

## Badania *in vitro* wpływu albendazolu na kinetykę reakcji katalizowanej przez cytozolową transferazę glutationową (GST) z wątroby szczura

### Effect *in vitro* of albendazole on the kinetics of cytosolic glutathione transferase from the rat liver

Agnieszka Wojtkowiak, Krystyna Boczoń i Elżbieta Wandurska-Nowak

Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

Adres do korespondencji: Krystyna Boczoń, Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; Tel/fax: (0-61) 8546236; E-mail: kboczon@amp.edu.pl

**ABSTRACT. Introduction.** Since the idea of multifunctional mode of action of anthelmintics is considered and in experimental trichinellosis *in vivo* albendazole seems to act as an allosteric activator of cytosolic GST from mice muscles, in this study a thermosensitivity after *in vitro* incubation with albendazole of purified commercial cytosolic glutathione transferase (GST) from the rat liver was investigated. **Methods.** Two extremal temperatures:  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $+30^{\circ}\text{C}$  were used to destroy the dimer in quaternary structure of this enzyme. **Results.** In control preparations both extremal temperatures destroy this structure, so the Michaelis-Menten kinetic curves of substrate saturation show the typical hyperbolic shape. After a long (15 h) freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  or heating (up to 14 h at  $+30^{\circ}\text{C}$ ) the kinetics of substrate saturation of GST after incubation with albendazole show the sigmoidal or "double sigmoidal" shape, pointing out the quaternary GST structure as a complex of "frozen subunits". Drug inhibits about 6-times the total activity of GST after incubation at  $+30^{\circ}\text{C}$ . We conclude that albendazole *in vitro* influences the structure of cytosolic GST from the rat liver and inhibits its activity, but, in opposite to *in vivo* study in mouse muscles infected with *Trichinella spiralis* larvae, does not act as an activator of this enzyme.

**Key words:** albendazole, cytosolic glutathione transferase from the rat liver, kinetics of substrate saturation.

#### Wstęp

Transferazy glutationowe (GST, EC 2.5.1.18) należą do wielofunkcyjnych enzymów metabolizmu glutationu, który neutralizuje w żywych komórkach toksyczny wpływ wolnych rodników tlenowych i nadtlenków organicznych (GST chronią więc komórki przed uszkodzeniem utleniającym). GST są enzymami allosterycznymi o budowie podjednostkowej, występującymi w formie homo- lub heterodimerów. W komórkach ssaków, bazując na strukturze pierwszorzędowej oraz specyficzności substratowej i inhibitorowej izoenzymów GST, wyróż-

niono siedem klas cytozolowych GST: alfa, mu, pi, sigma, teta, omega i zeta [1, 2]. GST składają się z dwóch podjednostek, które są kinetycznie niezależne [3]. Jednak w zależności od tkanki, z której GST jest izolowany, dyskutuje się tę kinetyczną niezależność, np. enzym pochodzący z ludzkiego łożyska wydaje się działać w ten sposób, że w trakcie zmian konformacyjnych w obu podjednostkach, jego własności katalityczne też ulegają zmianie [4]. Różne czynniki mogą wpływać na aktywność GST oraz modelować ich strukturę przestrzenną. Sugeruje się, że interakcje między powierzchnią oddzielającą podjednostki enzymu a czynnikiem zawartym

np. w produktach wydzielniczo-wydalniczych pasożytów, albo z lekami stosowanymi w leczeniu chorób pasożytniczych, mogą odgrywać znaczącą rolę w stabilizowaniu czwartorzędowej struktury GST [5]. Ponieważ GST odgrywają decydującą rolę w regulacji i kontroli wielu reakcji (m.in. są powiązane z biochemicznymi mechanizmami obronnymi), ich badanie w organizmie żywiciela w przebiegu inwazji pasożytniczej wydaje się ważne i interesujące.

Nasze dotychczasowe badania dotyczące zmian całkowitej aktywności cytozolowej GST w tkance mięśniowej myszy zarażonych larwami *Trichinella spiralis* wykazały, że aktywność tego enzymu ulega wyraźnej stymulacji, począwszy od 3 tygodnia inwazji, osiągając maksimum w 6 tygodniu inwazji [6].

W ostatnich latach przedmiotem naszych badań stał się stymulujący wpływ albendazolu, leku z wyboru w leczeniu włośnicy, na aktywność różnych enzymów antyoksydacyjnych w tkance żywiciela — mięśniach myszy zarażonych larwami włośnicy [7, 8]. Podobne intensyfikujące działanie albendazolu zaobserwowaliśmy w przypadku indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) w mięśniach myszy zarażonych larwami *T. spiralis* [9, 10]. Ogólnie wyniki tych badań sugerują, że albendazol, poza bezpośrednią aktywnością przeciw pasożytniczą, może przyczynić się do spotęgowania biochemicznych procesów obronnych żywiciela zachodzących z udziałem tlenowych i azotowych wolnych rodników.

Uważa się, że glutation stanowi ważny element obrony komórek przed cytotoksycznością tlenu azotu produkowanego przy udziale iNOS [11]. Dlatego nasze zainteresowanie wzbudziły zarówno enzymy metabolizmu glutationu (transferaza glutationowa i reduktaza glutationu), jak i wytwarzanie tlenu azotu w tkankach myszy w przebiegu włośnicy, oraz dodatkowo wpływ leku przeciw pasożytniczego na te procesy.

Tak jak w przypadku wszystkich innych enzymów allosterycznych, krzywe wysycenia substratem oczyszczonej GST z różnych źródeł charakteryzuje kształt sigmoidalny. Kształt tych krzywych ulega modyfikacji przez różne czynniki, które mogą zmieniać powinowactwo GST do substratu. Według jednoprzęściowego modelu oddziaływań allosterycznych [12] inhibitory allosteryczne stabilizują formę T (napiętą) enzymu, która ma małe powinowactwo do substratu, a aktywatory stabilizują formę R (rozluźnioną) o dużym powinowactwie do substratu. Niektóre enzymy o budowie podjednostko-

wej w pewnych warunkach wykazują kinetykę typową dla enzymów o tzw. „zamrożonych podjednostkach”, co objawia się zmianą kształtu ich krzywych wysycenia substratem z typowo sigmoidalnego na „podwójnie sigmoidalny” [13].

W naszej ostatniej pracy [14] wykazaliśmy, że w przebiegu doświadczalnej włośnicy u myszy następuje wyraźna modyfikacja krzywej wysycenia substratem cytozolowej GST w mięśniach zarażonych larwami włośnicy (2,3-krotny wzrost wysokiej wartości  $K_m$  dla dwufazowej krzywej wysycenia oraz 2,8-krotny spadek niskiej wartości  $K_m$  z takiej krzywej). Po podaniu zarażonym zwierzętom albendazolu, pomimo skomplikowanego „podwójnie sigmoidalnego” charakteru krzywej wysycenia GST, uzyskaliśmy obraz pozwalający przypuszczać, że lek może działać w tym przypadku jako allosteryczny aktywator.

Celem prezentowanych badań była analiza zmian w kinetyce wysycenia substratem cytozolowej GST, następujących w warunkach *in vitro* pod wpływem albendazolu. Do badań użyliśmy komercyjnego, oczyszczonego enzymu z wątroby szczura i sprawdziliśmy również, jak działają w takim układzie różne warunki temperaturowe, np. zamrażanie czy ogrzewanie, a więc procedury w założeniu rozbijające strukturę podjednostkową enzymów allosterycznych.

## Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła oczyszczona transferaza glutationowa (GST) z wątroby szczura (produkt Sigmy) o aktywności 18 U/mg białka. Albendazol (Zentel firmy SmithKline Beecham) inkubowano z enzymem w następujących stężeniach: 5 mM, 20 mM, 100 mM i 200 mM.

Aktywność GST oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc ilość tioeteru (S-2,4-dinitrofenyloglutationu), powstałego jako produkt reakcji zredukowanego glutationu (GSH) z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB) katalizowanej przez GST. Szybkość powstawania barwnego koniugatu określano mierząc przyrost absorbancji przy długości fali 340 nm, zgodnie z procedurą [15]. Aktywność GST wyrażono w jednostkach enzymu na mg białka. Jedna jednostka enzymu jest definiowana jako jego ilość katalizująca powstanie 1  $\mu$ moła tioeteru w ciągu 1 minuty w temperaturze +25°C. W celu wykreślenia krzywych wysycenia substratem dla GST użyto następujących stężeń substratu (GSH): 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 i 2,0 mM. Każdy punkt na

krzywych prezentowanych w wynikach jest średnią z 6–9 niezależnych pomiarów. Białko dla oznaczenia aktywności specyficznej enzymu oznaczano wg Lowry’ego i wsp. [16].

Wpływ albendazolu na kinetykę reakcji katalizowanej przez GST z wątroby szczura badano w trzech wariantach temperatury: (1) inkubacji w +4°C, (2) po jednokrotnym przemrożeniu powyższego preparatu w -80°C przez 15 godzin, (3) po ogrzewaniu do temperatury +30°C w różnym czasie inkubacji (po 10 minutach, 30 minutach, 1 godzinie i 14 godzinach).

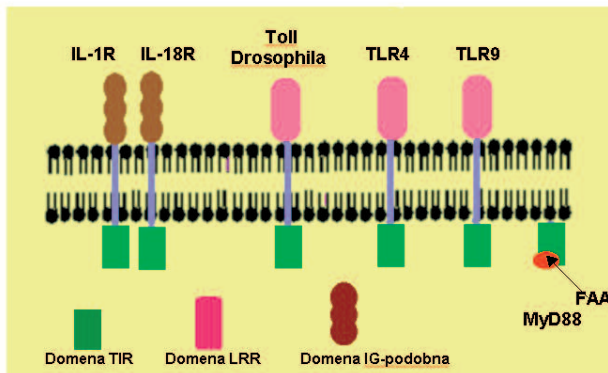
**Wyniki**

Analizując zmiany kinetyki reakcji katalizowanej przez cytozolową GST w mięśniach myszy zarażonych larwami włośnia [14], użyliśmy frakcji cytoplazmatycznej z surowego homogenatu mięśni. Aby uzyskać pełniejszą informację o wpływie albendazolu na ten enzym, postanowiliśmy w tej pracy przebadać ten wpływ w warunkach *in vitro*, używając w tym celu komercyjnej, oczyszczonej GST z wątroby szczura.

Wyniki badań wpływu albendazolu (zastosowanego w szerokich granicach stężeń: od 5 do 200 mM) na aktywność oraz krzywe wysycenia substratem GST z wątroby szczura, przeprowadzone w trzech wariantach temperatury, są interesujące. Z pomiarów dokonanych w temperaturze +4°C wynika, że chociaż lek w proporcji do swojego stęże-

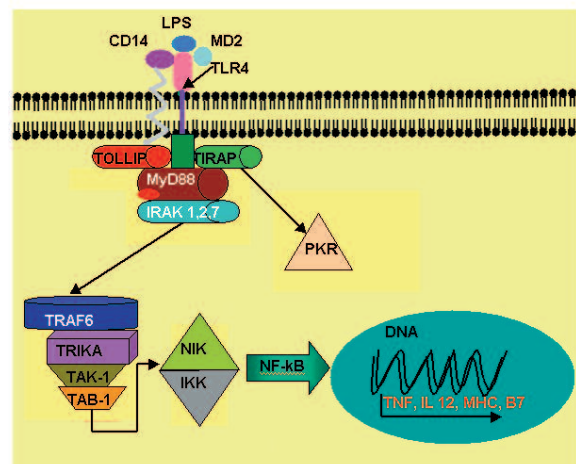
nia znacznie obniżał aktywność całkowitą enzymu (6-krotnie przy najwyższym, 200 mM stężeniu), we wszystkich przypadkach różnych stężeń leku krzywa wysycenia substratem ma charakter sigmoidalny, typowy dla enzymów o budowie podjednostkowej (Rys. 1). Można więc stwierdzić, że w tych warunkach temperaturowych, zapewniających stabilność enzymu, pod wpływem różnych stężeń leku podjednostkowa budowa GST z wątroby szczura jest nienaruszona.

W celu sprawdzenia wrażliwości enzymu na niską temperaturę, preparaty kontrolne (inkubowane bez leku) zostały poddane 15-godzinemu przemrożeniu w -80°C. Ta procedura, zgodnie z oczekiwaniami, rozbiła budowę podjednostkową GST z wątroby szczura, na co wskazywały odpowiednie krzywe wysycenia substratem o kształcie hiperbolicznym, typowym dla enzymów monomerycznych (Rys. 2). W preparatach przemrażanych przez 15



Rys. 1. Wpływ różnych stężeń albendazolu na krzywe wysycenia transferazy glutationowej z wątroby szczura (GST). Preparaty inkubowano z lekiem przez 10 minut w temp. +4°C

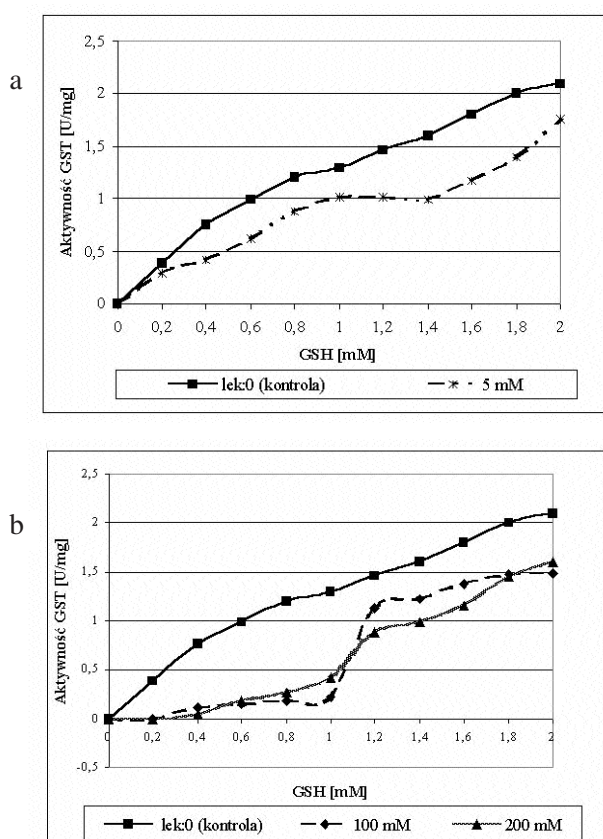
Fig. 1. Effect of different concentrations of albendazole on curves of substrate saturation of cytosolic glutathione transferase (GST) from the rat liver. Preparations were incubated with drug at +4°C for 10 min



Rys. 2. Wpływ przemrożenia (15 godzin w temp. -80°C) na krzywe wysycenia transferazy glutationowej z wątroby szczura (GST). Preparaty przed przemrożeniem inkubowano przez 10 minut w temp. +30°C lub +4°C

Fig. 2. Effect of freezing (15 h at -80°C) on curves of substrate saturation of cytosolic glutathione transferase (GST) from the rat liver. Before freezing preparations were incubated for 10 min at +30°C or at +4°C

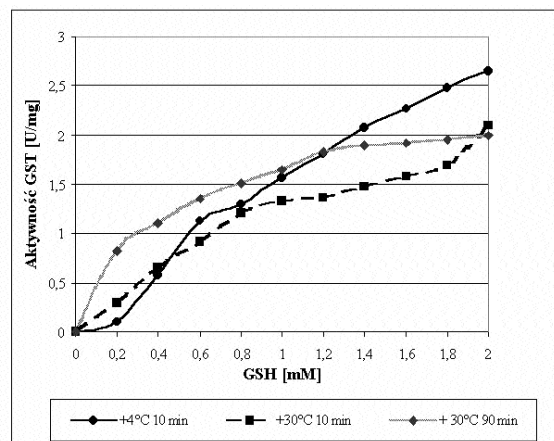
godzin w temp. -80°C i inkubowanych uprzednio przez 10 minut w temperaturze +30°C z 100 i 200 mM albendazolem, krzywe zmieniały kształt hiperboliczny na sigmoidalny z początkowym długim odcinkiem „wyplaszczonym” (typowym dla działania inhibitora). Lek wydaje się działać w stężeniu zarówno 5 mM (Rys. 3a), jak i 100 i 200 mM (Rys. 3b) jak inhibitor, nie wpływając jednak na całkowitą aktywność enzymu mierzoną przy optymalnym stężeniu substratu.



Rys. 3. Wpływ różnych stężeń albendazolu oraz przemrożenia (15-godzinne w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ ) na krzywe wysycenia transferazy glutationowej z wątroby szczura (GST). Preparaty przed przemrożeniem inkubowano z lekiem przez 10 minut w temp.  $+30^{\circ}\text{C}$ ; a — stężenie albendazolu: 5 mM, b — stężenie albendazolu: 100 oraz 200 mM

Fig. 3. Effect of different concentrations of albendazole as well as freezing (15 h at  $-80^{\circ}\text{C}$ ) on curves of substrate saturation of cytosolic glutathione transferase (GST) from the rat liver. Before freezing preparations were incubated with drug at  $+30^{\circ}\text{C}$  for 10 min; a — concentration of albendazole: 5 mM, b — concentration of albendazole: 100 and 200 mM

Wpływ ogrzewania do temperatury  $+30^{\circ}\text{C}$  na kinetykę reakcji katalizowanej przez GST z wątroby szczura przedstawiają Rys. 4 i 5. Po ogrzewaniu enzymu przez 10 minut w temp.  $+30^{\circ}\text{C}$  kształt krzywej wysycenia substratem zmieniał się z sigmoidalnego na „podwójnie sigmoidalny” (typowy dla enzymów o „zamrożonych podjednostkach”), a dopiero po 1,5-godzinnej inkubacji w  $+30^{\circ}\text{C}$  na hiperboliczny (Rys. 4). Po 10 minutach inkubacji w  $+30^{\circ}\text{C}$  lek w narastającym stężeniu coraz bardziej zmieniał krzywą na typową dla działania inhibitora (Rys. 5a). Po dłuższej, 30- lub 60-minutowej inkubacji enzymu z 200 mM albendazolem w temperaturze  $+30^{\circ}\text{C}$ ,



Rys. 4. Wpływ ogrzewania (przez 10 minut lub 90 minut do temp.  $+30^{\circ}\text{C}$ ) na krzywe wysycenia transferazy glutationowej z wątroby szczura (GST)  
 Fig. 4. Effect of heating (for 10 min or 90 min up to  $+30^{\circ}\text{C}$ ) on curves of substrate saturation of cytosolic glutathione transferase (GST) from the rat liver

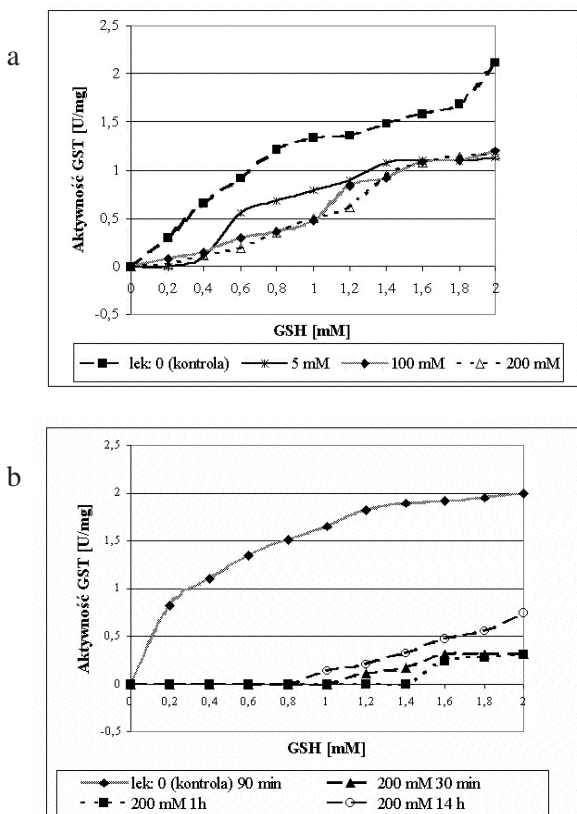
krzywe wykazywały kształt sigmoidalny, ale o bardzo wypłaszczonym początkowym odcinku (nawet do 1,4 mM GSH po 1-godzinnej inkubacji). Wiadomo, że krzywa zależności ułamka wysycenia  $Y$  ( $Y$  = frakcja cząsteczek enzymu zawierająca związany substrat) od stężenia substratu po działaniu inhibitora przybiera taki właśnie kształt. Równocześnie krzywe te, w proporcji do narastającego stężenia leku, wskazywały na silne (7-krotne) obniżenie aktywności całkowitej enzymu mierzonej przy optymalnym, 2 mM stężeniu substratu (Rys. 5b).

## Dyskusja

Zgodnie z naszą wiedzą wyniki tej pracy stanowią jedno z pierwszych doniesień o wpływie leku przeciwpasożynicznego na strukturę cytozolowej GST z tkanki ssaka (wątroby).

W naszej ostatniej pracy, dotyczącej wpływu na cytozolową GST w mięśniach żywiciela, zarówno zarażenia myszy larwami *Trichinella spiralis*, jak i ich leczenia przy użyciu albendazolu, wykazaliśmy, że zarówno samo zarażenie, jak i leczenie może wpływać na czwartorzędową strukturę tego enzymu [14]. Krzywe Lineweavera-Burka (podwójnej odwrotności, czyli zależności  $1/V$  od  $1/[S]$ ) kinetyki wysycenia substratem dla GST w mięśniach myszy zarażonych i leczonych albendazolem miały charakter dwufazowy, a odpowiednie krzywe kontrolne (GST w mięśniach myszy niezarażonych) wykazywały wyraźny charakter „podwójnej sigmoidalności”. Sugerowaliśmy jednak, pomimo skom-





Rys. 5. Wpływ różnych stężeń albendazolu oraz czasu ogrzewania na krzywe wysycenia transferazy glutationowej z wątroby szczura (GST). Preparaty inkubowano z lekiem w temp.  $+30^{\circ}\text{C}$  odpowiednio przez 10 minut, 30 minut, 1 godzinę lub 14 godzin; a — stężenie albendazolu 5, 100 i 200 mM, czas inkubacji 10 minut, b — stężenie leku: 200 mM, czas inkubacji: 30 minut, 1 godzina, 14 godzin

Fig. 5. Effect of different concentrations of albendazole as well as time of heating on curves of substrate saturation of cytosolic glutathione transferase (GST) from the rat liver. Preparations were incubated with drug at  $+30^{\circ}\text{C}$  for 10 min, 30 min, 1 h or 14 h, respectively; a — albendazole concentration: 5, 100 or 200 mM (time of incubation: 10 min), b — albendazole concentration: 200 mM, time of incubation: 30 minutes, 1 hour and 14 hours, respectively

plikowanego charakteru tych krzywych wysycenia, że albendazol może działać jako allosteryczny aktywator cytozolowej GST w mięśniach myszy zarażonych larwami włośnia.

W prezentowanych tu badaniach, prowadzonych z użyciem komercyjnej, oczyszczonej GST, ale pochodzącej z innej tkanki — wątroby (GST z mięśni nie jest dostępna w handlu) i w warunkach *in vitro*, albendazol działa (w proporcji do narastającego stężenia) po inkubacji w  $+30^{\circ}\text{C}$  jako inhibitor. Równocześnie zmienia strukturę czwartorzędową w taki

sposób, że pod wpływem inkubacji z najwyższym 200 mM stężeniem leku krzywa wysycenia substratem GST z wątroby przybiera, podobnie jak w przypadku opisanej powyżej GST w mięśniach zarażonych larwami włośnia, kształt „podwójnej sigmoidalności” (Rys. 5a), co świadczy o tym, że enzym pozostaje w stanie „zamrożonych” podjednostek.

Ciekawą sprawą, wartą bardziej szczegółowego omówienia, pozostaje problem termowrażliwości cytozolowej GST z wątroby szczura, zmieniającej się pod wpływem leku. Po wielogodzinnym przemrożeniu w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , w preparatach kontrolnych (inkubowanych bez leku) krzywe wysycenia GST substratem zmieniają się z kształtu sigmoidalnego na hiperboliczny (Rys. 2), co wskazuje na rozbicie dimerycznego enzymu na podjednostki. Natomiast po inkubacji z lekiem już niskie (5mM) stężenie albendazolu powodowało zmianę kształtu krzywej wysycenia GST substratem (Rys. 3a) na „podwójną sigmoidalność”. Ogrzewanie preparatu GST przez 90 minut w temperaturze  $+30^{\circ}\text{C}$  powinno skutkować rozbiciem struktury podjednostkowej enzymu i taki właśnie hiperboliczny kształt krzywej wysycenia substratem, typowy dla struktury monomerycznej, obserwowaliśmy (Rys. 4). Natomiast w preparatach inkubowanych z lekiem w tej samej temperaturze przez 14 godzin charakter krzywych pozostawał sigmoidalny (Rys. 5b).

Być może albendazol, działając jako inhibitor, włącza się w strukturę dimeru GST tak, że enzym staje się trudno dysocjowany, nawet w warunkach termicznych rozbijających normalnie jego strukturę dimeryczną (takich jak np. przemrażanie do  $-80^{\circ}\text{C}$  lub ogrzewanie do temperatury  $+30^{\circ}\text{C}$ ). Na podstawie tylko naszych badań nie można rozstrzygnąć, czy albendazol włącza się tak, że struktura dimeryczna GST nie jest rozbita (podjednostki są w stanie „zamrożonym”), ale równocześnie są blokowane centra aktywne w każdej z podjednostek enzymu.

Reasumując, należy stwierdzić, że albendazol działa hamująco na ten ważny enzym w tkankach ssaków, zmieniając również jego strukturę czwartorzędową, ale dla dokładnego wyjaśnienia mechanizmu tych interakcji lek-enzym należy w przyszłości posłużyć się metodami molekularnego modelowania, połączonego z technikami komputerowymi [17, 18].

## Literatura

- [1] Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jansson H., Kalim Tahir M., Warholm M., Jörnval H. 1985.

- Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82: 7202–7206.
- [2] Hayes J., Flanagan J., Jowsey I. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 51–88.
- [3] Danielson H., Mannervik B. 1985. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochemical Journal* 231: 263–267.
- [4] Radulovic L., Kulkarni A. 1986. H.p.l.c. separation and study of the charge isomers of human placental glutathione transferase. *Biochemical Journal* 239: 53–57.
- [5] Hornby J., Codreanu S., Armstrong R., Dirr H. 2002. Molecular recognition at the dimer interface of a class mu glutathione transferase: role of a hydrophobic interaction motif in dimer stability and protein function. *Biochemistry* 48: 14238–14247.
- [6] Derda M., Wandurska-Nowak E., Boczoń K. 2001. Glutathione-S-transferase activity in mouse muscles during experimental trichinellosis. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 227–232.
- [7] Derda M., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Wojt W. 2003. Changes in the activity of glutathione-S-transferase in muscles and sera from mice infected with *Trichinella spiralis* after treatment with albendazole and levamisole. *Parasitology Research* 89: 509–512.
- [8] Przydanek A., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Wojt W., Wojtkowiak A. 2004. The intriguing influence of albendazole on glutathione reductase activity in the muscles from *Trichinella spiralis* infected mice. *Wiadomości Parazytologiczne* 50: 273–277.
- [9] Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Szulc M. 2002. The effect of albendazole on iNOS- derived NO production in experimental trichinellosis. *Helminthologia* 39: 17–21.
- [10] Żeromski J., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Mazer-Lisewska I. 2005. Effect of aminoguanidine and albendazole on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in *T. spiralis*-infected mice muscles. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 43: 157–159.
- [11] Romano P., Fonseca S., Hothersall J., Noronha-Dutra A., Ferreira S., Cunha F. 1999. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology* 118: 559–566.
- [12] Monod J., Wyman J., Changeux J. 1965. On the nature of allosteric transitions. *Journal of Molecular Biology* 12: 88–118.
- [13] Kurganov B. 1975. Regulatory properties of slowly equilibrating association-dissociation enzyme systems. In: *Mechanism of Action and Regulation of Enzymes* (Ed. T. Keleti). Akademiai Kiado, Budapest: 29–42.
- [14] Wojtkowiak A., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Derda M. 2007. Evaluation of effects of albendazole on the kinetics of cytosolic glutathione transferase in skeletal muscles during experimental trichinellosis in mice. *Parasitology Research* 100: 647–651.
- [15] Habig W., Jakoby W. 1981. Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology* 77: 398–405.
- [16] Lowry O., Rosenbrough W., Farr A., Randall R. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- [17] Boczoń K. 1994. Współczesne zasady i metody modelowania struktury leków przeciwpasożytniczych. *Wiadomości Parazytologiczne* 41: 43–52.
- [18] Boczoń K. 1995. Methods of molecular biology as tools in the search for new targets of antiparasitic drugs. *Helminthologia* 32: 129–131.

Wpłynęło 28 sierpnia 2006

Zaakceptowano 30 października 2006