------ مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص 159-167، 2006------

المقدرة التطفيرية لبعض المضادات الفطرية في الفطر *Aspergillus amstelodami*

ساهي جواد ضاحي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

سمية ياسين الدباغ
فرع الأحياء المجهرية
كلية الطب البيطري
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/7/21 ؛ تاريخ القبول 2005/12/5)

الملخص

لقد جرى اختبار القدرة التطفيرية لأربع تراكيز مختلفة غير قاتلة من ثلاث مضادات فطرية هي Griseofulvin , Fluconazole ,Itraconazole على كونيـدات الفطـر *Aspergillus amstelodami* وبثلاث طرق هي المعاملة المسبقة والتضمين في الطبق والنمو الوسيط. لم يظهر المضاد الأول تأثيرا" الا عند تركيزه الأعلى فقط وبطريقتي التضمين في الطبق والنمو الوسيط. أما المضاد الثاني فقد كان مطفرا" بجميع تراكيزه بطريقة النمو الوسيط على الرغم من تذبذبه في الطريقتين الأخريتين. أما المضاد الثالـث فلم يكن مطفرا بجميع تراكيزه وبالطرق الثلاث.

Mutagenicity of Some Antifungals in *Aspergillus amstelodami*

Sahi J. Dhahi
Department of Biology
College of Science
Mousl University

Sumaya Y. AL- Dabbagh
Department of Microbiol.
Veterinary Medicine College
Mousl University

ABSTRACT

Four different sublethal concentrations of the antifungals Griseofulvin, Fluconazole and Itraconazol were tested for their mutagenicity in conidia of the ascomycetous fungus *Aspergillus amstelodami*. Using three protocols : pretreatment, plate incorporation and growth mediation, Griseofulvin was effective only at its highest concentration and in the plate incorporation and growth mediation methods. Fluconazole was inconsistent in its effect in the pretreatment and plate incorporation methods but consistently was positive at all its concentrations in the growth mediation method. Itraconazole was consistenly negative at all concentrations tested and in all three protocols used .

المقدمة

يطلق على العوامل المتخصصة باحداث تأثيرات جينية في الكائنات الحية عند مستوى التعرض لها تحت السام (Sublethal) والتي تؤدي الى ظهور خصائص وراثية مغايرة بالمواد المسممة للجين (Genotoxic)، وهذه العوامل قد تكون فيزياوية او كيمياوية والتي يمكن ان تتفاعل بسرعة مع الاحماض النووية. وتعد الكيمياويات البيئية من (ملوثات وعقاقير واضافات غذائية ونواتج صناعية أخرى) هي الاكثر تأثيرا" على حياة الانسان نظرا لسعة انتشارها وتعدد وسائل وصولها الينا. كما تعد التأثيرات الوراثية هي الاخطر من بين تأثيراتها الضارة نظرا لتأخر اكتشافها وانتشارها في الاجيال اللاحقة وصعوبة او استحالة معالجة البعض منها حين الكشف عنها (Moutschen, 1985).

تعد بعض العقاقير الطبية من المواد الكيمياوية ذات التأثير التطفيري المباشر على الكائنات الحية ، ومن العقاقير التي شهدت انتشارا" سريعا في مجال الانتاج والاستخدام في الأونة الأخيرة هي المضادات الفطرية (Antifungal drugs) وبالأخص من مشتقات الازولات (Sheppard and Lampiris, 2001) وكان ذلك بسبب زيادة نسبة الاصابة بالامراض الفطرية والناتج عن ضعف الجهاز المناعي لدى المرضى بعد اجراء العمليات الجراحية الكبرى مثل عمليات القلب المعقدة وعمليات زرع الاعضاء، اضافة الى الانتشار الواسع لمضادات السرطان وتزايد الاصابة بمرض الايدز (AIDS).

قد تبين من دراسات سابقة بأن لبعض المضادات الفطرية مثل Griseofulvin و Thiabendazole تأثيرا مباشرا في حث تعدد الكروموسومات غير الحقيقي (Aneuploidy) وسوء التوزيع الكروموسومي (Chromosome malsegregation) باستعمال نظام الفطر *A. nidulans* والبعض الأخر مثل Econazole أعطى تأثيرا غير مباشر في حث الطفرات (Crebelli, et al , 1991). لذا يهدف البحث الى امكانية حث طفرات نقطية (Point mutation) في الفطر *A. amstelodami* باستخدام ثلاث من المضادات الفطرية الواسعة الاستخدام في الميدان الطبي وهي (Griseofulvin و Fluconazole و Itraconazole) .

المواد وطرائق العمل

كائن الاختبار

أجريت جميع تجارب البحث على السلالة A_1 (wA_1) من الفطر الكيسي *Aspergillus amstelodami* وهي سلالة برية في جميع احتياجاتها الغذائية لكنها تحمل طفرة (wA_1) تحيل اللون الاخضر البري للكونيدات الى الابيض فتبدو المستعمرة بيضاء بدلا من خضراء (Caten, 1979).

الطرق المايكروبيولوجية

لقد كانت الاوساط الزرعية وظروف الزرع هي تلك التي وصفها Caten (1979) للتعامل مع هذا الفطر . حيث ان الدرجة الحرارية المثلى هي 30 م° وقد استخدم وسطان اساسيان للزرع هما الوسط الأدنى Minimal Medium (M) و وسط مستخلص الشعير – ملح الطعام Malt extract- (MTS)

salt medium وقد يضاف لأي من هذين الوسطين الملح Sodium deoxycholate (D) بتركيز نهائي قدره 400 µg/ml للحصول على MD أو MTSD ويضاف D عندما يراد الحصول على مستعمرات منفردة عديدة على الطبق الواحد بحيث يمكن عدها بسهولة ودون التباس . وكانت الاطباق تحضن لمدة خمسة أيام .

العقاقير

لقد جرى استخدام أربعة أنواع من العقاقير هي Sulphanilamide (SA) والمضادات الفطرية الثلاثة Griseofulvin (GRF) و Fluconazole (FCZ) والـ Itraconazole (ITZ) . وكان مصدر SA هو شركة فلوكا السويسرية . اما المضادات الفطرية فكانت بشكلها الصيدلاني وليست بصورتها النقية فالمضاد GRF كان بهيئة حبوب (tablets) من شركة الادوية في سامراء (SDI) العراق وكل حبة تحتوى على 125 ملغم من المادة الفعالة . اما FCZ فكان على شكل كبسولات من شركة Advanced (A) للصناعات الدوائية المتطورة (عمان/الاردن) وكل كبسولة تحتوي على 150 ملغم من المادة الفعالة . اما ITZ فكان بشكل كبسولات من شركة Jansseen-pharmaceutica البلجيكية وكل كبسولة تحتوي على 100 ملغم من المادة الفعالة .

المحاليل الخزينة للعقاقير

جرى تحضير محاليل خزينة من العقاقير في الماء المقطر المعقم بتراكيز 10000 µg/ml من SA و 1250 من GRF و 1500 من FCZ و 1000 من ITZ واستعملت هذه المحاليل بدون تعقيم باستثناء محلول SA حيث جرى تعقيمه بالمؤصدة ، وغلفت المحاليل بورق الالمنيوم وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام.

تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)

جرى تحديد التركيز المثبط الأدنى لكل من العقار السام SA والمضادات الفطرية GRF وFCZ و ITZ وذلك باستعمال تراكيز متصاعدة من العقاقير المذكورة مع وسط النمو وذلك بطريقة الوخز بعمل 4 وخزات من الفطر *A. amstelodami* في كل طبق مضافا" اليه المضاد المدروس وتحضن الأطباق لمدة أربعة أيام بدرجة 30 م° يتم بعدها قياس قطر المستعمرات النامية في كل طبق ويقارن بقطر المستعمرات النامية على الوسط الأدنى M الخالي من المضاد والذي يمثل قراءة السيطرة (Control) وسجل التركيز الذي يتوقف عنده نمو الفطر تماما" حول نقطة الوخز اذ يمثل هذا التركيز الحد الأدنى المثبط لنمو الفطر.

التحري عن الأثر الطفري للمضادات

لقد جرى التحري عن الأثر الطفري لكل مضاد من المضادات الثلاث وذلك بملاحظة الزيادة في تكرار الطافرات المقاومة للعقار السام SA بين كونيدات الفطر المعاملة باربع تراكيز مختلفة وغير سامة من كل مضاد ومقارنة هذه التكرارات بتكرار الطفرات التلقائية المقاومة في كل مرة . وكررت العملية

ثلاث مرات لكل تركيز ولكل مضاد ثم قورنت بمتوسط التكرار التلقائي في كل مرة احصائيا باستخدام اختبار t وجرت معاملة الكونيدات لكل مضاد بثلاث طرق (Venitt and Parry, 1984) وكالاتي :-

1. **طريقة المعاملة المسبقة (Pretreatment)**

وتتضمن هذه الطريقة معاملة العوالق الكونيدية بكل تركيز من تراكيز المضاد الفطري في انبوب اختبار لمدة ساعة ومن ثم تجرى عملية الزرع على الوسط الانتقائي (MD + SA) لعزل السلالات الطافرة والمقاومة.

يحضر اولا عالق كونيدي مركز (يحوي في حدود 10^7 كونيدة/مل) من مزرعة حديثة من السلالة البرية0 وهذا يمثل العالق الكونيدي غير المخفف(10^0) يقسم هذا العالق الى ثلاثة اقسام ، قسم منه (حوالي 10 مل) يضاف له المطفر المزعوم (المضاد الفطري) بالتركيز المعين ويترك في المختبر لمدة ساعة مع التحريك المتكرر. اما القسم الثاني (10مل) فينقل الى طبق زجاجي ويعرض الى اشعة UV القصيرة الموجة (253.7 nm) المتحصل عليها من مصباح UV (Philip Harris, England) وعلى بعد 10 سم ولمدة 20 دقيقة بحيث يكون غطاء الطبق مرفوعا" خلال التشعيع مع تحريك العالق المستمر بواسطة محرك مغناطيسي يدور قطعة مغناطيسية في وسط العالق. يعاد غطاء الطبق بعد انتهاء فترة التشعيع ويترك العالق لمدة ساعة واحدة على الاقل في الظلام لتجنب حصول عملية التنشيط الضوئي (Photoreactivation)التي تصلح بعض الطفرات فيقل عدد الطفرات التي نحصل عليها (Griffiths et,al., 2001) . ويمثل هذا العالق المشعع غير المخفف (10^0) اما القسم الثالث من العالق الاصلي (حوالي 5 مل) فينقل الى انبوب معقم ويترك في المختبر وهذا يمثل العينة غير المعاملة.

تحضر تخافيف عشرية من كل من العوالق الثلاثة اعلاه الى حد 10^{-4} يوزع 0.5 مل من كل عالق غير مخفف على خمسة اطباق MD + SA لعزل الطافرات .يوزع 0.2 مل من التخفيف 10^{-4} من كل عالق على طبقين MD ويستفاد من هذين الطبقين لتقدير العدد الحي من العالق الاصلي غير المخفف لكل معاملة ويضرب هذا العدد في فرق التركيزوفي فرق عدد الاطباق المزروعة من العالق الاصلي للحصول على حجم العشيرة الحية المتوقعة (Expected population) من كل 0.5 مل المزرعة. وبقسمه عدد الطافرات على حجم العشيرة المقدرة نحصل على تكرار الطافرات لكل من معاملة المضاد ومعاملة UV والعينة غير المعاملة (التكرار التلقائي).

كررت كل تجربة ثلاث مرات وجرى تقدير متوسط تكرار الطافرات للمعاملتين التلقائية ومعاملة المضاد. واختبرت معنوية الفرق بين تكرار الطافرات لكلتا المعاملتين باستخدام اختبار (t) اما المعاملة UV فلم تكرر اذ كان الهدف منها هو التأكد من استجابة السلالة A_1 للمطفر الموجب (UV) ولا خلل فيها بهذا الشأن.

2.طريقة التضمين بالطبق(Plate incorporation)

حضر عالق كونيدي مشابه للعالق في الطريقة السابقة وقسم الى ثلاثة أقسام الاول والثاني تركا بلا معاملة 0 أما الثالث فقد جرى تعريضه الى اشعة UV كما جرى في الطريقةالسابقة وحضرت تخافيف الى 10^{-4} من العوالق الثلاثة . ثم جرى الزرع كما في الطريقة السابقة باستثناء ان الزرع من العالق الاول (بدون معاملة) قد جرى على الوسط الانتقائي MD+SA المتضمن المضاد الفطري بالتركيز المطلوب ضمن وسط الزرع . أما العالق الثاني (الطافرات التلقائية) فقد جرى الزرع على الوسط الانتقائي MD+SA فقط . فاذا كان المضاد مطفرا" فسوف يحث الطفرات مباشرة على طبق الزرع . وكررت التجربة ثلاث مرات كما في المعاملة السابقة.

3. **معاملة النمو الوسيط** (Growth mediated)

جرى تحضير عالق كونيدي كما في الطريقة الاولى حيث استخدم بلا تخفيف لتلقيح طبق واحد من MD وطبق واحد من MD مضافا اليه المضاد وبالتراكيز المعينة ولكن بدون SA. تركت الاطباق تنمو لمدة ثلاثة أيام ثم حضر من كل منها عالق بالطريقة الاعتيادية وجرى الزرع كما في الطريقتين السابقتين على MD+SA لتقدير الطافرات وعلى MD لتقدير العدد الحي.

النتائج والمناقشة

التراكيز المثبطة الدنيا للعقاقير

لقحت السلالة A_1 على التراكيز 150، 100 ,75, 50 , 20 , 10 مايكروغرام/مل من SA . فتوقف نموها تماما عند التركيز 50 فعد ذلك اقل تركيز مثبط لنمو هذه السلالة حسب ظروف التجربة المذكورة رغم ان التركيز المثبط الادنى الحقيقي قد يكون في أي مكان اخر بين 50، 30 مايكروغرام/مل. وللاطمئنان الى كون الطافرات المعزولة هي فعلا طافرات مقاومة للعقار SA فقد اعتمد التركيز 100 مايكروغرام من SA في وسط عزل الطافرات .

أما بالنسبة للمضادات الفطرية فقد جرى اختبار التراكيز النهائية (µg/ml) الاتية

123.5 , 25 , 50 , 75 , 125 , 250 , 500 , 600 , 1200 من GRF و30,15 , 45, 60

150,90، 600 , 900 , 1200 , 1500 من FCZ و 0.01 ,0.05 ,0.1 ,0.5 ,2 , 4 , 8 , 20 من ITZ فلم يحصل تثبيط واضح للنمو بالمضادين GRF أو FCZ حتى عند اعلى التراكيز. أما المضاد الفطري ITZ فقد اوقف النمو تماما عند التركيز 20 مايكروغرام/مل . وقد عد هذا التركيز هو التركيز المثبط الادنى للمضاد وضمن ظروف التجربة الحالية رغم ان التركيز المثبط الحقيقي قد يكون واقعا بين التركيزين 8 و20 كما ان التراكيز المذكورة اعلاه للمضادات الثلاث هي بألتاكيد ليست تراكيز مضبوطة لان المضادات اذيبت في الماء وان هذه المضادات باستثناء FCZ بطيئة الذوبان بالماء (Bennett, 2001) وهذا يعني ان ITZ اكثر فعالية في قتل الفطريات من المضادين الاخرين ، وهو بالفعل كذلك

(Papich et al., 2001) وبناء على هذه الاختبارات فقد جرى اختيار اربعة تراكيز غير قاتلة (Sublethal) من كل مضاد لاختبار قدرتها التطفيرية وهذه التراكيز هي التراكيز التي لم تختزل اقطار المستعمرات النامية عليها بأية درجة من الدرجات . وكانت تراكيز المضادات الفطرية (مايكروغرام/مل) التي جرى اختبارها هي 75 , 50 , 25, 12.5 من GRF و 12.5, 25 , 50 , 75 من FCZ و 0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.5 من ITZ .

التأثير التطفيري للعقار Griseofulvin

يبين الجدول (1) نتائج اختبارات التطفير للعقار GRF ويبدو من النتائج المعروضة في هذا الجدول ان المضاد GRF لم يظهر اثرا طفريا عند جميع التراكيز المستخدمة بطريقة المعاملة المسبقة وانه ادى الى زيادة معنوية في متوسط الطافرات عند أعلى تركيز مستخدم (75µg) بطريقة التضمين في الطبق ($t_{(4)}$= 3.61, $P > 0.05$). وتاكد هذا في معاملة النمو الوسيط حيث ارتفع الفرق المعنوي عند هذا التركيز عما هو عليه في معاملة التضمين في الطبق ($t_{(4)}$ =5.30, P>0.05). غير ان هذا لا يزال تأثيرا تطفيريا واطئا مقارنة بتأثير الاشعة فوق البنفسجية بوصفها مطفرا ايجابيا معلوما حيث بلغ متوسط تكرار الطافرات 0.51 ± 21,2 (الجدول 1).

لم يذكر عن المضاد GRF انه يحث الطفرة النقطية (Point mutation) لذا فالقيمة المشاهدة الاولية في هذا البحث تسترعي الانتباه وتستدعي التأكيد بتجارب اخرى موسعة باستخدام الفطر او استخدام نظام ايمز في البكتريا (Ames et al., 1975) . كما اننا لو توسعنا بمفهوم التأثيرات الوراثية اكثر من الطفرة النقطية فقد ذكر عن هذا العقار بأنه يؤثر على تركيب المغزل وعمله مما يقود الى سوء التوزيع الكروموسومي اثناء الانقسام وانتاج الافراد المتعددة الكروموسومات غير الحقيقية (Aneuploids) (Quiun et al., 2002 و Dellarco et al., 1986 و Kappase et al., 1974) كما ان تعاطي هذا العقار بالجرع العالية ولفترات طويلة قد أدى الى حصول تشوهات خلقية (Teratogenic) وحث بعض انواع السرطان في الحيوانات المختبرية (Reynold, 1982) . ومعلوم ان هناك ترابطا وثيقا بين التأثير التطفيري والتأثير التسرطني للكثير من العوامل الكيميائية (Ames et al., 1977) . لذا بات ضروريا اجراء اختبارات موسعة على هذا العقار ليس من ناحية احداثه للطفرة النقطية وانما من النواحي الوراثية والتشويهية الاخرى ، خاصة وان العقار لا يزال يوصف علاجا لعديد من حالات الاصابات الفطرية في الانسان والتي يستمر فيها العلاج لفترات طويلة ، (Sheppard and Lampiris, 2001; Gridwood,1984; Lawrence and Bennett, 1987).

التأثير التطفيري للمضاد Fluconazole

يظهر من الجدول (2) ان التأثير التطفيري لهذا المضاد لم يكن متسقا في المعاملتين المسبقة والتضمين في الطبق اذ لم يبد تأثيرا تطفيريا في المعاملة المسبقة الا عند التركيز 60µg/ml ($t_{(4)}$ = 11.71, P> 0.05). أما في معاملة التضمين في الطبق فقد أعطى تأثيرا ايجابيا عند التركيز 30µg/m ($t_{(4)}$ = 3.38, P>0.05) فيما لم يؤثر عند التراكيز الأخرى .

الجدول1: متوسط تكرار الطافرات ($X10^{-6}$) المقاومة للعقار SA بين كونيدات الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المضاد الفطري Griseofulvin (GRF) وبثلاث طرق مختلفة وذلك مقارنة بتكراراتها التلقائية والمستحثة باشعة UV.

تركيز المضاد (µg/ml) GRF	Pretreatment		Plate incorporation		Growth mediated	
	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$**	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$**	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$**
0	0.68±0.13		1.25±0.21		1.41±0.05	
12.5	1.09±0.19	0.73	1.72±0.51	0.85	1.45±0.03	0.76
25.0	1.09±0.17	1.93	1.01±0.11	1.06	1.55±0.07	1.66
50	0.99±0.06	2.15	1.77±0.42	1.41	1.65±0.24	0.09
75	1.94±0.46	2.63	2.26±0.18	3.61*	2.70±0.24	5.30*
UV***	21.2±0.51		21.2±0.51		21.2±0.51	

* معنوية عند مستوى احتمال 0.05

** الارقام في هذا الحقل تمثل قيمة t لاربع درجات حرية التي تقارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع تكرارها التلقائي (المعاملة).

*** الارقام في هذا السطر تمثل تكرار الطافرات المستحثة باشعة UV وهذه لم تستخدم للمقارنة الاحصائية وانما استخدمت للدلالة على ان السلالة A_1 قابلة للطفور عند تعرضها لمطفر معلوم (UV في هذه الحالة) . ولم تكرر المعاملة UV مع المضادين الاخرين لاستخدام السلالة نفسها .

SE: الخطأ المعياري (Standard Error) . كل قيمة تمثل متوسطا لثلاث مكررات

الجدول 2: متوسط تكرار الطافرات ($X10^{-6}$) المقاومة للعقار SA بين كونيدات الفطر *A. amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المضاد الفطري Fluconazole (FCZ) وبثلاث طرق مختلفة مقارنة مع تكراراتها التلقائية .

تركيز المضاد (µg/ml) FCZ	Pretreatment		Plate incorporation		Growth mediated	
	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$
0	1.17±0.04		0.88±0.15		0.43±0.11	
15	0.77±0.20	1.97	1.06±0.57	0.60	1.17±0.19	3.35*
30	1.63±0.64	0.70	2.44±0.25	3.38*	1.10±0.18	3.24*
45	1.39±0.32	0.69	1.69±0.54	1.44	1.77±0.33	3.89*
60	1.68±0.05	11.71*	1.81±0.53	1.68	1.07±0.11	4.28*

*معنوية عند مستوى احتمال 0.05

بقية الرموز كما في الجدول 1.

أما باستخدام طريقة النمو الوسيط فقد ظهر العقار محفزا للطفرة بجميع تراكيزه المستخدمة مع زيادة في قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة بزيادة التركيز المستخدم اذ تدرجت من 3.35 للتركيز 15 µg/ml الى3.24 للتركيز 30 µg/ml الى 3.89 للتركيز 45 µg/ml ثم الى 4.28 للتركيز 60 µg/m (الجدول 2) وهذا ينسجم مع

احدى صفات المطفر حيث يزداد التأثير التطفيري بزيادة التركيز (Brusick, 1980) . كما ان وضوح هذا التأثير في معاملة النمو الوسيط قد يشير الى حاجة هذا العقار الى التنشيط الايضي (Ames et al., 1977 ; Venitt and Parry, 1984; Crebelli et al., 1991) وهذا ما يوفر نمو الكونيدات وتكوين الغزل الفطري بوجود المضاد دون العقار السام SA من طريقة النمو الوسيط .

التأثير التطفيري للمضاد Itraconazole

لم يظهر هذا المضاد أي أثر طفري بجميع تراكيزه وبجميع الطرق المستخدمة (الجدول 3) وضمن لظروف التجريبية الموصوفة في هذا البحث وهذا شيء حسن لكون العقار من المضادات الفطرية الواسعة الانتشار في معالجة العديد من الاصابات الفطرية في الانسان (Bossche et al., 1989; Rang et al., 2003; Sheppard and Lampirs, 2001). غير ان ذلك لا يعني تزكية شاملة لهذا المضاد من التأثيرات الضارة الأخرى على الانسان اذ ذكر عنه أنه بسبب تشوهات خلقية في الاجنة (Bennett, 2001) كما ان التأثيرات الوراثية لا تقتصر على الطفرات النقطية كالتي درست في هذا البحث بل أنها تشمل طائفة اوسع من التأثيرات كالتشوهات الكروموسومية وسوء التوزيع الكروموسومي(Chromosome malsegregation) اثناء الانقسام النووي وكذلك التحول الجيني (Gene conversion) وحدث التعابر (Recombination) وهذه التأثيرات تتطلب بروتوكولات مختلفة لدراستها (Brusick , 1980 ; Venitt and Parry , 1984) وهو ما لم يحصل في البحث الحالي .

الجدول 3: تكرار الطافرات ($x10^{-6}$) المقاومة للعقار SA بين كونيدات الفطر *A. amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المضاد الفطري Itraconazole (ITZ) وبثلاث طرق مختلفة مقارنة مع تكراراتها التلقائية .

تركيز المضاد ITZ(µg/ml)	Pretreatment		Plate incorporation		Growth mediated	
	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$	Mean ±SE	$t_{(2+2)}$
0	1.33±0.12		0.70±0.22		1.35±0.28	
0.01	1.59±0.18	1.21	1.61±0.09	0.38	1.42±0.36	0.15
0.05	1.73±0.20	0.61	1.56±0.18	0.49	1.46±0.09	0.37
0.1	1.53±0.38	0.50	1.66±0.51	0.07	1.32±0.03	0.07
0.5	1.69±0.36	0.95	1.85±0.39	0.50	1.79±0.38	2.07

الرموز كما في الجدول -1

المصادر الاجنبية

Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carinogens and mutagens with *Salmonella* mammalion microsome mutagenicity test. *Mutat. Res., 31* : pp.347-363.

Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., 1977. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella* mammalion microsome test. In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier (Amsterdam). pp.1-17.

Bennett, J.E., 2001. Antimicrobial agents : Antifungal agents. In : J.G. Hardman , L.E., Limbird and A.G. Gilman (eds.) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics , 2* , 10th ed , McGraw- Hil1 , New York , pp.1295-1312.

Bossche, H.V., Mackenzie, D.W.R. and Cauwenbergh, G. (eds.)., 1988. *Aspergillus and Aspergillosis* Plenum Press. New York and London .

Brusick, D., 1980. *Priciples of Genetic Toxicology* , Plenum Press. London.

Caten, C.E., 1979. Genetical determination of conidial color in *A. heterocaryolticus* and relation of this species to *A. amstelodami*. *Trans. Brit. Myco. Soci. 73* : pp.65-47.

Crebelli, R., Cont, G., Gonti, L. and Carere, A., 1991 In vitro studies with nine known or suspected spindle poisons : results in tests for chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans* diploid strains. *Mutagenesis 6* : pp.131-136.

Dellarco, V.L., Mavournin, K.H. and Waters, M.D., 1986. Aneuploidy database review committee : Summary compitation of chemical database and evaluation of test methodiology. *Mutat. Res., 176* : pp.149-169.

Gridwood, R.H.ed. 1984. *Clinical Pharmacology* 25th ed. Bailliere Tindall , London.

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M., 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*, 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

Kappas, A., Georgopoulos, S.G. and Hasti, A.C., 1974. On the genetic activity of benzinidazole and thiophenate fungicides on diploid *A. nidulans. Mutat. Res. 26* , pp.17-27.

Laurence, D.R.and Bennett, P.N., 1987. *Clinical Pharmacology* 6th ed. Churchill Living stone, Edinburgh.

Moutschen , J., 1985. *Introduction to Genetic Toxicology*, Wiley, New York.

Papich, M.G., Heit, M.C. and Riviere, J.E., 2001. Antifungal and Antiviral Drugs. In : Adams , H.R.(ed). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8th ed. Iowa State Press. pp. 918-946 .

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C. and Leonard, F.C., 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell, Oxford. pp.219-259.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. and Moore, P.K., 2003. *Pharmacology*, 5th ed. Churchill LivingStone, Edinburgh.

Reynolds, J.E.F., 1982. *Martindale the Extra Pharmacopoeia*, 28th ed. Pharmaceutical Press. London. pp.714-732.

Sheppard, D. and Lampiris, H.W., 2001. Antifungal agents. In B.G. Katzung (ed). *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th ed. McGraw-Hill, New York., : pp.814-822.

Venitt, S. and Parry, J.M., 1984. Backgrownd to mutagenicity testing. In : S. Venitt and Parry, J.M .(eds) . *Mutagenicity Testing Apractical Apporach*. Blackwell, Oxford. pp. 1-22.