

*Ewa Ambrożewicz, Ewa Zapora, Marek Szczepaniak¹⁾, Krzysztof Wnuczko¹⁾,
Izabela Dziakowska, Elżbieta Skrzydlewska*

PORÓWNANIE DZIAŁANIA CZARNEJ I ZIEŁONEJ HERBATY NA KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. *E. Skrzydlewska*

¹⁾ Klinika Neonatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: *.M. Szczepański*

W pracy porównano zdolności antyoksydacyjne czarnej i zielonej herbaty w przeciwdziałaniu powstawaniu stresu oksydacyjnego wywołanego przez wodoronadtlenek tert-butyłu (t-BHP) w komórkach śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC). Stwierdzono, że czarna i zielona herbata w znacznym stopniu zapobiega zmianom w układzie antyoksydacyjnym komórek HUVEC w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego za pomocą t-BHP i w konsekwencji chronią białka i lipidy komórek przed oksydacyjnymi modyfikacjami.

Hasła kluczowe: HUVEC, czarna herbata, zielona herbata, antyoksydanty, peroksydacja lipidów, modyfikacje białek.

Key words: HUVEC, black tea, green tea, antioxidant, lipid peroxidation, protein modifications.

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym do życia organizmów aerobowych, jednak będąc prekursorem reaktywnych form tlenu (RFT) może być także toksyczny. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają głównie podczas redukcji tlenu w łańcuchu oddechowym mitochondrium, w przemianach cyklooksygenoz, oraz podczas reakcji katalizowanych przez enzymy komórkowe takie jak oksydaza cytochromu P450 i oksydaza ksantynowa (1). W organizmie istnieje ścisła regulacja produkcji i eliminacji RFT, w której uczestniczą głównie endogenne antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne. Działanie endogennych składników układu antyoksydacyjnego muszą jednak wspomagać antyoksydanty egzogenne, zwłaszcza pochodzenia naturalnego. Wśród powszechnie spożywanych napoi odznaczających się działaniem antyoksydacyjnym są herbaty, a zwłaszcza herbata zielona i czarna. Herbata zielona otrzymywana w procesie dehydratacji liści zawiera monomeryczne polifenole – katechiny posiadające udowodnione właściwości antyoksydacyjne (2). Ostatnie badania wykazują jednak, że silne właściwości antyoksydacyjne posiada również czarna herbata otrzymywana w procesie fermentacji liści herbaty i w konsekwencji zawierająca mniejszą ilość katechin, a większą polimerycznych polifenoli – teaflawin i tearubigin, których aktywność biologiczna jest ciągle niedostatecznie udokumentowana (3, 4).

W warunkach stresu oksydacyjnego pierwszą linią obrony tkanek stanowią komórki śródbłonka, które są również w pierwszej kolejności narażone na RFT (5). Jednak komórki te zawierają mniej enzymów antyoksydacyjnych niż inne komórki jak np. fibroblasty czy komórki nabłonkowe typu II (6). Ponieważ komórki śródbłonka występują we wszystkich unaczynionych nowotworach są one bardzo istotnym celem dla związków antyoksydacyjnych. Dlatego celem przeprowadzonych badań było porównanie zdolności czarnej i zielonej herbaty w przeciwdziałaniu powstawania stresu oksydacyjnego wywołwanego przez wodoronadtlenek tert-butyłu (t-BHP) w komórkach śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC).

MATERIAL I METODY

Komórki HUVEC otrzymano z pępowiny noworodka urodzonego z ciąży prawidłowej. Żyłę pępowinową inkubowano w temp. 37°C przez 10 min. z 0,1% roztworem kolagenazy. Następnie perfundowano roztworem HBSS, uzyskany eluat wirowano, a osad komórek HUVEC zawieszano w podłożu M199 (o stęż. 25 mmol/dm³ HEPES), a następnie umieszczano w butelkach hodowlanych (Nagle Nunc International, USA). Eksperymenty przeprowadzano na komórkach z czwartego pasażu w pięciokrotnych powtórzeniach. W celu potwierdzenia czystości, hodowle komórek HUVEC sprawdzano immunocytochemicznie (z przeciwciałami przeciwko czynnikowi Von Willebranda).

Komórki HUVEC zostały podzielone na następujące grupy:

- HUVEC – kontrola – komórki niestymulowane
- HUVEC+zielona herbata – komórki inkubowano przez 2 godz. z ekstraktem zielonej herbaty (50 µg/cm³) (liofilizat TJ Lipton, Englewood Cliffs, NJ). Ekstrakt zawierał: galusan epigalokatechiny (97 mg/g suchego ekstraktu), epigalokatechine (82 mg/g), epikatechine (90 mg/g), galusan epikatechiny (15 mg/g).
- HUVEC+czarna herbata – komórki inkubowano przez 2 godz. z ekstraktem czarnej herbaty (50 µg/cm³) (liofilizat TJ Lipton, Englewood Cliffs, NJ). Ekstrakt zawierał: galusan epigalokatechiny (4,84 mg/g suchego ekstraktu), epigalokatechine (0,74 mg/g), epikatechine (0,94 mg/g), teaflawine (TF₁) (28,32 mg/g), 3-galusan teaflawiny (TF_{2A}) (50,88 mg/g), 3'-galusan teaflawiny (TF_{2B}) (26,72 mg/g), 3,3'-digalusan teaflawiny (TF₃) (28,3 mg/g).
- HUVEC+t-BHP – komórki inkubowano przez 30 min. w obecności wodoronadtlenku *tert*-butyłu (t-BHP) o stęż. 100 µmol/dm³;
- HUVEC+t-BHP+zielona herbata – komórki preinkubowano 2 godz. z ekstraktem z zielonej herbaty, a następnie inkubowano 30 min. w obecności t-BHP o stęż. 100 µmol/dm³;
- HUVEC+t-BHP+czarna herbata – komórki preinkubowano 2 godz. z ekstraktem z zielonej herbaty, a następnie inkubowano 30 min. w obecności t-BHP o stęż. 100 µmol/dm³;

Po zakończeniu inkubacji usunięte zostało medium wzrostowe, a komórki przemywano roztworem PBS i zawieszano w buforze lizującym (0,25% trypsyna z 0,03% EDTA-4Na). Komórki przemyte roztworem PBS poddano dezintegracji przez

3-krotne zamrażanie (-80°C) i odmrażanie. Otrzymaną zawiesinę poddano wirowaniu ($10000 \times g$, 10 min.), a uzyskany płyn nadosadowy użyto do badań.

Oznaczenia biochemiczne

W płynie nadosadowym oznaczono: aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD; EC.1.15.1.1) metodą *Misra and Fridovich* (1972) w modyfikacji *Sykes'a* (1978); aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px; EC.1.11.1.6) metodą *Paglia and Valentine*; aktywność reduktazy glutationowej (GSSG-R; EC.1.6.4.2) metodą *Mize and Langdon*; poziom GSH metodą HPLC wg *Cereser* (9); poziom witaminy A i E metodą HPLC; poziom markera peroksydacji lipidów (MDA) metodą HPLC (11); poziom markerów oksydacyjnej modyfikacji białek (dityrozyny i tryptofanu) oznaczano spektrofotometrycznie; poziom białka oznaczano metodą *Lowry* i współpr. Metody opisano w pracach wcześniejszych (3)

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki dla 5 powtórzeń przedstawione są jako średnia \pm SD. Wyniki były analizowane testem *t-Studenta*. Wartości dla $p < 0,05$ uznano za istotne statystyczne.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uważa się, że antyoksydanty, w tym także polifenole zawarte w diecie pełnią ochronną rolę w patogenezie w chorobach, których uczestniczą RFT, w tym w chorobach cywilizacyjnych takich, jak choroby nowotworowe oraz choroby układu krążenia. Dlatego istotne jest dostarczanie dla organizmu substancji, zwłaszcza naturalnych, o działaniu antyoksydacyjnym. Jednym z powszechnie spożywanych napojów o udowodnionym działaniu antyoksydacyjnym jest zielona herbata (7). W ostatnich latach pojawiły się jednak również doniesienia o antyoksydacyjnym działaniu czarnej herbaty (3, 4). Wyniki niniejszej pracy wykazały, że czarna herbata działa nawet silniej niż zielona na układ antyoksydacyjny komórek HUVEC w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego za pomocą wodoronadtlenku *tert*-butylu (*t*-BHP) (tab. I). Istnieją dwie różne drogi metabolizmu wodoronadtlenku *tert*-butylu; jedna z udziałem cytochromu P450, a druga z udziałem peroksydazy glutationowej przekształcającej *t*-BHP w *t*-butanol i utleniony glutation (8, 9). W wyniku metabolizmu *t*-BHP może dochodzić do wzrostu poziomu RFT (8), które mogą wchodzić w reakcje z ważnymi biologicznie składnikami komórek. Potwierdzają to wyniki niniejszej pracy, które wykazały, że stres oksydacyjny wywołany przez *t*-BHP powoduje oksydacyjne modyfikacje białek i lipidów (tab. I).

Uważa się, że głównym celem działania RFT są białka, które w różnym jednak stopniu wchodzą w reakcje z RFT (10). Spośród aminokwasów wchodzących w skład białek najbardziej wrażliwe na utlenianie są aminokwasy zawierające grupę sulfhydrylową oraz aminokwasy aromatyczne. Uznany markerem modyfikacji białek wywołanych głównie przez rodniki hydroksylowe jest poziom dityrozyny (11). Przeprowadzone badania wykazują, że w obecności *t*-BHP ilość tryptofanu ulega znacznemu obniżeniu, podczas gdy poziom dityrozyny wzrasta (tab. I). Konsekwencją modyfikacji reszt aminokwasowych białek są zmiany w drugo- i trzeciorzędowej strukturze białek, co może prowadzić do zmiany w funkcji tych związków.

Tab e l e 1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych i poziom antyoksydantów nieenzymatycznych oraz markerów oksydacyjnych modyfikacji lipidów [MDA] i białek [dityrozyna, tryptofan] w komórkach HUVEC po ich inkubacji z t-BHP, zieloną herbatą i czarną herbatą. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD (n=5)

Tab l e 1. Antioxidant enzymes activity, level of non-enzymatic antioxidants, level of markers of lipid peroxidation (MDA) and protein oxidative modifications (dityrosine and tryptophan) in the HUVEC cells after their incubation with t-BHP, green tea and black tea. Data are presented as mean \pm SD (n=5)

Grupa badana	SOD (U/mg białka)	GSH-Px (mU/mg białka)	GSSG-R (mU/mg białka)	GSH (nmol/mg białka)	Vit. E (nmol/mg białka)	Vit. A (pmol/mg białka)	MDA (pmol/mg białka)	Dityrozyna (mU/mg białka)	Tryptofan (mU/mg białka)
HUVEC	2,02 \pm 0,12	564 \pm 37	3,54 \pm 0,21	174 \pm 10	17,6 \pm 1,1	23,9 \pm 1,5	36,2 \pm 2,0	0,90 \pm 0,05	2,94 \pm 0,16
HUVEC +zielona herbata	2,20 \pm 0,18	678 \pm 44 ^a	4,87 \pm 0,30 ^a	186 \pm 16	17,4 \pm 1,2	24,4 \pm 1,6	29,7 \pm 1,8 ^a	0,82 \pm 0,04 ^a	3,52 \pm 0,19 ^a
HUVEC +czarna herbata	2,32 \pm 0,19	694 \pm 40 ^a	5,04 \pm 0,34 ^a	196 \pm 20	17,8 \pm 1,1	23,7 \pm 1,3	31,4 \pm 1,6 ^a	0,84 \pm 0,04 ^a	3,28 \pm 0,17 ^a
HUVEC+t-BHP	2,47 \pm 0,14 ^a	237 \pm 18 ^a	4,78 \pm 0,31 ^a	122 \pm 10 ^a	14,2 \pm 0,9 ^a	9,7 \pm 1,1 ^a	86,6 \pm 5,6 ^a	1,56 \pm 0,10 ^a	2,07 \pm 0,11 ^a
HUVEC+t-BHP +zielona herbata	2,57 \pm 0,17 ^a	428 \pm 28 ^{a,d,e}	5,25 \pm 0,31 ^{a,e}	162 \pm 18 ^{d,e}	16,1 \pm 1,2	22,8 \pm 1,4	54,5 \pm 3,5 ^{a,d,e}	1,02 \pm 0,06 ^{a,d,e}	2,72 \pm 0,17 ^{d,e}
HUVEC+t-BHP +czarna herbata	2,59 \pm 0,18 ^a	411 \pm 25 ^{a,d,e}	5,57 \pm 0,36 ^{a,e}	169 \pm 20 ^{d,e}	15,9 \pm 1,1	22,0 \pm 1,2	58,4 \pm 3,7 ^{a,d,e}	1,14 \pm 0,07 ^{a,d,e}	2,54 \pm 0,14 ^{d,e}

a – różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą HUVEC (p<0,05); b – różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą HUVEC+zielona herbata(p<0,05);

c – różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą HUVEC+czarna herbata (p<0,05); d – różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą HUVEC+t-BHP (p<0,05);

e – różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą HUVEC+t-BHP+zielona herbata (p<0,05).

Niezależnie od modyfikacji struktury białek wywołanej przez RFT, reszty aminokwasowe białek wchodzą również w reakcje z produktami peroksydacji lipidów. Spośród drobnocząsteczkowych związków powstających w czasie peroksydacji lipidów najbardziej reaktywne są aldehydy w tym dialdehyd malonowy i 4-hydroksynonenal (12), związki, które mogą pełnić funkcję „wtórnych przekaźników” w reakcjach wolnorodnikowych. Stwierdzono, że t-BPH powoduje istotne statystycznie podwyższenie poziomu MDA (tab. I). Reaktywność tych związków wynika z ich silnych właściwości elektrofilowych, co w powiązaniu z nuklofilowymi właściwościami tiolowych, aminowych i histydynowych grup białkowych, może być przyczyną ich reakcji z białkami. Wykazano, że w wyniku tego typu reakcji 4-hydroksynonenal hamuje aktywność peroksydazy glutationowej (13). Aktywność tego enzymu hamowana jest dodatkowo przez specyficzną reakcję pomiędzy dialdehydem malonowym lub 4-hydroksynonalem i selenocysteiną, która stanowi centrum aktywne proksydazy glutationowej (14). Enzym ten działa w kooperacji z GSH jako koenzymem. W niniejszej pracy wykazano obniżenie poziomu zredukowanego glutationu po zastosowaniu t-BHP. W związku z powyższym dochodzi do obniżenia aktywności peroksydazy glutationowej, a ponieważ GSH-Px bierze udział w rozkładzie nadtlentków w tym także nadtlentków lipidów, obniżenie jej aktywności zaobserwowane w czasie badań koresponduje z podwyższonym poziomem produktów peroksydacji lipidów. Nasileniu procesu peroksydacji lipidów po zastosowaniu t-BHP sprzyja również obniżenie poziomu witamin: A i E, które pełnią rolę lipofilowych antyoksydantów chroniących składniki błon biologicznych w tym także fosfolipidy błonowe. Stwierdzono, że obniżeniu aktywności peroksydazy glutationowej, towarzyszy podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlentkowej i reduktazy glutationowej. Sprzyja to nasilonej dysmutacji anionorodnika ponadtlentkowego i zwiększenie ilości nadtlentku wodoru, a wiadomo, że nadtlentek wodoru może aktywować ekspresję genów poprzez element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE). Uważa się, że mechanizm ten może polegać na elektrofilowej modyfikacji grup sulfhydrylowych, co zaobserwowano w ludzkich fibroblastach (15). Wzrost aktywności antyoksydacyjnej enzymów może być również spowodowany przez większą dostępność jonów metali przejściowych w tym jonów miedzi będących kofaktorami dysmutazy ponadtlentkowej (16). Natomiast wzrost aktywności GSSG-R może być spowodowany dążeniem komórek do utrzymania właściwego poziomu glutationu zredukowanego.

Dotychczasowe badania wykazywały, że komórki śródbłónka są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny niż fibroblasty (17), a istotną rolę w przeciwdziałaniu powstawania nadtlentków pełni układ antyoksydacyjny zależny od glutationu (18). Jest to niezwykle ważne ze względu na lokalizację komórek HUVEC w układzie naczyniowym, gdzie mogą one być narażone na działanie nadtlentków np. w czasie miejscowych stanów zapalnych lub kontaktu z utlenionymi lipoproteinami (19), co może prowadzić do uszkodzenia komórek śródbłónka. Zdolności antyoksydacyjne komórek śródbłónka są bardzo ważne dla zachowania prawidłowych ich funkcji, dlatego tak wiele uwagi poświęca się antyoksydantom naturalnym pochodzącym z owoców, warzyw i napoi, dostarczanych do organizmu wraz z pożywieniem. Herbata jest jednym z najczęściej spożywanych przez ludzi napoi, a jednocześnie odznacza się właściwościami antyoksydacyjnymi, dzięki zawartości polifenoli.

Za właściwości antyoksydacyjne zielonej herbaty odpowiadają głównie katechiny, które zapobiegają powstawaniu RFT, hamując aktywność enzymów biorących udział w ich generowaniu oraz uczestniczą w ich usuwaniu zmiatając RFT, lub kompleksując jony metali przejściowych katalizujących reakcje wolnorodnikowe. Prowadzone w ostatnich latach badania pokazały, że polimeryczne polifenole znajdujące się w czarnej herbacie, czyli teaflawiny powstające podczas fermentacji liści herbaty, posiadają nawet silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż ich prekursorzy – katechiny (4). Wykazano, że teaflawiny mają zdolność zapobiegania powstawania rodników tlenowych poprzez hamowanie aktywności oksydazy ksantynowej – enzymu biorącego udział w produkcji aniorodników ponadtlenkowych. Ponadto teaflawiny mają zdolność zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego, tlenu singletowego i rodników hydroksylowych 10 razy efektywniej niż katechiny (20). Ten fakt może tłumaczyć obserwowany w czasie badań większy wzrost aktywności peroksydazy glutationowej, oraz stężenia GSH i witamin po zastosowaniu ekstraktu z czarnej herbaty.

Polifenole herbat działając antyoksydacyjne, zmniejszają prawdopodobieństwo zajścia reakcji pomiędzy RFT i białkami oraz fosfolipidami, co w rezultacie chroni je przed modyfikacjami. Zielona oraz czarna herbata mają zdolność zmiatania wolnych rodników w fazie wodnej chroniąc w ten sposób reszty białkowe oraz zmniejszania ruchliwości RFT w dwuwarstwie lipidowej, gdyż katechiny i teaflawiny mają zdolność przenikania do rdzenia hydrofobowego błony. Sprzyja to zmianom w ułożeniu lipidów błonowych powodując jej stabilizację (21). Poprzez regenerację α -tokoferolu polifenole herbat chronią przed zużyciem lipofilowych antyoksydantów, a także chronią askorbinian (antyoksydant hydrofilowy), który uczestniczy w cyklu wzajemnych przemian antyoksydantów nieenzymatycznych. Powoduje to obserwowane w pracy obniżenie nasilenia procesu peroksydacji lipidów w czasie ekspozycji fosfolipidów błonowych na działanie RFT pochodzących z fazy wodnej.

Niezależnie od faktu, że komórki śródbłonka stanowią pierwszą linię obrony wszystkich tkanek są one także składnikami wszystkich unaczynionych guzów. Dlatego wydaje się, że są celem działania zarówno RFT jak i antyoksydantów, w tym także polifenoli. Jednakże ochronne działanie polifenoli w warunkach fizjologicznych i w warunkach patologicznych może niestety nasilać rozwój stanów chorobowych np. rozwój nowotworów. Jest to bardzo istotne w przypadku herbat, które są spożywane przez większość populacji ludzkiej.

WNIOSKI

Czarna i zielona herbata w podobnym stopniu przeciwdziałają zmianom w aktywności/poziomie parametrów antyoksydacyjnych komórek śródbłonka (HUVEC) w warunkach stresu oksydacyjnego.

Obie herbaty zapobiegają w znaczącym stopniu powstawaniu oksydacyjnych modyfikacji lipidów i białek.

E. Ambrożewicz, E. Zapora, M. Szczepański, K. Wnuczko,
I. Dziakowska, E. Skrzydlewska

COMPARISON OF BLACK AND GREEN TEA EFFECT
ON ENDOTHELIAL CELLS

Summary

The aim of the present study was to compare antioxidant activity of black and green tea against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). It has been shown that both black and green tea considerably prevent changes in HUVEC antioxidant system in conditions of oxidative stress induced by t-BHP, thereby protecting proteins and lipids from oxidative modification.

PIŚMIENNICTWO

1. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine Fourth Edition. Oxford University Press, UK, 2006. – 2. Khan N., Mukhtar H.: Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.*, 2007; 81: 519-33. – 3. Łuczaj W., Skrzydlewska E.: Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food Chem. Tox.*, 2004; 42: 2045-2051. – 4. Leung L.K., Su Y., Chen R., Zang Z., Huang Y., Chen Z.Y.: Theaflavins in Black Tea and Catechins in Green Tea Are Equally Effective Antioxidants. *J. Nutr.*, 2001; 131(17): 2248-2251. – 5. Therade-Matharan S., Laemmel E., Duranteau J., and Vicaut E.: Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC. *Am. J. Phys., Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 2004; 287: 1037-1043. – 6. Bishop C.T., Mirza Z., Crapo J.D., Freeman B.A.: Free radical damage to culture porcine aortic endothelial cells and lung fibroblasts: modulation by culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 1985; 21: 229-236. – 7. Harold N., Graham P.D.: Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev. Med.*, 1992; 21: 334-350. – 8. Rush G.F., Gorski J.R., Ripple M.G., Sowinski J., Bugelski P., Hewitt, W.R.: Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1985; 78: 473-483. – 9. Joyeux M., Rolland A., Fleurentin J., Mortier F., Dorfman P.: Tert-Butyl hydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying antihepatotoxic crude drugs. *Planta Med.*, 1990; 56: 171-174. – 10. Gębicki J.: The role of proteins in biological damage induced by oxidative stress. *Protein Oxidation and Disease*. Ed Jens Pietssch, 2006: 1-31.

11. Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T.: Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol. Med.*, 1999; 27: 1151-1163. – 12. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner J.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991; 11: 81-128. – 13. Mitchell D.Y., Petersen D.R.: The oxidation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987; 87: 403-410. – 14. Bosch-Morell F., Flohe L., Marin N., Romero F.J.: 4-hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase protection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 26: 1383-1387. – 15. Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B.: The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 11632-11659. – 16. Bueno P., Piqueras A.: Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. *J. Plant Growth Regul.*, 2002; 36: 161-167. – 17. Michiels C., Toussaint O., Remacle J.: Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, 1990; 144: 295-302. – 18. Suttorp N., Toepfer W., Roka L.: Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *Am. J. Physiol.*, 1986; 251: 671-680. – 19. Masaaki M., Mitsunori I., Hajime K.: Induction of Adhesion Molecule Expression in Vascular Endothelial Cells by Oxidized Low-Density Lipoprotein: Pharmaceutical, Biochemical and Clinical Applications. *Curr Pharm. Analysis.*, 2007; 3: 133-140. – 20. Thiagarajan G., Chandani S., Sundari C.S., Rao S.H., Kulkarni A.V., Balasubramanian D.: Antioxidant properties of green and black tea, and their potential ability to retard the progression of eye lens cataract. *Exp. Eye Res.*, 2001; 73: 393-401.

21. Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M.: Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids. *Arch Biochem. Biophys.*, 2000; 373: 102-109.