

*Renata Polaniak, Rafał Jakub Buldak¹⁾, Małgorzata Latocha²⁾, Ewa Romuk,
Dorota Karbowska, Karol Ochocki, Ewa Birkner*

ZABURZENIA UKŁADU PROOKSYDACYJNO/ ANTYOKSYDACYJNEGO KOMÓREK GLEJAKA MÓZGU POD WPLYWEM KARBOPLATYNY – *IN VITRO*

Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *E. Birkner*

¹⁾ Katedra i Zakład Fizjologii w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *K. Żwirska-Korzala*

²⁾ Zakład Biologii Komórki w Sosnowcu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: dr hab. n. farm. *M. Latocha*

Celem badań była ocena wybranych wskaźników układu prooksydacyjno/antyoksydacyjnego w hodowli komórek glejaka mózgu linii SNB19 pod wpływem karboplatyny, w różnych stężeniach i przedziałach czasowych. Hodowlę prowadzono na linii komórkowej glejaka mózgu SNB19, w warunkach standardowych. Komórki nowotworowe linii SNB19 traktowano karboplatyną w dwóch stężeniach: 20 i 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ medium hodowlanego. Stwierdzono, że karboplatyna w zastosowanych stężeniach i przedziałach czasowych zaburza układ prooksydacyjno/antyoksydacyjny komórek nowotworowych glejaka mózgu linii SNB19 hodowanych in vitro.

Hasła kluczowe: glejak mózgu, hodowla komórkowa, dysmutaza ponadtlenkowa, izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydaza glutationowa, dialdehyd malonowy.

Key words: brain glioma, cell cultures, superoxide dismutase, isozymes of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, malondialdehyde.

Szczególnie niebezpiecznym typem nowotworu jest glejak mózgu. Na podstawie badań stwierdzono, że ma on właściwość modyfikowania odpornościowych komórek makrofagowych tak, aby pomagały w rozwoju nowotworu. Wpływ na te procesy mają: TGF- β , jako transformujący czynnik wzrostowy oraz białka: osteopontyna i laktadheryna. Związki te, hamują inicjowanie stanu zapalnego i odpowiedź przeciwnowotworową organizmu. Pomimo stosowania nowoczesnych metod leczenia, rokowania w nowotworach mózgu, w tym w glejakach, są złe (1). Do chemioterapeutyków od dawna stosowanych w leczeniu nowotworów należą pochodne platyny. Przykładem może być karboplatyna i jej wpływ na wzrost oraz przemiany metaboliczne komórek nowotworowych. Wiadomym jest, że peroksydacja lipidów w bło-

nach np. kardiomiocytów może w konsekwencji prowadzić do uszkodzeń komórek pod wpływem oddziaływania tych leków. Ich skuteczność terapeutyczna jest ściśle związana z podaną dawką. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono istotną rolę analizy parametrów stresu oksydacyjnego. Badania te, dają możliwość wytypowania przemian uzupełniających elementy prognostyczno-diagnostyczne w diagnostyce nowotworowej. Do oceny skuteczności leczenia można wykorzystać aktywność enzymów układu prooksydacyjno/antyoksydacyjnego, ocenę ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, stężenie markerów peroksydacji lipidów, stężenie produktów działania reaktywnych form tlenu i wskaźniki stanu zapalnego badanego materiału (2).

Celem badań była ocena wybranych markerów układu prooksydacyjno/antyoksydacyjnego: aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i jej izoenzymów (mitochondrialnego i cytoplazmatycznego), peroksydazy glutationowej oraz peroksydacji lipidów na podstawie stężenia dialdehydu malonowego, pod wpływem karboplatyny, w lizatach komórkowych glejaka mózgu linii SNB19 *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Do hodowli użyto linię ludzkiego glejaka mózgu SNB19. Jako podłoże hodowlane zastosowano medium *Dulbecco's* z L-glutaminą, wzbogacone wołową surowicą płodową. Hodowlę prowadzono wg standardowej procedury (3). Komórki potraktowano karboplatyną w dwóch stężeniach: 20 i 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ medium komórkowego, w dwóch przedziałach czasowych: 24 i 72 godz. Komórki badanej linii komórkowej podzielono na cztery grupy: B1 – karboplatynę podawano do hodowli w stężeniu 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, czas ekspozycji 24 godz.; B2 – karboplatynę podawano do hodowli w stężeniu 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, czas ekspozycji 24 godz.; B3 – karboplatynę podawano do hodowli w stężeniu 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, czas ekspozycji 72 godz.; B4 – karboplatynę podawano do hodowli w stężeniu 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, czas ekspozycji 72 godz. Grupy kontrolne stanowiły kolonie komórek nie poddane działaniu karboplatyny.

Przygotowanie lizatów komórkowych: komórki nowotworowe linii SNB19 zostały mechanicznie oddzielone od podłoża i odwirowane ($1000\text{--}2000 \times \text{g}/10 \text{ min}/+4^\circ\text{C}$). Uzyskany supernatant odessano z paletki osadzonych komórek, które następnie zlizowano za pomocą schłodzonego buforu zawierającego: Tris-HCl o stęż. 50 mmol/dm^3 (pH 7,5), EDTA o stęż. 5 mmol/dm^3 i DTT o stęż. 1 mmol/dm^3 . Otrzymaną zawiesinę lizatu komórkowego odwirowano powtórnie ($10\ 000 \times \text{g}/15 \text{ min}, +4^\circ\text{C}$). Po wirowaniu zebrany supernatant komórkowy, przechowywany na lodzie posłużył do oznaczeń aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych.

Po 24 i 72 godz. od podaniu cytostatyku (do hodowli) w uzyskanych lizatach komórkowych oznaczano aktywności: dysmutazy ponadtlenkowej, SOD [EC 1.15.1.1] i jej izoenzymów: mitochondrialnego – MnSOD i cytoplazmatycznego – Cu/Zn-SOD; peroksydazy glutationowej – GSH-Px [EC 1.11.1.9] oraz stężenie dialdehydu malonowego – MDA, jako markera peroksydacji lipidów. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz jej izoenzymów oznaczano wg metody *Oyanagui* (4), wykorzystując ich różną podatność na inhibicję cyjankiem i wyrażono ją w jednostkach nitrowych/ cm^3 lizatu komórkowego (NU/cm^3). Jednostka nitrowa jest to taka

ilość enzymu, która rozkłada w jednostce czasu 50% ilości powstałego anionorodnika ponadtlenkowego (4). Aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px) oznaczano wg metody *Paglia i Valentine'a* (5), wyrażając ją w $\mu\text{molach NADPH}_2/\text{cm}^3$ lizatu komórkowego/min. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczano wg metody *Ohkawy* i współpr. (6), wykorzystując reakcję z kwasem tiobarbiturowym i wyrażono w $\mu\text{molach MDA}/\text{cm}^3$ lizatu komórkowego (7).

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o program StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com. Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym Gaussa weryfikowano testem zgodności *Shapiro-Wilka*. Analizę porównawczą dla zmiennych ciągłych realizowano za pomocą testu parametrycznego t-studenta lub testu nieparametrycznego *U Manna Whitney'a*. Wyniki badań przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SD lub mediany \pm IQR. Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany przy poziomie istotności $p < 0,05$.

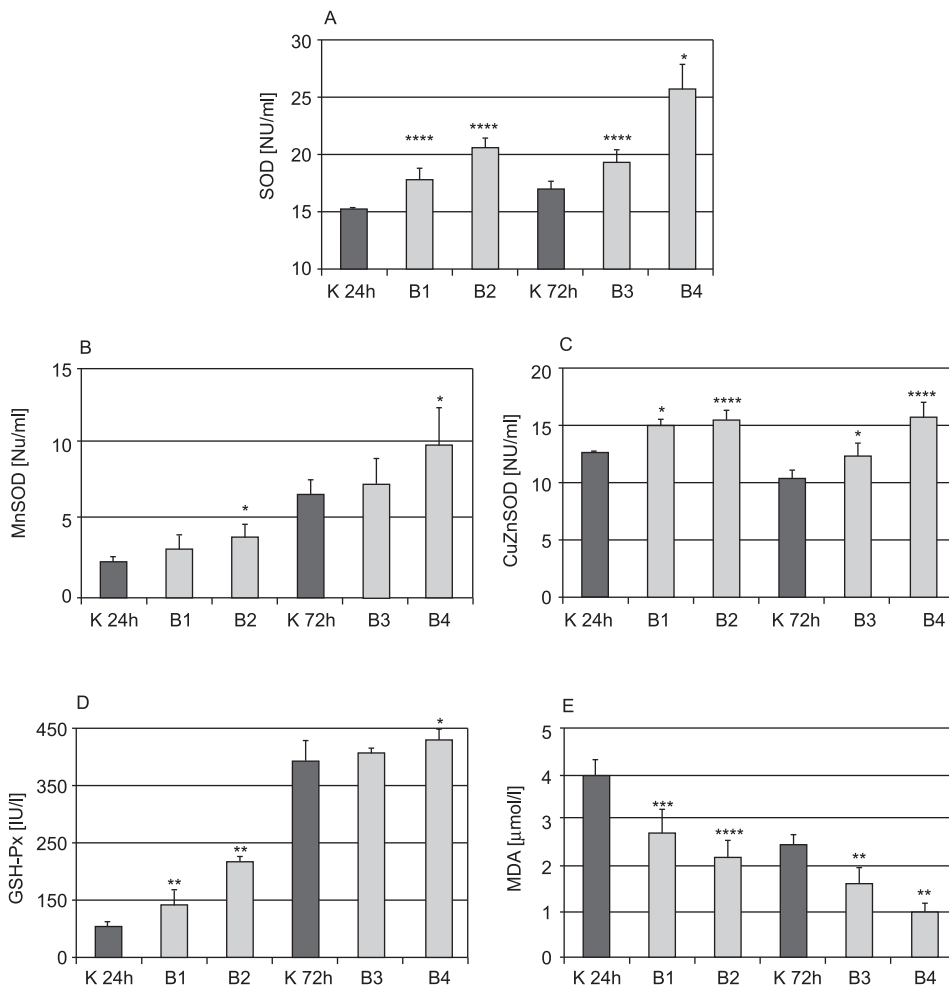
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Karboplatyna jest preparatem należącym do pochodnych platyny, o właściwościach farmakologicznych i zastosowaniu podobnym do cisplatyny. Jest lepiej tolerowana przez pacjentów i wykazuje większy współczynnik leczniczy od związku macierzystego (8). Hodowle komórkowe z kolei, dostarczają bogatych możliwości oceny aktywności i stężenia produktów przemian biochemicznych szlaków metabolicznych (9).

W przeprowadzonych badaniach obserwowano zmiany aktywności izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej: mitochondrialnego i cytoplazmatycznego, peroksydazy glutationowej oraz zmiany stężenia dialdehydu malonowego, pod wpływem karboplatyny w zastosowanych stężeniach i przedziałach czasowych. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wykresów na ryc. 1.

Aktywność całkowita dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w komórkach glejaka linii SNB19 była najwyższa po 72 godz. ekspozycji komórek na działanie karboplatyny w stężeniu $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, w stosunku do pozostałych grup badanych oraz komórek nietraktowanych, ($p < 0,001$ vs K 24h). Porównując aktywność SOD w komórkach badanej linii traktowanych karboplatyną w dwóch różnych przedziałach czasowych, zaobserwowano wyższą aktywność tego enzymu po 72 godz. ekspozycji względem 24 godz. (w obydwu zastosowanych stężeniach, $p < 0,05$); (ryc. 1A).

Analizując aktywność poszczególnych izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, stwierdzono, że aktywność izoenzymu MnSOD (mitochondrialnego) w komórkach traktowanych karboplatyną była istotnie statystycznie wyższa tylko w grupach komórek traktowanych w stężeniu: $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ zarówno po 24 oraz 72 godz. ekspozycji w stosunku do odpowiednich grup kontrolnych (komórki nietraktowane zbierane po 24 lub 72 godz., odpowiednio, ($p < 0,05$); (ryc. 1B). Aktywność izoenzymu Cu/ZnSOD była wyższa w komórkach traktowanych karboplatyną w większym stężeniu ($60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) w każdym ze stosowanych przedziałów czasowych (24 i 72 godz.) w stosunku do odpowiednich grup kontrolnych ($p < 0,0001$). Nie mniej, większą aktywność izoenzymu Cu/ZnSOD (cytoplazmatyczna izoforma SOD) obserwowano



Ryc. 1. Wpływ karboplatyny w różnych stężeniach na aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom dialdehydu malonowego w lizatach komórkowych ludzkiego glejaka linii SNB-19 (po 24 i 72 godz.). A – aktywność całkowita SOD, B – aktywność MnSOD, C – CuZnSOD, D – GSH-Px, E – stężenie dialdehydu malonowego (MDA).

Skróty: K 24h – grupa kontrolna (24 h); K 72h – grupa kontrolna (72 h); B₁ – Karboplatyna (20 µg/cm³)/24 h; B₂ – Karboplatyna (60 µg/cm³)/24h; B₃ – Karboplatyna (20 µg/cm³)/72 h; B₄ – Karboplatyna (60 µg/cm³)/72 h.

Wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); n = 6; test t studenta: * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001) vs grupa kontrolna (24 lub 72 h, odpowiednio).

Fig. 1. Influence of different concentration of carboplatin on activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in human glioma SNB-19 cell lysates (after 24 and 72 h). A – total SOD activity, B – MnSOD, C – CuZnSOD, D – GSH-Px activity, E – malondialdehyde (MDA) concentration.

Abbreviations: K 24h – control group (24 h); K 72h – control group (72 h); B₁ – Carboplatin (20 µg/cm³)/24 h; B₂ – Carboplatin (60 µg/cm³)/24h; B₃ – Carboplatin (20 µg/cm³)/72 h; B₄ – Carboplatin (60 µg/cm³)/72 h.

Mean values ± standard deviation (SD); n = 6; student's t-test: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), **** (p<0.0001) vs control group (24 or 72 h, respectively).

po 24 godz. ekspozycji komórek na działanie karboplatyny w stężeniu $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ względem komórek zbieranych po 72 godz. ekspozycji na karboplatynę w tym samym stężeniu, ($p < 0,0001$); (ryc. 1C).

Analizowano także zmiany aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w komórkach glejaka linii SNB19 pod wpływem karboplatyny. Zaobserwowano, zależnie od zastosowanego stężenia karboplatyny wzrost aktywności GSH-Px w komórkach linii SNB19 po 24 godz. ekspozycji. Po 24 godz. od dodania karboplatyny do hodowli komórek linii SNB19, aktywność GSH-Px była istotnie statystycznie najwyższa w grupie komórek traktowanych karboplatyną w stężeniu $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ względem komórek grupy kontrolnej (niektrowanych), ($p < 0,01$). Po dłuższym okresie inkubacji (72 h) aktywność tego enzymu była także najwyższa w grupie komórek traktowanych karboplatyną w stężeniu $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ względem pozostałych grup, $p < 0,05$; (ryc. 1D). W pracy dokonano także analizy stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w komórkach glejaka mózgu linii SNB19 pod wpływem oddziaływania karboplatyny w dwóch różnych stężeniach przez okres 24 i 72 godz. Zaobserwowano zmniejszenie stężenia MDA w analizowanych komórkach wraz ze wzrostem stężenia użytego cytostatyku (karboplatyny) oraz wzrostem czasu działania. Najmniejsze stężenie MDA jako markera procesu peroksydacji lipidów obserwowano po 72 godz. ekspozycji komórek na karboplatynę w stężeniu $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ względem pozostałych grup badanych i grup kontrolnych ($p < 0,01$) (ryc. 1E).

W piśmiennictwie znaleźć można sprzeczne doniesienia dotyczące udziału wolnych rodników w patomechanizmie toksycznego działania karboplatyny. Organizmy żywe, w tym także komórki nowotworowe, posiadają aktywne mechanizmy antyoksydacyjne, które osłaniają przemiany ustrojowe przed działaniem wolnych rodników także *in vitro*. Na uwagę zasługuje praca dotycząca układu prooksydacyjno/antyoksydacyjnego linii raka płaskonabłonkowego AT478, w której wykazano znaczenie zmian aktywności enzymatycznych zmiataaczy wolnych rodników, stężenia dialdehydu malonowego, jako markera peroksydacji lipidów oraz zmian struktury DNA w komórkach AT478 hodowanych *in vitro* pod wpływem oddziaływania napromieniowania. W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono wpływ napromienienia zarówno na aktywność badanych enzymów, jak i na zmiany morfologiczne występujące w komórkach megakolonii raka płaskonabłonkowego linii AT478 (10). W pracy Polaniak i współpr. (11) autorzy porównywali aktywność izoenzymów SOD w mediach hodowlanych komórek mysiego raka płaskonabłonkowego linii AT478 holoksanem w dwóch różnych stężeniach. Holoksan jest lekiem cytostatycznym, generującym powstawanie wolnych rodników tlenowych w komórkach poddanych terapii *in vitro*. Holoksan w dawce 10 i $40 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ powodował po 24 godz. wzrost aktywności izoenzymu MnSOD w mediach komórkowych względem aktywności tego izoenzymu w grupie kontrolnej. Jednocześnie zaobserwowano wzrost aktywności izoenzymu Cu/ZnSOD w mediach analizowanych komórek względem aktywności tego enzymu w grupie kontrolnej. Holoksan jako induktor reaktywnych form tlenu w komórkach poddanych terapii może zwiększać stężenie anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$): substratu: dla funkcjonujących izoenzymów SOD katalizujących reakcje dysmutacji ($\text{O}_2^{\cdot-}$) do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego. Aktywność tych enzymów, a tym samym badanie nasilenia reakcji dysmutacji, może być oznaczana we wnętrzu komórek (w lizatach komórkowych) lub ze względu na

ich wydzielanie do przestrzeni pozakomórkowej także w mediach komórkowych. Warto zauważyć, że substraty dla enzymów antyoksydacyjnych, a także produkty ich enzymatycznej katalizy swobodnie dyfundują w obie strony błony komórkowej, stąd określanie wypadkowej aktywności tych enzymów jest niezwykle trudne.

Dostępne są wyniki badań innych autorów dotyczących wpływu nadekspresji genów kodujących izoenzymy SOD na progresję zmian nowotworowych *in vitro*. Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych usuwających nadtlenuki wodoru w komórkach nowotworowych (katalazy oraz peroksydazy glutationowej) może wiązać się z indukcją procesu chemooporności na leki cytostatyczne stosowane w terapii doświadczalnej (12). *Buldak* i współpr. (13) wykazali, że jedynie etopozyd w stężeniu 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ powodował istotnie statystycznie zmniejszenie intensywności procesu peroksydacji lipidów w mediach komórkowych linii Me45 *in vitro* na skutek silnej aktywacji enzymu: GSH-Px. Peroksydaza glutationowa redukuje także nadtlenuki organiczne (ROOH) do odpowiedniego alkoholu (ROH), dlatego wysoka aktywność peroksydazy glutationowej ogranicza skutecznie intensywność procesu peroksydacji lipidów błonowych w komórkach, co można interpretować jako mechanizm obronny komórek nowotworowych do generowanego lekiem cytostatycznym stresu oksydacyjnego. Autorzy wykazali, że etopozyd zwiększając poziom reaktywnych form tlenu w hodowli, indukował odpowiedź obronną komórek manifestującą się zwiększeniem aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych (za wyjątkiem reduktazy glutationowej). Wysoka aktywność GSH-Px w hodowli komórek czerniaka linii Me45 skutkowała obniżeniem nasilenia procesów peroksydacji lipidów błonowych. Na podstawie danych dostępnych w piśmiennictwie wykazano, że wzrosty aktywności enzymów antyoksydacyjnych katalizujących reakcję dysproporcjonowania nadtlenuki wodoru (katalazy oraz peroksydazy glutationowej) w wybranych liniach komórek nowotworowych *in vitro* są związane ze zjawiskiem nabywania oporności na leki cytostatyczne stosowane w terapii. W pracach *Dusre* i współpr. (14) oraz *Samuels* i współpr. (15), przedstawiono wpływ aktywności peroksydazy glutationowej w komórkach nowotworowych na zjawisko indukcji procesu chemooporności komórek nowotworowych na leki cytostatyczne. *Dusre* i współpr. (14) zaobserwowali, że komórki raka piersi linii MCF-7^{ADR} wykazujące oporność względem mitomycyny C oraz adriamycyny posiadają wyższą aktywność GSH-Px w porównaniu do komórek linii dzikiej. W pracy *Samuels* i współpr. (15) wykazano różną wrażliwość na dokso-rubicynę komórek nowotworowych wywodzących się z tkanki łącznej w zależności od poziomu aktywności GSH-Px w komórkach.

WNIOSKI

Na podstawie wyników uzyskanych w przeprowadzonych badaniach można stwierdzić, że karboplatyna w zastosowanych stężeniach i przedziałach czasowych zaburza układ prooksydacyjno/antyoksydacyjny komórek nowotworowych glejaka mózgu linii SNB19 *in vitro*. Prowadzone obserwacje sugerują potrzebę dalszych badań nad wpływem cytostatyków o różnym mechanizmie działania, w różnych stężeniach i przedziałach czasowych na przemiany metaboliczne komórek linii SNB19 hodowanych *in vitro*.

R. Polaniak, R.J. Bułdak, M. Latocha, E. Romuk, D. Karbowska,
K. Ochocki, E. Birkner

DISTURBANCES OF THE PROOXIDANT/ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE BRAIN GLIOMA
CELLS UNDER INFLUENCE OF CARBOPLATIN – *IN VITRO* STUDY

Summary

Brain glioma is a particularly dangerous type of tumour. During the research it was found that it tends to modify immunological macrophage cells in such a way that they will help the tumour to expand. Carboplatin is a drug frequently used in treatment of neoplastic diseases. It is a cytostatic drug, a derivative of cisplatin.

The purpose of the research was assessment of chosen indices of the prooxidant/antioxidant system in SNB19 line brain glioma cells culture under the influence of carboplatin in various concentrations and time spans. The cultures were based on SNB19 line of brain glioma cells grown in standard conditions. The colonies were treated with two different concentration of carboplatin: 20 µg/ml and 60 µg/ml of culture medium. The control group was constituted by colonies which did not include any cytostatic drug in its content. The medium was collected after 24 and 72 hours after the preparation was administered. Furthermore, activity of the following antioxidant enzymes was assessed: superoxide dismutase (SOD), isozymes of SOD (mitochondrial, MnSOD and cytoplasmic, Cu/ZnSOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and concentration of malondialdehyde (MDA).

On the basis of results obtained from the conducted research, it was found that carboplatin administered in concentrations and time spans similar to those used during the research causes disturbances in the prooxidant/antioxidant system of SNB19 line brain glioma cells grown with use of the *in vitro* method.

PIŚMIENNICTWO

1. *Słowiński J., Mrówka R.*: Terapia genowa w leczeniu chorych z glejakami mózgu. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 2004; 38(1): 45-50. – 2. *Lind M.*: Growth factor of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Ortop. Scand.*, 1998; suppl.: 283(2): 2-37. – 3. *Tarnawski R., Kummermehr J., Trott K.R.*: The radiosensitivity of recurrent clones of a irradiated murine squamous cell carcinoma in the *in vitro* megacolon system. *Radiotherapy & Oncology*, 1998; 46: 209-214. – 4. *Oyanagui Y.*: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analyt. Biochem.*, 1984; 142: 290-296. – 5. *Paglia D., Valentine M.*: Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Me.*, 1967; 70: 158-169. – 6. *Ohkawa H., Ohishi N., Kunio Y.*: Assay for peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal. Biochem.*, 1979; 95: 351-358. – 7. *Lin Y., Jamieson D.*: Effect of antioxidants on oxygen toxicity *in vivo* and lipid peroxidation *in vitro*. *Pharmacol. and Toxicol.*, 1992; 70: 271-277. – 8. *Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.* red.: Leki współczesnej terapii. PZWL, 1996. – 9. *Beck E., Polaniak R., Widel M.* i współpr.: Influence of electromagnetic field on murine squamous cell *in vitro*. 12th Nortic Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics (ISBEMP); IFMBE Proceedings, 2002; 2: 142-143. – 10. *Przybyszewski W., Widel M., Polaniak R.* i współpr.: Contrasting effects of low vs high dose-rate radiation on lipid peroxidation, DNA damage, and antioxidant enzyme activities in tumor cells. *Progress in Medical Research*, 2005; vol.3: 12.

11. *Polaniak R., Birkner B., Matysiak N.* i współpr.: Wpływ holoksanu na aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej i stężenie dialdehydu malonowego w hodowli megakolonii komórek raka płaskonabłonkowego *in vitro*. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2008; 41(1): 89-94. – 12. *Trachootham D., Alexandre J., Huang P.*: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(7): 579-91. – 13. *Buđak R.J., Polaniak R., Kukla M.* i współpr.: Wpływ etopozydu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie dialdehydu malonowego w mediach hodowlanych ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii Me45 w badaniu *in vitro*. *Farm. Przegl. Nauk.*, 2010; 11: 11-19. – 14. *Dusre L., Rajagopalan S., Eliot HM, Covey JM, Sinha BK.*: DNA interstrand cross-link and free radical formation in a human multidrug-resistant cell line from mitomycin C and its analogues. *Cancer Res.* 1990; 50(3): 648-652. – 15. *Samuels BL, Murray JL.*: Cohen MB et al. Increased glutathione peroxidase activity in a human sarcoma cell line with inherent doxorubicin resistance. *Cancer Res.* 1991; 51(2): 521-527.