težinom bolesti, jer je ovaj lek indikovano kod pacijenata rezistentnih na terapiju drugim antipsihoticima (103). Međutim, u veoma kompleksnom istraživanju Zhang i saradnika nisu utvrđene značajne razlike u nivoima MDA i aktivnosti SOD i CAT u plazmi, među podgrupama pacijenata na hroničnoj terapiji klozapinom, risperidonom i klasičnim antipsihoticima (104). Slični rezultati su kasnije dobijeni i u drugim istraživanjima (127). Na osnovu ovih rezultata, smatra se da klasični i atipični antipsihotici, iako imaju različite

farmakološke mehanizme delovanja, njihov krajnji efekat na oksidativni stres je isti. Kao što je već pomenuto, pretpostavlja se da su promene u aktivnosti antioksidativnih enzima i nivoima oksidativnog oštećenja, nezavisne od vrste terapije i da su primarno povezane sa patofiziološkim procesima u shizofreniji. Takođe, nije utvrđeno da dužina bolesti, kao ni primenjena doza antipsihotika, izražena u hlorpromazin ekvivalentima, utiču na parametre enzimske antioksidativne zaštite u shizofreniji (132).

Za razliku od aktivnosti antioksidativnih enzima, literaturni podaci uglavnom ukazuju na smanjeni kapacitet neenzimske antioksidativne zaštite kod pacijenata sa shizofrenijom. Niske koncentracije GSH u shizofreniji su utvrđene u *post-mortem* uzorcima mozga (128, 139) kao i *in vivo* primenom magnetne rezonantne spektroskopije (140,141). Niske koncentracije GSH su određene u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata u akutnoj epizodi shizofrenije (140) kao i u krvi pacijenata sa shizofrenijom, nezavisno od primene antipsihotika (120).

Ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme, najvećim delom doprinose albumin, mokraćna kiselina i vitamin C, ali i drugi neenzimski antioksidansi kao što su bilirubin,  $\alpha$ -tokoferol i  $\beta$ -karoten (142). Različitim metodama utvrđeno je smanjenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme u prvoj epizodi shizofrenije (143), kao i kod hroničnih pacijenata koji primaju (144) ili nisu na antipsihotičnoj terapiji (133,145,146). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno utvrđenim sniženim koncentracijama individualnih antioksidanasa: albumina, mokraćne kiseline i bilirubina (147-149) kao i vitamina C (150) i vitamina E (151) kod pacijenata sa shizofrenijom.



### 1.3.3. Oksidativni stres, metabolički sindrom i shizofrenija

Metabolički sindrom (MetS) predstavlja udruženost abdominalne gojaznosti, hiperglikemije, hipertenzije i aterogene dislipidemije koja značajno povećava rizik od kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (152). Još uvek postoje različita mišljenja o tome da li MetS predstavlja zbir pojedinačnih faktora rizika ili klinički entitet u čijoj osnovi se nalazi viscelarna gojaznost (153). I pored dosadašnjih opsežnih istraživanja, etiopatogenetski mehanizmi odgovorni za nastanak MetS nisu u potpunosti razjašnjeni. Novija istraživanja ukazuju na integrativnu ulogu inflamacije i oksidativnog stresa u razvoju komplikacija abdominalne gojaznosti, kao što su insulinska rezistencija i MetS. Naime, poznato je da akumulacija masnih kiselina u adipocitima, dovodi do povećane produkcije ROS, stimulacijom aktivnosti NADPH oksidaza, koja za posledicu ima poremećaje u regulaciji insulinskih signalnih puteva i sekreciji adipokina (154). U gojaznih osoba, povećana je sekrecija leptina, faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina 6 (IL-6), angiotenzina II, neesterifikovanih masnih kiselina i inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1), a smanjena produkcija adiponektina.

Smatra se da poremećaj u sekreciji proinflamatornih i antiinflamatornih adipokina, naročito leptina i adiponektina, doprinosi sistemskom oksidativnom stresu i subkliničkoj inflamaciji, koja je karakteristična za osobe sa MetS. Koncentracije leptina u plazmi proporcionalne su veličini subkutanog masnog tkiva. Uticaj leptina na metaboličke puteve je direktan-povećava oksidaciju masnih kiselina u adipocitima i neadipoznom tkivu (jetra, mišići, pankreas). Snižavanjem nivoa insulina u plazmi i smanjenjem osetljivosti perifernih tkiva na insulin, leptin indirektno utiče na intenzitet metaboličkih procesa. Visoka koncentracija leptina, koja nastaje kao posledica gojaznosti, može da dovede do insulinske rezistencije i dijabetesa (155). Osim toga, oslobođeni leptin u cirkulaciji deluje proinflamatorno, stimuliše proliferaciju monocita i makrofaga i proizvodnju inflamatornih citokina (IL-6, TNF- $\alpha$ ), koji povećavaju aktivnost NADPH oksidaza, proizvodnju superoksidnog anjona, uz smanjenje bioraspoloživosti NO u endotelnim ćelijama. Pretpostavlja se da leptin smanjuje aktivnost PON1, enzima koji štiti lipoproteinske LDL čestice od oksidacije (156).

S druge strane, sekrecija adiponektina koji ima antidiijabetično, antiinflamatorno i antiaterogeno delovanje, u gojaznosti i MetS je smanjena. Rezultati istraživanja Tao i saradnika pokazali su da adiponektin ima antioksidativno delovanje- redukuje oksidativni/nitrozativni stres, inhibira aktivnost NADPH oksidaza i smanjuje ekspresiju iNOS (157).

Povećana ekspresija i aktivnost fagocitnih NAD(P)H oksidaza paralelno sa povećanjem koncentracije oksidovanih LDL čestica i nitrotirozina, koji ukazuju na subkliničku aterosklerozu, utvrđena je u pacijenata sa MetS (158). Takođe, utvrđena je snižena antioksidativna aktivnost protektivnih HDL lipoproteinskih čestica u MetS. Povećana produkcija ROS, dodatno je praćena smanjenom ekspresijom antioksidativnih enzima, kao i niskim koncentracijama vitamina E i C u MetS (159,160). Osim toga, nivo TAS je redukovan, a nivo peroksida i drugih markera oksidativnog stresa je povećan proporcionalno broju komponenata MetS (161). Prema nekim istraživačima, određivanje oksidativnog statusa u MetS može doprineti identifikaciji pacijenata sa povećanim rizikom od metaboličkih i kardiovaskularnih komplikacija (153).

Uzimajući u obzir, prema literaturnim podacima, veliku zastupljenost metaboličkih faktora rizika, kao i visoku prevalencu MetS kod pacijenata sa shizofrenijom, postojanje razlika u intenzitetu oksidativnog stresa i efikasnosti antioksidativne zaštite, u odnosu na prisustvo MetS, ne može se isključiti. Zbog toga je jedan od ciljeva ove disertacije bio da se ispita, da li kod pacijenata u stabilnoj fazi shizofrenije, nivo oksidativnog stresa i aktivnost antioksidativne zaštite se menja u zavisnosti od razvoja MetS. Prema našim saznanjima, ovo je originalno istraživanje povezanosti parametara oksidativnog stresa u plazmi/serumu i MetS kod pacijenata sa shizofrenijom.

#### 1.4. Suplementacija antioksidansima u shizofreniji

Iako sve veći broj istraživanja ukazuje na potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u patofiziologiji shizofrenije, relativno je malo dokaza koji podržavaju hipotezu da se primenom antioksidanasa može uticati na težinu i ishod ove bolesti. Iako tokom terapije pojedinim atipičnim antipsihoticima dolazi do promena u sistemu antioksidativne zaštite (107,108,135), nepoznato je da li su i na koji način, ove promene povezane sa njihovim antipsihotičnim delovanjem. Pretpostavlja se da smanjenje nivoa oksidativnog stresa u CNS može posredovati neuroprotektivnom delovanju antipsihotika koje je značajno za ishod terapije (162). Većina istraživanja usmerena je na ispitivanje potencijalne koristi adjunktivne terapije antioksidansima u shizofreniji, jer se pretpostavlja da su oksidativna oštećenja povezana sa lošijim ishodom bolesti (163,164) i pojavom neželjenih efekata, kao što je tardivna diskinezija (165).

Dodatna suplementacija vitaminom C (500 mg), uz terapiju atipičnim antipsihotikom, dovela je do smanjenja oksidativnog stresa i poboljšanja kliničke slike u dvostruko-slepo, placebo kontrolisanoj, 8. nedeljnoj studiji (166). Brojne studije ispitivale su uticaj vitamina E u terapiji hroničnih shizofrenih pacijenata sa tardivnom diskinezijom. Međutim, rezultati ovih istraživanja su različiti. Dok su neke studije pokazale da vitamin E utiče na smanjenje težine tardivne diskinezije (167-169), rezultati drugih studija to ne potvrđuju (170,171). Kombinovana suplementacija sa EPA/DHA (180:120 mg) i antioksidansima (vitamin E/C, 400 IU:500 mg), ujutro i uveče, tokom 4 meseca pokazala je značajno poboljšanje kliničke slike i kvaliteta života pacijenata sa shizofrenijom (172). Berk i saradnici ispitivali su uticaj N-acetilcisteina (NAC), kao prekursora glutationa, kod hroničnih pacijenata sa shizofrenijom. U ovoj studiji 2g NAC/dan podeljeno u više pojedinačnih doza ili placebo, korišćeno je tokom 24 nedelje uz antipsihotičnu terapiju. Rezultati su pokazali značajno smanjenje negativnih simptoma kod pacijenata koji su uzimali NAC kao dodatak postojećoj terapiji, u odnosu na placebo grupu (173).

Studija Carmeli i saradnika je utvrdila značajne promene u elektroencefalogramskoj sinhronizaciji, nakon primene NAC tokom 60 dana u odnosu na placebo (174). Meta-analiza o efikasnosti suplemenata na bazi ekstrakata lista *Ginkgo biloba* kao dodatka antipsihotičnoj terapiji kod hroničnih bolesnika sa shizofrenijom, pokazala je statistički značajno poboljšanje kliničke slike, odnosno smanjenje ukupnih i negativnih simptoma shizofrenije (175).

Poslednjih godina aktuelna su istraživanja suplementacije antioksidansima u cilju ublažavanja neželjenih metaboličkih efekata antipsihotika, naročito antipsihotika druge generacije (176,177).

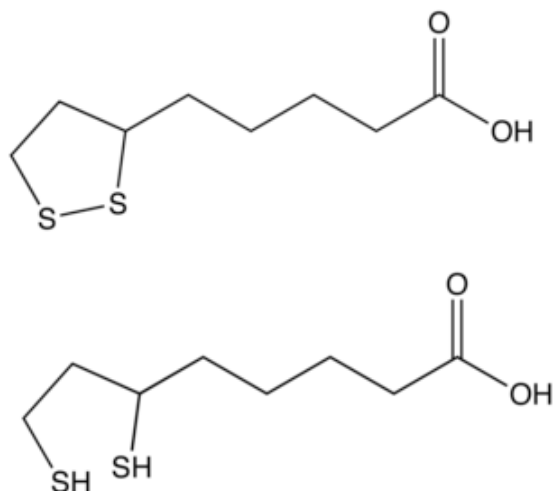
Iako dosadašnji rezultati, ukazuju na potencijalno korisne efekte suplementacije antioksidansima u shizofreniji, u skladu sa aktuelnim stavovima o rizicima primene visokih doza antioksidanasa, otvaraju se mnoga pitanja koja se odnose na izbor antioksidanasa, optimalnu količinu, dužinu suplementacije, kao i optimalno vreme za početak uzimanja antioksidansa u odnosu na klinički tok shizofrenije (178).

## 1.5. Alfa-liponska kiselina

Alfa-liponska kiselina sadrži u svojoj molekuli petočlani ciklični disulfid, a predstavlja supstituisani proizvod n-oktanske (kaprilne kiseline). Poznata je i kao tioktinska kiselina, lipoinska ili alfa-lipoinska kiselina, a u hemijskom pogledu to je 6,8-ditio-n-oktanska kiselina, 1,2-ditio-3-pentanska kiselina ili 1,2-ditiolan-3-valerijanska kiselina. Otkrivena je 1937. godine kao faktor rasta određenih mikroorganizma od strane Snell i saradnika (179). Tokom 50-ih godina izolovana je i hemijski okarakterisana od strane Reed i saradnika (180,181). Iako se smatralo da je esencijalna supstanca, zbog čega je prvobitno svrstana u vitamine, kasnije je otkriveno da je široko rasprostranjena u biljnom i životinjskom svetu (182,183).

### 1.5.1. Hemijska struktura i fiziološka uloga alfa-liponske kiseline

Hemijska struktura alfa-liponske kiseline (*engl.* Alpha lipoic acid-LA) i njenog redukovanog oblika, dihidroliponske kiseline (*engl.* Dihydrolipoic acid -DHLA) prikazana je na slici 5.



**Slika 5.** Strukturne formule LA i DHLA

S obzirom, da u svojoj molekuli sadrži jedan asimetričan ugljenikov atom, moguća su dva stereoizomerna oblika LA. Prirodni, biološki aktivan je destrogirni, R(+) stereoizomer, dok

je proizvod dobijen sintezom racemat, sa 50% biološke aktivnosti prirodnog proizvoda, jer je levogirni, S (-) stereoizomer biološki neaktivan.

Biosinteza LA se odvija u mitohondrijama iz oktanske kiseline i cisteina, koji predstavlja izvor sumpora, pomoću enzima lipoil-sintaze (184). Kapacitet endogene sinteze u humanom organizmu opada sa godinama. U organizmu R(+)LA je kovalentno vezana za  $\epsilon$ -amino grupu lizina i kao kofaktor mitohondrijalnih enzima učestvuje u katabolizmu proteina, ugljenih hidrata i masti (185). Kao strukturna komponenta kompleksa piruvat-dehidrogenaze i  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza, LA ima esencijalnu ulogu u energetskom metabolizmu (186). Takođe, LA je kofaktor dehidrogenaza keto kiseline razgranatog lanca, koje su značajne za stvaranje energije iz leucina, izoleucina i valina. Dok je uloga endogeno sintetisane, enzimski vezane LA u energetskom metabolizmu dobro proučena, manje je poznata uloga egzogene, slobodne LA u metaboličkim funkcijama (187).

### 1.5.2. Dijetarni izvori

Endogena R-LA, u obliku lipolizina, zastupljena je u namirnicama biljnog i životinjskog porekla. Sadržaj lipolizina u animalnim tkivima je različit i kreće se od 0.1 to 2.6 mg/g suve materije, sa najmanjom količinom u plućima, odnosno najvećom u bubrezima. Lipolizin je prisutan u značajnim količinama u srcu (1.5 mg/g), skeletnim mišićima (0.9 mg/g), jetri (0.9 mg/g) i crevima (0.8 mg/g). Najznačajniji dijetarni izvori LA biljnog porekla su spanać (3.2 mg/g), zatim brokoli (0.9 mg/g) i paradajz (0.6 mg/g). Ostalo zeleno povrće, kao što je prokelj i grašak sadrže lipolizin u značajno manjim količinama (0.4 mg/g), dok je njegov sadržaj u pirinčanim mekinjama u zanemarljivo malim količinama (0.2 mg/g) (188).

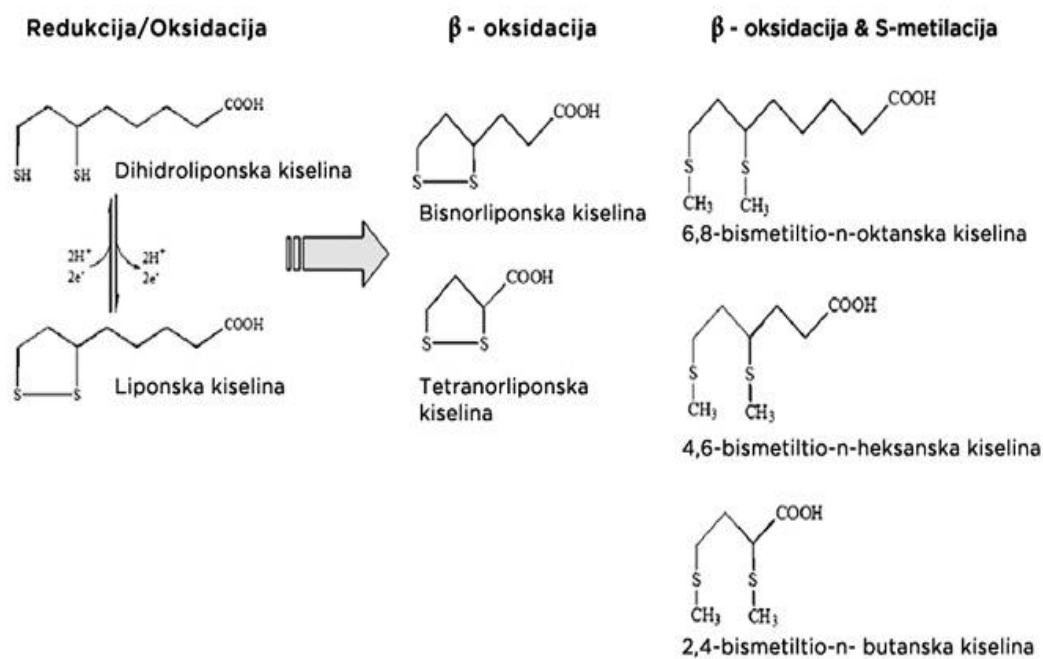
Iako je deo uobičajene ishrane nema podataka o procenjenom dnevnom dijetarnom unosu LA. Za razliku od namirnica, u kojima se R-LA nalazi vezana za lizinske ostatke u proteinima, u dijetetskim suplementima, LA se nalazi u slobodnom obliku, najčešće u obliku racemske smeše (R/S). Dijetetski suplementi uglavnom sadrže 50-600 mg LA u pojedinačnom doziranom obliku, što je višestruko (i do 1000 puta) veća količina od one koja se unosi uobičajenom ishranom.

### 1.5.3. Bioraspoloživost i metabolizam alfa-liponske kiseline

Endogeni nivoi u plazmi zdravih osoba iznose 1–25 ng/mL za LA, odnosno 33–145 ng/mL za DHLA (189). LA se apsorbuje iz dijetarnih izvora i suplemenata, transportuje u tkiva, a zatim preuzima od strane ćelija u kojima se najveći deo LA brzo konvertuje u DHLA (190). Takaishi i saradnici su istraživali mehanizme uključene u apsorpciju LA iz dijetarnih izvora korišćenjem CACO-2 ćelijskih modela za transepitelni transport. Rezultati ukazuju da LA brzo prolazi kroz epitelne ćelije na pH-zavisan način. Transport LA je inhibiran benzojevom kiselinom i masnim kiselinama srednje dužine lanca, što ukazuje da je monokarboksilni transportni protein odgovoran za intestinalnu apsorpciju (191). Druge *in vitro* studije identifikovale su LA kao supstrat za Na-zavisan multivitaminski transporter (eng. *sodium dependent multivitamin transporter*, SMVT), koji osim što doprinosi gastrointestinalnoj apsorpciji, učestvuje i u distribuciji LA iz plazme u druga tkiva (192,193). Obzirom da apsorpcija LA zavisi od transportnih proteina, kompeticija različitih supstrata, kao i transkripcioni, translacioni i post-translacioni regulatorni mehanizmi mogu uticati na bioraspoloživost LA iz egzogenih izvora. Istovremeno unošenje sa hranom, delimično zbog kompeticije za transportne proteine, redukuje bioraspoloživost LA, zbog čega se preporučuje da se preparati LA uzimaju 30 min pre ili 2 h posle jela (194).

Maksimalna koncentracija LA u plazmi nakon oralne primene, dostiže se za 30-60 min (195). Međutim, nakon unosa racemske smeše, maksimalna koncentracija R-LA u plazmi je 40-50% veća u odnosu na S-LA. Iako, se pretpostavlja da bi primena R-LA bila efikasnija, s druge strane postoje indicije da S-LA u racemskoj smesi može sprečiti polimerizaciju R-LA i tako povećati njenu bioraspoloživost (187). Apsolutna biorasploživost oralno primenjene LA u količini od 200 mg u vodenom rastvoru je 38% za R-oblik, odnosno 28% za S-oblik (196), dok je iz čvrstih doziranih oblika manja i iznosi 25% za R-LA, odnosno 20 % za S-LA (197).

Niska bioraspoloživost LA, može biti i posledica efekta prvog prolaza. Glavni katabolički put LA je  $\beta$ -oksidacija. Identifikovani su glavni metaboliti LA: bisnorliponska kiselina, tetranorliponska kiselina, beta-hidroksi-bisnorliponska kiselina ili bis-merkaptoderivati (Slika 6). Smatra se da neki od ovih metabolita, poseduju biološku aktivnost i doprinose antioksidativnoj aktivnosti LA (187).



**Slika 6.** Najznačajniji metaboliti LA (187)

Brza apsorpcija LA iz gastrointestinalnog trakta, praćena je i brzom distribucijom u tkiva, metabolizmom i ekskrecijom. Nakon apsorpcije, LA se brzo preuzima u ćelije, gde se redukuje u DHLA pomoću nekoliko enzima. Mitohondrijalna NADH-zavisna dihidrolipoamid-dehidrogenaza ima veći afinitet prema R(+) LA, dok citozolna NADPH-zavisna glutation-reduktaza pokazuje veći afinitet prema S(-)LA (198). Mehanizmi redukcije su tkivno specifični. NADH-zavisna dihidrolipoamid-dehidrogenaza doprinosi 90% redukciji LA u srcu, 63% u bubrezima, i 50% u jetri (199). Osim toga, u ćelijama koje ne sadrže mitohondrije, LA se može redukovati do DHLA, pomoću glutation- i tioredoksin reduktaza (200).

LA se primarno, ali prolazno akumulira u jetri, srcu i skeletnim mišićima, ali i u drugim tkivima. Poznato je da prolazi i krvno-moždanu barijeru. U studijama na animalnim modelima, utvrđeno je da se LA i njeni metaboliti primarno ekskretuju putem urina (198).



#### **1.5.4. Bezbednost suplementacije alfa-liponskom kiselinom**

Liponska kiselina se smatra relativno bezbednim antioksidansom. U Nemačkoj, LA se preko 50 godina, koristi u lečenju dijabetične neuropatije i retinopatije. Smatra se da LA može da se koristi i u dozama do 2400 mg/dan bez pojave ozbiljnijih neželjenih dejstava. Mogući neželjeni efekti nakon primene LA uključuju: alergijske reakcije na koži, gastrointestinalne tegobe, kao i mogućnost hipoglikemije kod dijabetičara, kao posledicu poboljšanja iskoristljivosti glukoze velikim dozama LA. Pri dugotrajnoj upotrebi postoji rizik od deficita biotina, zbog njegove slične hemijske strukture sa LA i kompeticije na nivou apsorpcije. Iako nema podataka o teratogenom delovanju, usled nedovoljno podataka o bezbednosti, upotreba preparata sa LA se ne preporučuje tokom trudnoće (187).

#### **1.5.5. Antioksidativna uloga alfa-liponske kiseline**

Jedan od vodećih istraživača iz oblasti oksidativnog stresa, Lester Packer, ustanovio je kriterijume za ocenu antioksidativnog potencijala supstanci koji uključuju: specifičnost za neutralizaciju slobodnih radikala, heliranje metalnih jona, interakciju sa ostalim antioksidansima, kao i uticaj na ekspresiju gena. Pored navedenih, koji ukazuju na višestruke mehanizme antioksidativnog delovanja, LA ispunjava i sledeće dodatne kriterijume: kao relativno mali molekul, lako se apsorbuje i transportuje kroz biološke membrane; zahvaljujući amfifilnom karakteru predstavlja „univerzalni antioksidans“, jer svoje delovanje ispoljava unutar ćelije, na nivou ćelijskih membrana, kao i u ekstracelularnoj sredini. Za razliku od ostalih antioksidanasa, LA je jedinstvena i po tome što se u ćeliji redukuje u antioksidativno efikasniji metabolit - DHLA. Takođe, smatra se i bezbednim antioksidansom, obzirom da i nakon primene u velikim količinama, nisu zabeležena ozbiljnija neželjena dejstva. Na osnovu ovih karakteristika, LA/DHLA redoks par često se u literaturi označava “idealnim antioksidansom” (201).

### 1.5.5.1. Neutralizacija slobodnih radikala

Hemijska reaktivnost LA koja dolazi do izražaja pri njenim biološkim funkcijama uglavnom je u vezi sa prisustvom petočlanog disulfidnog prstena. LA i njen redukovani oblik DHLA, formiraju LA/DHLA redoks par koji ima veliku redukcionu sposobnost (-0.32 V). Predominatni oblik koji reaguje sa ROS i RNS je DHLA, iako i redukovani oblik LA poseduje antioksidativnu aktivnost (Tabela 1) (187).

**Tabela 1.** Antioksidativna aktivnost LA i DHLA

Slobodni radikal	LA	DHLA
Singletni kiseonik	+	-
Superoksidni anjon	-	+
Hidroksil radikal	+	+
Vodonik peroksid	-	-
Hipohlorna kiselina	+	+
Azotmonoksid radikal	-	+
Peroksinitrit	+	+
Peroksil radikal	-	+

### 1.5.5.2. Heliranje metalnih jona

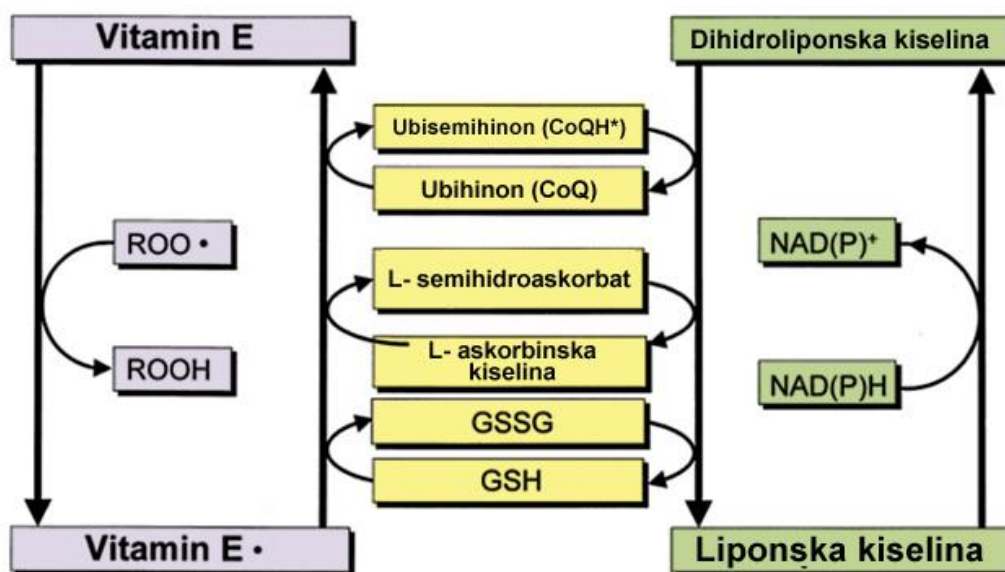
LA i DHLA grade helate sa jonima prelaznih i toksičnih metala i tako sprečavaju njihovo delovanje u reakcijama oksidativnog oštećenja biomolekula. Istraživanja *in vitro* su pokazala da LA formira stabilne komplekse sa  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  ali ne i sa  $\text{Fe}^{3+}$ , dok DHLA kompleksira  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  (202). U *in vitro* eksperimentima, u kojima je oksidativni stres indukovao dodatkom askorbinske kiseline i gvožđa,  $\text{Fe}^{(2+ \text{ ili } 3+)}$ , dodatak LA je inhibirao stvaranje  $\text{HO}^{\cdot}$  i lipidnu peroksidaciju (203,204). Istim mehanizmom može se objasniti protektivno delovanje LA u bakar indukovanoj lipidnoj peroksidaciji (204).

Bush i saradnici su ukazali da DHLA heliranjem gvožđa i bakra u mozgu ostvaruje protektivno dejstvo u Alchajmerovoj bolesti, smanjujući oksidativna oštećenja indukovana ovim metalima (205). Međutim, u *in vitro* istraživanjima je utvrđeno da DHLA može ispoljiti i prooksidativni efekat, odnosno DHLA može redukovati  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  i povećati lipidnu peroksidaciju. Takođe, postoje podaci da u *in vitro* eksperimentalnim uslovima DHLA može povećati oslobađanje gvožđa iz feritina, ali ne postoje dokazi da se ovaj proces odvija u organizmu.

### 1.5.5.3. Interakcija sa ostalim antioksidansima

Iako, *in vitro* studije podržavaju ulogu LA/DHLA kao snažnog antioksidansa, nepoznato je da li se pretpostavljeno direktno antioksidativno delovanje LA i DHLA može ostvariti i u organizmu, obzirom na prolaznu akumulaciju u tkivima i intenzivan metabolizam. Novija istraživanja, sve više ukazuju na indirektnu antioksidativnu ulogu LA u biološkim sistemima, koja se ostvaruje indukovanjem endogene antioksidativne zaštite (187).

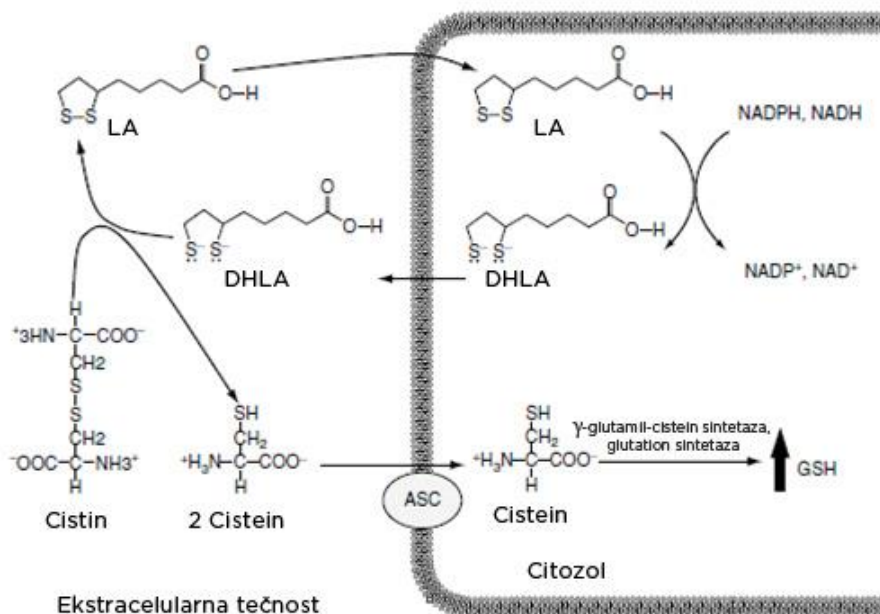
LA utiče na aktivnost drugih neenzimskih endogenih antioksidanasa, kao što su vitamini C i E, koenzim Q i glutation. Rosenberg i Culik su prvi ukazali da LA preventivno deluje na simptome deficita vitamina C i E kod pacova. Zatim, Podda i saradnici su potvrdili da LA ublažava simptome deficita vitamina E kod tokoferol-deficitarnih miševa (206). LA se u ćelijama redukuje u DHLA, snažno redukciono jedinjenje, koje može da regeneriše oksidovane oblike antioksidanasa kao što su askorbat, glutation, koenzim  $Q_{10}$  i vitamin E, produžavajući njihovo delovanje (207,208). Ova saznanja podržavaju koncept sinergističkog delovanja antioksidanasa poznat kao „antioksidantna mreža“ (Slika 7). Posebno je značajna sposobnost DHLA da „reciklira“ vitamin E, što se postiže direktno, redukcijom tokoferoksil radikala, ili indirektno redukcijom askorbinske kiseline ili povećanjem nivoa ubikvinola (redukovano koenzima  $Q_{10}$ ) i GSH. Ove reakcije su praćene istovremenom redukcijom DHLA u LA pomoću lipoamid-reduktaza, glutation-reduktaza ili tioredoksin-reduktaza (209). Na osnovu ovoga, pretpostavlja se da redoks par LA/DHLA ima veoma značajnu ulogu u neenzimskoj antioksidativnoj zaštiti.



Slika 7. Antioksidantna mreža (209)

Prema literaturnim podacima smatra se da suplementacija LA dovodi do povećanja sinteze intracelularnog GSH (190, 210). Poznato je da raspoloživost aminokiseline cisteina predstavlja limitirajući faktor za endogenu sintezu glutathiona. Pretpostavljeni mehanizam delovanja LA na sintezu GSH objašnjava se brzim preuzimanjem LA od strane ćelije, u kojoj se LA redukuje do DHLA, a koja potom prelazi u ekstracelularnu sredinu, redukuje cistin do cisteina, koji se zatim brzo preuzima od strane ćelije kao supstrat za sintezu GSH (190) (Slika 8).

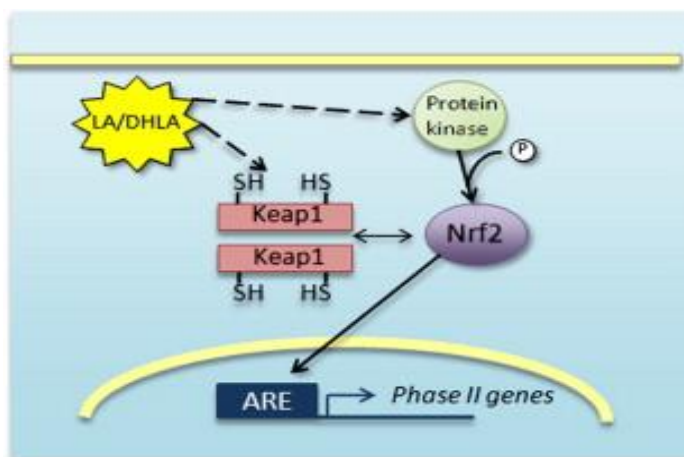
Dodatno, obzirom da redoks par LA/DHLA ima niži redoks potencijal (-0.32 V), u odnosu na GSH/GSSH (-0.24 V), postoji mogućnost redukcije oksidovanog GSSH od strane DHLA unutar ćelije.



**Slika 8.** Pretpostavljeni mehanizam promotivnog delovanja LA na sintezu GSH u ćeliji (preuzeto iz *Lipoic Acid: Energy Production, Antioxidant Activity and Health Effects*, eds Patel & Packer, CRC Press, 2008)

#### 1.5.5.4. Regulatorna uloga alfa-liponske kiseline

Poslednjih godina aktuelna su ispitivanja uticaja dijetarnih antioksidanasa na redoks signalne puteve i ekspresiju gena. Brojnim istraživanjima u ovoj oblasti utvrđeno je da LA/DHHLA ima modulatornu ulogu u redoks-osetljivim signalnim putevima. Prema literaturnim podacima, suplementacija LA aktivira transkripcioni nuklearni faktor Nrf2 (engl. *NF-E2 related factor 2*) koji indukuje ekspresiju mnogih citoprotektivnih proteina uključujući i antioksidativne enzime. Pretpostavlja se da ovim mehanizmom, LA utiče na ekspresiju  $\gamma$ -glutamylcistein ligaze, ključnog enzima u sintezi glutationa (187).



**Slika 9.** Pretpostavljeni mehanizmi delovanja LA na indukciju Faze II gena posredovanu Nrf2 transkripcionim faktorom. LA može oksidovati cisteinske ostatke Keap1 dimera ili formirati mešovite disulfide, pri čemu dolazi do sprečavanja vezivanja novo sintetisanih Nrf2 za Keap1. Takođe, LA može aktivirati protein kinazne signalne puteve koji dovode do fosforilacije Nrf2 na Ser40, što je praćeno odvajanjem Nrf2 i njegovom translokacijom iz citoplaze u jedro i vezivanjem za ARE (engl. *antioxidant response element*) u promotoru mnogih citoprotektivnih gena (187).

Oksidativnim stresom posredovana inflamacija predstavlja rani poremećaj u razvoju ateroskleroze, uključujući indukciju vaskularnih adhezivnih molekula i tkivnih matriks metaloproteinaza. *In vitro* studije su pokazale da LA može sprečiti inflamatorne procese blokadom ekspresije proinflamatornih gena i to supresijom aktivacije nuklearnog faktora  $\kappa$ B (Nf-  $\kappa$ B) (211). Takođe, poznato je da LA aktivira insulin/insulinu sličnim faktorom rasta signalne puteve. Slično interakciji sa Keap 1, LA ili DHLA mogu modulisati ostatke cisteina na beta subjedinici insulinskog receptora i drugim tiol proteinima uključenim u insulinske signalne puteve, koji dovode do translokacije transportera za glukozu iz citoplazme na površinu ćelije. Na ovaj način, može se objasniti uticaj LA na stimulaciju preuzimanja glukoze od strane skeletnih mišića i poboljšanje insulinske rezistencije. Pretpostavljena uloga LA uključuje i modulaciju ekspresije AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) u hipotalamusu i perifernim tkivima, čime se stimuliše preuzimanje glukoze i oksidacija masnih kiselina u skeletnim mišićima, što takođe doprinosi poboljšanju insulinske rezistencije (212). Smatra se da inhibicijom hipotalamusne AMPK i redukcijom unosa hrane, LA dovodi do redukcije telesne mase (213).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## **Ciljevi ove doktorske disertacije su:**

- Utvrditi da li postoji razlika u parametrima oksidativnog stresa i aktivnosti antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije u odnosu na zdrave ispitanike.
- Ispitati nivo oksidativnog stresa u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma, kao i u odnosu na stepen udruženosti pojedinačnih komponenata metaboličkog sindroma kod obolelih od shizofrenije.
- Ispitati uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom u periodu od 3 meseca na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije, kao i kod zdravih ispitanika.



### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

U istraživanje nivoa oksidativnog stresa i metaboličkog sindroma kod pacijenata sa shizofrenijom uključeno je ukupno 60 pacijenata sa shizofrenijom, oba pola, starosti od 18 do 65 godina, u stabilnoj fazi bolesti. Dijagnoza shizofrenije utvrđena je na osnovu kriterijuma 10. revizije Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB-10). Pacijenti su lečeni na Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Srbije i u trenutku istraživanja nisu bili hospitalizovani. U istraživanje su uključivani tokom dolazaka na redovne ambulantne kontrolne preglede. Uključeni su pacijenti u stabilnoj fazi bolesti, koji su bar 3 meseca bili na nepromenjenoj dozi antipsihotika. Kriterijumi za isključivanje bili su: mentalna retardacija, zavisnost o alkoholu ili drogama, neurološka ili somatska bolest. U istraživanju su učestvovalе osobe koje ne uzimaju ili nisu uzimale mesec dana pre studije: lekove za snižavanje koncentracije lipidnih parametara, oralne kontraceptive, hormonsku supstytucionu terapiju, kao ni dijetetske suplemente. Kontrolna grupa je obuhvatila 60 ispitanika, sličnih godina i pola, bez klinički evidentiranih oboljenja.

Drugim delom istraživanja, koji se odnosio na ispitivanje uticaja suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, obuhvaćena je grupa od 18 pacijenata, kao i u grupa od 38 zdravih ispitanika.

### 3.2. Dizajn studije

Pre uključenja u istraživanje svim osobama detaljno su objašnjeni ciljevi i metode istraživanja. Svi ispitanici su potpisali pristanak za dobrovoljno učešće u studiji. Istraživanja su sprovedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji uz prethodno odobrenje od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (br. 1856/14-A).

Nivo oksidativnog stresa obolelih od shizofrenije ispitan je poređenjem parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između grupe pacijenata i zdravih ispitanika.

Obzirom da su utvrđene razlike u zastupljenosti metaboličkih faktora rizika kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na zdrave ispitanike, u cilju ispitivanja uticaja ovih faktora na stepen oksidativnog stresa u shizofreniji, u daljem istraživanju pacijenti su podeljeni u dve grupe u zavisnosti od prisustva metaboličkog sindroma (MetS). U ovu svrhu korišćeni su dijagnostički kriterijumi Međunarodne federacije za dijabetes (*International Diabetes Federation-IDF*) (214). Prema ovim kriterijumima za dijagnozu MetS neophodno je prisustvo 3 od sledećih 5 faktora rizika: obim struka  $\geq 94$  cm kod muškaraca,  $\geq 80$  cm kod žena, vrednosti triglicerida  $>1,7$ mmol/L, HDL holesterol  $<1.0$  mmol/L kod muškaraca,  $<1,3$

mmola/L kod žena, vrednosti arterijskog krvnog pritiska  $\geq 130/85$  mmHg i vrednosti glikemije  $>5,6$  mmol/L. Na osnovu broja prisutnih dijagnostičkih komponenata MetS, pacijenti sa shizofrenijom su dodatno podeljeni u četiri grupe: grupa I (MetS skor  $\leq 1$ ), grupa II (MetS skor =2), grupa III (MetS skor =3) i grupa IV (MetS skor  $\geq 4$ ).

U studiji ispitivanja uticaja suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, učestvovalo je 18 pacijenata sa shizofrenijom i 38 zdravih ispitanika. Obe grupe ispitanika su uzimale kapsulu sa 500 mg LA jednom dnevno tokom 90 dana. Svim ispitanicima je preporučeno da kapsule LA uzimaju ujutro 30 min pre jela, kao i da se tokom studije pridržavaju uobičajenog načina ishrane. Takođe, pacijentima je posebno naglašeno da nastave sa uzimanjem propisane farmakološke terapije.

Uzimanje uzoraka krvi, antropometrijska određivanja i merenje krvnog pritiska je izvršeno: pre suplementacije, 45 dana i posle 90 dana suplementacije.

Dva uzorka venske krvi su uzeta iz prednje kubitalne vene nakon perioda noćnog gladovanja. Krv je skupljana u vakutejner sistemima sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom (EDTA) za izdvajanje plazme i vakutejnerima sa serum separator gelom za dobijanje seruma. Uzorci su čuvani na  $+4^{\circ}\text{C}$ , a zatim u što kraćem mogućem periodu centrifugirani na  $1500 \times g$ , deset minuta. Plazma i serum su podeljeni u alikvote i čuvani su na  $-80^{\circ}\text{C}$  do trenutka analiziranja.

Uzimanje uzoraka krvi, antropometrijska određivanja i merenje krvnog pritiska je urađeno u prostorijama Klinike za psihijatriju, Kliničkog centra Srbije. Biohemijske i laboratorijske analize uzoraka krvi su urađene na Katedri za medicinsku biohemiju i Katedri za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Određivanje koncentracije mikroelemenata urađeno je na Katedri za analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta u Beogradu.

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1. Antropometrijska merenja**

Merenje visine tela, izraženo u centimetrima, vršeno je prema standardizovanoj proceduri prenosivim stadiometrom sa tačnošću od 0,1 cm. Telesna masa i procenat telesne masti određeni su metodom analize bioelektrične impedance. Za analizu bioelektrične impedance, koja se zasniva na određivanju otpora koji pruža tkivo prilikom prolaska slabe naizmenične struje kroz ljudski organizam, korišćena je elektronska vaga (Tanita Scale BC587 InnerScan Body Composition Monitor, Tanita Corp, Japan), sa preciznošću od 0.1kg. U cilju procene distribucije telesnih masti ispitanicima su mereni obim struka i kukova, i računat odnos obima struk/kuk (S/K).

Za procenu stepena uhranjenosti ispitanika korišćen je indeks telesne mase (ITM) koji predstavlja količnik telesne mase u kilogramima i kvadrata telesne visine u metrima ( $ITM = TM(kg)/(TV(m))^2$ ).

Vrednosti arterijskog krvnog pritiska dobijene su konvencionalnim merenjem živinim sfingomanometrom i predstavljale su srednju vrednost dva uzastopna merenja krvnog pritiska u sedećem položaju u intervalu od pet minuta.

#### **3.3.2. Određivanje biohemijskih parametara**

Za određivanje koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola, glukoze i mokraćne kiseline, korišćeni su komercijalni testovi Biosystems S.A.(Barselona, Španija) i Byoanalitica (Beograd, Srbija) prema uputstvima proizvođača. Analize su urađene na biohemijском analizatoru Ilab 300+ u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

### 3.3.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

#### 3.3.3.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS)

Koncentracija TBKRS, krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije u plazmi, određivana je po metodi Girroti i saradnika (215). Ova metoda se zasniva na građenju obojenog kompleksa malondialdehida sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), čiji je maksimum apsorpcije na 535 nm.

TBA Reagens:

0,917 mmol/L trihlorsirćetna kiselina (TCA, 15% rastvor)

2,6 mol/L (0,375%) TBA-tiobarbiturne kiseline

0,25 mol/L HCl

#### Postupak

U 0,3 ml plazme dodato je 0,6 ml TBA reagensa. Smeša je promešana na vortexu, inkubirana 5 min na 100°C u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja i centrifugiranja na 10.000 g, tokom deset minuta na +4°C, očitavana je apsorpcija supernatanta na 535nm. Za izračunavanje koncentracije TBKRS korišćena je standardna kriva konstruisana upotrebom radnih rastvora koncentracije od 1-10 µmol/L, napravljenih od osnovnog standarda MDA koncentracije 1 mmol/L. Osim upotrebe standardne krive, koncentracija TBKRS može se izračunati i upotrebom molarnog apsorpcionog koeficijenta koji iznosi  $1.56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  za nastali obojeni kompleks.

### 3.3.3.2. *Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)*

Za određivanje AOPP kao markera oksidativnog stresa korišćena je metoda Witko-Sarsat i saradnika (216). Uzorak plazme, razblažuje se fosfatnim puferom (pH= 7,4). Nakon dodavanja glacijalne sirćetne kiseline i rastvora kalijum-jodida dolazi do promene apsorbcije koja se meri na 340 nm.

#### **Postupak**

Uzorku plazme, odnosno standarda (60 $\mu$ L) dodavano je 300  $\mu$ L reagensa 1 (R1) koji sadrži glacijalnu sirćetnu kiselinu izmešanu sa PBS u odnosu 1:8, i nakon inkubacije od 60s očitavana je prva apsorbcija uzorka. Nakon dodavanja reagensa 2 (R2), kalijum jodida pripremljenog u rastvoru PBS, i inkubacije od 180s, ponovo je očitavana apsorbcija na talasnoj dužini 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum) koji se koristi za izradu standardne krive u koncentracijama 10-100  $\mu$ mol/L, pri čemu njegova apsorbcija linearno raste sa porastom koncentracije.

### 3.3.3.3. *Određivanje nivoa superoksid anjon radikala u plazmi*

Koncentracija superoksid anjon radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) u plazmi određivana je po metodi Auclair i Voisin-a (217). Metoda je zasnovana na sposobnosti  $O_2^{\cdot-}$  da redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitro tetrazolijum plavog (engl. *Nitro Blue Tetrazolium*-NBT) (NBT, 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetilen)-ditetrazolium hlorid). Redukcija žuto obojenog NBT-a do plavog monoformazana meri se spektrofotometrijski i predstavlja nivo stvaranja  $O_2^{\cdot-}$ .

#### **Postupak**

U 0,02 ml uzoraka plazme dodavano je 0,2 ml radnog reagensa koji sadrži: 50 mM TRIS pufera (pH = 8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml želatina i 1 mM NBT-a. Nakon mešanja, praćeno je povećanje apsorbcije na 550 nm, na svakih 15 sekundi u toku jednog minuta, a zatim izračunavano  $\Delta A/\Delta t$ . Brzina stvaranja  $O_2^{\cdot-}$  se izražava preko brzine stvaranja redukovanog NBT-a koja se određuje kinetičkim postupkom, a izračunava se upotrebom molarnog ekstinkcionog koeficijenta. Krajnji izraz za izračunavanje glasi: red. NBT,  $\mu$ mol/min/L =  $\Delta A/\text{min} \times 1466$

### 3.3.4. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

#### 3.3.4.1. *Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SH grupa)*

Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa određivan je u plazmi Ellman-ovom metodom (218). Ova metoda se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH 9,0), pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po jednom molu tiola. Nastali anjon u baznoj sredini je žuto obojen i boja nastalog jedinjenja meri se spektrofotometrijski na 412 nm.

#### **Postupak**

Uzorci plazme (50 µl) su dodavani u 900 µl fosfatnog pufera (0,2 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L EDTA, pH 9,0). Nakon dodatka 200 µl DTNB reagensa (10 mmol/L DTNB, rastvoren u 50 mmol/L fosfatnog pufera, pH 7,0), mešanja i inkubiranja 25 minuta na 25°C, u mraku, očitavane su apsorbancije na 412 nm, prema slepoj probi. Za izračunavanje koncentracije ukupnog sadržaja SH grupa korišćena je standardna kriva konstruisana upotrebom radnih vodenih rastvora glutaciona koncentracija od 0,1 mmol/L do 1 mmol/L, napravljenih od koncentrovanog standarda glutaciona (1 mmol/L). Osim upotrebe standardne krive, koncentracija ukupnih SH grupa može se izračunati i preko molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove iznosi  $13600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 3.3.4.2. *Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)*

Totalni antioksidativni status (engl. *Total Antioxidant Status*- TAS) je određivan u serumu, spektrofotometrijski metodom po Erel-u, uz određene modifikacije (219). Metoda se zasniva na redukciji ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina) katjon radikala antioksidansima iz seruma, što se manifestuje smanjenjem apsorbancije na 660 nm. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan. Oksidacijom do ABTS<sup>+</sup> katjona, pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu (acetatni pufer; pH=5,8) rastvor dobija karakterističnu plavo-zelenu boju. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji prisutnih antioksidanasa u uzorku.

### **Postupak**

U 12,5  $\mu$ l seruma dodato je 200  $\mu$ l acetatnog pufera (pH=5,8; 0,4 mol/L), a zatim 37,5  $\mu$ l rastvora ABTS-a (10 mmol/L). Nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi, apsorbancije su očitavane na talasnoj dužini od 660 nm. Koncentracije prisutnih antioksidanasa u serumu su određivane metodom standardne krive, uz upotrebu Trolox-a, hidrosolubilnog ekvivalenta vitamina E. Pri konstruisanju standardne krive korišćeni su rastvori Trolox-a rastućih koncentracija i to: 0,125 mmol/l; 0,25 mmol/L, 0,5 mmol/L, 0,75 mmol/L; 1 mmol/L i 2 mmol/L. Dobijeni rezultati su izraženi u mmol Trolox ekvivalenata/ L.

#### **3.3.4.3. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaza (SOD)**

Aktivnost SOD određivana je u plazmi po originalnoj metodi koju su dali Misra i Fridovich (220), uz određene modifikacije. Metoda se zasniva na sposobnosti enzima SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH 10,2. Aktivnost ovog enzima se izražava u relativnim jedinicama, koje se dobijaju merenjem apsorbancije adrenohroma, nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza).

### **Postupak**

Određivana je količina rastvora adrenalina koja je u reakcionoj smeši sa karbonatnim puferom (slepa proba) dala promenu apsorbancije u minuti ( $\Delta A/\text{min}$ ) od 0,025 u lineranom delu. Pri tome se polazi od osnovnog rastvora adrenalina (10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCl), koji se razblažuje sve dok se ne postigne  $\Delta A/\text{min}$  od 0,025, jer je utvrđeno da SOD tada postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

Uzorci plazme (10 $\mu$ l) razblaživani su dodatkom 690  $\mu$ l karbonatnog pufera (0,05 mmol/L, pH 10,2), a zatim je dodavano 50  $\mu$ l radnog rastvora adrenalina. Nakon mešanja i stajanja na tamnom mestu, na 25<sup>0</sup>C, 3 minuta (vreme preinkubacije), očitavane su promene apsorbancija ( $\Delta A/\text{min}$ ) na 480 nm u toku 3 minuta. Izračunavane su  $\Delta A/\text{min}$  za kontrolu i analize.



### **Izračunavanje**

Relativna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao ona aktivnost koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina pod određenim uslovima. Aktivnost SOD u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće proporcije:

$$0,0125 : 1U = [ 0,025 - ( \Delta A_{analize/min} ) ] : X$$

Da bi se dobila aktivnost u 1 mL plazme dobijena vrednost se množi sa razblaženjem uzorka ( $V_{uk} / V_{uz}$ ), a zatim sa 1000 da bi se dobila aktivnost u zapremini od 1L plazme.

$$SOD, U/L = X \times \frac{V_{uk}}{V_{uz}} \times 1000$$

#### **3.3.4.4. Određivanje aktivnosti enzima paraoksonaza I (PON1)**

Aktivnost enzima PON1 je određivana u serumu po metodi Richter-a i Furlong-a (221). Ovom metodom određuje se aktivnost PON1 u odnosu na dva različita nefiziološka supstrata, paraoksonu (paraoksonazna, POazna aktivnost) i diazoksonu (diazoksonazna, DZOazna aktivnost).

#### ***Određivanje paraoksonazne aktivnosti (POazne) aktivnosti***

Određivanje aktivnosti PON1 prema paraoksonu zasniva se na delovanju enzima iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksone do p-nitrofenola a brzina reakcije se prati kinetički na 405 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum p-nitrofenoksidnog anjona u koji prelazi p-nitrofenol u baznoj sredini.

#### **Postupak**

Za određivanje POazne aktivnosti serum se razblažuje diluent puferom u odnosu 1:10. 4 $\mu$ l seruma promešano je sa 400  $\mu$ l rastvora paraoksone i merena je promena apsorbcancije u toku 3 minuta. POazna aktivnost se izražava kao  $\mu$ mol stvorenog p-nitrofenola/min/L ili kao IU/L.

### ***Određivanje diaksonazne aktivnosti (DZOazne) aktivnosti***

Određivanje diazoksonazne aktivnosti PON1 zasniva se na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat diazokson (diazinon-O-analog), pri čemu se diazokson konvertuje do 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidina (IMHP). Brzina ove reakcije prati se kinetički na 270 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za IMPH.

#### **Postupak**

Za određivanje DZOazne aktivnosti serum se razblažuje diluent puferom u odnosu 1:20. U epruvetu je odmereno 50 µl razblaženog seruma, dodato 500 µl rastvora diazoksona i merena je promena apsorpcije u toku 3 minuta. DZOazna aktivnost je određivana na 23° C, na pH =8,5 uz upotrebu 1 mmol/L TRIS-HCl pufera i u prisustvu rastvora NaCl. DZOazna aktivnost je izražavana kao µmol stvorenog IMPH/min/L ili kao IU/L. Formula za izračunavanje DZOazne aktivnosti glasi:

$$\Delta A/\text{min} \times 73\,333 = \mu\text{mol IMHP po minuti u litru rastvora} = \text{IU/L PON1 aktivnosti}$$

#### ***3.3.4.5. Određivanje mikrolemenata u plazmi metodom induktivno spregnute plazma-masene spektrofotometrije (ICP-MS)***

Nakon mikrotalasne digestije u zatvorenom sistemu (ETHOS 1, Advanced Microwave Digestion Labstation, Milestone, Italy), pomoću koncentrovane HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sadržaj Se, Cu i Zn je određivan metodom ICP-MS, na aparatu Thermo Scientific iCAPQ ICP-MS, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany). U cilju provere preciznosti i tačnosti metode upotrebljavani su referentni uzorci liofilizovane plazme (ClinChek® RECIPE Chemicals, Munich, Germany, Level I & II).

### 3.3.5. *Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)*

Princip ove metode se zasniva na dve reakcije: enzimskoj, u kojoj se TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) oksiduje do plavo obojenog katjona u reakciji sa peroksidima iz plazme i neenzimskoj, u kojoj se nastali TMB katjon obezbojava jer reaguje sa antioksidantnim jedinjenjima iz plazme koji ga redukuju. Vrednosti PAB su određivane metodom standardne krive, uz upotrebu rastvora  $H_2O_2$  i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina a na kraju  $H_2O_2$ . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu. Dobijeni rezultati se izražavaju u arbitrarnim jedinicama koje predstavljaju koncentraciju vodonik-peroksida (HK jedinice po početnim slovima prezimena autora metode Hamidi-Koliakos) (77).

#### **Reagensi**

*TMB I rastvor:* 60 mg TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzedina) se rastvori u 10 ml dimetilsulfoksida (DMSO), rastvor se alikvotira na zapremine od 1,1 ml i čuva na  $-20^{\circ}C$ .

*TMB katjon:* za pripremu TMB katjona 1 ml TMB/DMSO (TMB1) se dodaje u 50 ml acetatnog pufera (0,05M, pH 4,5), zatim se dodaje 175  $\mu L$  sveže pripremljenog hloramina T (100 mmol/L), dobro se promeša i inkubira 1 sat na  $37^{\circ}C$ , na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije u 50 ml TMB katjona dodaje se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor se pažljivo promeša, podeli u zapremine od 1,1 ml i čuva na  $-20^{\circ}C$ .

*TMB II rastvor:* 200  $\mu L$  TMB/DMSO se rastvori u 10 ml acetatnog pufera (0,05M, pH 5,6). Ovako pripremljen rastvor najbolje je koristiti odmah ili maksimalno u roku od 2 dana, pri čemu se čuva na temperaturi od  $4^{\circ}C$ .

*Radni rastvor:* 1 ml TMB katjona se dodaje u 10 ml TMB rastvora II i 6 minuta se meša na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Ovako pripremljen radni rastvor se koristi odmah.

*Standardni rastvor:* Standardni rastvori se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0-100%) 1 mmol/L  $H_2O_2$  sa 6 mmol/L mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mM NaOH)

## **Postupak**

10 µl svakog uzorka, standardnog rastvora i slepe probe (destilovana voda) je pomešano sa 180 µl radnog rastvora u bazenima polistirenske mikrootitracione ploče, koja se zatim inkubirala 12 minuta na 37° C, na tamnom mestu. Nakon inkubacije reakcija je prekinuta dodatkom 40 µl 2 mol/L hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevela u žutu. Apsorbancija je odmah očitavana na ELISA čitaču na 450 nm.

### **3.3.6. Određivanje koncentracije adipokina**

#### **3.3.6.1. *Određivanje koncentracije leptina***

Koncentracija leptina u plazmi je određena upotrebom komercijalnog Leptin (Sendvič) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testom prema uputstvu proizvođača (DRG Instruments, Marburg, Germany). Princip metode se zasniva na tome da su zidovi mikrotitracione ploče komercijalno obloženi anti-leptin antitelima u kojima se inkubiraju standardi, kontrole i uzorci plazme, pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa anti-leptin antitelo-leptin. Nakon ispiranja dodaje se drugo, antitelo obeleženo biotinom, koje se vezuje za prethodno nagrađeni kompleks, pri čemu se formira sendvič. Nakon inkubacije i ispiranja dodaje se streptavidin-peroksidaza, a zatim supstrat tetrametilbenzidin (TMB). Enzimaska reakcija prekida se dodatkom kiseline, a intenzitet promene boje supstrata, koji se meri spektrofotometrijski na 450 nm, direktno je proporcionalan koncentraciji leptina u uzorcima. Test sadrži standarde koji se koriste za konstruisanje standardne krive i kontrolne rastvore za kalibraciju testa. Analitička osetljivost metode je 1 ng/ml, a merni raspon od 1-100 ng/ml.

#### **3.3.6.2. *Određivanje koncentracije adiponektina***

Koncentracija adiponektina u plazmi određena je upotrebom komercijalnog Human total Adiponectin/Acrp30 Immunoassay testom (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Mikrotitraciona ploča je komercijalno obložena anti-adiponektin antitelima. Nakon dodatka standarda i uzoraka plazme dolazi do stvaranja kompleksa anti-adiponektin antitelo-adiponektin. Nakon ispiranja dodaje se drugo, antitelo obeleženo peroksidazom koje se vezuje za prethodno nagrađeni kompleks, pri čemu se formira sendvič. Nakon inkubacije i uklanjanja nevezanih antitela, dodaje se supstrat. Enzimaska reakcija prekida se dodatkom kiseline, a intenzitet promene boje supstrata, koji se meri spektrofotometrijski na 450 nm,

direktno je proporcionalan koncentraciji adiponektina u uzorcima. Analitička osetljivost metode je 0,246 ng/ml.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Normalnost raspodele podataka je proveravana upotrebom Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testa. Kontinuirani podaci prikazivani su kao srednje vrednosti i standardne devijacije, ukoliko je raspodela podataka sledila normalni tok. Kod parametara čija distribucija nije sledila normalan tok, proveravana je distribucija logaritmovanih vrednosti i rezultati su prikazivani kao geometrijske sredine i intervali pouzdanosti. Kontinuirani podaci koji ni nakon logaritamske transformacije nisu pratili normalnu raspodelu prikazani su kao medijane i interkvartilni rasponi.

Kontinuirane varijable koje slede normalnu raspodelu, kao i kontinuirane varijable koje nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu, poređene su parametarskim statističkim testovima: Studentovim t-testom, jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), kao i kombinovanom analizom varijanse ponovljenih merenja (engl. *Mixed model ANOVA*).

Varijable koje ne slede normalnu raspodelu poređene su Mann-Whitney i Kruskal-Wallis statističkim testovima. Za neparametarsku analizu podataka koji su rezultat ponovljenih merenja korišćeni su Friedman-ova ANOVA i Wilcoxon-ov test označenih rangova.

Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence, a razlike između njih testirane su upotrebom  $\lambda^2$  testa.

Za utvrđivanje korelacije između pojedinih parametara korišćena je Spearmanova neparametarska korelaciona analiza.

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je definisan verovatnoćom (p, nivo značajnosti) manjom ili jednakom 0,05.

Za obradu dobijenih rezultata korišćeni su računarski programi MS Excel, SPSS for Windows 11.5 (Chicago, IL, USA) i MedCalc (version 11.4 Software, Belgium).

## **4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA**

#### 4.1. Poređenje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa shizofrenijom (SHZ grupa)

U ovom istraživanju učestvovalo je ukupno 120 ispitanika, od toga 60 pacijenata sa shizofrenijom i 60 zdravih ispitanika. Svim ispitanicima uzeti su podaci o starosti, izmerena im je visina, težina, procenat masti, obim struka, kao i visina krvnog pritiska. Osnovni demografski i klinički podaci ispitanika prikazani su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Osnovni demografski podaci ispitanika i kliničke karakteristike pacijenata sa shizofrenijom

Parametar	SHZ grupa	Kontrolna grupa	p
Broj ispitanika	60	60	
Starost (godine)	40.1 ± 10.7	38.7 ± 11.1	0.485
Muškarci, n (%)	22 (36.7%)	16 (26.7%)	0.239
Žene, n (%)	38 (63.3%)	44 (73.3%)	
Pušači, n (%)	29 (48.3%)	22 (36.7%)	0.267
Dijagnoza shizofrenije (godine)	29.83 ± 10.11	-	-
Dužina bolesti (godine)	10.02 ± 6.54	-	-
Doza antipsihotika (HPE mg/dan)	354.6 ± 281.9	-	-
Klozapin, n (%)	20 (33.3%)	-	-
Risperidon, n (%)	16 (26.7%)	-	-
Olanzapin, n (%)	8 (13.3%)	-	-
Kombinacija antipsihotika, n (%)	14 (23.3%)	-	-
Psihostabilizatori, n (%)	10 (16.7%)	-	-
Anksiolitici, n (%)	14 (23.3%)	-	-
Antiholinergici, n (%)	7 (11.7%)	-	-

HPE-hlorpromazin ekvivalenti; Kontinuirani podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± S.D. Kategorički podaci su predstavljeni kao apsolutne frekvence.

Antropometrijske karakteristike, vrednosti krvnog pritiska, koncentracija glukoze i parametri lipidnog statusa u kontrolnoj grupi i SHZ grupi prikazani su u tabelama 3 i 4.

**Tabela 3.** Antropometrijske karakteristike i vrednosti krvnog pritiska ispitanika

Parametar	Kontrolna grupa	SHZ grupa	p
Sistolni KP, mmHg	120.3 ± 13.7	116.6 ± 16.4	0.186
Dijastolni KP, mmHg	79.5 ± 7.8	80.5 ± 7.8	0.539
Telesna visina (cm)	173 ± 9.6	168 ± 24.5	0.144
Telesna težina (kg)	72.1 ± 14.2	84.3 ± 17.7	<0.001
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	24.5 ± 3.3	27.9 ± 4.9	<0.001
Obim struka (cm)	84.0 ± 11.3	96.4 ± 13.9	<0.001
Masno tkivo (%)	29.5 ± 7.7	33.4 ± 9.3	<0.001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± S.D.

**Tabela 4.** Koncentracija glukoze i parametri lipidnog statusa ispitanika

Parametar	Kontrolna grupa	SHZ grupa	p
Glukoza (mmol/L) <sup>#</sup>	5.03 (4.88-5.13)	5.74 (5.49-6.09)	<0.001
T-holesterol (mmol/L)	5.9 ± 1.3	6.2 ± 1.6	0.258
LDL-H (mmol/L)	3.8 ± 1.1	4.0 ± 1.3	0.303
HDL-H (mmol/L)	1.5 ± 0.4	1.2 ± 0.3	<0.001
TG (mmol/L) <sup>#</sup>	1.37 (1.14-1.59)	2.17 (1.77-2.57)	<0.001
TG/HDL-H <sup>#</sup>	1.06 (0.78-1.13)	2.00 (1.57-2.44)	<0.001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± S.D. ili geometrijske srednje vrednosti i interval pouzdanosti za log-normalnu raspodelu (<sup>#</sup>).



Ispitivane grupe su bile sličnih godina i pola, što je i očekivano s obzirom na kriterijume za uključivanje u istraživanje. Takođe, na osnovu  $\lambda^2$  je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u statusu pušenja između ispitivanih grupa (Tabela 2). Statističkom analizom utvrđeno je da, izuzev distribucije telesne visine, svi ostali antropometrijski parametri se značajno razlikuju između SHZ grupe i kontrolne grupe. U grupi pacijenata sa shizofrenijom, utvrđene su veće vrednosti telesne mase i ITM, kao i obima struka i procenta masnog tkiva u odnosu na kontrolnu grupu, kao što je i očekivano (Tabela 3). Statističkom analizom biohemijskih parametara utvrđeno je da pacijenti sa shizofrenijom imaju značajno veće koncentracije glukoze i TG u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, u SHZ grupi utvrđene su značajno niže koncentracije HDL-H, kao i značajno veći odnos TG/HDL-H u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 4).

Da bi se utvrdilo koje statističke testove treba primeniti prilikom upoređivanja parametara oksidativno-stresnog statusa kontrolne grupe i SHZ grupe, prvo je primenjena metoda testiranja raspodele ovih parametara. Primenom Kolmogorov-Smirnov testa, utvrđeno je da normalnu raspodelu imaju koncentracije SH grupa, TAS i DZOazne aktivnosti i za poređenje ovih parametara korišćen je Studentov t-test. Vrednosti koncentracija TBKRS, PAB-a i aktivnosti SOD u kontrolnoj grupi, kao i POazne aktivnosti u obe ispitivane grupe, ne slede normalnu raspodelu ni nakon logaritamske transformacije raspodela, tako da su ovi parametri predstavljeni kao medijane i interkvartilni rasponi, a za njihovo poređenje korišćen je neparametarski Mann-Whitney-ev test. Eksperimentalno dobijeni podaci i statistički značajne razlike prikazani su u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Parametri oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i aktivnost enzima PON1 u kontrolnoj grupi i SHZ grupi

Parametar	Kontrolna grupa	SHZ grupa	p
TBKRS ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>&amp;</sup>	0.80 (0.76-0.85)	1.15 (1.06-1.33)	<b>&lt;0.001</b>
SH grupe (mmol/L)	0.62 ± 0.16	0.60 ± 0.16	0.594
TAS ( $\mu\text{mol/L}$ )	438 ± 161	683 ± 189	<b>&lt;0.001</b>
SOD (kU/L) <sup>&amp;</sup>	30 (29-32)	32 (28-37)	0.894
POazna aktivnost (U/L) <sup>&amp;</sup>	224 (189-416)	177 (156-220)	<b>&lt;0.01</b>
DZOazna aktivnost (U/L)	8976 ± 2693	6714 ± 3778	<b>&lt;0.01</b>
PAB (HK U) <sup>&amp;</sup>	379 (287-447)	386 (314-582)	0.158

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± S.D., odnosno kao medijana i interkvartilni raspon (<sup>&</sup>)

Kao što se i očekivalo, rezultati statističke analize su pokazali da pacijenti sa shizofrenijom imaju značajno veće koncentracije TBKRS u odnosu na kontrolnu grupu. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama ukupnih SH grupa, pacijenti sa shizofrenijom su imali statistički značajno više vrednosti TAS-a u odnosu na kontrolnu grupu. Na osnovu rezultata statističke analize, uočena je značajna razlika u aktivnostima PON1 između ispitivanih grupa. Naime, POazne i DZOazne aktivnosti bile su značajno niže u SHZ grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnosti SOD nisu se statistički značajno razlikovale između grupa. Takođe, nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima PAB-a (Tabela 5).

U cilju procene statusa antioksidativne zaštite kod svih ispitanika određivane su i koncentracije selena, bakra i cinka u plazmi. Na osnovu rezultata Studentovog t-testa, utvrđena je statistički značajno veća koncentracija bakra u SHZ grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, koncentracije cinka u SHZ grupi su bile veće u odnosu na kontrolnu grupu (rezultat na granici statističke značajnosti), dok u koncentracijama selena nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa (Tabela 6).

**Tabela 6.** Koncentracije mikroelemenata u kontrolnoj grupi i SHZ grupi

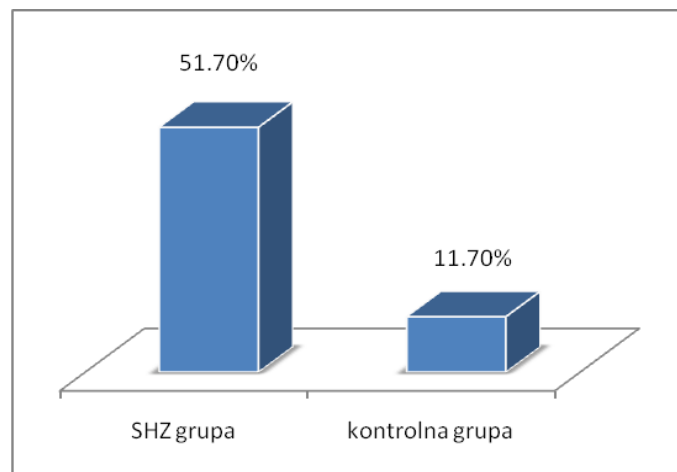
Parametar	Kontrolna grupa	SHZ grupa	P
Selen ( $\mu\text{g/L}$ )	$81.71 \pm 15.72$	$84.30 \pm 27.69$	0.569
Bakar ( $\text{mg/L}$ )	$0.77 \pm 0.32$	$0.97 \pm 0.31$	<b>&lt;0.001</b>
Cink ( $\text{mg/L}$ )	$0.98 \pm 0.24$	$1.07 \pm 0.26$	0.053

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  S.D.

#### 4.2. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma kod pacijenata sa shizofrenijom

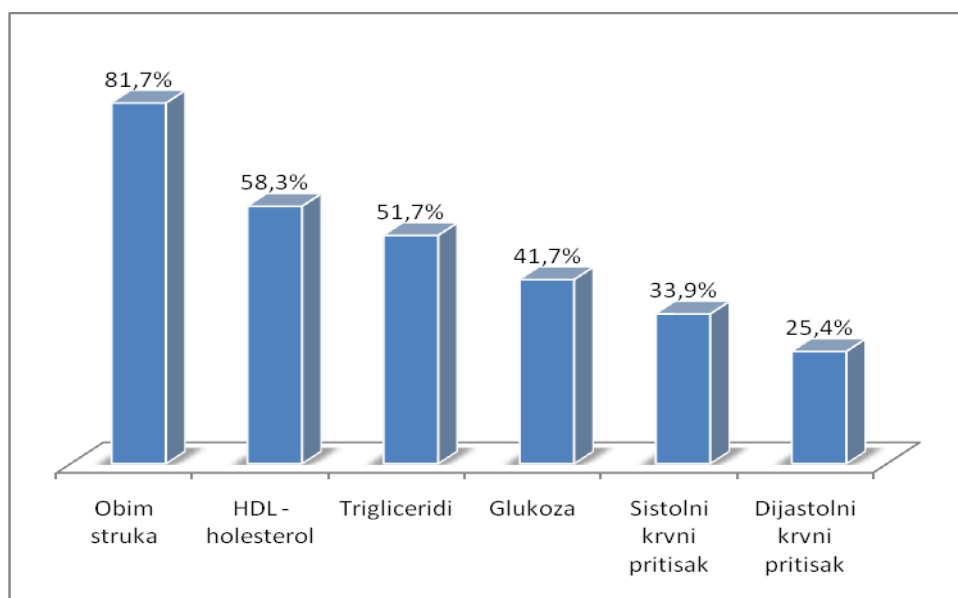
Obzirom na prethodno utvrđene razlike u antropometrijskim i biohemijskim parametrima, koji su ukazali na povećani obim struka, hiperglikemiju, kao i prisustvo aterogene dislipidemije u grupi pacijenata sa shizofrenijom, dalje istraživanje se odnosilo na ispitivanje njihove udruženosti u ispitivanim grupama.

Na osnovu IDF kriterijuma utvrđeno je prisustvo metaboličkog sindroma kod 31 (51.7%) pacijenta sa shizofrenijom (Slika 10).

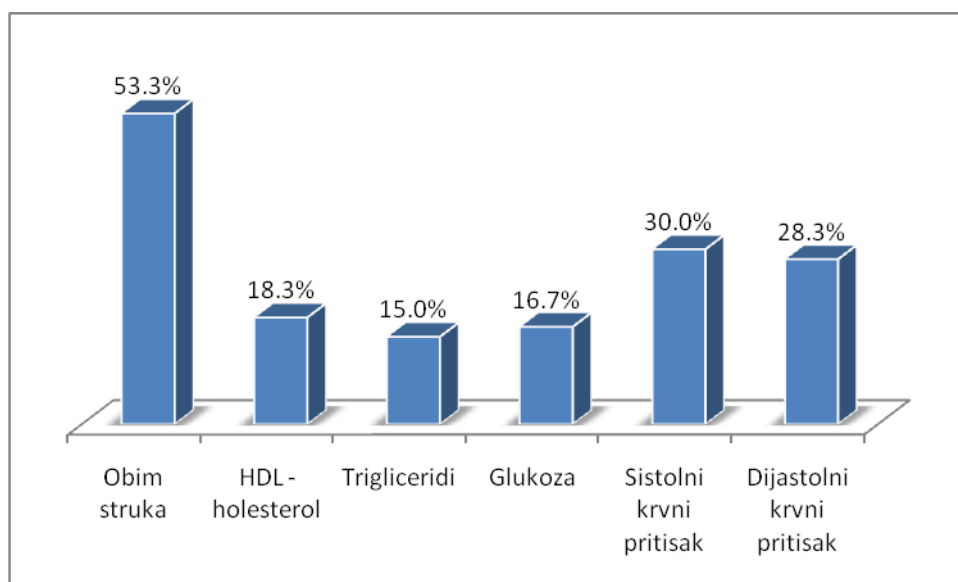


**Slika 10.** Zastupljenost metaboličkog sindroma u ispitivanim grupama

Procentualna zastupljenost različitih komponenti MetS za SHZ grupu i kontrolnu grupu prikazana je na slikama 11 i 12.



**Slika 11.** Zastupljenost komponenti MetS u grupi SHZ grupi



**Slika 12.** Zastupljenost komponenti MetS u kontrolnoj grupi

Na osnovu vrednosti  $\lambda^2$  ustanovljeno je da distribucija MetS komponenti nije ista kod pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi ( $p < 0.001$ ). U grupi pacijenata najzastupljenija komponenta je abdominalna gojaznost (81,7%), slede snižene vrednosti HDL-H (58,3%) i povećane koncentracije TG (51,7%). U kontrolnoj grupi, najzastupljenija komponenta MetS je takođe abdominalna gojaznost (53,3%), a zatim slede povećane vrednosti sistolnog (30%) i dijastolnog krvnog pritiska (28,3%). Učestalost svake komponente MetS, izuzev hipertenzije, veća je u SHZ grupi u odnosu na kontrolnu grupu.

U cilju ispitivanja uticaja MetS-a na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite pacijenti sa shizofrenijom su podeljeni u dve podgrupe: pacijenti bez metaboličkog sindroma (SHZ bez MetS) i pacijenti sa metaboličkim sindromom (SHZ sa MetS). Poređenje podgrupa pacijenata vršeno je i u odnosu na kontrolnu grupu, koja je obuhvatila ispitanike bez MetS-a (iz inicijalne kontrolne grupe isključeno je 7 ispitanika). Parametri koji slede normalnu i log-normalnu raspodelu upoređivani su primenom ANOVA testa, a za parametre koji ni posle logaritmovanja ne slede normalni tok korišćen je neparametarski Kruskal-Wallis-ov test. Osnovni demografski podaci, antropometrijske karakteristike i biohemijski parametri analiziranih grupa prikazani su u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Osnovni demografski podaci, antropometrijske karakteristike i rezultati biohemijskih analiza za kontrolnu grupu i grupe pacijenata sa i bez MetS-a

Parametar	Kontrolna grupa	SHZ bez MetS	SHZ sa MetS	p
Broj ispitanika	53	29	31	
Starost (godine)	36.7 ± 9.9	36.8 ± 9.4	43.2 ± 10.9 <sup>a,b*</sup>	<0.05
Dužina bolesti (godine)	-	8.3 ± 5.8	11.9 ± 6.9	<0.05
Pol (M/Ž)	14/39	11/18	11/20	0.496
Pušači, n (%)	19 (35.8%)	12 (41.4%)	17 (54.8%)	0.234
Sistolni KP, mmHg	118.6 ± 13.1	112.3 ± 14.1	120.6 ± 17.6	0.082
Dijastolni KP, mmHg	78.4 ± 7.6	76.4 ± 8.5	84.2 ± 9.8 <sup>a**,b**</sup>	<0.01
Telesna visina (cm)	168 ± 25.9	174 ± 7.7	173 ± 11.2	0.371
Telesna težina (kg)	71.6 ± 14.46	78.2 ± 17.52	89.98 ± 16.2 <sup>a***b*</sup>	<0.001
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	24.2 ± 3.4	25.8 ± 4.7	30.0 ± 4.4 <sup>a***,b***</sup>	<0.001
Obim struka (cm)	82.4 ± 10.3	88.5 ± 11.6 <sup>a*</sup>	103.7 ± 11.8 <sup>a***,b***</sup>	<0.001
Masno tkivo (%)	28.9 ± 7.9	30.7 ± 9.1	35.9 ± 8.8 <sup>a**</sup>	<0.01
Glukoza (mmol/L) <sup>&amp;</sup>	4.90 (4.79-5.00)	5.13 (4.88-5.32)	5.9 (5.30-6.34) <sup>a###,b##</sup>	<0.001
T-holesterol (mmol/L) <sup>#</sup>	5.61 (5.28-5.96)	5.45 (5.04-5.89)	6.54 (5.96-7.18) <sup>a**,b**</sup>	<0.01
LDL-H (mmol/L) <sup>#</sup>	3.51 (3.22-3.83)	3.59 (3.26-3.95)	4.40 (3.66-4.69)	0.058
HDL-H (mmol/L) <sup>#</sup>	1.41 (1.32-1.51)	1.23 (1.11-1.35) <sup>a*</sup>	1.11 (1.02-1.19) <sup>a***</sup>	<0.001
TG (mmol/L) <sup>&amp;</sup>	1.11 (1.05-1.27)	1.23 (1.07-1.40)	2.45 (1.91-3.27) <sup>a###,b###</sup>	<0.001
TG/HDL-H <sup>&amp;</sup>	0.75 (0.66-0.95)	1.10 (0.88-1.22)	2.11 (1.55-2.93) <sup>a###,b###</sup>	<0.001

Kontinuirani podaci sa normalnom raspodelom su prikazani kao srednje vrednosti ± S.D, geometrijske srednje vrednosti i interval pouzdanosti za log-normalnu raspodelu (<sup>#</sup>), odnosno kao medijana i interkvartilni raspon (<sup>&</sup>) <sup>a</sup> statistički značajno različito od kontrolne grupe, <sup>b</sup> statistički značajno različito od SHZ bez MetS \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 (Tukey's *post hoc* test) <sup>#</sup> *p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 (Mann-Whitney-ev test)

Statističkom analizom je potvrđeno da se grupa pacijenata sa MetS-om, osim u vrednostima sistolnog pritiska i koncentracijama LDL-H, razlikuje u vrednostima svih ostalih parametara u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, *post hoc* analizom utvrđeno je da se pacijenti sa i bez MetS-a, razlikuju međusobno u vrednostima obima struka, koncentracijama glukoze i TG, kao što je i očekivano. Međutim, iako su koncentracije LDL-H bile veće u grupi pacijenata sa MetS-om, uočena razlika u odnosu na grupu SHZ bez MetS-a, kao i kontrolnu grupu nije bila statistički značajna. S druge strane, između nižih koncentracija HDL-H u grupi pacijenata sa MetS-om u odnosu na grupu pacijenata bez MetS-a, nije bilo statistički značajne razlike. Rezultati ispitivanja uticaja MetS-a na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite ispitivanih podgrupa dati su Tabeli 8.

**Tabela 8.** Poređenje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe, SHZ pacijenata sa i bez metaboličkog sindroma

Parametar	Kontrolna grupa	SHZ bez MetS	SHZ sa MetS	p
Broj ispitanika	53	29	31	
TBKRS ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>&amp;</sup>	0.80 (0.74-0.85)	1.08 (0.97-1.25) <sup>a###</sup>	1.25 (1.08-1.63) <sup>a###,b#</sup>	<b>&lt;0.001</b>
SH grupe (mmol/L)	0.60 $\pm$ 0.12	0.56 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.18	0.082
TAS ( $\mu\text{mol/L}$ )	443 $\pm$ 157	598 $\pm$ 162 <sup>a***</sup>	771 $\pm$ 176 <sup>a***,b**</sup>	<b>&lt;0.001</b>
SOD (kU/L) <sup>&amp;</sup>	29.5 (28.6-31.0)	27.5 (22.4-34.0)	36.0 (29.0-58.5)	0.060
POazna aktivnost (U/L) <sup>&amp;</sup>	237 (193-417)	190 (171-321)	154 (121-202) <sup>a##</sup>	<b>&lt;0.01</b>
DZOazna aktivnost (U/L)	8868 $\pm$ 2732	7494 $\pm$ 3682	5984 $\pm$ 3778 <sup>a**</sup>	<b>0.001</b>
PAB (HK U) <sup>&amp;</sup>	379 (289-499)	587 (377-674) <sup>a#</sup>	324 (284-401) <sup>b#</sup>	<b>&lt;0.05</b>

Kontinuirani podaci sa normalnom raspodelom su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  S.D, odnosno kao medijana i interkvartilni raspon (<sup>&</sup>) <sup>a</sup> statistički značajno različito od kontrolne grupe; <sup>b</sup> statistički značajno različito od SHZ bez MetS; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Tukey's *post hoc* test); #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  (Mann-Whitney-ev test).

Primenom neparametarskog Kruskal-Wallis-ov testa utvrđeno je da se koncentracije TBKRS, kao parametra oksidativnog stresa, značajno razlikuju između ispitivanih grupa. Daljom analizom (upotrebom Mann-Whitney-evog neparametarskog testa) pokazano je da su koncentracije TBKRS statistički značajno veće u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, kao i dodatno u SHZ grupi sa MetS-om u odnosu na pacijente bez MetS-a, kao što se i očekivalo. Na osnovu rezultata statističke analize, može se uočiti značajna razlika u POaznim i DZOaznim aktivnostima između tri ispitivane podgrupe. Obe aktivnosti enzima PON1 su bile statistički značajno niže u grupi pacijenata sa MetS-om u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u POaznim i DZOaznim aktivnostima u SHZ grupi bez MetS-a u odnosu na kontrolnu grupu, kao ni i u odnosu na SHZ grupu sa MetS-om. Nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnostima antioksidativnog enzima SOD, kao ni u koncentracijama SH grupa između ispitivanih grupa.

Primenom analize varijanse (ANOVA) pokazana je statistički značajna razlika u nivoima TAS-a ispitivanih grupa. Tukey' s *post hoc* analizom je utvrđeno da je nivo TAS-a statistički značajno viši u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, kao i u grupi pacijenata sa MetS-om u odnosu na pacijente bez MetS-a. Rezultati Kruskal-Wallis-ovog neparametarskog testa, a zatim Mann-Whitney-eve *post hoc* analize, pokazali su da je nivo PAB-a bio statistički značajno veći u grupi pacijenata bez MetS-a u odnosu na kontrolnu grupu, kao i u odnosu na grupu pacijenata sa MetS-om. Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima PAB-a u grupi pacijenata sa MetS-om u odnosu na kontrolnu grupu.

Za poređenje koncentracije mikroelemenata u ispitivanim grupama korišćena je ANOVA, a značajnost razlike između podgrupa je određivana Tukey's *post hoc* analizom. Poređenjem koncentracija selena utvrđena je neočekivano statistički značajno veća koncentracija u grupi pacijenata sa MetS-om u poređenju sa grupom pacijenata bez MetS-a. Koncentracije bakra su bile statistički značajno veće u grupi pacijenata sa MetS-om u odnosu na kontrolnu grupu, bez statistički značajne razlike između podgrupa pacijenata u zavisnosti od prisustva MetS-a. Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama cinka između ispitivanih grupa (rezultat na granici statističke značajnosti) (Tabela 9).



**Tabela 9.** Poređenje koncentracija selena, bakra i cinka između kontrolne grupe, SHZ pacijenata sa i bez metaboličkog sindroma

Parametar	Kontrolna grupa	SHZ bez MetS	SHZ sa MetS	p
Selen ( $\mu\text{g/L}$ )	81.09 $\pm$ 16.41	75.38 $\pm$ 20.49	91.24 $\pm$ 30.81 <sup>b*</sup>	<0.05
Bakar (mg/L)	0.78 $\pm$ 0.34	0.92 $\pm$ 0.19	1.02 $\pm$ 0.38 <sup>a**</sup>	<0.001
Cink (mg/L)	0.96 $\pm$ 0.23	1.06 $\pm$ 0.27	1.08 $\pm$ 0.26	0.058

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  S.D.

<sup>a</sup> statistički značajno različito od kontrolne grupe

<sup>b</sup> statistički značajno različito od SHZ bez MetS

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Tukey's *post hoc* test)

#### 4.2.1. Korelacije između parametara oksidativno-stresnog statusa sa pojedinačnim komponentama metaboličkog sindroma u kontrolnoj grupi i SHZ grupi

Da bi se ispitalo eventualno postojanje korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa pojedinačnim komponentama MetS-a korišćena je metoda Spearman-ove neparametarske korelacione analize.

U kontrolnoj grupi je pokazano da su koncentracije TBKRS u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom glukoze. Koncentracija SH grupa bila je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa obimom struka i koncentracijom glukoze, dok je aktivnost antioksidativnog enzima SOD statistički značajno pozitivno korelirala sa koncentracijama HDL-H. Međutim, u kontrolnoj grupi neparametarska korelaciona analiza je pokazala da TAS, kao i aktivnost PON1, nisu u statistički značajnoj korelaciji ni sa jednom od komponenata metaboličkog sindroma. Statistička analiza je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju PAB-a sa obimom struka. Rezultati korelacione analize za kontrolnu grupu prikazani su u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza parametara oksidativno-stresnog statusa sa komponentama MetS u kontrolnoj grupi

Parametar	TBKRS ( $\mu\text{mol/L}$ )	SH ( $\text{mmol/L}$ )	TAS ( $\mu\text{mol/L}$ )	SOD ( $\text{kU/L}$ )	POaze ( $\text{U/L}$ )	DZOaze ( $\text{U/L}$ )	PAB ( $\text{HK U}$ )
Obim struka (cm)	0.099	0.409**	0.037	0.290*	-0.032	0.110	0.369**
Glukoza ( $\text{mmol/L}$ )	0.268*	0.421**	0.005	0.189	-0.093	-0.076	-0.187
TG ( $\text{mmol/L}$ )	0.100	0.144	-0.132	-0.060	0.122	0.056	-0.073
HDL-H ( $\text{mmol/L}$ )	0.012	-0.061	0.150	0.334*	0.081	-0.169	-0.037
SKP (mmHg)	-0.054	0.156	-0.092	0.128	0.016	0.122	0.001
DKP (mmHg)	0.101	0.076	-0.063	0.205	0.015	0.015	-0.001

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; U tabelama su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije

U grupi pacijenata sa shizofrenijom, primenom Spearman-ove neparametarske korelacione analize, koncentracije TBKRS su takođe pokazale značajnu pozitivnu korelaciju sa koncentracijama glukoze, ali i sa povećanjem broja komponentata metaboličkog sindroma (MetS skor). Koncentracije ukupnih SH grupa bile su u značajnoj korelaciji sa koncentracijama glukoze i TG, kao i MetS skorom. Vrednosti TAS-a, kao markera sveobuhvatne antioksidativne zaštite, su takođe bile u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa MetS skorom, kao i pojedinačno sa obimom struka, koncentracijama TG, vrednostima sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska. Aktivnost SOD je pozitivno korelirala sa koncentracijama TG i HDL-H. Takođe, utvrđeno je da je aktivnost enzima PON1 prema diazoksonu u negativnoj korelaciji sa MetS skorom u SHZ grupi. Statistička analiza je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju PAB-a sa koncentracijama glukoze, ali i negativnu korelaciju sa TG, kao i sa MetS skorom. Rezultati korelacione analize parametara oksidativno-stresnog statusa za grupu pacijenata sa shizofrenijom prikazani su u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza parametara oksidativno-stresnog statusa sa komponentama MetS u SHZ grupi

Parametar	TBKRS ( $\mu\text{mol/L}$ )	SH ( $\text{mmol/L}$ )	TAS ( $\mu\text{mol/L}$ )	SOD ( $\text{kU/L}$ )	POaze ( $\text{U/L}$ )	DZOaze ( $\text{U/L}$ )	PAB ( $\text{HK U}$ )
MetS skor	0.360**	0.314*	0.541***	0.266	-0.201	-0.304*	-0.400**
Obim struka (cm)	-0.045	0.222	0.388**	0.055	-0.159	-0.156	-0.208
Glukoza ( $\text{mmol/L}$ )	0.336**	0.267*	0.247	0.095	-0.135	-0.047	0.405**
TG ( $\text{mmol/L}$ )	0.149	0.453***	0.339*	0.361**	-0.076	-0.237	-0.274*
HDL-H ( $\text{mmol/L}$ )	0.204	0.051	0.183	0.280*	0.007	-0.097	-0.039
SKP (mmHg)	-0.077	0.153	0.340*	0.127	-0.061	-0.168	-0.130
DKP (mmHg)	0.096	0.102	0.426**	0.121	-0.166	-0.246	-0.160

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; U tabelama su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije

Rezultati Spearman-ove neparametarske korelacione analize između koncentracija mikroelemenata plazme sa pojedinačnim komponentama metaboličkog sindroma za kontrolnu grupu, kao i za grupu pacijenata sa shizofrenijom su prikazani u tabelama 12 i 13.

U grupi pacijenata sa shizofrenijom, koncentracije selena su bile u pozitivnoj korelaciji sa MetS skorom, obimom struka, koncentracijama glukoze i trigliceridima, dok je bakar pozitivno korelirao sa dijastolnim krvnim pritiskom i koncentracijama glukoze. U kontrolnoj grupi, jedino je uočena pozitivna korelacija bakra sa koncentracijama triglicerida. Koncentracije cinka, u obe ispitivane grupe, nisu bile u značajnoj korelaciji ni sa jednom komponentom metaboličkog sindroma.

**Tabela 12.** Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza koncentracija mikroelemenata sa komponentama MetS u kontrolnoj grupi

Parametar	Selen ( $\mu\text{g/L}$ )	Bakar ( $\text{mg/L}$ )	Cink ( $\text{mg/L}$ )
Obim struka (cm)	0.083	-0.139	0.214
Glukoza ( $\text{mmol/L}$ )	0.210	-0.042	0.094
TG ( $\text{mmol/L}$ )	-0.039	0.310*	0.180
HDL-H ( $\text{mmol/L}$ )	0.160	0.130	-0.172
SKP (mmHg)	0.094	0.092	0.181
DKP (mmHg)	0.079	-0.017	0.198

\* $p < 0.05$ , U tabeli su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije

**Tabela 13.** Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza koncentracija mikroelemenata sa komponentama MetS u SHZ grupi

Parametar	Selen ( $\mu\text{g/L}$ )	Bakar ( $\text{mg/L}$ )	Cink ( $\text{mg/L}$ )
MetS skor	0.443**	0.190	0.107
Obim struka (cm)	0.344*	0.207	0.073
Glukoza ( $\text{mmol/L}$ )	0.319*	0.263*	0.131
TG ( $\text{mmol/L}$ )	0.525***	0.114	0.041
HDL-H ( $\text{mmol/L}$ )	-0.179	0.091	-0.064
SKP (mmHg)	0.049	0.228	0.152
DKP (mmHg)	-0.011	0.272*	0.165

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; U tabeli su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije

#### 4.2.2. Poređenje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u SHZ grupi u zavisnosti od stepena udruženosti komponenti metaboličkog sindroma

Obzirom na prethodno utvrđenu statistički značajnu korelaciju većine parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa MetS skorom u SHZ grupi, u cilju daljeg ispitivanja uticaja MetS na razlike u oksidativno-stresnom statusu, upoređivani su parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između pacijenata sa shizofrenijom u zavisnosti od broja prisutnih komponenta MetS. U zavisnosti od MetS skora, pacijenti sa shizofrenijom su podeljeni u četiri podgrupe: grupa I (MetS skor  $\leq 1$ ; n=8), grupa II (MetS skor=2; n=20), grupa III (MetS skor=3; n=16) i grupa IV (MetS skor  $\geq 4$ ; n=16). U podgrupama pacijenata, na osnovu MetS skora, računate su medijane i interkvartilni rasponi za sve ispitivane parametre oksidativno-stresnog statusa, da bi se izbegle moguće greške nastale usled načina raspodele ovih parametara prilikom formiranja navedenih podgrupa, i za statističku analizu primenjen je neparametarski Kruskal-Wallis-ov test. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 14 (slika 13).

**Tabela 14.** Poređenje parametara oksidativno-stresnog statusa između pacijenata sa različitim stepenom udruženosti komponenti MetS

	I	II	III	IV	P
Broj ispitanika	8	20	16	16	
TBKRS (μmol/L)	1.14 (0.78-1.51)	1.07 (0.88-1.21)	1.08 (0.9-1.34)	1.69 (1.22-2.05) a*,b**,c**	<b>&lt;0.01</b>
SH grupe (mmol/L)	0.54 (0.45-0.69)	0.58 (0.44-0.65)	0.49 (0.43-0.64)	0.74 (0.63-0.88) a*, b**,c**	<b>&lt;0.01</b>
TAS (μmol/L)	555 (390-638)	652 (568-714)	672 (609-783)	858 (698-1014) a**,b**	<b>0.001</b>
SOD (kU/L)	27 (20-31)	27 (22-37)	37 (31-58)	35 (22-77)	0.084
Poaze (U/L)	285 (162-573)	190 (159-316)	141 (76-210)	194 (99- 304)	0.230
DZOaze (U/L)	8139 (5540-11083)	6928 (4732-10067)	7446 (3616-10489)	4860 (2399-6364)	0.142
PAB (HK U)	676 (402-819)	569 (313-665)	415 (299-616)	283 (236-333) a*,b*,c*	<b>&lt;0.05</b>

Rezultati su predstavljeni kao medijana i interkvartilni raspon. <sup>a</sup> statistički značajno različito od podgrupe I; <sup>b</sup> statistički značajno različito od podgrupe II; <sup>c</sup> statistički značajno različito od podgrupe III \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (Mann-Whitney-ev test).

Neparametarskim Kruskal-Wallis-ovim testom, poređenjem parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata sa shizofrenijom, pokazano je da se vrednosti TBKRS, SH grupa, TAS-a, kao i PAB-a statistički značajno razlikuju između različitih podgrupa u zavisnosti od broja MetS komponenti. Daljom statističkom analizom, primenom Mann-Whitney neparametarskog testa, utvrđeno je da su koncentracije TBKRS statistički značajno veće kod pacijenata u podgrupi IV u odnosu na pacijente u ostalim podgrupama. S druge strane, utvrđeno je da su koncentracije ukupnih SH grupa takođe statistički značajno veće u podgrupi IV u odnosu na ostale podgrupe pacijenata. Zatim, nivo TAS-a kod pacijenata u podgrupi IV je bio statistički značajno viši u odnosu na pacijente u podgrupama I i II. Međutim, statističkom analizom nije pokazano da povećanje broja komponenata metaboličkog sindroma značajno utiče na aktivnost enzimske antioksidativne zaštite, kako na nivo aktivnosti SOD, tako ni na aktivnosti enzima PON1 u analiziranim SHZ grupama. U skladu sa utvrđenim promenama parametara oksidativnog stresa i neenzimske antioksidativne zaštite, rezultati Kruskal-Wallis-ovog testa i kasnije Mann-Whitney *post hoc* analize, pokazali su da su vrednosti PAB kod pacijenata u podgrupi IV statistički značajno niže u odnosu na ostale podgrupe pacijenata.

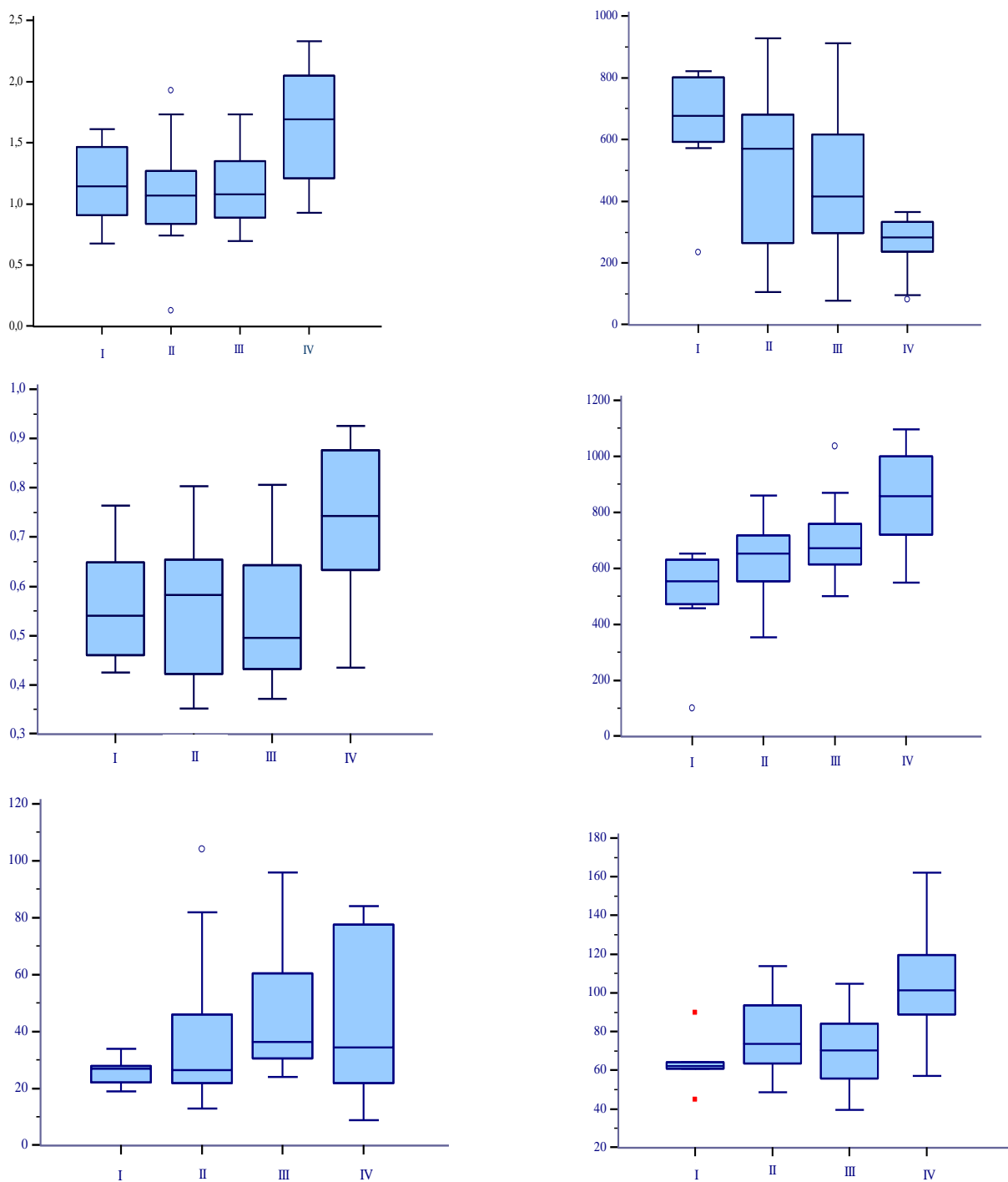
Koncentracije selena, bakra i cinka u plazmi pacijenata sa shizofrenijom u zavisnosti od broja komponenata MetS-a prikazane su u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Poređenje parametara oksidativno-stresnog statusa između pacijenata sa različitim stepenom udruženosti komponenti MetS

Parametar	I	II	III	IV	P
Selen (µg/L)	62.0 (48.2-85.1)	73.6 (62.9-95.0)	70.4 (54.4-89.6)	101.3 (89.8-117.4) a***, b**,c***	<0.001
Bakar (mg/L)	0.90 (0.66-1.05)	0.91 (0.85-1.04)	0.87 (0.68-1.03)	1.03 (0.92-1.29)	0.130
Cink (mg/L)	1.00 (0.78-1.29)	1.00 (0.95-1.13)	1.10 (0.92-1.28)	1.06 (0.95-1.13)	0.691

Rezultati su predstavljeni kao medijana i interkvartilni raspon (\*). <sup>a</sup> statistički značajno različito od podgrupe I; <sup>b</sup> statistički značajno različito od podgrupe II; <sup>c</sup> statistički značajno različito od podgrupe III \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (Mann-Whitney-ev test)

Na osnovu rezultata Kruskal-Wallis-ovog testa, a zatim Mann-Whitney-eve *post hoc* analize, pokazano je da su koncentracije selena bile statistički značajno veće u grupi IV u odnosu na ostale podgrupe (slika 13). Iako je uočeno blago povećanje koncentracije bakra i cinka sa povećanjem MetS skora ove razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 13).



**Slika 13.** Grafički prikaz odnosa parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na broj komponenata metaboličkog sindroma. Rezultati su predstavljeni „box and whisker“ dijagramima.



### 4.3. Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U okviru ovog dela istraživanja, ispitivan je uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u grupi pacijenata sa shizofrenijom, kao i u grupi zdravih ispitanika. Takođe, ispitivan je i uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na antropometrijske i biohemijske parametre, kao i na koncentracije mikroelemenata u ispitivanim grupama. Osim toga, određivane su i koncentracije leptina i adiponektina u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Antropometrijska merenja, biohemijske analize i određivanje svih ispitivanih parametara urađeno je na početku, posle 45 i 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom.

#### 4.3.1. Opšti podaci o ispitanicima

Kao što je napred navedno, istraživanjem suplementacije alfa-liponskom kiselinom je obuhvaćeno 18 pacijenata sa shizofrenijom, kao i 38 zdravih ispitanika. Osnovni demografski podaci ispitivanih grupa i kliničke karakteristike pacijenata sa shizofrenijom prikazani su u tabeli 16.

**Tabela 16.** Osnovni demografski i klinički podaci ispitivanih grupa

	SHZ grupa	Kontrolna grupa	P
Muškarci, n (%)	8 (44%)	12 (32%)	0.348
Žene, n (%)	10 (56%)	26 (68%)	
Starost (godine)	39.7 ± 8.4	41.1 ± 10.6	0.629
ITM, kg/m <sup>2</sup>	26.7 ± 5.4	24.9 ± 3.2	0.140
Pušači, n (%)	10 (55.6 %)	15 (39.5 %)	0.258
Dužina bolesti (godine)	11.4 ± 5.4	-	-
CGI-težina bolesti	3.6 ± 0.7	-	-
Doza leka (HPE mg/dan)	435 ± 358	-	-

CGI, skala opšteg kliničkog utiska; HPE, hlorpromazin ekvivalenti; Kontinuirani podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± S.D. Kategorički podaci su predstavljeni kao apsolutne frekvence.

Između ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike u distribuciji godina, pola, statusa pušenja. Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u bazalnim vrednostima ITM između pacijenata i kontrolne grupe.

#### 4.3.2. Antropometrijski i biohemijski parametri

Osnovni antropometrijski i biohemijski parametri ispitivanih grupa na početku studije, posle 45 dana i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom prikazani su u tabelama 17 i 18.

**Tabela 17.** Antropometrijski parametri i vrednosti krvnog pritiska: pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa shizofrenijom

	0 dan	45 dan	90 dan	S	S x G
<b>ITM, kg/m<sup>2</sup></b>					
Kontrolna grupa	24.9 ± 3.2	24.8 ± 3.3	24.4 ± 3.5 <sup>**,##</sup>	<b>&lt;0.05</b>	0.065
SHZ grupa	26.7 ± 5.4	26.6 ± 5.5	26.6 ± 5.4		
<b>Masno tkivo, %</b>					
Kontrolna grupa	30.8 ± 7.4	27.2 ± 8.7 <sup>**</sup>	25.8 ± 8.2 <sup>***</sup>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>
SHZ grupa	31.0 ± 8.9	32.5 ± 11.3	30.5 ± 9.8		
<b>Obim struka, cm</b>					
Kontrolna grupa	88.1 ± 10.5	85.7 ± 9.9 <sup>**</sup>	84.1 ± 11.3 <sup>***</sup>	<b>&lt;0.001</b>	0.140
SHZ grupa	98.6 ± 15.7 <sup>aa</sup>	96.5 ± 16.33 <sup>aa</sup>	96.9 ± 16,4 <sup>aa</sup>		
<b>S/K</b>					
Kontrolna grupa	0.82 ± 0.08	0.81 ± 0.07	0.81 ± 0.07	0.106	0.675
SHZ grupa	0.88 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.09 <sup>a</sup>		

*Nastavak table je na sledećoj strani*

<b>Sistolni KP, mmHg</b>					
Kontrolna grupa	124 ± 14.9	114 ± 16.9 <sup>***</sup>	110 ± 15.4 <sup>***</sup>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.01</b>
SHZ grupa	113 ± 14.4 <sup>a</sup>	113 ± 14.8	115 ± 13.9		
<b>Dijastolni KP, mmHg</b>					
Kontrolna grupa	81.4 ± 8.5	75.1 ± 10.5 <sup>a**</sup>	76.4 ± 9.2	<b>&lt;0.001</b>	0.828
SHZ grupa	81.8 ± 12.2	74.1 ± 7.1	78.5 ± 7.7		

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D. S-uticaj suplementacije, SxG-interakcija suplementacije i grupe. P<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*), i p<0.001 (\*\*\*): značajna razlika u odnosu na 0 dan. p<0.05 (#), p<0.01 (##) i p<0.001 (###): značajna razlika u odnosu na 45 dan. p<0.05 (<sup>a</sup>), p<0.01 (<sup>aa</sup>) i p<0.001 (<sup>aaa</sup>): značajna razlika između grupa u istom vremenskom intervalu.

Iako na početku studije, između ispitivanih grupa nije bilo statistički značajne razlike u ITM i procentu masnog tkiva, u grupi pacijenata sa shizofrenijom utvrđene su veće vrednosti obima struka i odnosa struk/kuk u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinovana analiza varijanse ponovljenih merenja je pokazala značajnu promenu u periodu suplementacije alfa-liponskom kiselinom u ITM, procentu masnog tkiva i obimu struka (p<0.05, p<0.01 i p<0.001, redom). Pokazan je značajan uticaj interakcije suplementacije i grupe (p<0.01) na procenat masnog tkiva. *Post hoc* analiza je pokazala značajno smanjenje procenta masnog tkiva u kontrolnoj grupi, ali ne i u SHZ tokom perioda suplementacije.

Na početku studije, utvrđene su značajno više bazalne vrednosti sistolnog KP u kontrolnoj grupi. Statistička analiza je pokazala značajan uticaj suplementacije (p<0.001), kao i značajan uticaj interakcije suplementacije i grupe (p<0.01) na vrednosti sistolnog KP. Naime, *post hoc* analizom je utvrđeno značajno smanjenje sistolnog KP u kontrolnoj grupi, ali ne i u grupi pacijenata sa shizofrenijom (Tabela 17).

**Tabela 18.** Osnovni biokemijski parametri: pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa shizofrenijom

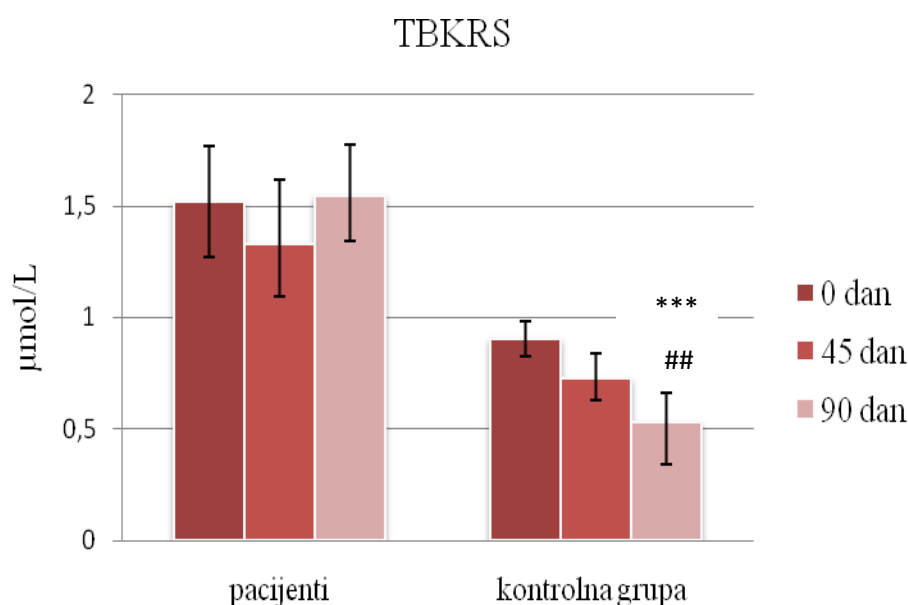
	0 dan	45 dan	90 dan	S	S x G
<b>Glukoza<sup>&amp;</sup>, mmol/L</b>					
Kontrolna grupa	5.15 (4.99-5.31)	5.46 (5.29-5.64) <sup>*</sup>	5.54 (5.35-5.75) <sup>**</sup>	< 0.001	<0.001
SHZ grupa	6.01 (5.40-6.67) <sup>aaa</sup>	5.42 (5.17-5.69) <sup>*</sup>	5.29 (5.01-5.58) <sup>**</sup>		
<b>T-holesterol, mmol/L</b>					
Kontrolna grupa	6.09 ± 1.28	5.95 ± 1.27	6.36 ± 1.29 <sup>#</sup>	0.470	0.071
SHZ grupa	6.36 ± 1.38	6.39 ± 1.78	6.18 ± 1.54		
<b>HDL-holesterol, mmol/L</b>					
Kontrolna grupa	1.44 ± 0.34	1.52 ± 0.44	1.35 ± 0.31 <sup>#</sup>	<0.05	0.646
SHZ grupa	1.19 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.39 <sup>a</sup>		
<b>LDL-holesterol, mmol/L</b>					
Kontrolna grupa	4.13 ± 0.99	4.00 ± 0.99	4.49 ± 1.02 <sup>#</sup>	0.182	<0.05
SHZ grupa	3.99 ± 0.86	4.16 ± 1.55	3.96 ± 1.30		
<b>Trigliceridi<sup>&amp;</sup>, mmol/L</b>					
Kontrolna grupa	1.23 (1.09-1.39)	1.16 (0.94-1.44)	1.31 (1.13-1.52)	0.810	0.359
SHZ grupa	1.91 (1.18-3.09) <sup>a</sup>	2.05 (1.41-2.99) <sup>aa</sup>	1.93 (1.36-2.74) <sup>a</sup>		
<b>Mokraćna kiselina, μmol/L</b>					
Kontrolna grupa	334 ± 145.6	211 ± 94.2 <sup>***</sup>	320 ± 122.6 <sup>###</sup>	<0.001	< 0.01
SHZ grupa	333 ± 181.7	315 ± 200.1 <sup>a</sup>	309 ± 120.4		

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija; <sup>&</sup>- geometrijske srednje vrednosti i interval pouzdanosti za log-normalnu raspodelu. S-uticaj suplementacije, SxG-uticaj interakcije suplementacije i grupe. P<0.05 (<sup>\*</sup>), p<0.01 (<sup>\*\*</sup>) i p<0.001 (<sup>\*\*\*</sup>): značajna razlika u odnosu na 0 dan. P<0.05 (<sup>#</sup>), p<0.01 (<sup>##</sup>) i p<0.001 (<sup>###</sup>): značajna razlika u odnosu na 45 dan. P<0.05 (<sup>a</sup>), p<0.01 (<sup>aa</sup>) i p<0.001 (<sup>aaa</sup>): značajna razlika između grupa u istom vremenskom intervalu.

Pacijenti sa shizofrenijom su imali značajno veće bazalne koncentracije glukoze ( $p < 0.001$ ) i TG ( $p < 0.05$ ), kao i značajno niže koncentracije HDL-H ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinovanom analizom varijanse ponovljenih merenja, pokazan je značajan uticaj suplementacije ( $p < 0.001$ ), kao i značajna interakcija suplementacije i grupe ( $p < 0.001$ ) na koncentracije glukoze u serumu. Nakon 45 dana, kao i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom, uočeno je značajno smanjenje glukoze u SHZ grupi ( $p < 0.05$  i  $p < 0.01$ , redom, Bonferoni test). Sa druge strane, u kontrolnoj grupi utvrđeno je značajno povećanje u koncentracijama glukoze u odnosu na bazalne vrednosti ( $p < 0.05$  i  $p < 0.01$ , redom, Bonferoni test), iako su ove promene bile u opsegu referentnih vrednosti. Takođe, statističkom analizom je utvrđena značajna promena u koncentracijama HDL-H tokom perioda suplementacije. *Post hoc* analizom, uočeno je značajno smanjenje koncentracije HDL-H u kontrolnoj grupi, nakon 90 dana u odnosu na 45 dan suplementacije ( $p < 0.05$ ). Ove promene u kontrolnoj grupi su praćene povećanjem koncentracije LDL-H na kraju perioda suplementacije u odnosu na bazalne vrednosti ( $p < 0.05$ , Bonferoni test). Kombinovana ANOVA ponovljenih merenja je pokazala statistički značajan uticaj suplementacije ( $p < 0.001$ ), kao i značajan uticaj interakcije suplementacije i grupe ( $p < 0.01$ ) na koncentracije mokraćne kiseline u serumu. Nakon inicijalnog smanjenja mokraćne kiseline nakon 45 dana ( $p < 0.001$ , Bonferoni test), utvrđeno je značajno povećanje koncentracija mokraćne kiseline posle 90 dana suplementacije u kontrolnoj grupi ( $p < 0.001$ , Bonferoni test), ali ne i u grupi pacijenata sa shizofrenijom.

### 4.3.3. Parametri oksidativnog stresa

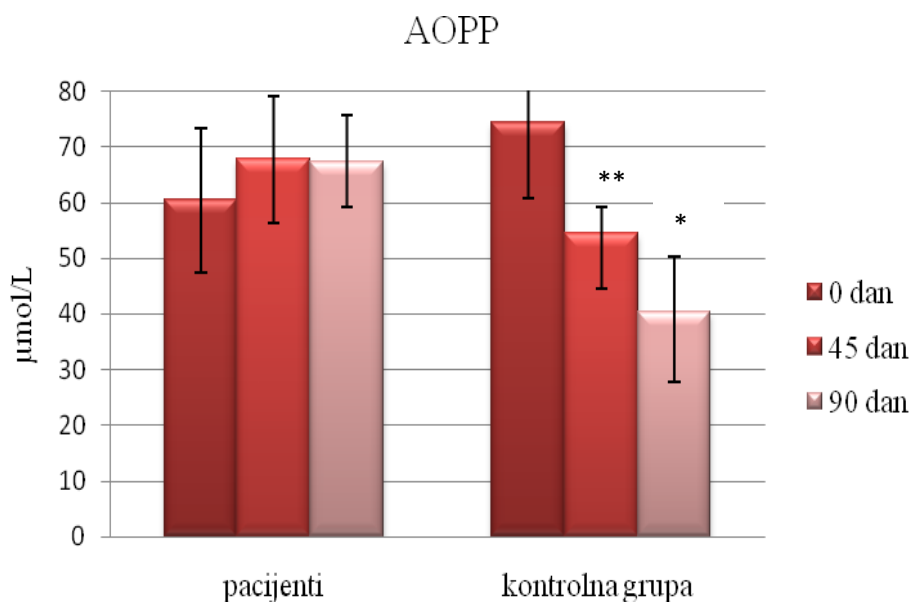
U cilju utvrđivanja uticaja suplementacije LA na nivo oksidativnog stresa, određivane su koncentracije TBKRS, AOPP i nivo  $O_2^{\bullet-}$  u plazmi.



**Slika 14.** Koncentracije TBKRS pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije liponskom kiselinom u SHZ grupi i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i interval pouzdanosti.  $p < 0.001$  (\*\*\*) značajna razlika u odnosu na 0 dan.  $p < 0.01$  (##) značajna razlika u odnosu na 45 dan.

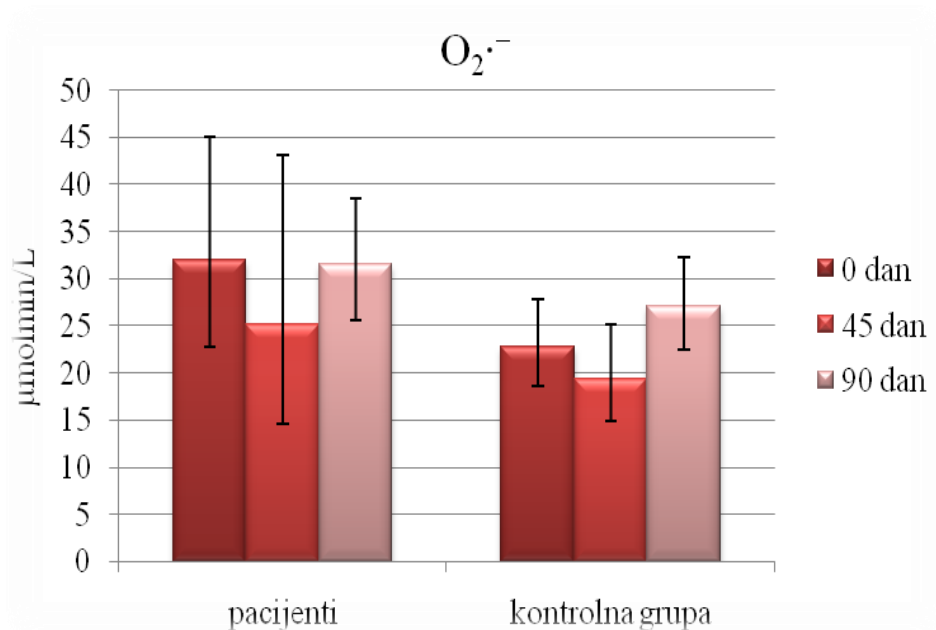
Kombinovana ANOVA ponovljenih merenja je pokazala statistički značajan uticaj suplementacije ( $p < 0.001$ ), kao i interakciju suplementacije i grupe ( $p < 0.01$ ) na koncentracije TBKRS. Nakon 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom, utvrđen je značajan pad koncentracije TBKRS u kontrolnoj grupi u odnosu na koncentracije pre i nakon 45 dana suplementacije ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , redom, Bonferroni test), dok promene u grupi pacijenata sa shizofrenijom nisu bile statistički značajne. Grupa pacijenata sa shizofrenijom imala je statistički značajno veće bazalne koncentracije TBKRS ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu.

Kombinovana ANOVA ponovljenih merenja je takođe pokazala značajan efekat interakcije suplementacije i grupe ( $p < 0.01$ ) i na koncentracije AOPP, kao markera oksidativnog oštećenja proteina. Uočeno je smanjenje koncentracija AOPP u kontrolnoj grupi nakon 45 i 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u odnosu na bazalne koncentracije ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , redom, Bonferoni test), dok promene u grupi pacijenata sa shizofrenijom nisu bile statistički značajne. Bazalne koncentracije AOPP bile su veće u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu pacijenata sa shizofrenijom, međutim ova razlika nije bila statistički značajna.



**Slika 15.** Koncentracije AOPP pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije liponskom kiselinom u SHZ grupi i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i interval pouzdanosti.  $P < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0.05$  (\*) značajna razlika u odnosu na 0 dan.

U grupi pacijenata sa shizofrenijom utvrđeni su viši bazalni nivoi  $O_2^{\bullet-}$  u plazmi u odnosu na kontrolnu grupu, iako ova razlika nije bila statistički značajna. Kombinovanom ANOVA analizom ponovljenih merenja nisu utvrđene značajne promene u nivoima  $O_2^{\bullet-}$  u plazmi tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom, u obe ispitivane grupe (slika 16).



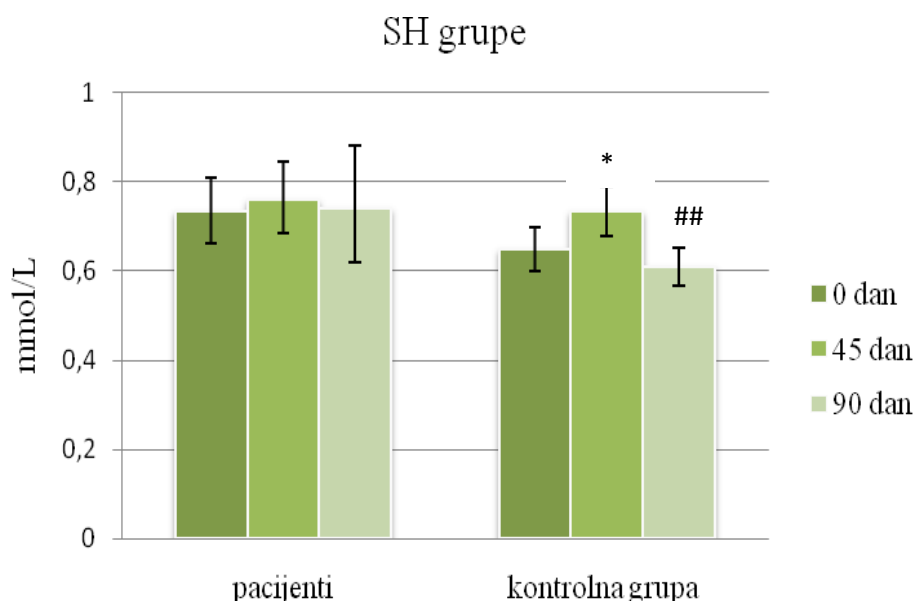
**Slika 16.** Koncentracije  $O_2^{\cdot-}$  u plazmi pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije LA u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.

#### 4.3.4. Parametri antioksidativne zaštite

Endogena antioksidativna zaštita organizma obuhvata enzimске i neenzimske antioksidanse. Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na antioksidativnu zaštitu određivan je određivanjem ukupnog sadržaja SH grupa, aktivnosti enzima SOD i PON1, kao i određivanjem TAS-a. Takođe, u obe ispitivane grupe određivane su i koncentracije selena, bakra i cinka.



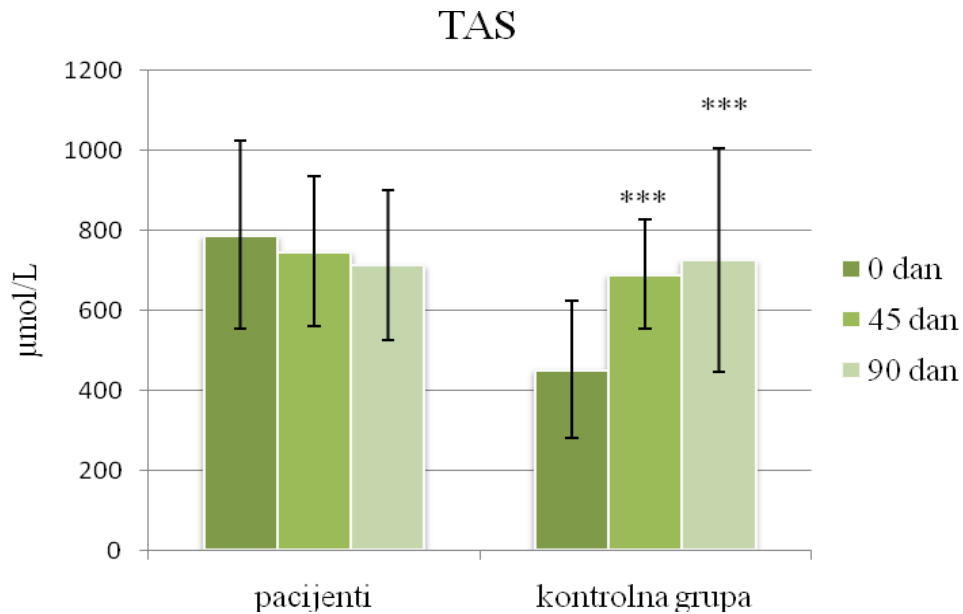
Ukupne SH grupe proteina su integralni deo neenzimske antioksidativne zaštite i imaju važnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže u organizmu.



**Slika 17.** Ukupni sadržaj SH grupa pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.  $P < 0.05$  (\*) značajna razlika u odnosu na 0 dan;  $p < 0.01$  (##) značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Na početku studije utvrđene su značajno veće koncentracije ukupnih SH grupa ( $p < 0.01$ ) u grupi pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinovana ANOVA ponovljenih merenja je pokazala statistički značajan uticaj suplementacije ( $p < 0.05$ ) na koncentracije ukupnih SH grupa. U kontrolnoj grupi, nakon inicijalnog povećanja ( $p < 0.05$ ), uočeno je značajno smanjenje koncentracija SH grupa do nivoa bazalnih vrednosti na kraju studije ( $p < 0.01$ ). Promene u koncentracijama ukupnih SH grupa kod pacijenata sa shizofrenijom nisu bile statistički značajne (slika 17).

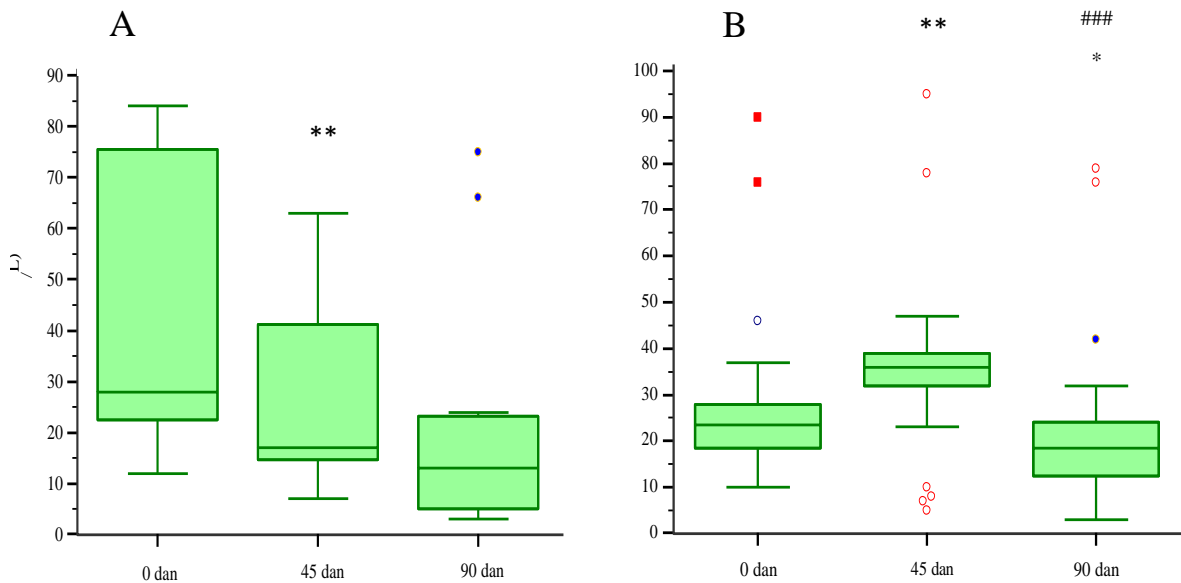
TAS predstavlja marker sveobuhvatne antioksidativne zaštite u plazmi. Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na vrednosti TAS plazme u ispitivanim grupama, tokom perioda od 90 dana prikazan je na slici 18.



**Slika 18.** TAS pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.  $P < 0.001$  (\*\*\*) značajna razlika u odnosu na 0 dan.

Kombinovana ANOVA ponovljenih merenja je pokazala značajan efekat suplementacije alfa-liponskom kiselinom ( $p < 0.01$ ), kao i značajan efekat interakcije suplementacije i grupe ( $p < 0.05$ ) na vrednosti TAS plazme. Uočeno je značajno povećanje TAS u kontrolnoj grupi nakon 45 i 90 dana suplementacije u odnosu na bazalne vrednosti ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ , redom, Bonferoni test), dok promene u grupi pacijenata sa shizofrenijom nisu bile statistički značajne. Na početku studije kod pacijenata sa shizofrenijom su utvrđene značajno više vrednosti TAS plazme ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu.

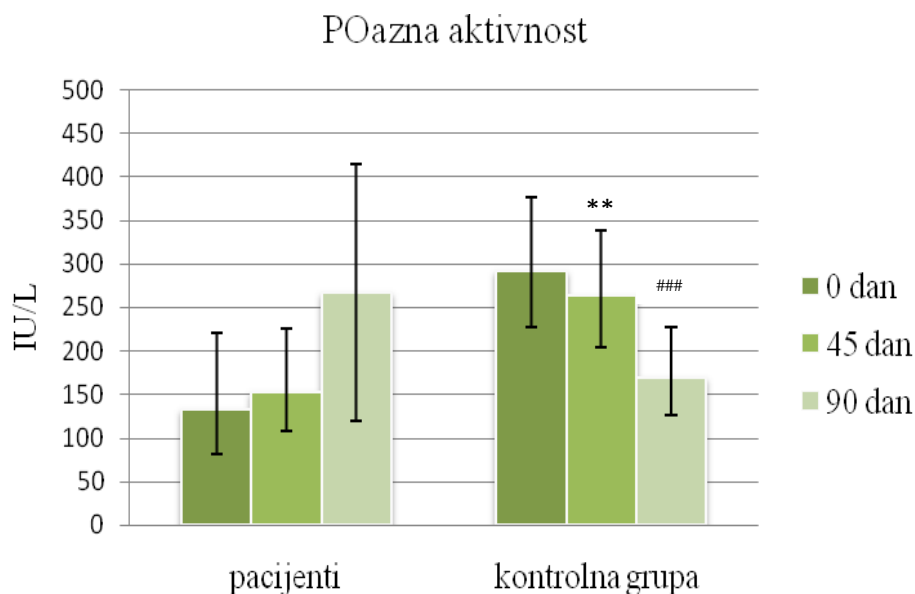
Superoksid dismutaza je metaloenzim koji neutrališe superoksidni anjon i zajedno sa ostalim antioksidativnim enzimima, predstavlja primarni nivo antioksidativne zaštite organizma. Promene aktivnosti SOD u plazmi tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom u ispitivanim grupama prikazana je na slici 19.



**Slika 19.** Aktivnost SOD pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom (A) i kontrolnoj grupi (B). Rezultati su predstavljeni „box and whisker“ dijagramima;  $P < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), značajna razlika u odnosu na 0 dan;  $p < 0.001$  (###) značajna razlika u odnosu na 45 dan (Wilcoxon-ov test označenih rangova)

Primenom Friedmanovog neparametarskog ANOVA testa, a zatim Wilcoxon-ovim testom označenih rangova, pokazano je značajno smanjenje aktivnosti SOD u grupi pacijenata sa shizofrenijom nakon 45 dana suplementacije u odnosu na bazalne vrednosti ( $p < 0.01$ ). Neparametarskom statističkom analizom ponovljenih merenja takođe je utvrđena značajna promena u aktivnostima SOD i u kontrolnoj grupi tokom perioda suplementacije ( $p < 0.001$ ). Wilcoxon-ovim neparametarskim testom utvrđeno je najpre značajno povećanje aktivnosti SOD nakon 45 dana ( $p < 0.01$ ), a zatim nakon 90 dana uočeno je značajno smanjenje aktivnosti SOD u odnosu na 45 dan, kao i u odnosu na bazalnu aktivnost ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ , redom, Wilcoxon-ov test označenih rangova).

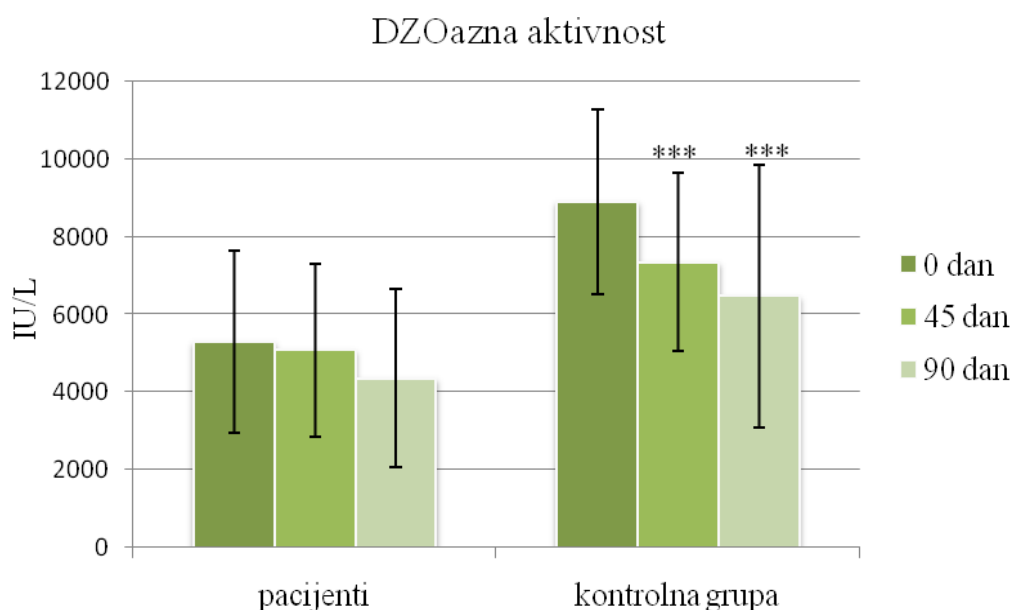
Kao što je napred pomenuto, PON1 status podrazumeva određivanje aktivnosti enzima PON1 prema dva različita nefiziološka supstrata, paraoksonu (paraoksonazna, POazna aktivnost) i diazoksonu (diazoksonazna, DZOazna aktivnost). Promene u statusu PON1 enzima tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom u ispitivanim grupama prikazane su na slikama 20 i 21.



**Slika 20.** POazna aktivnost pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.  $P < 0.01$  (\*\*): značajna razlika u odnosu na 0 dan.  $P < 0.001$  (###) značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Pre početka studije, kao i nakon 45 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom, pacijenti sa shizofrenijom su imali značajno manje aktivnosti PON1 prema paraoksonu u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Statistička analiza kombinovane varijanse ponovljenih merenja je pokazala značajne promene u POaznoj aktivnosti tokom perioda suplementacije ( $p < 0.05$ ), kao i značajnu interakciju suplementacije i grupe na POaznu aktivnost ( $p < 0.01$ ). Nakon 90 dana suplementacije, uočeno je značajno smanjenje PON1 aktivnosti prema paraoksonu u kontrolnoj grupi, u poređenju sa bazalnom aktivnošću, kao i aktivnošću posle 45 dana suplementacije ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , redom, Bonferoni test). Promene POazne aktivnosti, iako je zabeležen trend povećanja aktivnosti, u grupi pacijenata sa shizofrenijom nisu bile statistički značajne.

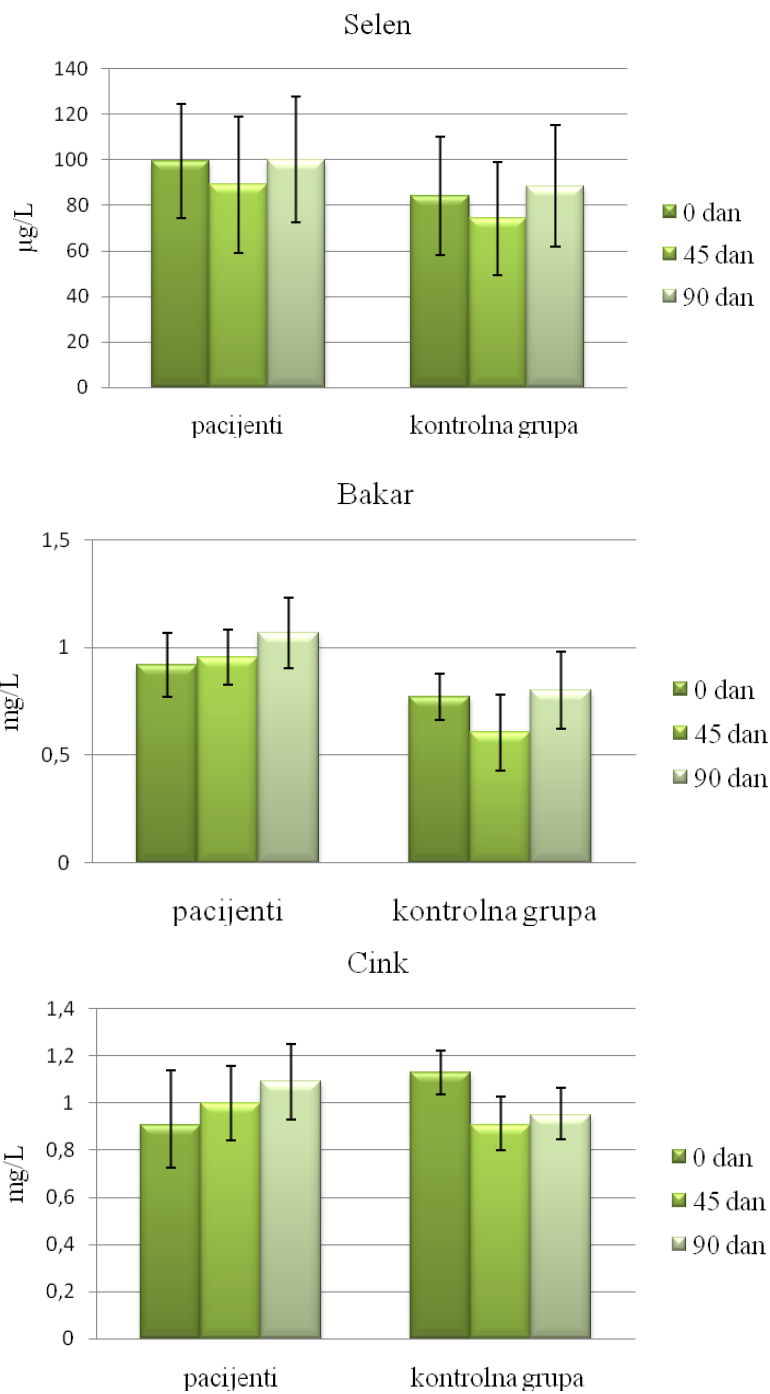
Takođe, kombinovana ANOVA ponovljenih merenja je pokazala značajne promene u DZOaznoj aktivnosti tokom perioda suplementacije ( $p < 0.01$ ) (Slika 21.)



**Slika 21.** DZOazna aktivnost pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.  $P < 0.001$  (\*\*\*) : značajna razlika u odnosu na 0 dan.

Nakon 45 i 90 dana suplementacije, uočeno je značajno smanjenje PON1 aktivnosti prema diazaoksonu u kontrolnoj grupi u poređenju sa bazalnom aktivnošću ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ , redom, Bonferoni test). Iako je i u grupi pacijenata sa shizofrenijom, uočeno blago smanjenje aktivnosti PON1 aktivnosti prema diazaoksonu, ove promene nisu bile statistički značajne. Tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom, DZOazne aktivnosti u grupi pacijenata sa shizofrenijom su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , redom, Bonferoni test).

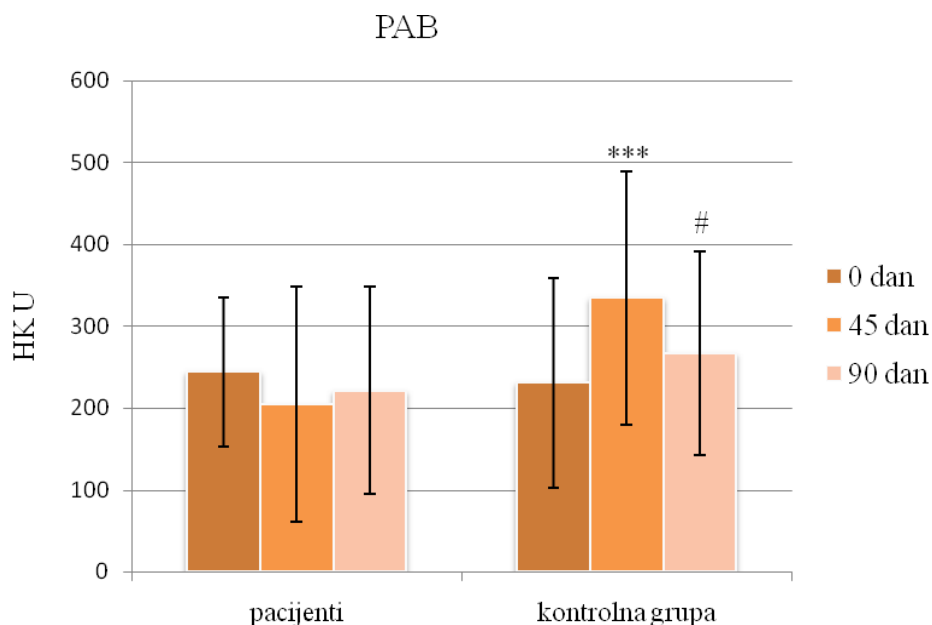
Primenom kombinovane analize varijanse ponovljenih merenja, nisu utvrđene statistički značajne promene u koncentracijama selena, bakra i cinka u periodu od 90 dana, u obe ispitivane grupe (Slika 22).



**Slika 22.** Koncentracije selena, bakra i cinka u plazmi pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije LA u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Koncentracije selena su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  S:D., dok su koncentracije cinka i bakra predstavljene kao geometrijska sredina i interval pouzdanosti.

#### 4.3.5. Prooksidativno-antioksidativni balans

Promene u vrednostima PAB-a, koji predstavlja parametar ravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa u plazmi, tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom u ispitivanim grupama prikazane su na slici 23.



**Slika 23.** Vrednosti PAB-a pre, 45 dana i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom i kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D.;  $p < 0.001$  (\*\*\*) : značajna razlika u odnosu na 0 dan.  $p < 0.05$  (#) : značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Na osnovu kombinovane analize varijanse ponovljenih merenja, uočena je statistički značajna interakcija suplementacije i grupe ( $p < 0.01$ ) na vrednosti PAB. U kontrolnoj grupi, nakon inicijalnog povećanja vrednosti PAB ( $p < 0.001$ , Bonferoni test), utvrđeno je značajno smanjenje nivoa PAB u odnosu na 45 dan suplementacije ( $p < 0.05$ , Bonferoni test). Između bazalnih vrednosti PAB-a u ispitivanim grupama nije bilo statistički značajne razlike.

#### 4.3.6. Uticaj suplementacije LA na koncentracije leptina i adiponektina u SHZ grupi

Leptin i adiponektin imaju značajnu ulogu u regulaciji telesne težine i insulinske osetljivosti. Kod pacijenata sa shizofrenijom, poređenjem koncentracija leptina, analizom varijanse ponovljenih merenja je utvrđeno da se koncentracije ovog adipokina nisu statistički značajno razlikovale tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom. Međutim, statističkom analizom je uočena značajna promena u koncentracijama adiponektina. *Post hoc* analizom utvrđeno je statistički značajno povećanje koncentracije adiponektina nakon 90 dana suplementacije u odnosu na bazalne vrednosti ( $p < 0,05$ , Bonferoni test). Promene u koncentracijama leptina i adiponektina kod pacijenata sa shizofrenijom tokom suplementacije alfa-liponskom kiselinom prikazane su u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Koncentracije leptina i adiponektina na početku studije, posle 45 i posle 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom u grupi pacijenata sa shizofrenijom

	0 dan	45 dan	90 dan	p
Leptin (ng/mL)	6.89 (3.92-9.87)	6.94 (4.15-9.73)	6.78 (3.72-9.85)	0.968
Adiponektin (ng/mL)	8135 (5672-11666)	10308 (7712-13777)	12793 (9917-16503) <sup>a*</sup>	<0.05

Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i interval pouzdanosti

<sup>a</sup> statistički značajno različito od 0 dana

\* $p < 0.05$ , (Bonferoni *post hoc* test)



## **5. DISKUSIJA**

## 5.1. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije

Oksidativni stres u shizofreniji je predmet velikog broja istraživanja. Uprkos veoma različitim rezultatima, koji ukazuju na heterogenu simptomatologiju i tok shizofrenije s jedne, i kompleksnost mehanizama uključenih u povećanu produkciju slobodnih radikala s druge strane, sve je veći broj dokaza koji podržavaju ulogu oksidativnog stresa u patofiziologiji shizofrenije (222).

U fiziološkim uslovima najveće količine slobodnih radikala u CNS nastaju tokom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, kao i metabolizmom neurotransmitera, uključujući dopamin i glutamat, koji su od posebnog značaja u patofiziologiji shizofrenije. Relativno nizak stepen antioksidativne zaštite mozga, u poređenju sa drugim organima, ima zadatak da održava redoks ravnotežu i onemogućuje štetno delovanje slobodnih radikala na moždane strukture i funkcije. Ovo protektivno delovanje ostvaruje se višestrukim mehanizmima, koji uključuju udruženo delovanje antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidanasa.

Aktuelni pretpostavljeni mehanizmi kojima se pokušava objasniti povećana produkcija slobodnih radikala u shizofreniji uključuju stimulaciju mitohondrijalne aktivnosti kao posledicu poremećaja homeostaze glukoze, koja predstavlja glavni izvor energije u CNS, s jedne strane ali i poremećaje na nivou respiratornog lanca elektrona u mitohondrijama, koje su posebno osetljive na oksidativna oštećenja, s druge strane. Poremećaji u oksidativnoj fosforilaciji dalje, posledično dovode do promena u sintezi i oslobađanju neurotransmitera, smanjenja reparacije DNK i apoptoze. Takođe, poznato je da je shizofrenija povezana sa imunološkom disfunkcijom, uključujući povećanu produkciju inflamatornih citokina (223). Inflamacija može dodatno povećati proizvodnju slobodnih radikala, i obrnuto.

Izmenjena enzimaska antioksidativna aktivnost, redukovani nivo neenzimskih antioksidanasa, kao i povećani stepen lipidne peroksidacije utvrđen je u akutnoj psihotičnoj epizodi ali i kod klinički stabilnih i dugotrajno lečenih pacijenata sa shizofrenijom (87).

Da bi se potvrdila početna pretpostavka da se pacijenti sa shizofrenijom nalaze u stanju hroničnog oksidativnog stresa, u ovom istraživanju je određivana koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS), završnih produkata lipidne peroksidacije, koje predstavljaju najčešće određivani parametar oksidativnog stresa u shizofreniji (224). U našem istraživanju, pacijenti sa shizofrenijom su imali značajno veće koncentracije TBKRS u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovaj rezultat, je u skladu sa

prethodnim mnogobrojnim studijama koje su proučavale stepen lipidne peroksidacije kod pacijenata sa shizofrenijom (121). Dodatno, treba istaći da među ispitivanim grupama u našem istraživanju, nije bilo značajne razlike u statusu pušenja, obzirom da pušenje, kao i način ishrane, mogu da utiču na koncentracije TBKRS (121, 224).

SOD je antioksidativni enzim koji neutrališe superoksidni anjon prevodeći ga u vodonik peroksid. Dosadašnji rezultati studija koje su proučavale ovaj enzim antioksidativne zaštite kod pacijenata sa shizofrenijom su veoma različiti. Meta-analiza vrednosti parametara oksidativnog stresa od strane Flatow i saradnika je pokazala da je nivo aktivnosti SOD u plazmi značajno povećan u prvoj psihotičnoj epizodi, ali značajno smanjen kod klinički stabilnih pacijenata na antipsihotičnoj terapiji u odnosu na kontrolnu grupu. S druge strane, aktivnost SOD u eritrocitima je značajno smanjena tokom prve psihotične epizode, relapsa, kao i u stabilnoj fazi shizofrenije (222). Međutim, postoje i mišljenja da veće aktivnosti SOD u plazmi pacijenata u stabilnoj fazi shizofrenije predstavljaju adaptivni mehanizam antioksidativne zaštite u uslovima povećanog oksidativnog stresa (118). Prema rezultatima našeg istraživanja, nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnostima SOD u grupi pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Činjenica da aktivnost SOD nije povećana nasuprot povećanoj lipidnoj peroksidaciji, ukazuje na postepeno iscrpljivanje enzimske antioksidativne zaštite, obzirom da su pacijenti u ovom istraživanju imali prosečnu dijagnozu shizofrenije od 10 godina. S druge strane, moguće objašnjenje se može tražiti i u mogućem kompenzatornom povećanju aktivnosti drugih antioksidanasa.

Kako je naše istraživanje bilo primarno usmereno na proučavanje oksidativnog stresa kao jednog od faktora rizika za razvoj ateroskleroze i KVB, a koje su veoma zastupljene kod obolelih od shizofrenije, u cilju procene efikasnosti enzimske antioksidativne zaštite određivali smo, pored SOD, i aktivnosti enzima PON1. Ovaj antioksidativni enzim se nalazi u cirkulaciji vezan za HDL čestice i ima važnu ulogu u prevenciji ateroskleroze, jer sprečava oksidativnu modifikaciju LDL, ali i HDL čestica. Poređenjem aktivnosti enzima PON1, dobili smo značajno manje aktivnosti ovog antioksidativnog enzima kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu. Pokazano je da je aktivnost PON1 prema oba nefiziološka supstrata, paraoksonu i diazoksonu, bila značajno niža u grupi pacijenata. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatom prethodnog istraživanja (225). Nedavna studija, Mabrouk i saradnika je takođe potvrdila značajno niže aktivnosti enzima PON1 kod pacijenata sa shizofrenijom, nezavisno od demografskih i kliničkih karakteristika (226).

Kao parametre za procenu aktivnosti neenzimske antioksidativne zaštite, određivali smo koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa, kao i totalni antioksidativni status. Proteinske SH grupe, su veoma osetljive na oksidaciju i postoje dokazi negativne korelacije SH grupa sa nivoom lipidne peroksidacije i ostalim parametrima oksidativnog oštećenja (227). Takođe, nekoliko istraživanja je pokazalo značajno niže koncentracije neproteinskih SH grupa kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na zdrave ispitanike (116,228). Međutim, naši rezultati su pokazali da, iako su koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa bile nešto niže u odnosu na kontrolnu grupu, ova razlika nije bila statistički značajna. Dobijeni rezultati, kao i za aktivnost SOD, mogu se objasniti činjenicom da još uvek nije došlo do potpunog iscrpljivanja neenzimske antioksidativne zaštite.

S druge strane, poređenjem aktivnosti totalnog antioksidativnog statusa neočekivano su dobijene statistički značajno veće vrednosti TAS u grupi pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu. Uzimajući u obzir da SH grupe proteina, mokraćna kiselina i vitamin C, čine više od 90% ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme (219), ovaj rezultat se može objasniti potencijalnim povećanjem koncentracija mokraćne kiseline kod pacijenata sa shizofrenijom. Naime, smatra se da u uslovima oksidativnog stresa, sinteza mokraćne kiseline kao sporednog produkta katabolizma purina, predstavlja adaptivni zaštitni mehanizam koji štiti organizam od progresivne mitohondrijalne disfunkcije (79). Međutim, obzirom da u ovom delu istraživanja nije određivana koncentracija mokraćne kiseline ovo su samo pretpostavke. Rezultati našeg istraživanja se razlikuju od prethodnih rezultata, koji ukazuju na značajno smanjenje TAS kod pacijenata u stabilnoj fazi shizofrenije, u odnosu na zdrave ispitanike (144). Prethodno pomenuta meta-analiza pokazala je da je nivo TAS u serumu/plazmi pacijenata sa shizofrenijom značajno niži u prvoj psihotičnoj epizodi, a da se zatim značajno povećava u fazi stabilizacije, kao odgovor na antipsihotičnu terapiju (222).

U okviru našeg istraživanja, određivali smo i koncentracije mikroelemenata bakra, cinka i selena koji imaju značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti kao komponente velikog broja enzima i proteina, koji su uključeni u regulaciju redoks statusa ćelije i redoks osetljivih signalnih puteva. Prema dosadašnjim istraživanjima, postoje nalazi poremećaja homeostaze pojedinih mikroelemenata u shizofreniji, uz pretpostavku da bi ove promene mogle biti vezane za patofiziološke procese u shizofreniji (229, 230). Takođe, slično ostalim parametrima antioksidativne zaštite, postoje podaci koji ukazuju na promene u

koncentracijama pojedinih mikroelemenata u shizofreniji tokom terapije antipsihoticima, iako su mehanizmi ovih promena nepoznati (231, 232).

U skladu sa rezultatima drugih studija, naši rezultati su potvrdili veće koncentracije bakra u plazmi pacijenata sa shizofrenijom (230, 231). Poznato je da bakar predstavlja značajan kofaktor velikog broja enzima, uključujući tirozin i dopamin  $\beta$ -hidroksilazu koje su uključene u sintezu dopamina i noradrenalina (233). Uzimajući u obzir ovu činjenicu, dobijeni rezultati značajno veće koncentracije bakra u grupi pacijenata sa shizofrenijom, u odnosu na kontrolnu grupu, mogu se objasniti poremećajem dopaminske neurotransmisije u shizofreniji. Takođe, poznato je da visoke koncentracije bakra kompetitivno antagonizuju preuzimanje cinka koji je neophodan za sintezu CuZnSOD, Zn-tioneina, enzima uključenih u sintezu serotonina, kao i mnoge druge esencijalne funkcije CNS-a. Visoke koncentracije slobodnog bakra, mogu katalizovati Fentonovu reakciju i stvaranje toksičnog hidroksilnog radikala. Pored toga, visoke koncentracije bakra inhibiraju ksantin-oksidadu koja je neophodna za sintezu mokraćne kiseline, koja neutrališe povećane koncentracije NO i sprečava oksidaciju vitamina C (katalizovane Cu ili Fe) koji učestvuje u reakcijama konverzije dopamina u noradrenalin (234). Međutim, utvrđene koncentracije bakra u plazmi pacijenata sa shizofrenijom, u našem istraživanju, iako statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu, bile su u granicama referentnih vrednosti.

Cink je mikroelement koji takođe ima esencijalnu ulogu u CNS. Oko 90% ukupne količine cinka u mozgu je vezano za metaloproteine. Ostatak se nalazi u sinaptičkim vezikulama glutamatergičkih neurona i učestvuje u modulaciji nervne ekscitabilnosti (235). Rezultati nekoliko istraživanja su pokazali niske koncentracije Zn u plazmi u akutnoj epizodi shizofrenije (229, 236). S druge strane, neke studije ukazuju na normalizaciju sniženih koncentracija cinka utvrđenih u akutnoj epizodi, kao odgovor na terapiju antipsihoticima tokom faze stabilizacije (236,237). Prema rezultatima našeg istraživanja, iako su koncentracije cinka bile više u grupi pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu, utvrđena razlika nije bila statistički značajna. Ovi dobijeni rezultati, su u skladu sa prethodnim studijama u kojima nisu utvrđene promene u koncentracijama cinka u plazmi kod klinički stabilnih pacijenata na antipsihotičnoj terapiji (230, 231, 238).

Selen ulazi u sastav selenoproteina koji su esencijalni za održavanje redoks homeostaze, metabolizam tiroidnih hormona, antioksidativnu zaštitu, kao i zaštitu od inflamacije. Rezultati našeg istraživanja su potvrdili relativno nizak nivo selena u plazmi u našoj populaciji. Srednje koncentracije selena su iznosile 81.7  $\mu\text{g/L}$  u kontrolnoj grupi,

odnosno 84.3 µg/L u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Međutim, u odnosu na inicijalnu studiju Maksimovića i saradnika iz 1992. godine, koji su utvrdili prosečnu koncentraciju selena u zdravoj populaciji Srbije ispod 45 µg/L (239), naši rezultati pokazuju značajno poboljšanje u koncentracijama selena u plazmi. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživača (240, 241) i potvrđuju trend povećanja koncentracije selena u plazmi nakon 2000. godine, kada je kao strateška mera za poboljšanja statusa selena, uvedena obavezna selenizacija hrane za životinje, a uzimajući u obzir veliku zastupljenost namirnica animalnog porekla u ishrani stanovnika Srbije (242). Međutim, ove utvrđene koncentracije selena u plazmi su još uvek nedovoljne za postizanje optimalne aktivnosti GPx, obzirom da su niže od 95 µg/L (optimalni raspon: 89-114 µg/L) (243).

S druge strane, veoma je ograničeni broj literaturnih podataka o koncentracijama selena u shizofreniji. Vaddadi i saradnici su utvrdili značajno niže koncentracije selena u plazmi i eritrocitima pacijenata sa shizofrenijom, koji su bili na terapiji klopazinom, u odnosu na zdrave ispitanike, kao i u odnosu na grupu pacijenata koja je bila na terapiji ostalim antipsihotičnim lekovima. Ovi istraživači su pretpostavili da niske koncentracije selena mogu doprineti ozbiljnim srčanim komplikacijama, kao neželjenim efektima klopazina. Međutim, obzirom na dizajn studije, zaključeno je da se ne može isključiti mogućnost da su teraporezistentni pacijenti pre uvođenja klopazina, već imali snižene koncentracije selena (244). U ovom delu našeg istraživanja, nije utvrđena značajna razlika u koncentracijama selena između grupa, iako su koncentracije selena u plazmi pacijenata sa shizofrenijom bile nešto više u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživača (230, 245).

Prema dostupnim literaturnim podacima, ovo je prvo istraživanje u kome je određivana vrednost PAB-a u shizofreniji. Ovim relativno novim parametrom oksidativnog stresa, zapravo se određuje ravnoteža između oksidativnih i antioksidativnih procesa, što je od strane autora metode navedeno kao značajna prednost u odnosu na određivanje i interpretiranje pojedinačnih parametara oksidativnog stresa (77). Rezultati dosadašnjih studija pokazuju da PAB pokazuje značajnu korelaciju sa ostalim parametrima oksidativno-stresnog statusa. Rezultati našeg istraživanja, nisu pokazali razlike u nivoima PAB-a između pacijenata sa shizofrenijom i kontrolne grupe. Ovi rezultati su i očekivani, obzirom na povećanu lipidnu peroksidaciju, ali i značajno veći nivo TAS kod pacijenata sa shizofrenijom.

Na osnovu rezultata dobijenim u ovom delu istraživanja, može se zaključiti da shizofrenija predstavlja kompleksno hronično oboljenje praćeno povećanim oksidativnim stresom, kao i izmenjenom antioksidativnom zaštitom. Adaptivnim mehanizmima modulirane aktivnosti enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite, iako verovatno odlažu, ipak nisu dovoljno efikasne da bi se sprečila oksidativna oštećenja u uslovima dugotrajne i kontinuirane povećane produkcije slobodnih radikala.

## **5.2. Ispitivanje nivoa oksidativnog stresa u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma kod pacijenata sa shizofrenijom**

Inicijalni rezultati našeg istraživanja su potvrdili prisustvo kardiometaboličkih faktora rizika u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Vrednosti obima struka, koji ukazuju na abdominalnu gojaznost, bile su značajno veće u grupi pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 2). Takođe, pokazali smo značajno veće koncentracije glukoze kod pacijenata sa shizofrenijom (Tabela 3). Upoređivanjem parametara lipidnog statusa između pacijenata i kontrolne grupe, utvrđene su značajno niže koncentracije HDL-H i visoke koncentracije TG u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Očekivano, vrednosti indeksa TG/HDL-H, kao indirektnog pokazatelja prisustva aterogenih, malih gustih LDL čestica, bile su statistički značajno veće u grupi pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 3). Ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjem Fan i saradnika koji su predložili određivanje odnosa TG/HDL-H kao indikatora insulinske rezistencije u nedijabetičnih pacijenata sa shizofrenijom (246).

Daljom analizom dobijenih rezultata, utvrdili smo da je prevalenca MetS u grupi pacijenata sa shizofrenijom bila veoma visoka, i prema IDF kriterijumima iznosila je 51,3%. Takođe, utvrdili smo i visoku zastupljenost pojedinačnih komponenata MetS koje su, osim za vrednosti povišenog krvnog pritiska, bile značajno više zastupljene u grupi pacijenata sa shizofrenijom, u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživanja koji ukazuju na visoku prevalencu MetS u shizofreniji (41).

Mehanizmi koji dovode do razvoja MetS u shizofreniji su kompleksni i prema rezultatima dosadašnjih istraživanja nedovoljno proučeni. Iako genetski faktori, kao i faktori vezani za način života, svakako mogu doprineti većoj učestalosti pojedinačnih metaboličkih faktora rizika, većina istraživanja u ovoj oblasti izdvaja primenu antipsihotika kao glavni

faktor rizika za razvoj MetS u shizofreniji. Povećanje telesne težine i metabolički poremećaji su karakteristični za obe generacije antipsihotika. Generalno, terapija atipičnim antipsihoticima (posebno klopazinom i olanzapinom), visoko efikasnim antipsihoticima obe generacije kao i polifarmacija izdvajaju se kao najznačajniji faktori rizika za razvoj MetS. Osim antipsihotične terapije, razvoju MetS značajno doprinose dužina bolesti i pušenje (41). Prema rezultatima aktuelne meta-analize Mitchella i saradnika iz 2011. godine, MetS razvije oko 1/3 pacijenata sa shizofrenijom, a kao značajni prediktori za razvoj MetS posebno su izdvojeni dužina bolesti i terapija klopazinom, obzirom da MetS razvije više od polovine pacijenata koji su na terapiji ovim antipsihotikom (40). Visoka zastupljenost MetS u našoj grupi pacijenata, može se objasniti i činjenicom da je osim monototerapije antipsihotikom, 14 (23,3%) pacijenata lečeno kombinovanom antipsihotičnom terapijom, a 10 pacijenata (16,7%) je dodatno primalo i psihostabilizator, u vidu valproata, koji se takođe dovodi u vezu sa rizikom od povećanja telesne težine i insulinskom rezistencijom.

Povećani rizik od dijabetesa i KVB u MetS, kao rezultat kompleksne interakcije individualnih faktora rizika, nije u potpunosti razjašnjen. Iako je opšte poznato da je glavni patogenetski mehanizam u osnovi metaboličkog sindroma insulinska rezistencija, sve je više dokaza da su stanje subhronične inflamacije i oksidativnog stresa, usko povezani sa razvojem komplikacija MetS, kao što su endotelna disfunkcija, hipertenzija, ateroskleroza i dijabetes melitus tip 2 (247-249).

Pošto smo već prethodno utvrdili da je shizofrenija, patofiziološke stanje praćeno povećanim oksidativnim stresom i izmenjenom antioksidativnom zaštitom, daljim istraživanjem želeli smo da utvrdimo da li postoji razlika u oksidativno-stresnom statusu između pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na prisustvo metaboličkog sindroma. Prilikom upoređivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u grupama SHZ pacijenata, sa i bez MetS, u odnosu na grupu metabolički zdravih ispitanika, uočili smo značajno veće koncentracije TBKRS u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, kao što se i očekivalo (Tabela 8). Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da je shizofrenija, sama po sebi, psihijatrijski poremećaj koji je praćen oksidativnim stresom (222). Međutim, koncentracije TBKRS su bile dodatno veće u SHZ grupi sa MetS u odnosu na SHZ grupu bez MetS.



Iako se ne može isključiti uticaj starosti, odnosno dužine bolesti na ove rezultate, obzirom da su SHZ pacijenti sa MetS bili značajno stariji i sa dužom dijagnozom shizofrenije u odnosu na SHZ grupu bez MetS (Tabela 7), ovi rezultati potvrđuju činjenicu da je MetS stanje praćeno povećanim sistemskim oksidativnim stresom, odnosno lipidnom peroksidacijom (250). U prilog ovoj činjenici, u našem istraživanju utvrđena je pozitivna korelacija TBKRS sa brojem komponenata MetS u shizofreniji (Tabela 11).

U odgovoru na mitohondrijalnu disfunkciju i sprečavanje oksidativnog oštećenja, u ranim fazama MetS dolazi do aktivacije enzimskih i neenzimskih antioksidativnih zaštitnih sistema. Nekoliko studija je utvrdilo veće enzimске aktivnosti SOD u eritrocitima kod odraslih i dece sa MetS (251, 252). Aktivnosti SOD u plazmi, u našem istraživanju, bile su veće u SHZ grupi sa MetS, u odnosu na SHZ grupu bez MetS, kao i u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,060$ ; Tabela 8).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je aktivnost enzima PON1 značajno niža kod SHZ pacijenata sa MetS, u odnosu na kontrolnu grupu, kao što je i očekivano. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima u kome su takođe utvrđene niže aktivnosti PON1 kod osoba sa MetS (251, 253, 254).

Naši rezultati su takođe pokazali značajno veće nivoe TAS u SHZ grupi sa MetS u odnosu na SHZ grupu bez MetS, kao i u odnosu na kontrolnu grupu. U prethodnom istraživanju u opštoj populaciji, utvrđeno je da je antioksidativni kapacitet plazme niži kod predgojaznih osoba sa MetS u odnosu na zdravu kontrolnu grupu, kao i da između predgojaznih osoba bez MetS i normalno uhranjenih osoba nema razlika u antioksidativnom kapacitetu plazme (255). Međutim, u drugom istraživanju je utvrđeno da je nivo TAS kod gojaznih osoba sa MetS značajno viši u odnosu na zdrave ispitanike normalne uhranjenosti (256). Koncentracije ukupnih SH grupa u našem istraživanju, bile su nešto više kod pacijenata sa MetS, u odnosu na ostale ispitivane grupe, iako nismo pokazali da je ova razlika statistički značajna ( $p=0,082$ ; Tabela 8).

Rezultati našeg istraživanja pokazali su veće koncentracije selena u SHZ grupi sa MetS u odnosu na SHZ grupu bez MetS. Ovaj rezultat se razlikuje od prethodnih istraživanja u kojima nisu utvrđene razlike u koncentracijama selena u odnosu na prisustvo MetS u opštoj populaciji (160, 257). Međutim, rezultati nedavne multicentrične IMMIDIET studije su pokazali veće koncentracije selena kod žena sa MetS (258).

U prvom delu našeg istraživanja utvrdili smo povećanu koncentraciju bakra u grupi pacijenata sa shizofrenijom i pretpostavili da se ova promena odnosi na poremećaj u dopaminskoj transmisiji. Međutim, daljim istraživanjem smo utvrdili da se koncentracije bakra nisu značajno razlikovale u SHZ grupi bez MetS u odnosu na kontrolnu grupu. S druge strane, utvrđeno je da su koncentracije bakra veće kod pacijenata sa MetS u poređenju sa zdravim kontrolama. Dobijeni rezultat može se delimično objasniti učešćem bakra u inflamatornim i oksidativnim procesima povezanim sa razvojem MetS (259).

Poređenjem vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa, utvrdili smo veći nivo PAB kod pacijenata bez MetS u odnosu na zdrave ispitanike sličnih godina, pola i statusa pušenja. Ovaj rezultat bi se mogao objasniti većim intenzitetom oksidativnog stresa, centralnog porekla, imajući u vidu činjenicu da u ovoj podgrupi pacijenata, u odnosu na kontrolnu grupu, osim u vrednostima obima struka i HDL-H, nije bilo značajnih razlika u ostalim određivanim parametrima. U SHZ grupi sa MetS, utvrdili smo značajno niže vrednosti PAB u odnosu na SHZ grupu bez MetS, međutim nije utvrđena razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa prethodnim istraživanjem povezanosti tradicionalnih faktora rizika i oksidativnog stresa u opštoj populaciji, u kome je pokazano da vrednost PAB predstavlja značaj prediktor MetS. Značajno povećanje PAB u ovom istraživanju u odnosu na naše rezultate, može se objasniti razlikama u stepenu uhranjenosti, kao i godinama. Naime, u istraživanju Korkamaz i saradnika obuhvaćena je grupa gojaznih osoba sa MetS (ITM oko 35), prosečne starosti oko 50 godina (256).

Jedan od ciljeva naše studije, bio je da se ispita i nivo oksidativnog stresa u zavisnosti od udruženosti, odnosno broja komponenata metaboličkog sindroma. Daljom analizom parametara oksidativno-stresnog statusa, pokazali smo da pacijenti sa 4 i više MetS komponenti imaju značajno veći stepen lipidne peroksidacije u odnosu na pacijente sa manjim brojem MetS komponenti. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima nedavne LIPGENE studije u kojoj je istraživani nivo oksidativnog stresa u odnosu na broj komponenata MetS u opštoj populaciji, i u kojoj je utvrđeno da osobe sa većim brojem MetS komponenata imaju veći stepen oksidativnog stresa (260). U LIPGENE studiji, takođe su utvrđene i veće enzimске aktivnosti SOD u grupama sa 4 i 5 komponenti MetS, u odnosu na grupe sa 2 i 3 komponente MetS. Obzirom da su aktivnosti SOD u LIPGENE studiji bile u značajnoj korelaciji sa obimom struka, TG i HDL-H, kao i ostalim kardiovaskularnim faktorima rizika, predloženo je da određivanje SOD aktivnosti može biti indikator stepena

oksidativnog stresa u MetS. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa rezultatom ove studije, obzirom da smo pokazali trend povećanja aktivnosti SOD sa povećanjem brojem komponenata MetS u shizofreniji.

Suprotno rezultatima prethodnog istraživanja u kome je utvrđeno smanjenje PON1 aktivnosti sa povećanjem broja komponenata MetS i istovremenim povećanjem lipidne peroksidacije (261), naši rezultati nisu pokazali značajne razlike u aktivnostima PON1 između grupa sa različitim brojem MetS komponenti. Osim lipidnih peroksida, PON1 hidrolizuje vodonik peroksid koji predstavlja glavni ROS u arterijskom zidu. OxLDL čestice inaktiviraju PON1 reagujući sa slobodnim SH grupama aktivnog centra enzima PON1. Niska aktivnost PON1, takođe može reflektovati povećani oksidativni stres u metaboličkom sindromu. Rezultati našeg istraživanja su pokazali negativnu korelaciju DZOazne aktivnosti sa MetS skorom. Dobijeni rezultati smanjenja PON1 aktivnosti sa povećanjem broja MetS komponenti, ali bez utvrđene statistički značajne razlike, mogu se objasniti činjenicom da se radi o SHZ pacijentima u početnim fazama razvoja MetS, kod kojih se još uvek nisu razvile komplikacije MetS.

Rezultati naše studije su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju seleno u plazmi sa obimom struka, koncentracijama glukoze i TG. Upoređivanjem grupa pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na broj komponenti MetS dobili smo značajno veće koncentracije seleno u grupi pacijenata sa najvećim MetS skorom. Ovaj rezultat se može objasniti potencijalnim povećanjem aktivnosti GPx sa povećanjem broja komponenata MetS (260), ili povećanom ekspresijom selenoproteina P. Selenoprotein P (SeP) je sekretorni glikoprotein koji sadrži 22%-65% seleno u plazmi, u zavisnosti od nutritivnog statusa seleno (262). SeP ima centralnu ulogu u homeostazi seleno obzirom da utiče na retenciju seleno u organizmu i utiče na distribuciju seleno iz jetre do ekstrahepatičnih tkiva (263). Mozak ima posebno izražen afinitet za selenoprotein P, obzirom da se u njemu produkuju velike količine vodonik peroksida, a da je seleno neophodan za aktivnost GPx i TrxR. Tokom deficita seleno, utvrđena je sekvestracija seleno u mozgu, što dodatno potvrđuje njegovu značajnu funkciju u CNS (264). Kanazawa i saradnici su pokazali da je ekspresija SeP povećana u krvi i mozgu pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem (265). S druge strane, poznato je da je ekspresija SeP povećana i do 8 puta kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u poređenju sa zdravim ispitanicima (266). Smatra se da SeP dovodi do ushodne regulacije glukoneogenih enzima, kao i da inaktivira AMPK, koja je regulator sinteze i sekrecije insulina u  $\beta$  ćelijama

pankreeasa (267). Speackamann i saradnici su utvrdili da tretman metforminom dovodi do dozno zavisne nishodne regulacije ekspresije gena za selenoprotein P na eksperimentalnim životinjama (268). Takođe, pokazano je da SeP, modulacijom inflamatornih i redoks osetljivih signalnih puteva ima značajnu ulogu u diferencijaciji adipocita (269). U studiji koja je obuhvatila osobe sa različitom tolerancijom glukoze, pokazano je da je nivo SeP povezan sa insulinskom rezistencijom, i nakon korekcije za razlike u odnosu na godine, pol i ITM. Serumske koncentracije SeP su bile značajno veće kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 ili predijabetesom u odnosu na osobe sa normalnom tolerancijom na glukozu. Dodatno, predgojazne i gojazne osobe su imale takođe značajno veće koncentracije SeP. Ovi istraživači su zaključili da su koncentracije SeP povećane kod osoba sa poremećenom glikoregulacijom i da SeP ima značajnu ulogu u nastanku oboljenja sa insulinskom rezistencijom, kao što su ateroskleroza i dijabetes melitus tip 2 (266).

Ako pretpostavimo da koncentracije selena u plazmi u našem istraživanju, reflektuju koncentracije SeP, koji predstavlja glavni transportni protein selena u plazmi, onda utvrđena značajno veća koncentracija selena u plazmi u grupi SHZ pacijenata sa najvećim MetS skorom, delimično objašnjava i dobijene značajno veće koncentracije SH grupa, kao i nivo TAS u ovoj grupi pacijenata sa shizofrenijom.

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom delu istraživanja, može se zaključiti da je prisustvo bolesti glavni uzrok oksidativnog stresa kod pacijenata sa shizofrenijom, ali da razvoj MetS čini ovaj proces intenzivnijim. Povećanje oksidativnog stresa, praćeno je adaptivnim povećanjem enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite. Međutim, utvrđene aktivnosti najveće antioksidativne zaštite s jedne ali istovremeno i najveći stepen lipidne peroksidacije u grupi sa 4 i više MetS komponenti s druge strane, govori u prilog da endogena antioksidativna zaštita ipak nije dovoljna da spreči štetno delovanje slobodnih radikala. Ovi rezultati ukazuju na potencijalni značaj dijetarnih antioksidanasa, odnosno njihov povećani unos balansiranom ishranom ili pojedinačno putem suplemenata.

Takođe, u skladu sa konceptom koji podržava veći broj istraživača, a prema kome oksidativni stres predstavlja rani događaj u razvoju komplikacija MetS, sprovođenje preventivnih mera u cilju redukcije faktora koji doprinose njegovom nastanku u ranim fazama razvoja MetS, ima esencijalan značaj.

### **5.3.Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije i zdravih ispitanika**

Metabolički sindrom, kao što je već pomenuto, predstavlja udruženost faktora rizika koji povećavaju rizik od koronarne bolesti i dijabetes melitusa tip 2. Uprkos predloženim brojnim nefarmakološkim merama, koje uključuju primenu različitih dijetarnih režima ishrane, prestanak pušenja, ograničeni unos alkohola i povećanje nivoa fizičke aktivnosti, ali i primeni odgovarajućih farmakoloških mera, epidemiološki podaci ukazuju na globalno povećanje prevalencije MetS i njegovih komplikacija, reflektujući multifaktorsku osnovu ovih oboljenja, ali i ukazujući na problem nedovoljne komplijanse koja je značajan faktor izostanka optimalnog efekta prevencije. S druge strane, nekoliko izolovanih nutrijenata i biološki aktivnih sastojaka hrane, prepoznato je da ima potencijalni klinički značaj u primarnoj i sekundarnoj prevenciji hroničnih bolesti, u čijoj osnovi se nalaze oksidativni stres i inflamacija. Ovi nutrijenti uključuju antioksidativne vitamine (C i E), vitamin D, konjugovanu linolnu kiselinu, omega-3-masne kiseline, minerale (hrom i magnezijum), alfa-liponsku kiselinu, dijetna vlakna, kao i biološki aktivne sastojke hrane kao što su flavonoidi i fitoestrogeni (270). Iako *in vitro* istraživanja, studije na eksperimentalnim životinjama, kao i interventne kliničke studije, ukazuju na potencijalni klinički značaj dijetarnih antioksidanasa, rezultati velikih randomizovanih kliničkih istraživanja i meta-analize to uglavnom ne potvrđuju. Dodatno, ističe se rizik od primene visokih doza antioksidanasa. Kao glavni razlozi izostanka potvrde očekivanog pozitivnog delovanja antioksidanasa u istraživanjima koja uključuju veliki broj ispitanika, navodi se odsustvo adekvatnih laboratorijskih kriterijuma za uključivanje ispitanika u istraživanje, problem definisanja optimalne dužine suplementacije, kao i izbor optimalne suplementirane doze.

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje uticaja suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata sa shizofrenijom, a takođe i jedna od malobrojnih studija ispitivanja efekata suplementacije LA u zdravoj populaciji. Uzimajući u obzir činjenicu da se LA/DHLA redoks par smatra jednim od najsnažnijih bioloških antioksidativnih sistema, sposobnost LA da prolazi krvno-moždanu barijeru i povećava nivo endogenih antioksidanasa, posebno GSH, koji predstavlja glavni endogeni antioksidans u CNS, kao i potencijalne pozitivne metaboličke efekte, prepostavili smo da suplementacija LA može imati potencijalno povoljne efekte kao dodatak antipsihotičnoj terapiji kod klinički stabilnih pacijenata sa shizofrenijom (271, 272).

Iako se LA smatra relativno bezbednim antioksidansom, bez izraženih neželjenih efekata, doza od 500 mg je izabrana na osnovu rezultata prethodnih istraživanja koja su pokazala da LA ima bolju biološku raspoloživost i da je bezbednija ukoliko se primeni u umerenim količinama (273). Takođe, imali smo u vidu i aktuelna saznanja da antioksidansi u visokim koncentracijama mogu ispoljiti prooksidativni efekat ili dovesti do neutralizacije fizioloških koncentracija ROS koje su neophodne za održavanje uobičajenih ćelijskih aktivnosti (274).

Rezultati studija na eksperimentalnim životinjama su pokazali da LA dovodi do smanjenja telesne težine (275-277). Iako precizan mehanizam ovog delovanja LA nije utvrđen, pretpostavlja se da je povezan sa supresijom apetita, odnosno inhibicijom aktivnosti AMPK u hipotalamusu.

Ovaj efekat LA na gubitak telesne težine, potvrđen je i rezultatima nekoliko kliničkih studija. Carbonelli i saradnici su pokazali da suplementacija LA (800 mg/dan) tokom 4. meseca dovodi do značajnog gubitka masnog tkiva (~7-9%), smanjenja ITM (~ 3 jedinice) i obima struka (~8 cm) kod predgojaznih i gojaznih osoba (278). Zatim, drugi istraživači su pokazali da 1800 mg LA/dan dovodi do umerenog gubitka telesne mase (2,1%) kod gojaznih osoba tokom 20 nedelja suplementacije (279). U pilot istraživanju, Kim i saradnika koje je obuhvatilo 5 pacijenata sa shizofrenijom, utvrđeno je da suplementacija LA (1200 mg/dan) u periodu od tri meseca, značajno umanjuje antipsihoticima izazvano povećanje telesne mase kod pacijenata sa shizofrenijom (176). Ovi rezultati su potvrđeni i u istraživanju Ratliif-a i saradnika koji su takođe utvrdili smanjenje telesne mase (-2,2 kg ± 2,5 kg) nakon 10 nedelja suplementacije sa 1200 mg LA/dan kod 12 nedijabetičnih pacijenata sa shizofrenijom (280). Rezultati naše studije su pokazali da je suplementacija sa 500 mg/dan LA dnevno tokom 90 dana, dovela do značajnog smanjenja ITM, procenta masnog tkiva, obima struka u kontrolnoj grupi, bez utvrđenih promena u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Uzimajući u obzir rezultate prethodnih istraživanja, može se zaključiti da suplementacija LA u količini od 500 mg/dan tokom 90 dana, dovodi do smanjenja telesne mase i gubitka viscelarnog masnog tkiva kod zdravih osoba, ali da je ova doza LA nedovoljna da bi se ovaj efekat ispoljio kod pacijenata sa shizofrenijom.

Rezultati studija na eksperimentalnim životinjama, pokazuju da LA poboljšava lipidni status (281, 282), snižavanjem koncentracija T-holesterola, LDL-H i TG, odnosno povećanjem koncentracija HDL-H, iako nije poznato da li je ovaj efekat posledica redukcije

telesne težine ili nezavisan efekat suplementacije LA. Međutim, rezultati kliničkih studija uglavnom ne potvrđuju ove rezultate. Gianturco i saradnici su utvrdili značajno povećanje HDL-H, kao i umereno smanjenje LDL-H kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2, nakon primene 400 mg LA/dan (283). Međutim, Chang i saradnici nisu uočili razlike u T- holesterolu i ox-LDL nakon primene 600 mg LA/dan u poređenju sa kontrolnom grupom (284). Takođe, nisu utvrđene promene u lipidnom statusu gojaznih osoba nakon 20-nedeljne suplementacije sa 1200 mg, odnosno 1800 mg LA (279), kao ni kod osoba sa metaboličkim sindromom nakon suplementacije 600 mg LA/dan tokom 12 meseci (285). Uprkos činjenici da je gubitak telesne težine povezan sa poboljšanjem lipidnog statusa, rezultati našeg istraživanja su pokazali smanjenje HDL-H uz povećanje koncentracija T- holesterola, kao i LDL-H u kontrolnoj grupi nakon 90 dana suplementacije, u odnosu na 45 dan suplementacije. Moguće objašnjenje za ove rezultate, može biti smanjena aktivnost lipoproteinske lipaze tokom aktivnog gubitka telesne težine koja je utvrđena u prethodnim istraživanjima (286, 287).

Rezultati naše studije su pokazali da je suplementacija LA dovela do značajnog smanjenja koncentracije glukoze kod pacijenata sa shizofrenijom. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim saznanjima da LA poboljšava preuzimanje glukoze u perifernim tkivima i poboljšava insulinsku rezistenciju (288). Pretpostavljeni mehanizmi ovog delovanja LA na osnovu rezultata *in vitro* istraživanja i studija na eksperimentalnim životinjama, uključuju stimulaciju aktivnosti AMPK u perifernim tkivima, kao i povećanu ekspresiju receptora za adiponektin u masnom tkivu. Osim sniženih koncentracija glukoze, rezultati našeg istraživanja su pokazali povećane koncentracije adiponektina nakon 90 dana suplementacije LA u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Poznato je da su koncentracije adiponektina smanjene kod gojaznih osoba, osoba sa metaboličkim sindromom, kao i osoba obolelih od dijabetesa tipa 2 (289) i da su u korelaciji sa stepenom insulinske rezistencije, obzirom da insulin inhibira oslobađanje adiponektina. S druge strane, poznato je da adiponektin ima značajnu ulogu u definisanju insulinske senzitivnosti. Vezivanjem za specifične adiponektinske receptore u mišićima i u jetri, adiponektin aktivira AMPK (290). Noviji podaci pokazuju da adiponektin pored AMPK, stimuliše i PGC-1 $\alpha$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -coactivator 1 $\alpha$* ) kao i antioksidativne enzime (291). Takođe, poznato je da su nivoi adiponektina u plazmi, kao i njegova ekspresija u masnom tkivu,

zmanjeni u uslovima povećanog oksidativnog stresa, posebno nivoa superoksidnog anjona  $O_2^{\cdot-}$  (154).

Dobijeni rezultat povećane koncentracije adiponektina nakon suplementacije LA u našem istraživanju, u skladu je sa prethodnim istraživanjima efekata LA na sekreciju adiponektina kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 (292). Međutim, suprotni su od rezultata istraživanja Manning-a i saradnika, koji nisu utvrdili promene u koncentracijama adiponektina i inflamatornih adipokina kod pacijenata sa MetS (285). Takođe, treba istaći da u našem istraživanju nisu utvrđene promene u telesnoj težini, kao ni i u koncentracijama leptina u SHZ grupi, obzirom da je poznato da redukcija telesne mase dovodi do povećanja koncentracija adiponektina (293).

Suprotno dobijenim rezultatima smanjene koncentracije glukoze kod pacijenata sa shizofrenijom, u kontrolnoj grupi smo utvrdili povećane koncentracije glukoze kao odgovor na suplementaciju LA, iako su uočene promene bile u opsegu referentnih vrednosti. Moguće objašnjenje za ovaj rezultat je činjenica da antioksidansi mogu suprimirati stvaranje  $H_2O_2$  koji ima ulogu sekundarnog glasnika, i učestvuje u aktivaciji insulin signalnog puta. U našem istraživanju, utvrdili smo značajno smanjenje SOD, koja učestvuje u stvaranju  $H_2O_2$ , nakon 45 dana suplementacije u kontrolnoj grupi ispitanika. Prethodnim istraživanjem je utvrđeno da kombinacija visokim dozama antioksidativnih vitamina dovodi do insulinske rezistencije (294).

Statističkom analizom utvrdili smo značajne razlike u bazalnim nivoima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između grupe pacijenata sa shizofrenijom i kontrolne grupe. U SHZ grupi, utvrđene su veće koncentracije TBKRS, kao što je i očekivano. Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje u kome je određivan AOPP, kao marker oksidativnog oštećenja proteina kod pacijenata sa shizofrenijom. Međutim, nisu utvrđene razlike u bazalnim koncentracijama AOPP između grupa. Prethodne kliničke studije pokazale su izraženu antioksidativnu aktivnost LA koja se manifestuje smanjenjem lipidne peroksidacije i oksidativnog oštećenja proteina kod zdravih ispitanika (295, 296).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali značajno smanjene koncentracije TBKRS, završnih produkata lipidne peroksidacije, u kontrolnoj grupi nakon 90 dana suplementacije. Ova promena je bila značajna u odnosu na bazalne koncentracije ali i u odnosu na koncentracije utvrđene 45 dana suplementacije. Promene u koncentracijama AOPP, kao



markera kasnog oksidativnog oštećenja proteina, su pratile utvrđene promene u stepenu lipidne peroksidacije u kontrolnoj grupi. U grupi pacijenata sa shizofrenijom, međutim nisu utvrđene promene u koncentracijama TBKRS i AOPP tokom perioda suplementacije. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je suplementacija LA imala protektivan antioksidativan efekat kod zdravih ispitanika, ali ne i u SHZ grupi. Dobijene razlike u efektima suplementacije LA, između kontrolne i SHZ grupe, pokazuju da doza LA od 500 mg verovatno nije bila dovoljna da spreči oksidativna oštećenja u uslovima oksidativnog stresa visokog intenziteta.

Antioksidativni zaštitni sistem obuhvata enzimske i neenzimske antioksidanse. SOD je primarni enzim antioksidativne zaštite odgovoran za eliminaciju  $O_2^{\bullet-}$ . U našem istraživanju, bazalne aktivnosti SOD su bile nešto veće u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Ovo povećanje aktivnosti SOD u SHZ grupi je u saglasnosti sa istraživanjima drugih istraživača (106, 130). Takođe, paralelno sa povećanjem SOD aktivnosti utvrdili smo i veće koncentracije  $O_2^{\bullet-}$  u SHZ grupi, iako ovo povećanje nije bilo statistički značajno. Ovaj rezultat potvrđuje pretpostavku, da je aktivnost SOD kompenzatorno povećana kao odgovor na povećanu produkciju  $O_2^{\bullet-}$ . Tokom suplementacije LA, pokazali smo značajno smanjenje u aktivnostima SOD u obe ispitivane grupe. Moguće objašnjenje za ove rezultate je da tokom suplementacije antioksidansom dolazi do smanjenja produkcije  $O_2^{\bullet-}$  i kompenzatornog smanjenja aktivnosti SOD. Ako pretpostavimo, da je aktivnost SOD povezana sa metaboličkim faktorima rizika u grupi pacijenata sa shizofrenijom (260), uočeno smanjenje aktivnosti SOD u SHZ grupi, moglo bi se objasniti smanjenjem nivoa glukoze u serumu.

Takođe, rezultati našeg istraživanja su pokazali značajno smanjenje aktivnosti enzima PON1 tokom perioda suplementacije u kontrolnoj grupi. Ovaj rezultat se može objasniti delimično uočenim smanjenjem HDL-H nakon 45 dana suplementacije, ali i mogućim kompenzatornim smanjenjem aktivnosti PON1 kao posledicom povećanja neenzimske antioksidativne zaštite.

Uticaj suplementacije LA na neenzimsku antioksidativnu zaštitu praćen je određivanjem vrednosti TAS, ukupnih SH grupa, mokraćne kiseline i koncentracija mikroelemenata u plazmi. Rezultati su pokazali značajno povećanje nivoa TAS u kontrolnoj grupi. Paralelno sa povećanjem ukupnih SH grupa, potvrđeno je značajno povećanje u nivou TAS u kontrolnoj grupi nakon 45 dana suplementacije LA, u poređenju sa bazalnim koncentracijama. Međutim, nakon 90 dana suplementacije LA uočeno je značajno smanjenje

SH grupa u kontrolnoj grupi. Ove promene su praćene promenama u koncentracijama mokraćne kiseline, kao i promenama u nivoima PAB u kontrolnoj grupi.

Iako prethodna istraživanja u *in vitro* eksperimentalnim uslovima pokazuju direktno antioksidativno delovanje LA i DHLA, neutralizacijom ROS ili heliranjem metalnih jona, postoje dokazi da u *in vivo* biološkim sistemima LA deluje indirektno, regeneracijom endogenih antioksidansa i/ili indukovanjem mehanizama druge faze antioksidativne zaštite, promenom redoks statusa ćelije (187). Takođe, postoje dokazi da DHLA regeneriše askorbinsku iz dehidroaskorbinske kiseline i indirektno vitamin E, kao i da povećava koncentracije intracelularnog GSH i koenzima Q10 (207). Imajući u vidu činjenicu da TAS reflektuje aktivnost svih antioksidanasa u plazmi, veći nivo TAS u kontrolnoj grupi nakon 90 dana suplementacije, uprkos značajnom smanjenju SH grupa, nakon 45 dana suplementacije, može se objasniti povećanjem niskomolekularnih antioksidanasa u plazmi. Takođe, obzirom na pretpostavku da LA povećava sintezu glutaciona, povećanjem ekspresije  $\gamma$ -glutamilcistein ligaze koja učestvuje u sintezi glutaciona, kao i povećanjem celularnog preuzimanja cisteina, koji predstavlja prekursor za sintezu glutaciona (198), može se pretpostaviti da uočene promene u sadržaju SH grupa mogu biti rezultat razmene tiolnih komponenti između plazme i ćelija. S druge strane, pretpostavlja se da suplementacija LA može dovesti do oslobađanja gvožđa, koje stimuliše autooksidaciju tiolnih grupa. Ova reakcija može biti dodatno poboljšana askorbatom (297). Takođe, može se pretpostaviti da povećanje mokraćne kiseline nakon 45 dana suplementacije, predstavlja adaptivni odgovor u cilju prevencije produkcije ROS i stabilizacije drugih antioksidanasa kao što su tiolna jedinjenja i vitamin C (298).

Na kraju, na osnovu dobijenih rezultata i u ovom delu istraživanja, može se takođe zaključiti da pacijenti sa shizofrenijom imaju kompenzatorno povećanu aktivnost antioksidativne zaštite, kao odgovor na povećani oksidativni stres. Suplementacija alfa-liponskom kiselinom (500 mg/dan) tokom 90 dana dovela je do pozitivnih metaboličkih efekata, poboljšanja nivoa glukoze i koncentracija adiponektina, ali nije bila dovoljna da spreči oksidativna oštećenja, u grupi pacijenata sa shizofrenijom. Dodatne, dozno zavisne i placebo kontrolisane studije su neophodne da bi se potvrdio potencijalni značaj suplementacije LA kod pacijenata sa shizofrenijom.

## **6. ZAKLJUČCI**

U skladu sa postavljenim ciljevima studije, na osnovu rezultata ispitivanja možemo zaključiti sledeće:

- Shizofrenija je psihijatrijsko oboljenje koje je povezano sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom. Klinički stabilni pacijenti sa shizofrenijom, na terapiji antipsihoticima, imaju kompenzatorno povećane kapacitete antioksidativne zaštite. Ipak, i pored toga oboleli od shizofrenije, imaju veći stepen oksidativnog oštećenja u odnosu na zdrave, osobe bez psihijatrijskih oboljenja, sličnog pola i godina.
- Oboleli od shizofrenije imaju veću zastupljenost abdominalne gojaznosti, hiperglikemije, dislipidemije, kao i veću prevalencu metaboličkog sindroma u odnosu na zdrave ispitanike, sličnog pola i godina. Udruženost pojedinačnih faktora rizika, u okviru metaboličkog sindroma, dodatno povećava nivo oksidativnog stresa kod pacijenata sa shizofrenijom, što može dovesti do smanjenja kapaciteta antioksidativne zaštite.
- Suplementacija alfa-liponskom kiselinom, u količini 500 mg dnevno tokom 90 dana, nije imala uticaja na stepen oksidativnog oštećenja (prikazano kroz TBKRS i AOPP), kao ni na aktivnost neenzimske antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije. Nakon 45 dana, pokazano je smanjenje aktivnosti SOD, dok se aktivnost enzima PON1 tokom perioda suplementacije ne menja kod obolelih od shizofrenije.
- Suplementacija alfa-liponskom kiselinom, u količini 500 mg dnevno tokom 90 dana, uticala je kako na smanjenje oksidativnog oštećenja (prikazano kroz TBKRS i AOPP), tako i na povećanje neenzimske antioksidativne zaštite (prikazano kroz TAS) kod zdravih ispitanika. Nakon 45 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom kod zdravih ispitanika pokazano je povećanje aktivnosti SOD i koncentracije ukupnih SH grupa, a zatim njihovo smanjenje nakon 90 dana suplementacije. Rezultati su pokazali smanjenje aktivnosti enzima PON1 tokom perioda suplementacije alfa-liponskom kiselinom kod zdravih ispitanika.
- Suplementacija alfa-liponskom kiselinom, u količini 500 mg dnevno tokom 90 dana, povoljno deluje na redukciju telesne mase, obima struka i procenta masnog tkiva kod zdravih ispitanika, ali ne i kod obolelih od shizofrenije.

- Koncentracije glukoze su smanjene nakon 45 dana, odnosno 90 dana suplementacije alfa-liponskom kiselinom kod pacijenata sa shizofrenijom, ali su povećane nakon 90 dana suplementacije kod zdravih ispitanika.
- Suplementacija alfa-liponskom kiselinom nije uticala na koncentracije leptina, ali je dovela do povećanja koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa shizofrenijom.

## 7. LITERATURA

1. Scharfetter C. Eugen Bleuler's schizophrenias – synthesis of various concepts. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 2001; 152:34–37.
2. Laviolette SR. Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? *Schizophr Bull* 2007; 33: 971–981.
3. Tsuang M. Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry* 2000; 47: 210-220.
4. Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsä E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppä T, Härkänen T, Koskinen S, Lönnqvist J. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64:19–28.
5. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray C. Global burden of disease and risk factors - Disease Control Priorities Project. Washington (DC): World Bank, 2006.
6. Hafner H, an der Heiden W. Course and outcome of schizophrenia. In: Hirsch SR, Weinberger DR, editors. *Schizophrenia*. Massachusetts, Oxford, Victoria, Berlin: Blackwell, Science, 2003, pp 101
7. Barbato A. Prevention, treatment and care. *Schizophrenia and Public health*, Geneva: World Health Organisation, 1998
8. Cohen AS, Docherty NM. Affective reactivity of speech and emotional experience in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2004;69:7–14.
9. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. *Shizofrenija: Nacionalni vodič dobre kliničke prakse*. Klinički vodič, 20/13; Republika Srbija, Ministarstvo zdravlja, 2013; str. 16-17.
10. Mueser KT, McGurk SR. Schizophrenia. *Lancet* 2004; 363:2063-2072.
11. Meyer JM, Nasrallah HA, McEvoy JP, Goff DC, Davis SM, Chakos M, et al. The Clinical Antipsychotic Trials Of Intervention Effectiveness (CATIE)

- Schizophrenia Trial: clinical comparison of subgroups with and without the metabolic syndrome. *Schizophr Res* 2005; 80:9-18.
12. Kahn RS, Fleischhacker WW, Boter H, Davidson M, Vergouwe Y, Keet IP et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. *Lancet* 2008; 371:1085-1097.
  13. Goldberg TE, Goldman RS, Burdick KE, Malhotra AK, Lencz T, Patel RC, et al. Cognitive improvement after treatment with second-generation antipsychotic medications in first episode schizophrenia: is it a practice effect? *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64:1115-1122.
  14. Buckley PF, Stahl SM. Pharmacological treatment of negative symptoms of schizophrenia: therapeutic opportunity or cul-de-sac? *Acta Psychiatr Scand* 2007; 115:93-100.
  15. Csernansky JG, Mahmoud R, Brenner R. Risperidone USASG. A comparison of risperidone and haloperidol for the prevention of relapse in patients with schizophrenia. *N Engl J Med*, 2002: 346:16–22.
  16. Meltzer HY, Alphas L, Green AI, et al. International Suicide Prevention Trial Study Group. Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60:82-91.
  17. Gabbard GO. *Gabbard's Treatments of Psychiatric Disorders*. American Psychiatric Press, 2007
  18. Bushe CJ, Taylor M, Haukka J. Mortality in schizophrenia: a measurable clinical endpoint. *J Psychopharmacol* 2010; 24:17-25.
  19. Casey DE. Metabolic issues and cardiovascular disease in patients with psychiatric disorders. *Am J Med* 2005; 118:15S-22S.
  20. Birkenaes AB, Sjøgaard AJ, Engh JA, Jonsdottir H, Ringen PA, Vaskinn A, Friis S, Sundet K, Opjordsmoen S, Andreassen OA. Sociodemographic characteristics and

- cardiovascular risk factors in patients with severe mental disorders compared with the general population. *J Clin Psychiatry* 2006; 67: 425-433.
21. Brown S, Inskip H, Barraclough B. Causes of the excess mortality of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2000; 177: 212-217.
  22. Ryan MC, Thakore JH. Physical consequences of schizophrenia and its treatment: the metabolic syndrome. *Life Sci* 2002; 71(3): 239-257.
  23. Strassnig M, Brar JS, Ganguli R. Low cardiorespiratory fitness and physical functional capacity in obese patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2011; 126:103-109.
  24. McIntyre RS, Mancini DA, Basile VS. Mechanisms of antipsychotic-induced weight gain. *J Clin Psychiatry* 2001;62: 23-29.
  25. Stahl SM, Mignon L, Meyer JM. Which comes first: atypical antipsychotic treatment or cardiometabolic risk? *Acta Psychiatr Scand* 2009; 119:171-179.
  26. Maudsley, H. *The Pathology of Mind* (3rd edn). London: Macmillan, 1979
  27. Thakore JH, Mann JN, Vlahos I, Martin A, Reznik R. Increased visceral fat distribution in drug-naive and drug-free patients with schizophrenia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Jan;26(1):137-41.
  28. Kirkpatrick B, Miller BJ, Garcia-Rizo C, Fernandez-Egea E, Bernardo M. Is abnormal glucose tolerance in antipsychotic-naive patients with nonaffective psychosis confounded by poor health habits? *Schizophr Bull* 2012; 38:280-284.
  29. Fernandez-Egea E, Bernardo M, Parellada E, Justicia A, Garcia-Rizo C, Esmatjes E, Conget I, Kirkpatrick B. Glucose abnormalities in the siblings of people with schizophrenia. *Schizophr Res* 2008; 103:110-113.
  30. Fernandez-Egea E, Miller B, Bernardo M, Donner T, Kirkpatrick B. Parental history of type 2 diabetes in patients with nonaffective psychosis. *Schizophr Res* 2008; 98:302-306.
  31. Hansen T, Ingason A, Djurovic S, Melle I, Fenger M, Gustafsson O, et al. At-risk variant in TCF7L2 for type II diabetes increases risk of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2011; 70: 59–63.



32. Bradley AJ, Dinan TG. A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *J Psychopharmacol* 2010; 24: 91-118.
33. McCreddie RG. Scottish Schizophrenia Lifestyle Group. Diet, smoking and cardiovascular risk in people with schizophrenia: descriptive study. *Br J Psychiatry* 2003; 183:534-539.
34. Brown S, Birtwistle J, Roe L, Thompson C. The unhealthy lifestyle of people with schizophrenia. *Psychol Med* 1999; 29:697-701.
35. Ratliff JC, Palmese LB, Reutenauer EL, Liskov E, Grilo CM, Tek C. The effect of dietary and physical activity pattern on metabolic profile in individuals with schizophrenia: a cross-sectional study. *Compr Psychiatry* 2012; 53:1028-1033.
36. Amani R. Is dietary pattern of schizophrenia patients different from healthy subjects? *BMC Psychiatry* 2007; 7:15.
37. Vancampfort D, Probst M, Knapen J, Carraro A, De Hert M. Associations between sedentary behaviour and metabolic parameters in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2012; 200:73-78.
38. Heiskanen T, Niskanen L, Lyytikäinen R, Saarinen PI, Hintikka J. Metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2003; 64:575-579.
39. Saari KM, Lindeman SM, Viilo KM, Isohanni MK, Järvelin MR, Laurén LH, Savolainen MJ, Koponen HJ. A 4-fold risk of metabolic syndrome in patients with schizophrenia: the Northern Finland 1966 Birth Cohort study. *J Clin Psychiatry* 2005; 66: 559-563.
40. Mitchell AJ, Vancampfort D, Sweers K, van Winkel R, Yu W, De Hert M. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic abnormalities in schizophrenia and related disorders--a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Bull* 2013; 39:306-318
41. Papanastasiou E. The prevalence and mechanisms of metabolic syndrome in schizophrenia: a review. *Ther Adv Psychopharmacol* 2013;3:33-51.
42. Gilbert, DL. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899: 1
43. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.

44. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39: 44-84.
45. Dargel R. Lipid peroxidation — a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxicol Pathol* 1992;44: 169-181.
46. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006; 36: 327-358.
47. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872-879.
48. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:79-110.
49. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18 :125-126.
50. van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2899-2937.
51. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
52. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biol Med* 1995; 18: 125–126.
53. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1147-1150.
54. Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 1749-1770.
55. Li Y. Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications. New York: Nova Science Publishers; 2011
56. Đukić MM. Antioksidativna zaštita i preparati sa antioksidativnim delovanjem u: Đukić Mirjana (ur.) Oksidativni stres - slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi, Beograd: Mono i Manjana, 2008, pp 67-95.

57. Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269:1020-1025.
58. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1260-1267.
59. Sousa T, Afonso J, Carvalho F, Albino-Teixeira A. Lipid peroxidation and antioxidants in arterial hypertension. In: Catala A, editor. *Lipid Peroxidation*. InTech; 2012 DOI: 10.5772/50346. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-and-antioxidants-in-arterial-hypertension>
60. Costa LG, Giordano G, Cole TB, Marsillach J, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology* 2013; 307:115-122.
61. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276 :44444-44449
62. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is a HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 542-547
63. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986; 235:747-754.
64. Palozza P, Krinsky NI. Antioxidant properties of carotenoids. In: Livrea MA, Vidali G (eds) *Retinoids: from basic science to clinical applications*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 1994

65. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1182-1190.
66. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:956792. doi: 10.1155/2013/956792. Epub 2013 Apr 29.
67. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999;19:51-71.
68. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893:13-18.
69. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* 2013; 60:1-4.
70. Aikens J, Dix TA. Perohydroxyl radical initiated lipid peroxidation the role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 1991; 266: 15091-15098.
71. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272:20313-20316.
72. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000; 50: 279-289.
73. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004 142:231-255.
74. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004; 19:169-185.
75. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333:19-39.
76. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1173-1181.
77. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007; 40: 248-254.

78. Hoffer A, Osmond H, Smythies J. Schizophrenia: a new approach. *J Ment Sci* 1954; 100: 29–45.
79. Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(7): 2011-2035
80. Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Fisher S (eds). *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*, 6th edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999; pp 637–669.
81. Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry* 2004; 9:684-97.
82. Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res* 2009;34:1021-1029.
83. Casademont J, Garrabou G, Miró O, López S, Pons A, Bernardo M, Cardellach F. Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol* 2007; 27:284-288.
84. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634-1658.
85. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005; 79:157-165.
86. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 1999; 55: 659-665.
87. Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr Res* 1996;19: 1–17.

88. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993;262:689–695.
89. Patel M, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I, McNamara JO. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 1996;16:345–355.
90. Gegg ME, Beltran B, Salas-Pino S, Bolanos JP, Clark JB, Moncada S, Heales SJ. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem* 2003;86: 228-237.
91. du Bois TM, Deng C, Huang XF. Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29:878–888.
92. Mahadik SP, Yao JK. Phospholipids in schizophrenia. In: Lieberman JA, Stroup TS, Perkins DO, editors. *Textbook of Schizophrenia*. Washington, DC: The American Psychiatric Publishing, Inc; 2006, pp 117–135.
93. Skosnik PD, Yao JK. From phospholipid and fatty acid defects to altered neurotransmission: is arachidonic acid a nexus in the pathophysiology of schizophrenia? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:367–384.
94. Horrobin DF, Manku MS, Hillman H, Lain A, Glen M. Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry* 1991;30:795–805.
95. Kaiya H, Horrobin DF, Manku MS, Fisher NM. Essential and other fatty acids in plasma in schizophrenics and normal individuals from Japan. *Biol Psychiatry* 1991; 30:357–362.
96. Glen AIM, Glen EMT, Horrobin DF, Vaddadi KS, Spellman M, Morse-Fisher N, Ellis K, Skinner FS. A red cell membrane abnormality in a sub-group of schizophrenic patients: evidence for two diseases. *Schizophr Res* 1994;12:53–61
97. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK, Mahadik SP. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 2003; 53:56–64.

98. Gattaz WF, Schmitt A, Maras A. Increased platelet phospholipase A<sub>2</sub> activity in schizophrenia. *Schizophr Res* 1995;16:1–6.
99. Mahadik SP, Mukherjee S, Horrobin DF, Jenkins K, Correnti EE, Scheffer RE. Plasma membrane phospholipid fatty acid composition of cultured skin fibroblasts from schizophrenic patients: comparison with bipolar patients and normal subjects. *Psychiatry Res* 1996; 63:133–142.
100. McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Hahn CG, Richtand NM, Stanford KE. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: gender differences and partial normalization with antipsychotic medication. *Schizophr Res* 2007; 91:37–50.
101. Yao JK, Leonard S, Reddy R. Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2000; 42:7–17.
102. Yao JK. Abnormalities of fatty acid metabolism in red cells, platelets and brain in schizophrenia. In: Peet M, Glen I, Horrobin DF, editors; *Phospholipid spectrum disorders in psychiatry and neurology*. 2nd. Lancashire, UK: Marius Press; 2003, pp. 193–212.
103. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30:512–515.
104. Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res* 2006;81:291–300.
105. Medina-Hernández V, Ramos-Loyo J, Luquin S, Sánchez LF, García-Estrada J, Navarro-Ruiz A. Increased lipid peroxidation and neuron specific enolase in treatment refractory schizophrenics. *J Psychiatr Res* 2007; 41:652-658.
106. Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Cereser KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of

- bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32:1677–1681.
107. Al-Chalabi BM, Thanoon IA, Ahmed FA. Potential effect of olanzapine on total antioxidant status and lipid peroxidation in schizophrenic patients. *Neuropsychobiology* 2009;59:8–11.
  108. Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett* 2010; 479:317–320.
  109. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry* 1998; 43:674–679.
  110. Dadheech G, Mishra S, Gautam S, Sharma P. Evaluation of antioxidant deficit in schizophrenia. *Indian J Psychiatry* 2008; 50:16-20.
  111. Wang JF, Shao L, Sun X, Young LT. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord* 2009;11:523–529.
  112. Lohr JB, Kuczenski R, Bracha HS, Moir M, Jeste DV. Increased indices of free radical activity in the cerebrospinal fluid of patients with tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* 1990; 28:535–539.
  113. Dietrich-Muszalska A, Olas B, Rabe-Jablonska J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005;16:386–391.
  114. Dietrich-Muszalska A, Olas B. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry* 2009;10:27–33.
  115. Dietrich-Muszalska A, Malinowska J, Olas B, Głowacki R, Bald E, Wachowicz B, Rabe-Jabłońska J. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochem Res* 2012; 37:1057-1062.



116. 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.
117. Jorgensen A, Broedbaek K, Fink-Jensen A, Knorr U, Greisen Soendergaard M, Henriksen T, Weimann A, Jepsen P, Lykkesfeldt J, Poulsen HE, Balslev Jorgensen M. Increased systemic oxidatively generated DNA and RNA damage in schizophrenia. *Psychiatry Res* 2013; 209:417-423.
118. Mukherjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr Res* 1996;19:19–26.
119. Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 2003; 121:109-122
120. Raffa M, Mechri A, Othman LB, Fendri C, Gaha L, Kerkeni A. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:1178–1183.
121. Zhang M, Zhao Z, He L, Wan C. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci* 2010; 53:112-124.
122. Reddy R, Sahebarao MP, Mukherjee S, Murthy JN. Enzymes of the antioxidant system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1991; 30:409–412.
123. Khan NS, Das I. Oxidative stress and superoxide dismutase in schizophrenia. *Biochem Soc Transact* 1997; 25:418S.
124. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY. Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Res* 2003;117:85–88.

125. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP. Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiatry Res* 1998; 32:385–391.
126. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sögüt S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001; 6:66-73.
127. Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett* 2010; 479:317–320.
128. Gawryluk JW, Wang JF, Andreazza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; 14:123-130.
129. Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 2002; 20:171-175.
130. Dakhale G, Khanzode S, Khanzode S, Saoji A, Khobragade L, Turankar A. Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 2004; 49:205–209.
131. Rukmini MS, D'Souza B, D'Souza V. Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian J Clin Biochem* 2004; 19:114-118.
132. Ciobica A, Padurariu M, Dobrin I, Stefanescu C, Dobrin R. Oxidative stress in schizophrenia - focusing on the main markers. *Psychiatr Danub* 2011; 23: 237-245.
133. Pazvantoglu O, Selek S, Okay IT. Oxidative mechanisms in schizophrenia and their relationship with illness subtype and symptom profile. *Psychiatry Clin Neurosci* 2009; 63:693-700.

134. Kropp S, Kern V, Lange K. Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2005; 17:227-31.
135. Parikh V, Khan MM, Mahadik SP. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res* 2003; 37:43-51.
136. Pillai A, Parikh V, Terry AV, Mahadik SP. 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.
137. Martins MR, Petronilho FC, Gomes KM. Antipsychotic induced oxidative stress in rat brain. *Neurotox Res* 2008; 13:63-69.
138. Miljevic C, Nikolic M, Nikolic-Kokic A, Jones DR, Niketic V, Lecic Tosevski D, Spasic MB. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:303–307.
139. Yao JK, Leonard S, Reddy RD. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Disease Markers* 2006; 22:83–93.
140. Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Krüger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, Cuénod M. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci* 2000;12:3721–3728.
141. Wood SJ, Berger GE, Wellard RM, Proffitt TM, McConchie M, Berk M, McGorry PD, Pantelis C. Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a <sup>1</sup>H-MRS investigation. *Neurobiol Dis* 2009;33:354-357.
142. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. The relative contribution of vitamins E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy

radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924:408–419.

143. Li XF, Zheng YL, Xiu MH, Chen da C, Kosten TR, Zhang XY. Reduced plasma total antioxidant status in first-episode drug-naive patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:1064–1067.
144. Virit O, Altindag A, Yumru M, Dalkilic A, Savas HA, Selek S, Erel O, Herken H. A defect in the antioxidant defense system in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009; 60:87–93.
145. Ustundag B, Atmaca M, Kirtas O, Selek S, Metin K, Tezcan E. Total antioxidant response in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 60: 458–464.
146. Chittiprol S, Venkatasubramanian G, Neelakantachar N, Babu SV, Reddy NA, Shetty KT, Gangadhar BN. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. *J Psychiatr Res* 2010; 44: 310-313.
147. Yao, J.K., Reddy, R., McElhinny, L.G., van Kammen, D.P., 1998b. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 32, 1 – 8.
148. Yao, J.K., Reddy, R.D., van Kammen, D.P., 2000. Abnormal age related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 97, 137– 151.
149. Reddy RD, Keshavan MS, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first episode patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2003; 62:205–212.
150. Suboticanec K, Folnegovic-Smalc V, Korbar M, Mestrovic B, Buzina R. Vitamin C status in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1990; 28: 959–966.
151. McCreadie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G, Paterson JR. The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum

vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *Br J Psychiatry* 1995;167: 610-617.

152. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Hypomagnesemia, oxidative stress, inflammation, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 471-476.
153. Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20:72-77.
154. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-1761.
155. Crowley VE. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann Clin Biochem* 2008; 45:245-255.
156. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003; 170: 21–29.
157. Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, Lopez BL, Koch W, Chan L, Goldstein BJ, Ma XL. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 2007; 115: 1408–1416.
158. Fortuño A, San José G, Moreno MU, Beloqui O, Díez J, Zalba G. Phagocytic NADPH oxidase overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome. *Diabetes* 2006; 55: 209-215.
159. Demircan N, Gurel A, Armutcu F, Unalacak M, Aktunc E, Atmaca H. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 2008; 14: CR97-101.

160. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003; 52: 2346-2352.
161. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Celik H, Guzel S, Selek S, Kocyigit A. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 1187-1193.
162. Magliaro BC, Saldanha CJ. Clozapine protects PC-12 cells from death due to oxidative stress induced by hydrogen peroxide via a cell-type specific mechanism involving inhibition of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Brain Res.* 2009; 1283:14-24.
163. Mahadik SP, Scheffer RE. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55: 45-54.
164. Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, and Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of a combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry* 18: 119–131, 2006.
165. Cadet JL, Lohr JB. Possible involvement of free radicals in neuroleptic-induced movement disorders. Evidence from treatment of tardive dyskinesia with vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570:176–185.
166. Dakhale GN, Khanzode SD, Khanzode SS, Saoji A. Supplementation of vitamin C with atypical antipsychotics reduces oxidative stress and improves the outcome of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 182: 494-498.
167. Adler LA, Peselow E, Rotrosen J, Duncan E, Lee M, Rosenthal M, Angrist B: Vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 1993; 150:1405-1407.
168. Lohr JB, Caligiuri MP: A double-blind placebo-controlled study of vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *J Clin Psychiatry* 57:167–173.

169. Peet M, Laugharne J, Rangarajan N, Reynolds GP: Tardive dyskinesia, lipid peroxidation, and sustained amelioration with vitamin E treatment. *Int Clin Psychopharmacol* 1993;8:151–153.
170. Corrigan FM; van Rhijn AG, Mackay AV, Skinner ER, Horrobin DF. Vitamin E treatment of tardive dyskinesia [letter] *Am J Psychiatry* 1993; 150: 991-993.
171. Shriqui CL, Bradwejn J, Annable L, Jones BD. Vitamin E in the treatment of tardive dyskinesia: a double-blind placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 1992; 149:391–393.
172. Arvindakshan M, Ghate M, Ranjekar PK, Evans DR, Mahadik SP. Supplementation with a combination of omega-3 fatty acids and antioxidants (vitamins E and C) improves the outcome of schizophrenia. *Schizophr Res* 2003; 62:195-204.
173. Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Judd F, Katz F, Katz P, Ording-Jespersen S, Little J, Conus P, Cuenod M, Do KQ, Bush AI. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia-a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry* 2008; 64:361-368.
174. Carmeli C, Knyazeva MG, Cuénod M, Do KQ. Glutathione precursor N acetyl-cysteine modulates EEG synchronization in schizophrenia patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS One* 2012; 7:e29341.
175. Singh V, Singh SP, Chan K. Review and meta-analysis of usage of ginkgo as an adjunct therapy in chronic schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13:257-271.
176. Kim E, Park DW, Choi SH, Kim JJ, Cho HS. A preliminary investigation of alpha-lipoic acid treatment of antipsychotic drug-induced weight gain in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2008; 28:138–46.
177. Salmasi FB, Jazayeri M, Ghaeli P, Hashemian F, Akhondzadeh S, Raisi F, Hosseini SH, Setareh MJ, Khavidaki SD. Comparing the effects of high-dose

- vitamin E with those of placebo on insulin resistance in patients with schizophrenia treated with olanzapine. *J Clin Psychopharmacol* 2009; 29:182-183.
178. Reddy R, Reddy R. Antioxidant therapeutics for schizophrenia. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2047-2055.
  179. Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. VI: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Biochem J.* 1937; 31:1789–1799.
  180. Reed LJ, DeBusk BG, Gunsalus IC, Hornberger CS Jr. Crystalline alpha-lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 1951;114:93–94.
  181. Reed LJ. The chemistry and function of lipoic acid. *Adv Enzymol.* 1957; 18:319–347.
  182. Rosenberg HR, Culik R. Effect of  $\alpha$ -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch Biochem Biophys* 1959; 80:86-93.
  183. Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol* 1979; 62:152–158.
  184. Dupre S, Spoto G, Materese RM, et al. Biosynthesis of alpha-lipoic acid in the rat: Incorporation of S- and C-labeled precursors. *Arch Biochem Biophys* 1980;202:361-365.
  185. Reed LJ. Multienzyme complexes. *Acc Chem Res* 1974; 7: 40–46.
  186. Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J* 1990 4 : 3224-3233.
  187. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:1149-1160.
  188. Lodge JK, Youn HD, Handelman GJ, et al. Natural sources of lipoic acid: determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high



- performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J Appl Nutr* 1997; 49: 3-11.
189. Teichert J, Preiss R. HPLC-methods for determination of lipoic acid and its reduced form in human plasma. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992; 30:511-512.
  190. Sen CK, Roy S, Han D, Packer L. Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis. *Free Radic Biol Med.* 1997;22 :1241-1257.
  191. Takaishi N, Yoshida K, Satsu H, Shimizu M. Transepithelial transport of alpha-lipoic acid across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 2007; 55:5253-5259.
  192. Balamurugan K, Vaziri ND, Said HM. Biotin uptake by human proximal tubular epithelial cells: cellular and molecular aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F823–F831.
  193. Prasad PD, Wang H, Huang W, et al. Molecular and functional characterization of the intestinal Na<sup>+</sup>-dependent multivitamin transporter. *Arch Biochem Biophys* 1999; 366: 95-106.
  194. Gleiter CH, Schreeb KH, Freudenthaler S, et al. Lack of interaction between thioctic acid, glibenclamide and acarbose. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48: 819-825.
  195. Breithaupt-Grogler K, Niebch G, Schneider E, et al. Dose-proportionality of oral thioctic acid--coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8:57-65.
  196. Hermann R, Niebch G, Borbe HO, et al. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic alpha-lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci.* 1996;4:167-174.
  197. Teichert J, Kern J, Tritschler HJ. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36:625-628.

198. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 315-331.
199. Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Direct and indirect antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:114-125.
200. Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:83–93.
201. Moini H, Packer L, Saris NE. Antioxidant and prooxidant activities of alpha lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 182:84-90.
202. Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1995; 50:123–126.
203. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res* 1994; 20:119-133.
204. Suh JH, Moreau R, Heath SH, Hagen TM. Dietary supplementation with (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-related accumulation of iron and depletion of antioxidants in the rat cerebral cortex. *Redox Rep.* 2005; 10: 52-60.
205. Bush AI. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002; 23:1031–1038.
206. Podda M, Tritschler HJ, Ulrich H, Packer L. Alpha-lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 98-104.
207. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. Dihydrolipoic acid - a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:1637-1649.

208. Bast A, Haenen GR. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1988; 963:558-561.
209. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 2001;17: 888-895.
210. Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohé L, Packer L. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 1997; 6: 321-338.
211. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 227–250.
212. Poh ZX, Goh KP. A current update on the use of alpha lipoic acid in the management of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009; 9:392-398.
213. Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 205–215.
214. Alberti KG, Zimmet P and Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23: 469-480.
215. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *Journal of Trauma* 1991; 31: 32 – 35.
216. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304–1313.
217. Auclair C & Voisin E: Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed): *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*, 123-132. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985.
218. Ellman GI: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1952; 82: 70-7.

219. Erel O: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-285.
220. Misra HP & Fridovich I: Chemistry and metabolism of substances of low molecular weight: the role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
221. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9(6): 745-753.
222. Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2013;74(6):400-409.
223. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry* 2011; 70(7): 663-71.
224. Grignon S, Chianetta JM. Assessment of malondialdehyde levels in schizophrenia: A meta-analysis and some methodological considerations. *Progr Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatr* 2007; 31: 365–369.
225. Sarandol, A., Kirli, S., Akkaya, C., Ocak, N., Eroz, E., Sarandol, E. Coronary artery disease risk factors in patients with schizophrenia: Effects of short term antipsychotic treatment. *Journal of psychopharmacology* 2007; 21: 857-863.
226. Mabrouk H, Mechria H, Mechri A, Azizi I, Neffati F, Douki W, Gaha L, Najjar MF. Paraoxonase 1 activity and lipid profile in schizophrenic patients. *Asian J Psychiatr* doi:10.1016/j.ajp.2013.12.019
227. Prakash M, Shetty MS, Tilak P, Anwar N. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. *Online J Health Allied Scs* 2009; 8: 2.
228. Huang TL, Liou CW, Lin TK. Serum thiobarbituric acid-reactive substances and free thiol levels in schizophrenia patients: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res* 2010;177:18–21.

229. Pfeiffer CC, Iliev V. A study of zinc deficiency and copper excess in the schizophrenias. *Int Rev Neurobiol* 1972; 1:141–165.
230. Yanik M, Kocyigit A, Tutkun H, Vural H, Herken H. Plasma manganese, selenium, zinc, copper, and iron concentrations in patients with schizophrenia. *Biol Trace Elem Res* 2004; 98: 109-117.
231. Herrán A, García-Unzueta MT, Fernández-González MD, Vázquez-Barquero JL, Alvarez C, Amado JA. Higher levels of serum copper in schizophrenic patients treated with depot neuroleptics. *Psychiat Res* 2000; 94: 51-58.
232. Nechifor M, Vaideanu C, Palamaru I, Borza C, Mindreci I. The influence of some antipsychotics on erythrocyte magnesium and plasma magnesium, calcium, copper and zinc in patients with paranoid schizophrenia. *J Am Coll Nutr* 2004; 23: 549S-551S.
233. Cramer JL. Trace elements in neuropsychiatry. *B J Psych* 1983; 143: 85-88.
234. Johnson S. Micronutrient accumulation and depletion in schizophrenia, epilepsy, autism and Parkinson's disease? *Med Hypotheses* 2001; 56:641-645.
235. Bitanhirwe BK, Cunningham MG. Zinc: The brain's dark horse. *Synapse* 2009; 63: 1029.
236. Ogundahunsi OA, Duduyemi OO, Soyinka OO. Effects of antipsychotic drugs on the levels of selected trace elements in schizophrenia. *African Scientist* 2011; 12:77-82.
237. Arinola OG, Idonije OB. Status of plasma nitric oxide and non-enzymatic antioxidants before and after antipsychotic treatment in Nigerian patients with schizophrenia. *JRMS* 2009; 14: 37-42.
238. Craven C, Duggan PF, Buckley N, Gaughran F . Serum zinc levels in patients with schizophrenia and their mothers. *Schizophrenia Research* 1997; 26: 83-84.
239. Maksimović ZJ, Djujić I, Jović V, Rsumović M. Selenium deficiency in Yugoslavia. *Biol Trace Elem Res* 1992; 33:187-196.

240. Mihajlovic MB, Vasiljevic Z, Sobajic S, Jovanovic IB, Pesut O, Matic G. Antioxidant status of patients with acute myocardial infarction. *Trace Elem Electrolytes* 2003; 20: 5-7.
241. Pesut O, Backovic D, Sobajic S. Dietary selenium supplementation of pigs and broilers as a way of producing selenium enriched meat. *Acta Vet (Beograd)* 2005; 55: 483-492.
242. Pavlović Z, Miletic I, Jokic Z, Stevanovic J, Sobajic S, Bulat Z. The influence of selenium supplementation of animal feed on human selenium intake in Serbia. *Biotech Anim Husbandry* 2013; 29: 345-352.
243. Duffield AJ, Thomson CD, Hill KE, Williams S. An estimation of selenium requirements for New Zealanders. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 896-903.
244. Vaddadi KS, Soosai E, Vaddadi G. Low blood selenium concentrations in schizophrenic patients on clozapine. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55: 307-309.
245. Alertsen AR, Aukrust A, Skaug OE. Selenium concentration in blood and serum from patients with mental diseases. *Acta Psychiat Scand* 1986; 74: 217-219.
246. Fan X, Liu EY, Hoffman VP, Potts AJ, Sharma B, Henderson DC. Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio: a surrogate to predict insulin resistance and low-density lipoprotein cholesterol particle size in non diabetic patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2011;72(6): 806-812.
247. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 816–823.
248. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 2127–2131.

249. Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 499–505.
250. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* 2006; 70:1437-1442.
251. Vávrová L, Kodydková J, Zeman M, Dušejovská M, Macášek J, Staňková B, Tvrzická E, Zák A. Altered activities of antioxidant enzymes in patients with metabolic syndrome. *Obes Facts* 2013; 6:39-47.
252. Dimitrijevic-Sreckovic V, Colak E, Djordjevic P, Gostiljac D, Sreckovic B, Popovic S, Canovic F, Ilic M, Obrenovic R, Vukcevic V, Nikolic D, Nisic T, Milic G, Pejic G. Prothrombotic factors and reduced antioxidative defense in children and adolescents with pre-metabolic and metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:1140-1144.
253. Garin MC, Kalix B, Morabia A, James RW. Small, dense lipoprotein particles and reduced paraoxonase-1 in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2264-2269.
254. Rizos E, Tambaki AP, Gazi I, Tselepis AD, Elisaf M. Lipoprotein-associated PAF-acetylhydrolase activity in subjects with the metabolic syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72:203-209.
255. Venturini D, Simão AN, Scripes NA, Bahls LD, Melo PA, Belinetti FM, Lozovoy MA, Dichi I. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 2361-2366.
256. Korkmaz GG, Altinoglu E, Civelek S, Sozer V, Erdenen F, Tabak O, Uzun H. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism* 2013; 62: 828-835.

257. Pizent A, Pavlovic M, Jurasovic J, Dodig S, Pasalic D, Mujagic R. Antioxidants, trace elements and metabolic syndrome in elderly subjects. *J Nutr Health Aging* 2010; 14: 866-871.
258. Arnaud J, de Lorgeril M, Akbaraly T, Salen P, Arnout J, Cappuccio FP, van Dongen MC, Donati MB, Krogh V, Siani A, Iacoviello L; European Collaborative Group of the IMMIDIET Project. Gender differences in copper, zinc and selenium status in diabetic-free metabolic syndrome European population - the IMMIDIET study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22: 517-524.
259. Bo S, Durazzo M, Gambino R, Berutti C, Milanesio N, Caropreso A, Gentile L, Cassader M, Cavallo-Perin P, Pagano G. Associations of dietary and serum copper with inflammation, oxidative stress, and metabolic variables in adults. *J Nutr* 2008; 138:305-310.
260. Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Peña-Orihuela P, Perez-Martinez P, Fuentes F, Marin C, Tunez I, Tinahones FJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J. Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study. *Exp Mol Med* 2013; 45:e28. doi: 10.1038/emm.2013.53.
261. Sentí M, Tomás M, Fitó M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masiá R, Marrugat J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5422-5426.
262. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenoproteins. *Annual Review of Nutrition* 1993; 13: 65-81.
263. Hill KE, Wu S, Motley AK, Stevenson TD, Winfrey VP, Capecchi MR, Atkins JF, Burk RF. Production of selenoprotein P (Sepp1) by hepatocytes is central to selenium homeostasis. *J Biol Chem* 2012; 287:40414-40424.
264. Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci* 2001; 4:81-97.
265. Kanazawa T, Chana G, Glatt SJ, Mizuno H, Masliah E, Yoneda H, Tsuang MT, Everall IP. The utility of SELENBP1 gene expression as a biomarker for



- major psychotic disorders: replication in schizophrenia and extension to bipolar disorder with psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B :686-689.
266. Misu H, Ishikura K, Kurita S, Takeshita Y, Ota T, Saito Y, Takahashi K, Kaneko S, Takamura T. Inverse correlation between serum levels of selenoprotein P and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2012; 7:e34952.
267. Rayman MP, Stranges S. Epidemiology of selenium and type 2 diabetes: Can we make sense it? *Free Radic Biol Med* 2013. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.003.
268. Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H. Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387:158-163.
269. Zhang Y, Chen X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2011; 300: E77-E85.
270. Davì G, Santilli F, Patrono C. Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovascular Therapeutics* 2010; 28: 216–226.
271. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radicals Biol Med* 1997; 22: 359–378.
272. Seybolt SE: Is it time to reassess alpha lipoic acid and niacinamide therapy in schizophrenia? *Med Hypotheses* 2010; 75: 572-575.
273. Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: Current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:421–430.
274. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 228-237.

275. Seo EY, Ha AW, Kim WK.  $\alpha$ -Lipoic acid reduced weight gain and improved the lipid profile in rats fed with high fat diet. *Nutr Res Pract* 2012; 6:195-200.
276. Butler JA, Hagen TM, Moreau R. Lipoic acid improves hypertriglyceridemia by stimulating triacylglycerol clearance and downregulating liver triacylglycerol secretion. *Arch Biochem Biophys* 2009; 485: 63-71.
277. Timmers S, de Vogel-van den Bosch J, Towler MC, Schaart G, Moonen Kornips E, Mensink RP, Hesselink MK, Hardie DG, Schrauwen P. Prevention of high-fat diet-induced muscular lipid accumulation in rats by alpha lipoic acid is not mediated by AMPK activation. *J Lipid Res* 2010; 51: 352-359.
278. Carbonelli MG, Di Renzo L, Bigioni M, Di Daniele N, De Lorenzo A, Fusco MA. Alpha-lipoic acid supplementation: a tool for obesity therapy? *Curr Pharm Des* 2010; 16: 840-846.
279. Koh EH, Lee WJ, Lee SA, Kim EH, Cho EH, Jeong E et al. Effects of alpha lipoic acid on body weight in obese subjects. *Am J Med* 2011; 124: 81-88.
280. Ratliff JC, Palmese LB, Reutenauer EL, Tek C. An open-label pilot trial of alpha-lipoic acid for weight loss in patients with schizophrenia without diabetes. *Clin Schizophr Relat Psychoses*; 2013:1-13.
281. Yang R, Shi Y, Li W, Yue P. Effect of lipoic acid on gene expression related to oxidative stress, lipid and glucose metabolism of mice fed with high fat diet. *Wei Sheng Yan Jiu* 2008;37:560-562.
282. Huong DT, Ide T. Dietary lipoic acid-dependent changes in the activity and mRNA levels of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Br J Nutr* 2008; 100: 79-87.
283. Gianturco V, Bellomo A, D'Ottavio E, Formosa V, Iori A, Mancinella M, Troisi G, Marigliano V. Impact of therapy with alpha-lipoic acid (ALA) on the oxidative stress in the controlled NIDDM: a possible preventive way against the organ dysfunction? *Arch Gerontol Geriatr* 2009; 49:129-133.

284. Chang JW, Lee EK, Kim TH, Min WK, Chun S, Lee KU, Kim SB, Park JS. Effects of alpha-lipoic acid on the plasma levels of asymmetric dimethylarginine in diabetic end-stage renal disease patients on hemodialysis: a pilot study. *Am J Nephrol* 2007; 27:70-74.
285. Manning PJ, Sutherland WH, Williams SM, Walker RJ, Berry EA, De Jong SA, Ryalls AR. The effect of lipoic acid and vitamin E therapies in individuals with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23:543-549.
286. Cominacini L, Garbin U, Davoli A, Cenci B, Pasini C & Bosello O: Influence of weight reduction on plasma high-density-lipoprotein cholesterol concentrations in severe obesity: interrelationships with plasma insulin levels. *Ann Nutr Metab* 1991; 35: 339–346.
287. Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 320-328.
288. Jacob S, Ruus P, Hermann R, Tritschler HJ, Maerker E, Renn W et al. Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 309-14.
289. You T, Yang R, Lyles MF, Gong D, Nicklas BJ. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E741-747.
290. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006; 444: 847-853.
291. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 2010; 464:1313-1319.
292. Yang L, Zang SF, Song MQ. Effect of alpha-lipoic acid combined with transient intensive insulin therapy on adipokine level in patients with type 2

- diabetic perineuropathy. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2013;35:353-356.
293. Faraj M, Havel PJ, Phélis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 1594-1602.
294. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 8665-8670.
295. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 1999; 27: 1114–1121.
296. Zembron-Lacny A, Slowinska-Lisowska M, Szygula Z, Witkowski K, Szyszka K. The comparison of antioxidant and hematological properties of N acetylcysteine and alpha-lipoic acid in physically active males. *Physiol Res* 2009; 58: 855-861.
297. Çakatay U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses* 2006; 66: 110–117.
298. Vina J, Gomez-Cambresia MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000; 50: 271-277.

## Biografija

Bojana Vidović je rođena 16.01.1980. godine u Doboju. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, upisala je školske 1998/1999. godine i diplomirala 2005. godine. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž u Apotekarskoj ustanovi Beograd i položila stručni ispit za farmaceute. Doktorske akademske studije iz Bromatologije upisala je školske 2006/2007. godine. Od novembra 2010. godine pohađa zdravstvene specijalističke studije iz Sanitarne hemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od aprila 2005. godine zaposlena je kao saradnik na Katedri za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Hemija hrane i dijetetskih proizvoda izabrana je 2007. godine, a reizabrana 2010. godine. U periodu od 2007-2010. godine bila je angažovana kao saradnik na dva projekta tehnološkog razvoja, finansiranim od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a od 2011. godine saradnik je na dva tekuća projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (III-46009; III-46001), koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Koautor je „Praktikuma iz bromatologije“ i stručne publikacije „Dijetetski suplementi na tržištu Srbije“. Autor je i koautor 10 radova štampanih u časopisima nacionalnog i međunarodnog značaja, kao i 43 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Na V kongresu farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 13-17. oktobar 2010. godine osvojila je II nagradu za prezentaciju rada pod nazivom „Status uhranjenosti i komponente metaboličkog sindroma u pacijenata na terapiji atipičnim antipsihoticima“.

Aktivno učestvuje kao predavač na seminarima kontinuirane edukacije. Član je Sekcije za sanitarnu hemiju Saveza farmaceutskih udruženja Srbije i Društva za ishranu Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Бојана Б. Видовић

број индекса 44/06

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**“Утицај суплементације алфа-липонском киселином на параметре оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код оболелих од схизофреније”**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 15.05.2014.

Видовић Бојана

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојана Б. Видовић

Број индекса 44/06

Студијски програм Докторске академске студије из броматологије

Наслов рада **“Утицај суплементације алфа-липонском киселином на параметре оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код оболелих од шизофреније“**

Ментори: др сц. Брижита Ђорђевић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

др сц. Срђан Миловановић, доцент, Универзитет у Београду-Медицински факултет

Потписани/а Бојана Видовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 15.05.2014.

Vidovic' Bojana

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**“Утицај суплементације алфа-липонском киселином на параметре оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код оболелих од шизофреније”**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 15.05.2014.

Vidovic' Bojana



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.