

STANOVENÍ HYDROXYLOVÝCH A NITROXIDOVÝCH RADIKÁLŮ U DEPRESE A HYPERLIPIDÉMIE ELEKTRONOVOU PARAMAGNETICKOU REZONANCÍ

MIROSLAV ZEMAN^a, PAVEL STOPKA^c,
MAREK VECKA^a, ALEŠ ŽÁK^a, ALEXANDRA
PÍSAŘÍKOVÁ^a, ROMAN JIRÁK^b, BARBORA
STAŇKOVÁ^a, LUCIE VÁVROVÁ^a, JANA
KODYDKOVÁ^a, JANA KRÍŽOVÁ^c a JAROSLAV
MACÁŠEK^a

^a Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 4. interní klinika, ^b Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Psychiatrická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, U Nemocnice 2, 128 00 Praha 2, ^c Ústav anorganické chemie Akademie věd ČR v.v.i., 250 68 Řež u Prahy mirozem@seznam.cz

Došlo 15.9.08, přepracováno 9.2.09, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: Oxidační stres, hyperlipidémie, deprese, EPR

Úvod

V klinické medicíně je dnes věnována velká pozornost pochodům spojeným s oxidačním stresem a působením reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS – reactive oxygen and nitrogen species). Mezi RONS patří jednak volné radikály, jednak sloučeniny, které snadno oxidují jiné látky, nebo se na radikály mění. Ke klinicky nejdůležitějším radikálům řadíme superoxidový anion $\cdot\text{O}_2^-$, oxid dusnatý, $\cdot\text{NO}$, nebo hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$. Mezi neradikálové reaktivní částice patří např. peroxid vodíku, H_2O_2 , kyselina chlorná (HOCl) a peroxyinitrit (ONOO^-) (cit. ¹⁻³).

RONS vznikají v průběhu metabolických pochodů u všech aerobních organismů; na jejich vzniku se účastní i vnější vlivy, jako je elektromagnetické záření, xenobiotika, toxiny či léky. Buňky a tkáň živých organismů jsou před poškozením těmito látkami chráněny antioxidantními ochrannými systémy (enzymovými i neenzymovými). Působení RONS hraje významnou roli při vzniku a rozvoji řady závažných onemocnění, jako jsou ateroskleróza a její komplikace, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc), psychiatrická onemocnění (schizofrenie, depresivní porucha) i zhoubné nádory^{2,4,5} a na straně druhé se tvorba volných radikálů s úspěchem využívá u některých kancerostatik, antivirových a antibakteriálních přípravků. V lidském organismu se však RONS účastní také fyziologických regulací, jako např. účast v procesech přenosu signálu, imunitní odpovědi, v regulaci

cévního tonusu a dalších⁶. Působení RONS v lidském organismu může poškozovat strukturu lipidů, přičemž dochází ke změnám složení biologických membrán a k ovlivnění funkce struktur s nimi spojených (funkce enzymů, iontových kanálů, přenosu signálu aj.). RONS poškozují také strukturu proteinů a DNA. Jsou poškozovány purinové a pyrimidinové báze i deoxyribosa. Oxidace deoxyribosy působí destrukci a přerušení řetězce DNA. Modifikace DNA vede k chybným párováním bází při replikaci DNA a ke změnám genetické informace s často fatálními důsledky pro organismus⁵.

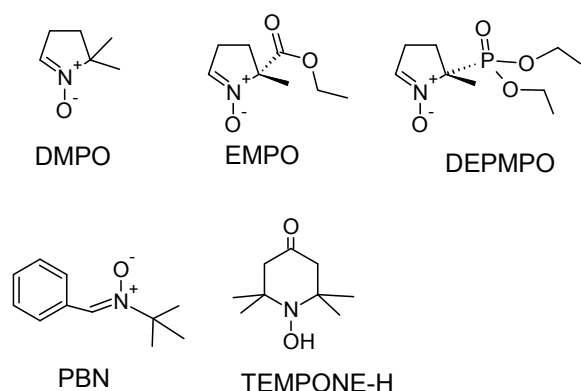
Proti patogennímu působení RONS působí v lidském organismu antioxidantní systém, zahrnující antioxidanty charakteru enzymů i antioxidanty neenzymové. Mezi enzymové antioxidanty patří např. superoxidodismutasa (SOD), katalasa (CAT), glutathion-peroxidasa (GPx), glutathion reduktasa (GR). Glutathion peroxidasa mění H_2O_2 na vodu za spoluúčasti glutathionu (GSH) jako dárce vodíku. Vznikající glutathion disulfid (GSSG) je přeměňován zpět na GSH působením GR, jejímž kofaktorem je NADPH. Mezi neenzymové antioxidanty patří vitaminy A, C a E, GSH, kyselina alfa-lipoová, dále karotenoidy, stopové prvky jako měď, zinek a selen, koenzym Q_{10} (Co Q_{10}) a kofaktory jako kyselina listová, a vitaminy B_1 , B_2 , B_6 a B_{12} , dále též močovina i albumin. Hlavním intracelulárním antioxidantem je GSH, který působí jako přímý lapač radikálů a současně jako kosubstrát pro GPx (přehled působení antioxidantů viz cit. ⁷⁻⁹). Stav, spojený s nadměrnou tvorbou a/nebo nedostatečným odstraňováním RONS, resp. zvýšený poměr prooxidační k antioxidantní aktivitě, je označován pojmem oxidační stres (OS)¹⁰.

Pro sledování OS je možné zvolit několik přístupů¹¹: 1. měřit redoxní potenciály antioxidantních systémů, 2. kvantifikovat přítomné radikály ve vzorku, 3. sledovat přítomnost markerů oxidačního poškození systému a 4. měřit aktivitu antioxidantního systému. Jako nejlepší přímá metoda detekce volných radikálů je dostupná (vedle přístupů polarografických, HPLC nebo UV-VIS) elektronová paramagnetická rezonance (EPR), která dovoluje měřit přímo relativně stabilní radikály¹². Ve spojení s metodou spinového záchytu („spin-trapping“) je pak možné identifikovat a kvantifikovat i některé méně stabilní radikály, jako např. hydroxylový. Cílem této pilotní studie bylo stanovit koncentrace hydroxylového a nitroxidového radikálu v séru nemocných s depresivní poruchou (DP) s hyperlipidemiemi a u zdravých kontrolních osob metodou EPR.

Experimentální část

Metodika EPR

EPR spektroskopie je založena na sorpci mikrovlnného záření nepárovými elektrony za přítomnosti silných magnetických polí. Tím je umožněno studovat: a) volné radikály různých typů, např.: hydroxylové, superoxidové, nitroxidové radikály, b) paramagnetické komplexy (např. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} a další), c) excitované stavy (molekuly



Obr. 1. Činidla zachycující radikálové sloučeniny (spin trap činidla)

s vybuzeným elektronem). V případech, že se jedná o relativně stabilní radikály, je možné jejich přímé měření v plynném, kapalném i pevném stavu. U nestabilních radikálů s krátkou dobou života se používá metoda spinového záchytu („Spin Trapping“). Je to metoda chemické stabilizace radikálů, která prodlužuje dobu jejich života. Krátkodobě žijící radikály reagují s nitrososloučeninami nebo s nitrony a tím se převedou na stabilní radikály. Nejčastěji používané radikálové lapače jsou: 5,5'-dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (DMPO), 5-(diethoxyfosforyl)-5-methyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (DEPMPO), 2-ethoxykarbonyl-2-methyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (EMPO), *N*-*tert*-butyl- α -fenylnitron (PBN) a 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidin (TEMPONE-H) (viz obr. 1). Spektra EPR těchto aduktů s volnými radikály jsou pro určité druhy radikálů charakteristická. Metoda umožňuje zjistit druh radikálů, jejich koncentraci i časové změny.

Zkoumané vzorky zpravidla nejsou stabilní. Krev byla proto odebírána do zkumavky Vacutainer® obsahující draselnou sůl EDTA (koncentrace 1 mg ml⁻¹ krve), jež byla ihned uložena do ledové tříště. Po oddělení plazmy centrifugací (4 °C, 10 min, 1500 g) se odebralo 100 ml plazmy do kryozkumavek s napipetovaným činidlem zachycujícím radikály („spin trap“) (10 ml DMPO) a dále přechovávány při teplotách –80 °C, nebo při teplotě kapalného dusíku –196 °C pro transport. Vzorky jsou rozmraže-

ny, převedeny do ploché křemenné kyvety a ta je umístěna do rezonátoru (měřicí komůrka) EPR spektrometru. Poté je provedeno při teplotě 25 °C vlastní měření. Spektra jsou vyhodnocována pomocí PC a grafických programů, blíže viz též cit.¹³.

Soubory nemocných

V této pilotní studii jsme v době od června 2006 do dubna 2008 vyšetřili 3 skupiny postupně přicházejících osob.

1. Soubor 42 nemocných z ambulance Psychiatrické kliniky VFN a 1. LF UK Praha, u kterých byla diagnostikována depresivní porucha (DP) podle manuálu Americké psychiatrické společnosti (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. vydání)¹⁴;
2. Soubor 60 dosud neléčených nemocných s dyslipidemiemi (koncentrace sérového LDL-cholesterolu $\geq 4,1$ mmol l⁻¹ a/nebo triacylglycerolu $\geq 1,7$ mmol l⁻¹ a/nebo koncentrace HDL-cholesterolu $\leq 1,0$ mmol l⁻¹ u mužů, resp. 1,3 mmol l⁻¹ u žen);
3. Soubor 49 zdravých dobrovolníků, dosud neléčených pro kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, renální či jaterní onemocnění.

Ze studie byly vyloučeny osoby se známkami endokrinopatie a osoby požívající antioxidanty, antidepresiva, potravinové doplňky vícenenasycených mastných kyselin či ethylalkohol v dávce vyšší než 20 g denně. Byli také vyloučeni nemocní, kteří v uplynulých šesti měsících prodělali operační zákrok či infekční onemocnění. Základní charakteristiky sledovaných souborů jsou uvedeny v tab. I.

Klinická a základní biochemická vyšetření

U osob ve sledovaných souborech jsme vypočetli hmotnostní index („body mass index“ – BMI) podle rovnice BMI = hmotnost (kg)/výška (v m)². U všech zúčastněných jsme provedli základní biochemická a hematologická vyšetření, z nichž je uvedena v tab. I pouze koncentrace celkového cholesterolu (TC). Krev byla odebírána po celonočním lačnění do zkumavky Vacutainer® obsahující draselnou sůl EDTA (1 mg ml⁻¹ krve). Koncentrace TC byly stanovovány enzymovou metodou (CHOD/PAP, Test

Tabulka I
Základní charakteristiky sledovaných souborů

| Parametr | HLP ^d (n = 60) | DP ^e (n = 42) ^b | KON ^f (n = 49) |
|---|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Věk, roky | 54,8 ± 10,7 ^a | 61,0 ± 15,8 | 56,1 ± 14,5 |
| Pohlaví, muži/ženy | 35/25 | 7/35 | 19/30 |
| BMI ^c , kg m ⁻² | 29,9 ± 4,1 | 26,6 ± 4,7 | 25,3 ± 4,1 |
| Celkový cholesterol, mmol l ⁻¹ | 6,24 ± 1,44 | 5,79 ± 1,45 | 5,47 ± 0,93 |

^a Průměr ± S.D.; ^b n = počet vyšetřených, ^c BMI – hmotnostní index, ^d HLP – hyperlipidémie, ^e DP – depresivní porucha, ^f KON – kontrolní skupina

Combination, Boehringer Mannheim). Pro statistické hodnocení byl použit software STATISTICA (Tulsa, OK, U.S.A., 2000).

Stanovení nitroxidových a hydroxylových radikálů v séru metodou EPR

Vzhledem k tomu, že většina těchto radikálů je velmi nestabilní, rozhodli jsme se použít metodu spinového zachytu za použití lapačů DMPO, případně PBN. Po vyhodnocení spektrálních parametrů zjištěných radikálů se zjistí dvojitou integrací 1. derivace EPR spekter relativní koncentrace studovaných radikálů a její změny v čase. Výsledné hodnoty se porovnávají se spektry standardů (Mn^{2+}/ZnS , příp. Cr^{3+}/MgO) o známém počtu spinů.

K záznamu spekter jsme používali Elexsys E-540 spektrometr od firmy Bruker (Bruker-Biospin, Rheinstetten, Německo), a magnetické pole na 1H NMR magnetometru s čítačem mikrovlnných frekvencí. Vlastní podmínky měření byly: výkon mikrovlnného pole 20 mW, modulační amplituda 0,1 mT, faktor zeslabení 20 dB, časová konstanta 0,5 s, rychlost záznamu 0,3 mT min⁻¹. Software pro záznam, zpracování a hodnocení naměřených spekter pocházel od firmy Bruker. Záznam 1. derivace spekter EPR byl počítačově zpracováván (program Origin, Origin-Lab Corporation, Northampton, MA, U.S.A.) a spektra byla interpretována za použití databázi z National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. Paralelně byly měřeny kontrolní vzorky, t.j. slepé pokusy.

Pro zjištění časové stability vzorků byly proměřeny náhodně vybrané vzorky. Od okamžiku rozmrazení vzorků z kapalného dusíku, kde byly přechovávány a transportovány, byly vzorky měřeny do 5 min. Změřená spektra se neměnila po dobu 50 min, během dalších 30 min došlo k poklesu intenzity spekter o cca 10 až 12 %. Jedná se spíše o časovou stabilitu radikálů a jejich spekter. Kalibrace byla provedena pomocí firemních standardů Weak Pitch, Strong Pitch, (Bruker-Biospin), dále Mn^{2+}/ZnS a Cr^{3+}/MgO (Magnettech GmbH Berlin, Německo).

Koncentrace hydroxylových radikálů byla kalibrována pomocí srovnávacích měření, kdy jako zdroj přesného množství OH radikálu byl použit peroxid vodíku o známé koncentraci a množství. Koncentrace nitroxidových radikálů byla kalibrována pomocí stabilního radikálu Tempolu (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidinu, Sigma-Aldrich). V oblasti měřených množství volných radikálů (OH, NO)

ve vzorcích byla závislost intenzity signálů na množství/koncentraci zcela lineární, nad tuto hranici dochází k negativním odchylkám od linearit. Přesnost metody byla testována opakováním kompletního měření, tj. pipetování, ředění, ladění spektrometru a měření třikrát, v některých případech až pětkrát. Mez stanovitelnosti byla brána jako hodnota intenzity signálu, která byla dvakrát vyšší než poměr amplitudy/intenzity šumu (při akumulaci spekter třicetkrát vyšší) při uvedených nastavených hodnotách. Akumulace signálu byla vhodná pro měření hydroxylových radikálů, pokud byla koncentrace příliš nízká.

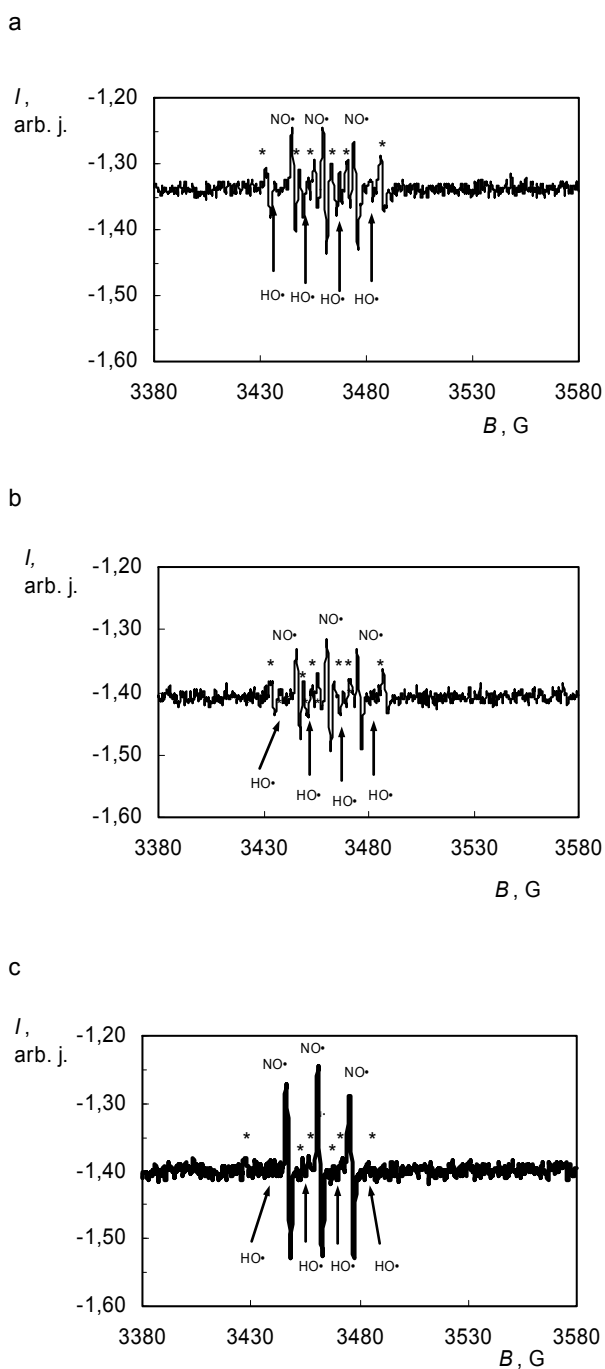
Výsledky a diskuse

Získané výsledky měření nitroxidových a hydroxylových radikálů, měřených metodou EPR jsou uvedeny v tab. II. Osoby ve skupině pacientů s depresivní poruchou (DP) měli statisticky významně vyšší koncentrace nitroxidových radikálů ve srovnání s hyperlipidemickými osobami ($P < 0,05$), rozdíl od kontrolní skupiny nedosáhl statistické významnosti. Ve skupině DP i hyperlipidémie jsme ve srovnání s kontrolní skupinou zjistili vyšší koncentrace OH radikálů, rozdíl však opět vzhledem k velikosti rozptylu nedosáhl statistické významnosti ($P = 0,131$ resp. $P = 0,110$). Ukázky získaných spekter jsou uvedeny na obr. 2a–c. U hypercholesterolemie i hypertriacylglycerolemie je zjišťována zvýšená tvorba $\cdot O_2^-$ (cit.^{15–17}) zřejmě v důsledku zvýšené aktivity xantinoxidasy, (enzymu, redukujícího kyslík na $\cdot O_2^-$) a NAD(P)H oxidasy (enzym, vázaný na buněčnou membránu, který používá elektrony, pocházející z NADPH k redukcí molekulárního kyslíku na $\cdot O_2^-$) (cit.^{18,19}). Léčba hypercholesterolemie statiny (inhibitory klíčového enzymu syntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktasy), je provázena snížením úrovně oxidačního stresu (OS). Působení statinů²⁰ vede mimo jiné k inhibici aktivity enzymu NAD(P)H oxidasy a k poklesu tvorby angiotenzinogenu II, s následným snížením tvorby $\cdot O_2^-$. Základními farmaky, užívanými k léčbě hypertriacylglycerolemie^{21,22} jsou fibráty (deriváty kyseliny fibrové), jejichž podávání rovněž vede k poklesu OS. Fibráty, podobně jako statiny, ovlivňují více metabolických dějů; mimo jiné aktivují jaderný transkripční faktor PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) α (cit.²³) s následnou indukci exprese a aktivace antioxidantních enzymů SOD a GPx a inhibicí indukce enzymu cyklooxygenasy 2

Tabulka II
Nitroxidové a hydroxylové radikály, měřené metodou EPR v plazmě

| Parametr ^{f,g} | HLP ^c (n = 60) | DP ^d (n = 42) | KON ^e (n = 49) |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| NOx, $\mu\text{mol l}^{-1}$ | 2,06 ± 0,90 ^a | 2,80 ± 1,55 ^b | 2,38 ± 1,49 |
| $\cdot\text{OH}$, $\mu\text{mol l}^{-1}$ | 0,83 ± 0,53 | 0,82 ± 0,53 | 0,59 ± 0,26 |

^a Průměr ± S.D., n = počet vyšetřených, ^b $P < 0,05$; rozdíl mezi skupinou DP a KON; analýza rozptylu, ^c HLP – hyperlipidémie, ^d DP – depresivní porucha, ^e KON – kontrolní skupina, ^f NOx – nitroxidový radikál, ^g $\cdot\text{OH}$ – hydroxylový radikál



Obr. 2. Elektronová paramagnetická spektra; a) vzorek osoby z kontrolní skupiny, b) vzorek osoby ze skupiny hyperlipidémie, c) vzorek osoby ze skupiny depresí; NO^\bullet – nitroxidový radikál (triplet), HO^\bullet – hydroxylový radikál (kvartet), * – „six lines“ signál (sextet), zřejmě struktura konjugovaných dvojných vazeb

(COX-2) (cit.²⁴), který katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandin G_2 , který je následně redukován na prostaglandin H_2 za vzniku $^*\text{O}_2^-$.

Etiopatogeneze depresivní poruchy (DP) je složitá. Mezi jinými faktory zde hrají roli chronický stres se zvýšením aktivity hypothalamus-hypofýza-nadledvina a chronický zánětlivý proces. Recidivující chronický stres působí v mozku pokles hladiny tkáňových antioxidantů a zvýšení lipoperoxidace²⁵. Chronický subklinický zánět, často přítomný u pacientů s depresivní poruchou, vede rovněž ke zvýšené tvorbě RONS²⁶. Závažnost symptomů DP korelovala s hladinou lipoperoxidů v séru²⁷. U nemocných s DP byly popsány zvýšené hladiny malondialdehydu (výsledný produkt oxidace polynenasycených mastných kyselin v důsledku působení RONS), aktivita SOD a pokles koncentrace kyseliny askorbové, které se po léčbě antidepresivy vracely k normě, současně s ústupem deprese²⁸. Oxidační stres může zřejmě vést k poklesu hladiny mozkového neurotrofického faktoru BDNF (brain derived neurotrophic factor). BDNF je protein, který usnadňuje růst neuronů, neurogenezi a moduluje neurotransmisí²⁹. V posledních letech byly publikovány práce, které ukazují na význam OS i v patogeneze dalších neuropsychiatrických onemocnění (schizofrenie, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a další). Mozek je totiž vůči OS vysoce citlivý, protože využívá 20 % kyslíku spotřebovaného organismem³⁰ a také obsahuje velké množství vícenenasycených mastných kyselin i železa; v mozku je současně nízká aktivita antioxidantních enzymů.

Význam nálezů zvýšených koncentrací nitroxidového radikálu u depresivních osob v naší studii nelze zatím přesně posoudit. Za fyziologických okolností vzniká $^*\text{NO}$ působením syntáz oxidu dusnatého (NOS) oxidací L-argininu. Významně se podílí na regulaci cévního tonusu, má protizánětlivé účinky, inhibuje agregaci krevních destiček a adhezi leukocytů i destiček na endotel, reguluje proliferaci a diferenciaci buněk cévní stěny a v mozkové tkáni působí jako neuropřenašeč. V podmínkách OS za současně zvýšené tvorby $^*\text{O}_2^-$ vzniká z $^*\text{NO}$ toxický peroxyinitrit (ONOO^-) s řadou nepříznivých účinků. Peroxyinitrit reaguje s CO_2 a vytváří jednoelektronové oxidanty $^*\text{NO}_2$ a CO_3^{*+} , které oxidací aminokyseliny tyrosinu vedou ke vzniku tyrosylového radikálu Tyr $^\bullet$ a pak k tvorbě 3-nitrotyrosinu, 3- NO_2 -Tyr (cit.³¹). Z ONOO^- může také vzniknout $^*\text{OH}$, působící peroxidací lipidů, mutace DNA, jejich fragmentaci nebo modifikace proteinů. Radikál $^*\text{NO}$ může reagovat s peroxylovým radikálem (ROO^\bullet), hydroxylovým radikálem ($^*\text{OH}$) nebo NO^- za vzniku alkyl peroxyinitritu (ROONO), kyseliny dusité (HNO_2) nebo oxidu dusného (N_2O).

Závěrem lze říci, že v této pilotní studii jsme prokázali možnost přímého měření koncentrace hydroxylového a nitroxidového radikálu v lidském séru metodou EPR. Zjistili jsme zvýšení koncentrací nitroxidového radikálu v séru nemocných s depresí, což podporuje hypotézu o působení oxidačního stresu v patogeneze deprese, která je v současné době intenzivně studována. EPR metoda se používá většinou pouze v základním výzkumu orientovaném na chemii, nicméně výsledky práce ukazují na možnost jejího využití i v oblastech klinického výzkumu one-

mocnění, spojených s oxidačním stresem – ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění, diabetes mellitus a další.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR, č. NR 8806-3.

Seznam zkratk

| | |
|---------|--|
| DP | depresivní porucha |
| HMG-CoA | hydroxymethylglutaryl-koenzym A |
| PPAR | peroxisome proliferator activated receptor |
| OS | oxidační stres |
| RONS | reaktivní formy kyslíku a dusíku |

LITERATURA

- Halliwell B., Whiteman M.: *Br. J. Pharmacol.* 142, 231 (2004).
- Štípek S. (ed.): *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada publishing, Praha 2000.
- Racek J., Holeček V.: *Chem. Listy* 93,11A – 780 (1999).
- McCord J. M.: *Am. J. Med.* 108, 652 (2000).
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. T. D., Mazura M., Telser J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44 (2007).
- Dröge W.: *Physiol. Rev.* 82, 47 (2002).
- Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P., Salsman S., Floyd R. A.: *Free Radical Biol. Med.* 28, 1456 (2000).
- Hodgson J. M., Watts G. F.: *Biofactors* 18, 129 (2003).
- Heller R., Unbehaun A., Schellenberg B., Mayer B., Werner-Felmayer G., Werner E. R.: *J. Biol. Chem.* 276, 40 (2001).
- Sies H.: *Exp. Physiol.* 82, 291 (1997).
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (ed.): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press, New York 1999.
- Weil J. A., Bolton J. R., Wertz J. E. (ed.): *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications*. J. Wiley and Sons, New York 1994.
- Rokyta R., Stopka P., Holeček V., Křikava K., Pekárková I.: *Neuroendocrinol. Lett.* 25, 252 (2004).
- American Psychiatric Association.: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. vyd. American Psychiatric Association, Washington, D.C 1994.
- Ohara Y., Peterson T. E., Harrison D. G.: *J. Clin. Invest.* 6, 2546 (1993).
- Guzik T. J., West N. E., Black E., McDonald D., Ratanunga C., Pillai R., Channon K. M.: *Circ. Res.* 86, E85 (2000).
- Kusterer K., Pohl T., Fortmeyer H. P., März W., Scharnagl H., Oldenburg A., Angermüller S., Fleming I., Usadel K. H., Busse R.: *Cardiovasc. Res.* 42, 783 (1999).
- Harrison R.: *Drug. Metab. Rev.* 36, 363 (2004).
- Madamanchi N. R., Vendrov A., Runge M. S.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 39 (2005).
- Jasińska M., Owczarek J., Orszulak-Michalak D.: *Pharmacol. Rep.* 59, 483 (2007).
- Tkáč I., Molčányiová A., Javorský M., Kozárová M.: *Pharmacol. Res.* 53, 261 (2006).
- Zeman M., Žák A., Vecka M., Tvrzická E., Romaniv S., Konárková M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 336 (2002).
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J. C., Staels B.: *J. Clin. Invest.* 116, 571 (2006).
- Bordet R., T. Ouk T., Petrault O., Gelé P., Gautier S., Laprais M., Deplanque D., Duriez P., Staels B., Fruchart J. C., Bastide M.: *Biochem. Soc. Transact.* 34, 1341 (2006).
- Hibbeln J. R., Salem N., Jr.: *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1 (1995).
- Maziere C., Auclair M., Maziere J. C.: *FEBS Lett.* 338, 43 (1994).
- Tsuboi H., Shimoi K., Kinae N., Oguni I., Hori R., Kobayashi F.: *J. Psychosom. Res.* 56, 53 (2004).
- Khanzode S. D., Dakhale G. N., Khanzode S. S., Saoji A., Palasodkar R.: *Redox Rep.* 8, 365 (2003).
- Wu A., Ying Z., Gomez-Pinilla F.: *Eur. J. Neuroscience* 19, 1699 (2004).
- Juurlink B. H., Paterson P. G.: *J. Spinal Cord Med.* 21, 309 (1998).
- Peluffo G., Radi R.: *Cardiovasc. Res.* 75, 291 (2007).

M. Zeman^a, P. Stopka^c, M. Vecka^a, A. Žák^a, A. Písaříková^a, R. Jiráček^b, B. Staňková^a, L. Vávrová^a, J. Kodydková^a, J. Křížová^c, and J. Macáček^a
^aDepartment of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ^bPsychiatric Clinic, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ^cInstitute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež): **Electron Spin Resonance Determination of Hydroxyl and Nitroxide Radicals in Depressions and Hyperlipidemia**

Increasing attention has been paid to clinical manifestation of oxidative stress and reactive oxygen and nitrogen species (RONS), e.g. in atherosclerosis, diabetes mellitus, hyperlipidemia, neurodegenerative and psychiatric diseases. The most clinically significant RONS are free radicals (superoxide anion, hydroxyl and nitroxide radicals) and non-radical species (peroxynitrite, hydrogen peroxide). The aim of this study was to investigate by EPR the concentrations of hydroxyl and nitroxide radicals in blood serum of patients with hyperlipidemia and with depressions and to compare them with healthy persons. Nitroxide radical concentrations were significantly higher in the depressive patients compared with controls. The clinical significance of this finding is not quite clear, but it supports the hypothesis on the participation of oxidative stress in pathogenesis of depressive disorders.