تأثير مضادات الكالسيوم على نمو الاطوار المتغذية للأميبا الحالّة للنسج (*Entamoeba histolytica*) في الزجاج

The effect of calcium antagonists on the growth of *Entamoeba histolytica in vitro*

زهراء عبد الرحيم أحمد عبد الله علي حسين أدحية** آمنة نصيف جاسم
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
*وحدة الأبحاث البايولوجية للمناطق الحارة /كلية العلوم جامعة بغداد

Zahra'a Abdul-Raheem Ahmed* Ali H. Ad'hiah* Amna N. Jasim
Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad
**Tropical-Biological Research Unit, College of Science, University of Baghdad.

المستخلص

نميت الاميبا الحالة للنسج في الزجاج باستخدام الوسطين الزرعيين Locke-egg medium (LEM) و Liver Iinfusion agar medium (LIAM). تم دراسة تأثير مضادات الكالسيوم (Nifedipine و(EDTA) Ethylene-diaminetetraacetic acid) على نمو ونشاط الأميبا في الوسطين الزرعيين . وتبين بأن لمضادات الكالسيوم (Nifedipine و EDTA) تأثيراً تثبيطياً لمعدل تضاعف الاميبا الحاله للنسج وبالاعتماد على نوع الوسط الزرعي والتركيز . بأستخدام العقار Nifedipine وصلت نسبة التثبيط لمعدل التضاعف الى 99.7% عند التركيز الثالث 41.6 ملغم /مليليتر ولكلا الوسطين الزرعيين ، وكان لمادة EDTA تأثيراً متقارباً لتصل نسبة التثبيط الى (98.2 و95.8)% عند التركيز الثالث 0.83 ملغم/ مليليتر في الوسطين الزرعيين LEM و LIAM على التوالي. كما لوحظ حالات تكيس للطفيلي في الوسط الزرعي LEM المعامل بعقار Nifedipine .

Abstract

The *E. histolytica* parasite was maintained in *vitro* using Locke-egg medium (LEM) and Liver infusion agar medium (LIAM). The effect of two calcium antagonists (Nifedipine and Ethylene-diaminetetraacetic acid EDTA) on the growth and activity of the parasite in the two culture media was investigated. The calcium antagonists Nifedipine and EDTA inhibited the reproduction rate of *E. histolytica* in a concentration-dependent manner. For Nifedipine, a concentration of 41.6 mg/ml inhibited the reproduction rate to 99.7% in both media. The EDTA had an approximate effect (98.2 and 95.8)% at a concentration of 0.83 mg/ml in LEM and LIAM media, respectively. Additionally, some cases of a parasite encystment were observed in LEM medium that was treated with Nifedipine.

المقدمة

تسبب الأميبا الحالّة للنسج الأحادية الخلية مرض الزحار الأميبي (dysentery Amoebic) والذي يعرف ايضاً بداء المتحولات الأميبية (Amoebiasis) . أذ تظهر الأميبا الحالّة للنسج خلال دورة حياتها بثلاثة أشكال مميزة مظهرياً ، وهو الطور المتغذي Trophozoite والشكل ما قبل التكيس Precyst والشكل المتكيس Cyst وهو الطور المعدي . ولأيونات الكالسيوم (Ca^{++}) دوراً في السيطرة على عدة عمليات خلوية في الأميبا الحالّة للنسج أذ أن لأيونات الكالسيوم الخارج الخلوي وتدفق الكالسيوم الداخل الخلوي وقنوات الكالسيوم دور في حدوث النمو والتكيس وتطور الخروج من التكيس(Excystation) [2،1] . ان ارتفاع تركيز الكالسيوم في السايتوبلازم نتيجة المأخوذ من المساحة الخارج خلوية خلال قنوات الغشاء البلازمي أو الذي يتحرر من المخزون الداخلي كالفجوات ، وان حدث تغير في التدفق الأيوني بين كلا من الأميبا وخلايا الهدف أو الوسط المحيطي يتسبب ذلك في قتل الأميبا [3] . وتشير نتائج دراسة [2] بأن خالبات الكالسيوم (Calcium chelators) وغالقات قنوات الكالسيوم (Calcium channel blockers) تثبط نمو وتكيس الأميبا الحالة للنسج في الأوساط الزرعية وأن الكالسيوم الخارج خلوي مهم في حدوث عملية التكيس اضافة الى دور الكالسيوم الداخل خلوي في تحلل خلايا الهدف . أما نتائج دراسة [1] فتشير الى دور أيونات الكالسيوم الخارج خلوي والكالسيوم الداخل خلوي وقنوات الكالسيوم في الخروج من التكيس ثم التطور الى الطور خليفة الكيس (Metacyst) لانواع من الاميبا ، ولذا تعمل مضادات الكالسيوم على تثبيط الخروج من التكيس . لذا أجريت هذه الدراسة لمعرفة دور مضادات الكاليسوم وبالتحديد عقار نيفيدبين (Nifedipine) الذي يستخدم لوقاية القلب من الذبحة الصدرية ولعلاج ارتفاع ضغط الدم ، كذلك استخدام المادة الكيميائية (EDTA) والذي يستخدم كمانع لتخثر الدم .

المواد وطرائق العمل

تحضير الأوساط الزرعية (Culture Media)

حضرت نوعين من الأوساط الزرعية من نوع Xenic culture media ، وهذه الأوساط ذات بيئة ثنائية الطور (Diphasic media) .

أ- الوسط الزرعي Locke- egg medium (LE)

حضر الوسط الزرعي والذي يتكون من طورين بحسب ما ورد في [4]

1. **الطور الصلب** : أن المكون الأساسي لهذا الطور هو محتوى بيض الدجاج و يمثل السطح الصلب المائل بمقدار 5 مليليتر.
2. **الطور السائل** : محتوى هذا الطور هو محلول لوك (Locke's solution) و يمثل الطور السائل العلوي إذ أضيف بمقدار 6 مليليتر الى الطور الصلب المائل في انبوبة الزرع .

ب- الوسط الزرعي Liver infusion agar medium (LIAM)

حضر الوسط بحسب ما ورد في [5] ويتكون ايضاً من طورين :

1. **الطور الصلب** : أن المكون الأساسي لهذا الطور هو نقيع كبد البقر(Beef liver infusion) و يمثل السطح الصلب المائل بمقدار 5 مليليتر.
2. **الطور السائل**: يتألف هذا الطور من دارئ المحلول الفسيولوجي ومصل الخروف ، إذ مزجا بنسبة 1:5 . تم أضافةهذا المزيج (6 مليليتر) والذي يمثل الطور السائل الى الطور الصلب .

المضادات الحيوية

أضيف كل من Streptomycin Sulphate بمقدار 2 ملغم/ مليليتر و Procaine Benzylpenicillin بمقدار 1000وحدة دولية/ مليليتر و Nystatin بمقدار 2 ملغم/ مليليتر الى الطور السائل للوسط الزرعي للسيطرة على نمو البكتريا ولمنع نمو الفطريات لكي تساعد على تجهيز السلالة الأميبية في الزرع حسب ما ورد في [4،5] .

تنميت الاميبا الحالة للنسج في الزجاج

عزلت الأميبا الحالة للنسج من عينة براز لشخص مصاب بالزحار الأميبي بأخذ 1غم من العينة وخصوصاً المنطقة الحاوية على الدم أو المخاط ، ثم مزجت العينة مع 3 مليليتر من المحلول الملحي الفسيولوجي ، ومررت من خلال طبقة من الشاش المعقم لغرض إزالة الدقائق الكبيرة من المستحلب قبل إضافته الى الوسط الزرعي (4) ، وبعد عزل الأميبا من البراز أضيف حجم معين 0.5 مليليتر من المستحلب الى أنابيب الوسط الزرعي ثم حضنت أنابيب الأوساط الزرعية بوضع عمودي في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة [4،5] .

غالقات قنوات الكالسيوم (Calcium channel blockers)

استخدم العقار نيفيدبين (Nifedipine) كمثال على غالقات قنوات الكالسيوم والذي يستخدم لوقاية القلب من الذبحة الصدرية ولعلاج ارتفاع ضغط الدم . طحنت حبة من العقار (20 ملغم) بوساطة جفنة خزفية ليصبح مسحوقاً وحضرت ثلاث تراكيز مختلفة لهذا العقار وأضيف الى الأوساط الزرعية وكانت التراكيز كالآتي: (4.1 و 20.8 و 41.8) ملغم / مليليتر من الطور السائل للوسط الزرعي ، وقد تم تحديد هذه التراكيز بعد عدة اختبارات لتراكيز مختلفة .

خالبات الكالسيوم (Calcium chelators)

استخدمت المادة الكيميائية أثلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) كمثال على خالبات الكالسيوم والذي يستخدم كمانع لتخثر الدم وتم استخدامه جاهزاً على هيئة مسحوق وحضرت ثلاثة تراكيز مختلفة لهذه الماده وأضيفت الى الأوساط الزرعية وكانت التراكيز كالآتي: (0.08 ، 0.41 ، 0.83) ملغم / مليليتر من الطور السائل للوسط الزرعي .

قياس فعالية المعاملة

تم قياس فعالية المعاملة بأستخدام المعادلة الاتية وكما ورد في [6]:

$$\text{فعالية المعاملة (\%)} = [100 - 100 \times \frac{\text{المعاملة (طور متغذي / مليليتر)}}{\text{السيطرة (طور متغذي / مليليتر)}}]$$

التحليل الإحصائي

حللت النتائج باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (Least significant Difference (LSD)) وكذلك استعمل اختبار دنكن المتعدد المدى (Duncan Multiple Range Test) بأستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS) .

النتائج

غالقات قنوات الكالسيوم : أضيفت التراكيز التالية لعقار النيفيدبين (4.1 ، 20.8 ، 41.6) ملغم/ مليليتر الى الأوساط الزرعية وحضنت لمدة 48 ساعة مع العالق الأميبي (0.08×10^6) طور متغذي/ مليليتر ، وتم تحديد هذه التراكيز بعد عدة اختبارت لتراكيز مختلفة وهي (4.1 ، 8.3 ، 12.5 ، 16.6 ، 20.8 ، 25.0 ، 41.6 ، 83.3) ملغم/ مليليتر إذ لوحظ نمواً جيداً وبعض حالات انقسام في التركيزين (4.1 و 8.3) ملغم/ مليليتر ، ونمواً أقل في التراكيز (12.5، 16.6، 20.8) ملغم/ مليليتر، في حين وجدت أعداد قليلة جداً لم تتجاوز 5 أميبات في التراكيز (25.0 ، 41.6) ملغم/ مليليتر ، أما في التركيز (83.3) ملغم/ مليليتر فلم يشاهد أي نمو .

لوحظ بشكل عام تثبيط النمو بزيادة التركيز، ففي الوسط LEM لوحظ فرقاً معنوياً عند مستوى احتمالية ≤0.001 للتركيزين الثاني والثالث عند المقارنة مع السيطرة ، بينما في الوسط LIAM فكان الفرق معنوياً عند مستوى احتمالية ≤0.05 للتراكيز الثلاثة مع السيطرة . أذ كانت نسبة التثبيط (14.5 ، 99.0 ،99.7) % للتراكيز الثلاثة على التوالي في الوسط LEM ، أما في الوسط LIAM فقد بلغت نسبة التثبيط (84.4 ، 96.8 ، 99.7) % للتراكيز الثلاثة على التوالي ، أما عند المقارنة بين الوسطين الزرعيين فقد ظهرت فروق معنوية عند التركيز الأول فقط عند مستوى احتمالية ≤0.001 . وعند نقل مستنبت التركيز الأول الى وسط زرعي خالٍ من هذه المضادات لوحظ نمو الأميبا بشكل جيد على العكس من التركيزين الثاني والثالث فقد كانت الهلاكات عالية للأميبا جدول (1) ، كذلك لوحظ تلون أعداد من الأميبا بملون التريبان الزرقاء والتي امتازت بفقدانها للنواة شكل (1) وتمزق الغشاء الخلوي شكل (2)، كما لوحظ وجود حالات تكيس لا تتجاوز الثلاثة وكانت غير ناضجة شكل (3) .

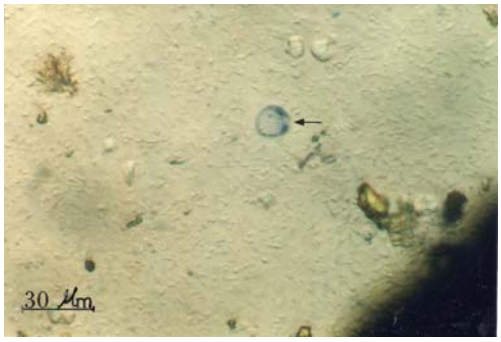
خالبات الكالسيوم : أضيفت التراكيز (0.08 ، 0.41 ، 0.83) ملغم/ مليليتر من مادة EDTA الى الأوساط الزرعية وحضنت مع العالق الأميبي (0.08×10^6) طور متغذي / مليليتر لمدة 48 ساعة . لوحظ بشكل عام تثبيط للنمو الأميبي وازدادت شدة التثبيط كلما زاد التركيز، ففي الوسط LEM لوحظت فروق معنوية بين التركيز الأول والسيطرة عند مستوى احتمالية ≤0.01 وفرق معنوي عند مستوى احتمالية ≤0.001 للتركيزين الثاني والثالث مع السيطرة . أما فعالية المعاملة فكانت تثبيطية أذ بلغت نسبة التثبيط (50.7 ، 92.7 ، 98.2) % على التوالي ، أما في الوسط LIAM فلم تظهر فروق معنوية بين التركيز الأول والسيطرة فيما ظهرت في التركيزين الثاني والثالث عند مستوى احتمالية <0.05 . أما فعالية المعاملة فكانت تثبيطية أذ بلغت نسبة التثبيط 75.1%، 90.6% ، 95.8 % للتراكيز الثلاث على التوالي . ولم تلاحظ فروق معنوية بين الوسطين الزرعيين عند التركيزين الثاني والثالث ، أما عند التركيز الأول فقد وجد فرق معنوي بين الوسطين الزرعيين عند مستوى احتمالية <0.01 . وعند نقل المستنبت في التركيز الأول الى وسط خالٍ من خالبات الكالسيوم استعادت الأميبا نشاطها ونموها على العكس من التركيزين الثاني والثالث ، ولم تلاحظ أي حالة تكيس في هذه المعاملة .

جدول (1) : تأثير مضادات الكالسيوم (Calcium antagonists) على نمو طفيلي الأميبا الحالة للنسّج والنامية في الوسطين الزرعيين (Locke-Egg Medium(LEM و (Liver Infusion Agar Medium (LIAM) .

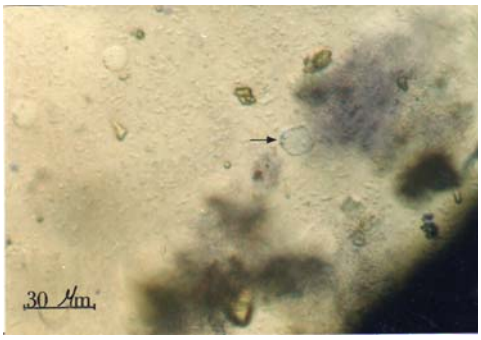
المجاميع		تركيز المادة ملغم/مل/وسط زرعي	** معدل أعداد الطفيلي النامية ± الخطأ القياسي ×10^6/مليليتر		فعالية المعاملة (%) في وسطي		*الاحتمالية≤
			LEM	LIAM	LEM	LIAM	
السيطرة		0.00	0.905±0.084 أ	0.386±0.085 أ			0.001
مضادات الكالسيوم Calcium antagonists	غالقات الكالسيوم Nifedipine	4.1	0.773±0.038 أ	0.060±0.020 ب	14.5-	84.4-	0.001
		20.8	0.009±0.0005 ب	0.012±0.002 ج	99.0-	96.8-	غير معنوي
		41.6	0.002±0.001 ج	0.001±0.0006 ج	99.7-	99.7-	غير معنوي
	خالبات الكالسيوم (EDTA)	0.08	0.446±0.043 ب	0.096±0.018 أ	50.7-	75.1-	0.01
		0.41	0.066±0.017 ج	0.036±0.003 ب	92.7-	90.6-	غير معنوي
		0.83	0.016±0.003 ج	0.016±0.003 ج	98.2-	95.8-	غير معنوي

* الاحتمالية : المقارنة مابين الوسطين الزرعيين LEM وLIAM .

** الاحرف المختلفة : فرق معنوي (الاحتمالية ≤ 0.05) مابين معدلات العمود الواحد



شكل (1): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي المعامل بمضادات الكالسيوم، يوضح هلاك الاميبا الحالّة للنسج وتلونها بملون تريبان الزرقاء .



شكل (2): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي المعامل بعقار النيفيدبين، يوضح تضرر غشاء الخلية الأميبية الملونه بملون تريبان الزرقاء .

شكل (3): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM المعامل بعقار النيفيدبين، يوضح وجود الأكياس الثنائية النواة ( ) والثلاثية النواة (↑) (ملون تريبان الزرقاء).

المناقشة

بينت النتائج نجاح عزل الأميبا من البراز وتنميتها على الوسطين الزرعيين(Locke- Egg Medium (LEM و Liver Infusion agar Medium (LIAM) ولوحظ نمو الأطوار المتغذية في الوسطين الزرعيين وعدم وجود الأكياس أو حدوث التكيس وهذا ما أكده باحثون سابقون [8،7] .

أن قدرة الأميبا على التحلل الخلوي(Cytolytic activity) في الزجاج يمكن ان تثبط بواسطة خالبات الكالسيوم الخارج خلوي(Chelation of extracellular calcium) مثل EDTA و EGTA وبوضع مضادات لتدفق أو سيلان الكالسيوم الداخل خلوي وإغلاق قنوات الكالسيوم [2،1] ، وهذا يشير الى دور الكالسيوم في الطفيلي لتحفيز الموت المبرمج لخلايا الهدف . إذ أن الكالسيوم الداخل خلوي مهم في التحلل الخلوي والذي يحدث في غضون 5-15 دقيقة بعد التماس مع الأميبا ، ويقوم الكالسيوم بتنشيط الإنزيم المحلل وبهذا يعمل كمرسال ثانوي لتحفيز الموت المبرمج للخلايا وأن تثبيط تدفق الكالسيوم الداخل خلوي يثبط عملية الالتصاق والتحلل الخلوي لخلايا الهدف بواسطة الأميبا [3].

إن تدفق الكالسيوم الخارجي الى داخل سايتوبلازم الاميبا مسؤول عن زيادة أيونات الكالسيوم إذ أن الكالسيوم السايتوبلازمي المخزون يستهلك بسرعة وفي غياب الكالسيوم الخارجي بعد إضافة عوامل الخالبات(Chelating agents) تضعف قابلية الأطوار المتغذية على الالتصاق [9] ، لذا يتغير تركيز الكالسيوم الداخل خلوياً بواسطة تغير الكالسيوم الخارج خلوي وهذا ما يحدث في تجويف الأمعاء إذ يتأثر الطفيلي بكمية الكالسيوم المهضوم والممتص والمفرز ويتكيس عندما يكون تركيز الكالسيوم في التجويف أعلى من 1 ملي مول [10] .

أما بالنسبة لأثر قنوات الكالسيوم ، فعند حدوث الالتصاق بين الأميبا الحالّة للنسج وخلايا الهدف تحرر الاميبا البروتينات الثاقبة لتشكل قنوات أيونية (Ion channel pores) في غشاء خلايا الهدف وتحفز الأميبا على سرعة رفع تركيز الكالسيوم في خلايا الهدف وبالتالي موت الخلية وإن حدث تغير في السيل الأيوني بين الأميبا وخلية العائل قد تؤدي الى قتل الأميبا لذا تعمل غالقات قنوات الكالسيوم كعلاج تحمي الخلايا من التحلل بواسطة الأميبا[3] .

أظهرت النتائج على أن نشاط الأميبا الحالّة للنسج في الزجاج يتأثر بواسطة خالبات الكالسيوم الخارج خلوية وبواسطة غالقات قنوات الكالسيوم . إذ تم استخدام عقار نيفيدبين (Nifedipine) الذي يقوم بإغلاق ممرات الكالسيوم بجدران الخلايا ولوحظ بأنه كلما زاد التركيز زاد التثبيط وتدنت فرصة نجاة الطفيلي ، وانسجاماً مع ذلك فقد درس [2] تأثير عقارين (Bepridil و Verapamil) على النمو الأميبي في الزجاج واستخدم الوسط الزرعي BI-S-33 من نوع وحيد النوع النامي axenic وكانت النتيجة بأن عقار Bepridil ثبط نمو الاميبا بتركيز 10 مايكرومول و بنسبة 98% بينما لم يظهر عقار Verapamil أي تأثير على النمو في التركيز 10 مايكرومول ، ولكن تتسبب زيادة تركيز العقار في الوسط بتثبيط النمو تدريجياً وقد بدأ التثبيط بالتراكيز 30 ، 50 ، 100 مايكرومول وبنسبة مئوية (10 و 32 و 84) % على التوالي . وفي الدراسة الحالية والتي أستخدم فيها عقار نيفيدبين (Nifedipine) بتراكيز4.1 ، 20.8 ،41.6 ملغم/مليليتر والمساوية الى 11.8، 60 ، 120.1 مايكرومول كانت فعالية التثبيط 14.5 ، 99.0 ، 99.7% على التوالي، في الوسط LEM أما في الوسط LIAM فكانت (84.4 ، 96.8 ، 99.7) % على التوالي ، وبالتالي فأن عقار نيفيدبين (Nifedipine) كان أفضل من عقار Verapamil في تثبيط النمو الأميبي وتثبيط التحلل الخلوي . ومن ذلك يمكن الاستنتاج بأن غلق قنوات الكالسيوم في الاميبا يثبط عملها في قتل خلايا الهدف ويغير من قابليتها على الالتصاق وبذلك يمكن توفير الحماية للخلايا من التحلل بسبب الاميبا [2] .

لقد تأكد أثر الكالسيوم في النمو الاميبي من خلال دراسة خالبات الكالسيوم بهدف التعرف على دور الكالسيوم الخارج خلوي في التحلل الخلوي لخلايا الهدف ، إذ تم استخدام مادة EDTA بتراكيز مختلفة وتبين بانه كلما زاد التركيز زاد التثبيط ، إذ قام Makioka *et al*. (2001) باستخدام EDTA بتركيز 0.1 ملي مول وكان ذو تثبيط قليل ثم استخدم تركيز 0.5 ملي مول فلوحظ تثبيط النمو بشكل كامل ، وفي هذه الدراسة أستخدم EDTA بالتراكيز 0.08 ، 0.41 ، 0.83 ملغم/ مليليتر والمساوية 0.0002 ، 0.0014 ، 0.0028 ملي مول ، وأظهرت النتائج بأن التركيز الأول كان أقل قابلية في تثبيط النمو مقارنة بالتركيزين الثاني والثالث إذ كانت فعالية التثبيط في الوسط LEM (50.7، 92.7 ، 98.2) %على التوالي ، أما في الوسط LIAM فكانت (75.1 ، 90.6 ، 95.8) % على التوالي ، وهذا ما لا يتفق مع [2] والذي ذكر بأنه يحدث تثبيط ضئيل في التركيز 0.1 ملي مول (mM) وهذا الاختلاف ربما يعود الى طبيعة الوسط الغذائي المستخدم ، ولكن يمكن الاتفاق بأن EDTA يؤثر بشكل كبير على الأميبا في الوسط الزرعي ، إذ ذكر [9] بأن إضافة الخالبات(Chelating agents) وغياب الكالسيوم يتسبب بألتصاق ضعيف للأطوار المتغذية وذلك لأن الكالسيوم الخارجي يكون مسؤول عن زيادة الكالسيوم السايتوبلازمي المخزون والذي يستهلك بسرعة . أما [11] فقد اشار الى أن الفعل التثبيطي لخالبات الكالسيوم (EDTA) يكمن في تأثيرها التثبيطي للانزيمين Protease و Cysteine proteinase في الأميبا وكذلك ضد أصناف أنزيمية محررة بواسطة الطفيلي .

المصـادر

1. Makioka, A.; Kumagai, M.; Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (2002[a]). Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystations and metacystic development of *Entamoeba invadens* .*Parasitol.Res*., 88:837-843.
2. Makioka, A.; Kumagai, M.; Ohtomo, H.; Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (2001). Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystations of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* . *Parasitol.Res*., 87:833-837.
3. Teixeira, J.E. and Mann, B.J. (2002). *Entamoeba histolytica* -induced dephosphorylation in host cells. *Infect. Immun*. , 70:1816-1823.
4. Clark, C.G. and Diamond, L.S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*., 15:329-341.
5. Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. (1968). The cultivation of parasites *in vitro* . Blackwell Science Publ., Oxford .pp.120-144.
6. Lwin, K.M. and Oo, M.(2004). *In vitro* anteamoebicidial activity of "Dysenzi" on *Entamoeba histolytica* in cultures. *FAME Pharmaceuticals Co., Ltd*. Internet:http://Famepharma.com.

7. Eichinger, D.(2001). Encystation in parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4:421-426.

8. Makioka, A.; Kumagai, M.; Ohtomo, H.; Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (2002[b]). Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens Parasitol.Res*., 88:454-459.

9. Espinosa-Cantellano, M. and Martinez-Palomo, A.(2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis : From molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev*., 15:318-331.

10. Gilchrist, C.A.; Leo, M.; Line, C.G.; Mann, B.J. and Petri, W.A.(2003). Calcium modulates promoter occupancy by the *Entamoeba histolytica* Ca^{+2}-binding transcription factor URE3-BP. *J. Biol. Chem.,* 278:4646-4653.

11. Moncada,D.; Keller, K. and Chadee, K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter it's protective function. *Infect. Immun*., 71:838-844.