

## بررسی تأثیر داروی گریزئوفولین بر روی بیان ژن ATPase-subunit G در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون روبروم

کامیار متواضع<sup>۱</sup>، نسیم شاه محمدی<sup>۲</sup>، مسعود امامی<sup>۳</sup>، ساسان رضائی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
<sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
<sup>۳</sup> استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
<sup>۴</sup> دانشیار، بخش بیولوژی مولکولی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** ترایکوفایتون روبروم یکی از درماتوفیت‌های انسان دوست با انتشار جهانی است. این ارگانیسم یکی از عوامل شایع کچلی در انسان به ویژه کچلی کشاله ران، بدن، پا و دست در همه نواحی دنیا می‌باشد. خصوصیات متعددی از این قارچ تا به حال مورد بررسی قرار گرفته است، با این وجود در زمینه زیست‌شناسی مولکولی این قارچ، مطالعات محدودی صورت گرفته است. در مطالعه حاضر سعی شده است تا بیان زیر واحد G ژن ATPase در این قارچ تحت اثر داروی گریزئوفولین بررسی شده و تغییرات میکروسکوپی نیز تحت تأثیر دارو مشخص گردند.

**روش بررسی:** در این مطالعه بنیادی، رقت‌هایی از گریزئوفولین که توأم با رشد قارچ بود، تهیه شد و با نمونه شاهد که هیچ‌گونه دارویی روی آن اثر داده نشده مقایسه گردید. در این بررسی نمونه‌ها تحت تأثیر رقت‌های مورد نظر دارو، از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و پس از آن RNA آنها استخراج شد. به دنبال آن RT-PCR هر سه نمونه به‌طور هم‌زمان انجام گردید تا بیان زیر واحد G ژن ATPase تحت اثر رقت‌های گریزئوفولین مورد بررسی قرار گیرد.

**یافته‌ها:** از نظر میکروسکوپی در رقت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گریزئوفولین، میزان کوتاه شدن و خمیده شدن میسلیم‌ها نسبت به رقت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشتر بود. همچنین از نظر بیان ژن، در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بیان زیر واحد G ژن ATPase افزایش یافت، اما با افزایش میزان غلظت به ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیان ژن، کاهش پیدا کرد.

**نتیجه‌گیری:** داروی گریزئوفولین تا رقت معین بر روی خصوصیات میکروسکوپی قارچ ترایکوفایتون روبروم، تأثیر محسوسی دارد، ضمن این که بیان زیر واحد G ژن ATPase را افزایش می‌دهد. اما در رقت‌های بالاتر یا به دلیل کاهش رشد ترایکوفایتون روبروم و یا به دلیل ایجاد نوعی ایجاد تحمل در قارچ، بیان ژن به تدریج کاهش پیدا می‌کند.

**واژگان کلیدی:** درماتوفیت، ترایکوفایتون روبروم، ATPase-subunit G، RT-PCR، گریزئوفولین

### مقدمه

(۱، ۲). ATPase های نوع V، کمپلکس پروتئینی هستند که از ۱۳ زنجیره پلی پپتیدی ساخته شده‌اند. امروزه مشخص شده است که V-ATPase از دو بخش عملکردی اصلی تشکیل شده است: بخش  $V_1$  خارجی که یک کمپلکس محیطی و عامل هیدرولیز ATP می‌باشد و بخش  $V_0$  داخلی که مسوول نقل مکان پروتون است (۳-۵). یکی از زیر واحدهای V-ATPase، زیر واحد G است که ژن آن را با نام vma10 مشخص می‌کنند و پروتئین ۱۳ کیلودالتونی که

ATPase های  $H^+$  واکوئلی (V-ATPase) خانواده‌ای از پمپ‌های پروتونی وابسته به ATP هستند که مسوول اسیدی کردن و انتقال پروتون به لومن غشاء داخلی ساختارهای داخل سلولی مثل اندوزوم، لیزوزوم و وزیکول‌های ترشحی می‌باشند

آدرس نویسنده مسؤل: تهران، واحد تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی، کامیار متواضع

(e-mail: motavaze49@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۴/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۹/۱۶

صورت گرفت که بعد از انجام مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی از بین ۳۲ مورد درماتوفیتوزیس، وجود قارچ ترایکوفایتون روبروم در ۴ نمونه تأیید و با سویه استاندارد، مقایسه گردید.

رقت‌هایی از گریزئوفولوین تهیه گردید و روی قارچ اثر داده شد تا رقتی به دست آید که میزان رشد قارچ در آن کمی کمتر از رشد نمونه شاهد باشد. بدین منظور از استوک ۱/۰۰۰ گرم در میلی‌لیتر، رقت‌های ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد که رشد کافی از قارچ مورد نظر ما را داشتند و میزان رقت نهایی دارو در این دو نمونه به ترتیب ۱۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. سپس در پلیت‌ها، نمونه‌های ترایکوفایتون روبروم تحت اثر دارو و نیز در غیاب دارو کشت داده شدند.

استخراج RNA هم برای نمونه‌های شاهد و هم دو نمونه از سلول‌های قارچی که به ترتیب در رقت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از گریزئوفولوین قرار داده شده بودند (در هر یک از ۴ نمونه مورد بررسی و سویه استاندارد)، انجام گردید. پودر میسلومی به دست آمده با کمک نیتروژن مایع، در داخل محلول گوانیدین ایزوتیوسیانات (GITC) سرد و به مدت ۱۵ دقیقه به صورت هموژنیزه درآمد و به دنبال آن نمونه در سانتیفریژ  $25000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. عمل استخراج با سدیم استات ۲ مولار، فنل اسیدی و کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) همراه با سانتیفریژ  $12000 \times g$  به مدت ۷ دقیقه دنبال شد. بعد از افزودن حجم مساوی از ایزوپروپانول و قرارگیری نمونه‌ها در حرارت  $20^\circ C$  به مدت ۱ ساعت، سانتیفریژ  $12000 \times g$  به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. سپس GITC و ایزوپروپانول به نمونه‌ها افزوده شده و مخلوط حاصل در  $20^\circ C$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. نمونه‌های نهایی در سانتیفریژ  $12000 \times g$  به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و رسوب RNA حاصله، با کمک اتانول ۷۰٪ به آرامی شستشو داده شد. ابتدا cDNA برای نمونه شاهد و نیز نمونه‌های همراه با رقت‌های ۱۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گریزئوفولوین ساخته شد و سپس RT-PCR تحت برنامه  $94^\circ C$  (۵ دقیقه)،  $94^\circ C$  (۳۰ ثانیه)،  $51^\circ C$  (۲ دقیقه)،  $72^\circ C$  (۲ دقیقه) و  $72^\circ C$  (۵ دقیقه) انجام شد. پس از آن که در ژل نمونه الکتروفورز، هر سه نمونه باند مورد نظر را داشتند، OD سه نمونه در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شدند تا میزان cDNA لازم در سه نمونه به دست آید. سپس دوباره RT-PCR تحت برنامه‌ای که در بالا

توسط این ژن بیان می‌شود را Vma10p می‌نامند (۶). در پستانداران ATPase-V به عنوان هدفی برای داروهای ضد پوکی استخوان و ضد سرطان در نظر گرفته شده است، زیرا این آنزیم در عمل بازجذب استخوان‌ها و محل تهاجم و متاستاز تومورها دخیل است (۷، ۸). آنزیم ATPase یکی از آنزیم‌های بسیار مهم در متابولیسم قارچ‌هاست. شناخت ساختار مولکولی و عوامل موثر بر آن کمک بسیار مهمی به درک فیزیولوژی قارچ‌ها می‌نماید.

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های رشته‌ای کراتین‌دوست هستند که جلد انسان و حیوانات را مورد حمله قرار می‌دهند. ترایکوفایتون روبروم در انسان ایجاد کچلی بدن، پا، ناخن و دست می‌کند. همچنین به موها حمله و ایجاد کونیدیایهای خارج و داخل مو (اکتواندوتریکس) می‌کند (۹). کلونیزه شدن درماتوفیت‌ها محدود به بافت‌های کراتینه و مرده لایه شاخی بوده و ممکن است منجر به واکنش‌های التهابی خفیف تا شدید گردد. ایمنی هومورال، سلولی و نیز دفاع غیراختصاصی میزبان بر علیه درماتوفیت‌ها فعال بوده که می‌تواند باعث حذف قارچ گردند و در نتیجه از پیشرفت عفونت به سمت بافت‌های تحتانی جلوگیری نمایند (۱۰).

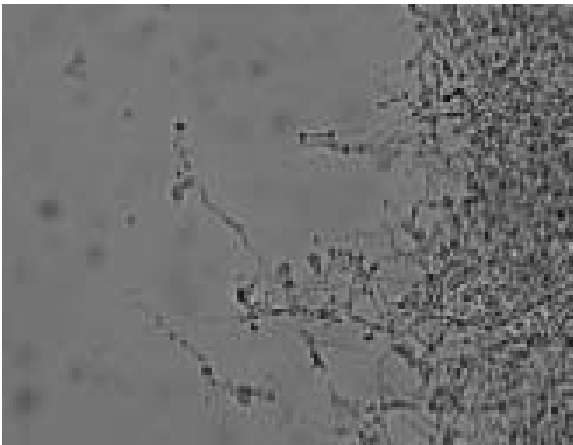
گریزئوفولوین محصول متابولیسمی از کپک پنی‌سیلیوم گریزئوفولووم است و بیش از ۴۰ سال است که برای درمان درماتوفیتوزیس به کار می‌رود و در شرایط آزمایشگاه علیه انواع گونه‌های میکروسپوروم، ترایکوفایتون و اپیدرموفایتون اثر بازدارندگی دارد. مکانیسم عمل آن کاملاً مشخص نیست و احتمالاً از طریق ممانعت از میتوز و سنتز اسید نوکلئیک روی سلول قارچ مؤثر است. شایع‌ترین اثرات سوء این دارو سردرد و علائم گوارشی است (۱۱).

در پژوهش‌های قبلی، توالی کامل نوکلئوتیدی زیرواحد G از آنزیم ATPase در قارچ مورد بررسی مشخص گردیده است. در مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن سنتز کننده این زیرواحد در قارچ ترایکوفایتون روبروم تحت تأثیر گریزئوفولوین بررسی گردید تا مشخص شود با غلظت‌های مختلف این دارو میزان تولید پروتئین تغییر یافته یا ثابت می‌ماند. همچنین تغییرات میکروسکوپی قارچ نیز تحت تأثیر داروی مذکور مورد مطالعه قرار گرفت.

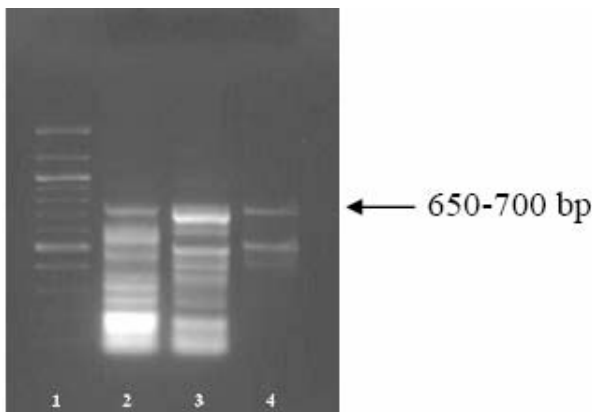
## مواد و روشها

در این مطالعه بنیادی، از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۵ نمونه‌برداری

زیر واحد G در ATPase در رقت ۵ میکروگرم در میلی لیتر بیشتر می شود ولی در رقت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر کاهش بیان ژن اتفاق می افتد (شکل ۴).



شکل ۳- میسلیم های کوتاه تر و چروکیده تر در ترایکوفایتون روبروم تحت اثر ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر گریزئوفولون



شکل ۴- تصویر الکتروفورز هر سه نمونه (۱ سایز مارکر ۲) نمونه شاهد (۳) رقت ۵ میکروگرم در میلی لیتر و (۴) رقت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر (با مشاهده باندها در ناحیه ای که با فلش مشخص شده است افزایش بیان در ۳ و کاهش بیان در ۴ مشخص است. باندهای سایز مارکر از بالا به پایین عبارتند از: ۱۱۰۰، ۱۲۰۰، ۱۳۰۰، ۱۴۰۰، ۱۵۰۰، ۱۶۰۰، ۱۷۰۰، ۱۸۰۰، ۱۹۰۰، ۲۰۰۰ جفت نوکلئوتید)

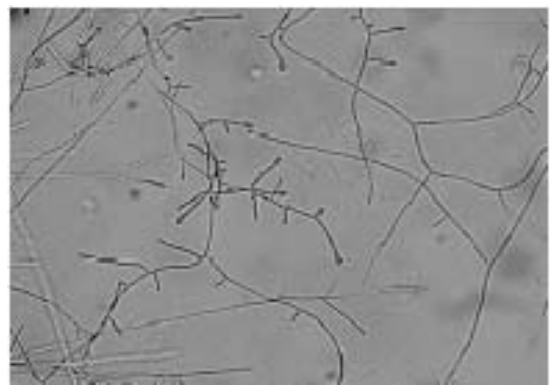
### بحث

در مطالعه حاضر، اثر گریزئوفولون روی زیر واحد G ژن ATPase در قارچ ترایکوفایتون روبروم بررسی شده است. گونه های جنس ترایکوفایتون رشد کندی دارند (۳). ترایکوفایتون روبروم جزو تعداد اندکی از درماتوفیت ها است که منحصراً برای رشد روی بدن انسان تطابق یافته اند. عفونت حاصل از ترایکوفایتون روبروم مزمن بوده و در بعضی از افراد تا آخر عمر ادامه می یابد (۹، ۱۲).

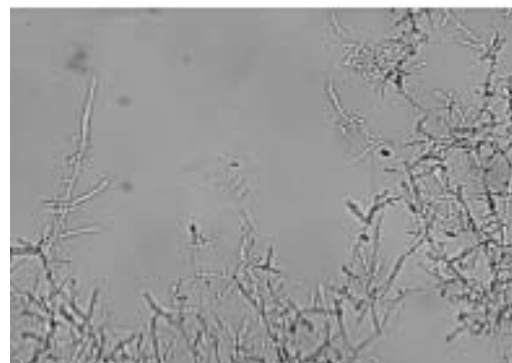
ذکر شد و با مقادیر جدید cDNA برای سه نمونه انجام شد تا میزان بیان ژن زیر واحد G در ATPase تحت اثر دارو بررسی شود.

### یافته ها

بررسی نمونه ها با لاکتوفنل در زیر میکروسکوپ نشان داد که میزان چروکیدگی شدن میسلیم ها در رقت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشتر از رقت ۵ میکروگرم در میلی لیتر است. بنابراین هر چه میزان رقت دارو بالا می رود، میزان کوتاه و چروکیدگی شدن میسلیم ها بیشتر می شود (شکل ۱-۳).



شکل ۱- میسلیم های باریک و دراز و میکروکنیدیای گلابی شکل در ترایکوفایتون روبروم شاهد



شکل ۲- میسلیم های کوتاه و چروکیده در ترایکوفایتون روبروم تحت اثر ۵ میکروگرم در میلی لیتر گریزئوفولون

بعد از جداسازی RNA و RT-PCR همزمان برای سه نمونه شاهد، رقت ۵ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر، OD های هر سه نمونه خوانده شد که مقادیر آن به ترتیب ۳/۳، ۳/۹ و ۴ بود و از روی این اعداد مقادیر cDNA لازم برای انجام RT-PCR بعدی هر سه نمونه به دست آمد که این مقادیر به ترتیب ۳، ۲/۵ و ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. مطالعات RT-PCR نهایی نشان داد که بیان ژن

میکروگرم در میلی لیتر بیان ژن کاهش پیدا کرد. در غلظت پایین دارو، گریزئوفولوین احتمالاً روی تنفس سلولی قارچ اثر گذاشته و آن را دچار اختلال می کند که بر این مینا سلول اقدام به افزایش میزان تولید پروتئین زیر واحد G در ATPase می کند، ولی با افزایش غلظت گریزئوفولوین کاهش بیان ژن داریم. رقت های بالاتر مرگ سلول را به همراه دارد.

مطالعات محدودی در مورد اثر داروهای ضد قارچی روی درماتوفیت ها بخصوص ترایکوفایتون روبروم انجام شده است که در اکثر آنها گریزئوفولوین بهترین دارو با حساسیت بالا است (۲۲، ۲۳) که با نتایج این پژوهش همخوانی زیادی نشان می دهد. همچنین ژن کد کننده ABC انتقالگر در ترایکوفایتون روبروم (TruMDR1) در مواجهه قارچ با گریزئوفولوین افزایش بیان ژن دارد (۲۴) که مشابه نتایج به دست آمده در این تحقیق می باشد. بررسی های اخیر نشان داده اند که ترینافین و ایتراکونازول اثر تیماری مشابه یا کمی بیشتر از گریزئوفولوین دارند، ولی مزیت مهم آنها این است که دوره اثر کوتاه تری دارند و روی کاندیدا و کپک های غیرپاتوژن نیز موثر هستند (۲۵، ۲۶). می توان نتیجه گرفت که گریزئوفولوین در رقت های مختلف روی بیان ژن مورد نظر اثر متفاوتی دارد. به این شکل که در رقت های کم دارو افزایش بیان ژن داریم که حداکثر این افزایش در رقت ۵ میکروگرم در میلی لیتر است ولی در رقت های بالاتر تا ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر کاهش بیان ژن مشاهده می شود که برای این کاهش دو تفسیر وجود دارد. یکی اینکه از این غلظت به بالا قارچ رشدش را از دست می دهد و به آرامی به سوی مرگ پیش می رود و بیان ژن ها از جمله ساب یونیت G کم یا متوقف می شود و دیگری اینکه تحمل در قارچ به وجود می آید و قارچ زنده است و رشد دارد ولی با توجه به عادت قارچ به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر نیازی به افزایش بیان ژن و ترمیم سلولی پیدا نکرده است که به نظر می رسد نظریه اول به واقعیت نزدیک تر باشد و در رقت های بالاتر سلول به سوی مرگ می رود. پس داروی گریزئوفولوین تأثیر اساسی بر روی بیان ژن ATPase در قارچ ترایکوفایتون روبروم دارد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات بی شائبه کارکنان آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه سپاسگزاری می شود.

به دلیل آن که روش های تشخیصی ابتدایی مثل کشت با نتایج ضعیفی همراه بوده است، روش های زیست شناسی مولکولی برای افزایش دقت تشخیص مورد توجه قرار گرفته اند (۱۳). مطالعات مولکولی بسیار محدودی که روی درماتوفیت ها و خصوصاً ترایکوفایتون روبروم انجام گرفته، نشان می دهند که حساسیت PCR بسیار بیشتر از کشت است و علاوه بر آن طول مدت تشخیص از ۲ تا ۴ هفته در مورد کشت به ۴۸ ساعت در PCR تقلیل می یابد (۱۵-۱۳). همچنین با استفاده از روش های PCR بر روی ژن DNA توپوایزومراز II برای تشخیص درماتوفیت ها در مرحله ای خاص (۱۶)، از قطعه ای از ناحیه rDNA (RFLP) برای تشخیص تیپ های ترایکوفایتون روبروم (۱۷) و از توالی ژن کیتین سنتاز I (CHS I) برای بررسی همولوژی بین ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفایتون ویولاسئوم استفاده کرد (۱۸).

ATPase های  $H^+$  و اکونولی (V-ATPase) خانواده ای از پمپ های پروتونی وابسته به ATP هستند که مسوول اسیدی کردن و انتقال پروتون به لومن غشاء داخلی ساختارهای داخل سلولی می باشند و در فرآیندهای درون سلولی مثل اندوسیتوز، پردازش پروتئین و تجزیه و ورود ویروس های بخصوص و توکسین ها از ساختارهای اندوسیتیک به داخل سلول نقش دارند (۱، ۲، ۸). مکانیسمی که تحت آن V-ATPase انتقال پروتون وابسته به ATP را انجام می دهد، احتمالاً به این شکل است که هیدرولیز ATP باعث چرخش ساب یونیت مرکزی  $\gamma$  درون هگزامر  $\alpha 3\beta 3$  می شود و انرژی ایجاد شده تحت این فرآیند به  $V_0$  منتقل می شود که منجر به انتقال پروتون می شود (۲۱-۱۹، ۳).

در بررسی حاضر، سه گروه کشت قارچی مورد پژوهش قرار گرفتند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که هیچ دارویی روی آن ها اثر داده نشده بود و دو گروه دیگر به ترتیب تحت اثر ۱۰ و ۵ میکروگرم در میلی لیتر داروی گریزئوفولوین قرار گرفته بودند. پس از استخراج RNA در سه نمونه به منظور انجام RT-PCR، ابتدا cDNA برای هر سه نمونه ساخته شد و پس از گرفتن باند مورد نظر در الکتروفورز، OD های سه نمونه در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شدند تا میزان cDNA لازم در سه نمونه به دست آید. سپس دوباره RT-PCR با مقادیر جدید cDNA برای سه نمونه انجام شد تا میزان بیان زیر واحد G ژن ATPase تحت اثر دارو بررسی شود. در این مطالعه، در غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر بیان ژن زیر واحد G در ATPase افزایش یافت و سپس با افزایش میزان غلظت به ۱۰

**REFERENCES**

1. Forgac M. Function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)ATPase. FEBS Letters 1998;440:258-63.
2. Inoue T, Forgac M. Cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V<sub>1</sub> domain and subunit-a of the V<sub>0</sub> Domain. J Biol Chem 2005;280(30): 27896-903.
3. Fethiere J, Vezke D, Diepholz M. Building the stator of the yeast vacuolar-ATPase specific interaction between subunits E and G. J Biol Chem 2004;279(39): 40670-76.
4. Forgac M. Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. J Biol Chem 1999;274(19):12951-54.
5. Wilkens S, Forgac M. Three-dimensional structure of vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy. J Biol Chem 2001;276(47):44064-68.
6. Leng XH, Manolson M, Liu Q. Site-directed mutagenesis of the 100-kDa subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. J Biol Chem 1996;271:22487-93.
7. Kawasaki-Nishi S, Bowers K, Nishi T. The Amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. J Biol Chem 2001;276(50):47411-20.
8. Stevens TH, Forgac M. Function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. Ann Rev Cell Dev Biol 1997;13:799-808.
9. Mahon R, Manuselis G. Textbook of diagnosis microbiology. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
10. Collier L. Microbiology and microbial infections. 9<sup>th</sup> edition. London: Arnold;1998.
11. Develoux M. Griseofulvin. Ann Dermatol Venereol 2001;128(12):1317-25.
12. Rippon J. Medical Mycology. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders; 1998.
13. Li RY, Li DM, Yu J. Application of molecular biology techniques in the identification of pathogenic fungi and the diagnosis of fungal infection. Beijing Da Xue Xue Bao 2004;36(5):536-39.
14. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T. Forty-eight hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. J Clin Microbiol 2006;4: 1419-27.
15. Wang L, Ma L, Leng W. Analysis of part of the trichophyton rubrum ESTs. Sci China C Life Sci 2004;47(5):389-95.
16. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A. Species-identification of dermatophytes trichophyton, microsporum and epidermophyton by PCR and PCR-RFLP targetting of the DNA topoisomerase II genes. J Dermatol Sci 2003;33(1):41-54.
17. Jackson CJ. Molecular identification and starin typing of dermatophyte. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2001;42(1):7-10.
18. Kano R, Okabayashi K, Nakamura Y. Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. Med Mycol 2000;38(1):47-50.
19. Cross RL, Duncan TM. Subunit rotation in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthases as a means of coupling proton transport through F<sub>0</sub> to the binding changes in F<sub>1</sub>. J Bioener Biomemb 1996;28:403-408.
20. Vik SB, Antonio BJ. A mechanism of proton translocation by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. J Biolog Chem 1996;271:22487-93.
21. Wilkens S, Capaldi RA. ATP synthase's second stalk comes into focus. Nature 1998;393:29.
22. Chadeganipour M, Nilipouer S, Havaei A. In vitro evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. Mycoses 2004;47:503-507.
23. Sumana MN, Rajagopal V. A study of dermatophytes and their in vitro antifungal sensitivity. Indian Pathol Microbiol 2002;45(2):169-72.
24. Cervelatti EP, Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen trichophyton rubrum. Med Mycol 2006;44(2):141-47.
25. Gupta AK, Shear NH. A risk-benefit assessment of the newer oral antifungal agemts used to treat onychomycosis. Drug Saf 2000;229(1):33-52.
26. Mohrenschlager M, Korting HC, Seidi HP. Tinea capitis, therapeutic options in the post-griseofulvin era. Hautarzt 2002;53(12):788-94.