

Review Article

A Review of Clostridial Toxins Involved in Enterotoxemia

Aisan Heyrani¹, Ramin Bagheri Nejad³, Maedeh Samianifard², Khosro Khalifeh¹,
Ali Nazari^{2*}

1. Department of Biology, Faculty of Science, Zanjan University, Zanjan, Iran.

2. Research and Development Department, Purification Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

3. Anaerobic Vaccine Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received: 2025.01.07

Accepted: 2025.03.13

Revised: 2025.03.09

Published: 2025.12.22

* Email: anshirvan@gmail.com

Abstract

Introduction: Enterotoxemia is an acute and often fatal intestinal disease that affects domesticated animals, including livestock, horses, and pigs. This disease typically results in rapid animal death shortly after bacterial multiplication and toxin production. The causative agent is *Clostridium perfringens*, and clinical signs vary significantly depending on the bacterial type involved. Initial diagnosis is often based on the sudden and unexpected death of animals. *Clostridium perfringens* produces six major toxins: alpha, beta, epsilon, iota, enterotoxin, and necrotic enteritis-like beta toxin. Based on the specific toxins produced, they are classified into seven types (A, B, C, D, E, F, G). According to published reports, enterotoxemia causes substantial economic losses in the livestock industry. Vaccination against this clostridial infection is an effective method of prevention and immunization of animals. **Objective:** To understand the characteristics and mechanisms of action of *Clostridium perfringens* toxins in order to inform the development of effective clostridial vaccines, considering the challenges in vaccine production. **Findings:** Research indicates that types A, B, C, D, and E are involved in enterotoxemia. Specifically, the primary toxins alpha, beta, epsilon, and iota contribute to the disease in various ways. Enterotoxin may also induce enterotoxemia. This review further explores the specific characteristics and mechanisms of each of these toxins. **Conclusion:** The findings of this study are highly relevant for veterinary medicine, providing valuable insights for the development and improvement of clostridial vaccines against enterotoxemia.

Key words: Enterotoxemia, *Clostridium perfringens*, toxin



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by Razi Vaccine & Serum Research Institute. This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

مروری بر توکسین‌های کلستریدیایی مؤثر در بیماری آنتروتوکسمی

آيسان حيراني^۱، رامين باقري نژاد^۲، مائده سميعاني فرد^۳، خسرو خليفه^۱، علي نظري^{۳*}

۱ دانشکده علوم بخش زیست‌شناسی، دانشگاه زنجان، ایران.

۲ بخش تحقیق و توسعه، آزمایشگاه تخلیص، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

۳ بخش تولید واکسن‌های بی‌هوازی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.



تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۱۹

* Email: anshirvan@gmail.com

چکیده

مقدمه: آنتروتوکسمی یکی از بیماری‌های مزمن و کشنده روده‌ای است که گونه‌های اهلی حیوانات مانند دام، کره اسب و خوک‌ها را مبتلا می‌سازد. این بیماری به‌طور معمول در زمان کوتاهی پس از تکثیر باکتری و تولید توکسین باعث مرگ حیوان می‌شود. عامل این بیماری باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس است و علائم بالینی آن براساس تیپ باکتری دخیل متفاوت است. تشخیص اولیه این بیماری با توجه به سیر سریع بیماری و مرگ ناگهانی در حیوانات است. باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس شامل شش توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون، یوتا، آنتروتوکسین و بتا شبه‌آنتریت نکروتیک است و براساس اینکه کدام توکسین‌ها را تولید می‌کند به هفت تیپ مختلف (A, B, C, D, E, F, G) طبقه‌بندی می‌شود. با توجه به گزارش‌های جمع‌آوری‌شده این بیماری باعث خسارات فراوانی در صنایع دامداری می‌شود که واکسیناسیون علیه این عفونت کلستریدیایی روشی مؤثر در پیشگیری از ابتلا و ایمن‌سازی حیوانات است.

هدف: با توجه به چالش‌های موجود در تولید واکسن علیه این بیماری، هدف از این مطالعه شناخت ویژگی‌ها و مکانیسم عمل این توکسین‌ها به‌منظور به‌کارگیری مؤثر آن‌ها در واکسن‌های کلستریدیایی است.

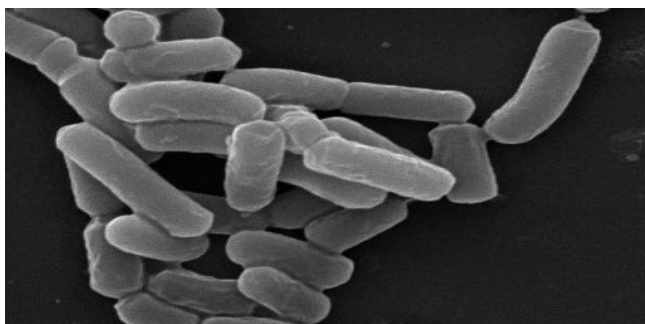
یافته‌ها: طبق پژوهش‌های صورت‌گرفته پنج تیپ A, B, C, D, E در بیماری آنتروتوکسمی نقش دارند، یعنی توکسین‌های اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا هر یک به‌نحوی در این بیماری نقش دارند، همچنین آنتروتوکسین نیز می‌تواند باعث القای این بیماری شود که در مقاله به بررسی ویژگی‌های آن‌ها پرداخته‌ایم.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه در حوزه دامپزشکی به‌منظور تهیه و توسعه واکسن‌های کلستریدیایی علیه بیماری آنتروتوکسمی بسیار مهم است.

واژگان کلیدی: آنتروتوکسمی، کلستریدیوم پرفرنجنس، توکسین

مقدمه

(۴، ۷). کلستریدیوم پرفرنجنس به‌رغم بی‌هوازی بودن می‌تواند وجود مقدار کمی اکسیژن را تحمل کند (۸). همچنین توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد که به آن مقاومت بیشتری در برابر عوامل ضد میکروبی و سیستم ایمنی می‌دهد (۹).



شکل ۱. تصویر تهیه‌شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی که باکتری

کلستریدیوم پرفرنجنس را نشان می‌دهد (۱۰).

این باکتری به‌طور گسترده در خاک، آب، هوا، غذا، مدفوع و روده انسان و حیوانات یافت می‌شود و همچنین بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش است (۸). کلستریدیوم پرفرنجنس عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها است (جدول ۱)، که می‌تواند به‌سرعت به مرگ منجر شود (۱۱). اندازه سلولی آن با طول $1/3 \mu m$ تا $19/0 \mu m$ و عرض $0/6 \mu m$ تا $2/4 \mu m$ است که به‌صورت تکی یا جفت دیده می‌شود (۷)،

به بیماری‌های کلستریدیایی که منشأ آن‌ها روده است، معمولاً آنروتوکسمی می‌گویند، این بیماری به‌وسیله توکسین‌های تولیدشده در روده و جذب آن‌ها در خون ایجاد می‌شود که متعاقباً بر اندام‌های مختلف هدف در بدن مانند مغز و ریه‌ها تأثیر می‌گذارند (۱). آنروتوکسمی کلستریدیایی یکی از بیماری‌های حاد و کشنده است که به‌دنبال پرخوری، تغییر جیره غذایی یا استفاده بیش از حد از غلات در گوسفند، بره، گوساله، خوک و گاه کره اسب‌ها ایجاد می‌شود (۲، ۳) و عامل اصلی این بیماری باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس (*Clostridium perfringens*) است (۴)، این بیماری واگیردار نیست و وجود کلستریدیوم پرفرنجنس در روده، به معنای ابتلا به بیماری نیست و فقط زمانی که شرایط رشد سریع در روده فراهم شود، می‌تواند موجب بیماری‌های کشنده شود، همچنین انواع آنروتوکسمی ناشی از این باکتری از نظر بالینی و آسیب‌شناسی براساس تیپ باکتری و توکسین‌های خاص تولیدشده توسط آن متفاوت است (۵).

باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در گروه باسیل‌های گرم‌مثبت، بی‌هوازی، هاگ‌زا و کپسول دار قرار دارد (شکل ۱) و فاقد تاژک است، اما توانایی سر خوردن با واسطه پیلی نوع IV را دارد (۶). این باکتری آنزیم کاتالاز و توانایی تجزیه پراکسید هیدروژن را ندارد

جدول ۱- بیماری‌های حیوانی ناشی از تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس (۷، ۹)

تیپ	بیماری
A	آنروتوکسمی بی‌هوازی (حیوانات مختلف)، انتریت نکروتیک (پرندگان)، گاستروانتریت هموراژیک (اسب، سگ)، کلستریدیوزیس روده‌ای (اسب)، اتساع حاد معده (حیوانات مختلف)، انتریت (حیوانات مختلف)
B	آنروتوکسمی (گوسفند، بز)، انتریت نکروتیک (گاو، اسب)، اسهال خونی (بره)
C	انتریت نکروهموراژیک (Necrohemorrhagic enteritis) (خوک، بره، گاو، اسب، انسان)، آنروتوکسمی (بره، خوک)، استراک (struck) (گوسفند)، انتریت فیبرینونکروتیک (Fibrinonecrotic enteritis) (پرندگان)
D	آنروتوکسمی (گوسفند، گاو، گوساله، بره)، کلیه پالپی (Pulpy kidney disease) یا قلوۀ نرمی (بره، گوسفند)، انتریت کولین (Enterocolitis) (بز)
E	انتریت هموراژیک (Hemorrhagic enteritis) و آنروتوکسمی هموراژیک (گوساله، بره، خرگوش)، اسهال خونی (بره)
F	مسمومیت غذایی انسان، اسهال‌های ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک
G	انتریت نکروتیک پرندگان

جدول ۲- توکسین‌های اصلی کلستریدیوم پرفرنجنس (۱۳)

تیپ	آلفا	بتا	اپسیلون	یوتا	انتروتوکسین	بتا شبه‌آنتریت نکروتیک
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

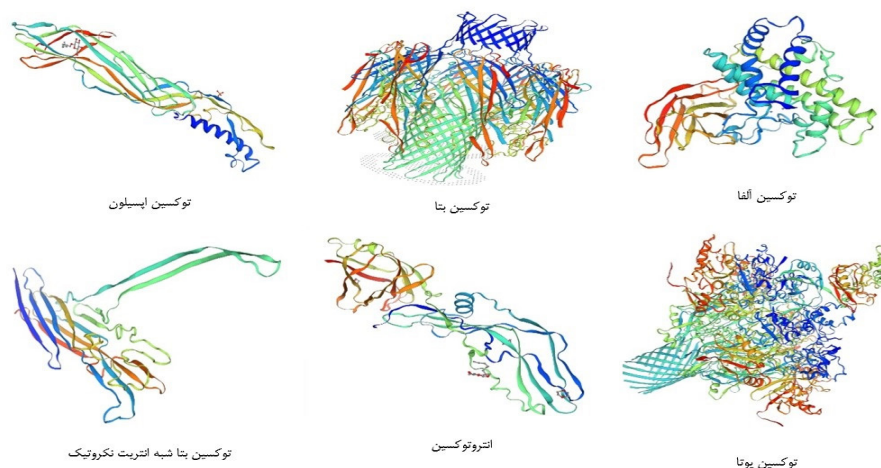
ETX: Epsilon toxin)، اپسیلون (*Clostridium perfringens* Beta toxin)، یوتا (ITX: Iota toxin)، انتروتوکسین (*Clostridium* CPE: Clostridium toxin)، و توکسین بتا شبه‌آنتریت نکروتیک (*perfringens enterotoxin*) (NetB: Necrotic Enteritis B-Like Toxin) هستند (۱۱) (شکل ۲). و سایر توکسین‌های تولیدشده توسط کلستریدیوم پرفرنجنس عبارت‌اند از: لامبدا (Lambda)، کاپا (Kappa)، مو (Mu)، نو (Nu)، تتا یا پرفرینگولیزین O (Perfringolysin O) و بتا ۲ (Beta2 toxin) (۳، ۵، ۱۴).

بیشتر توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنجنس در پلاسמידهای بزرگی با اندازه ۴۵ تا ۱۴۰ کیلوباز که به سه خانواده اصلی پلاسמידهای شبه pCW3، شبه pCP13 و شبه pIP404 تعلق دارند، کدگذاری می‌شوند (۶، ۱۵). همچنین هریک از توکسین‌ها ویژگی‌هایی دارند که در (جدول ۳) به برخی از آن‌ها اشاره شده است.

۱۲). کلستریدیوم پرفرنجنس به‌عنوان اولین باکتری گرم‌مثبتی شناخته می‌شود که نقشه کامل ژنوم آن تهیه شده است و اندازه ژنوم آن ۳ تا ۳/۷ مگاباز بوده و درصد گوانین و سیتوزین در DNA آن بین ۲۴% تا ۲۷% است و به‌عنوان سریع‌ترین ارگانیسم در حال تکثیر شناخته می‌شود (۷). یکی از ویژگی‌های پراهمیت این باکتری تولید هاگ در شرایط نامساعد محیطی است، این هاگ‌ها از نظر متابولیکی غیرفعال‌اند و می‌توانند برای مدت طولانی زنده بمانند و با مساعد شدن شرایط محیطی، جوانه بزنند (۸).

این باکتری بیش از ۱۶ نوع توکسین تولید می‌کند (۵)، و در حال حاضر براساس توانایی آن در تولید توکسین‌های مختلف به هفت تیپ (A-G) طبقه‌بندی شده است (۱۳) (جدول ۲).

توکسین‌های تولیدشده توسط این باکتری شامل توکسین‌های آلفا (CPA: *Clostridium perfringens* Alpha-toxin)، بتا (CPB: *Clostridium perfringens* Beta-toxin)،



شکل ۲- ساختار سه‌بعدی توکسین‌های اصلی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس (ساختارهای توکسین‌ها در سایت swiss-model در دسترس‌اند).

جدول ۳- خصوصیات توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنجنس (۳، ۱۱، ۱۶)

توکسین	آلفا	بتا	اپسیلون	یوتا	انتریتوکسین	بتا شبه آنتریت نکروتیت
فعالیت	کشنده،	نکروز پوست، ادم،	کشنده، نکروز	کشنده،	کشنده،	نکروز دهنده
بیولوژیکی	نکروز دهنده، همولیتیک	آنتریتوکسیک، سیتوتوکسیک	پوست، ادم	نکروز دهنده	آنتریتوکسیک، اریتما	
جایگاه ژنی	کروموزوم	پلاسمید	پلاسمید	پلاسمید	کروموزوم یا پلاسمید	پلاسمید
ژن	Cpa یا plc	cpb	etx	iab و iap	cpe	netB
کدگذاری شده						
مکانیسم عمل	فسفولیپاز C	تشکیل دهنده منفذ	تشکیل دهنده منفذ	-ADP	تشکیل دهنده	تشکیل دهنده
				ریپوزیلاسیون	منفذ	منفذ

به مرور توکسین‌های کلستریدیایی مؤثر در بیماری آنتریتوکسمی می‌پردازیم.

توکسین آلفا

توکسین آلفا یک همولیزین قوی است (۱۸) که دارای وزن مولکولی ۴۳ kDa و از ۳۷۰ اسید آمینه تشکیل شده است (۳). دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها ۳ μg/kg است (۲۳) و توسط تمام انواع کلستریدیوم پرفرنجنس تولید می‌شود، اما در مقادیر بیشتر توسط تیپ A تولید می‌شود (۱۸). به‌طور کلی توکسین آلفا یک متالوآنزیم چندکاره وابسته به عنصر روی است که شامل فسفولیپاز و اسفنگومیلیناز است، که قادر به هیدرولیز لسیتین به فسفوریل کولین و دی گلیسرید است (۱۱، ۱۵). این توکسین با آنتریتوکسمی در بره‌ها، گاو، خوک، اسب و بز مرتبط است، ولی به‌خوبی مستند نشده است و هیچ شواهد واضحی مبنی بر اینکه توکسین آلفا باعث بیماری روده می‌شود، وجود ندارد (۱۵).

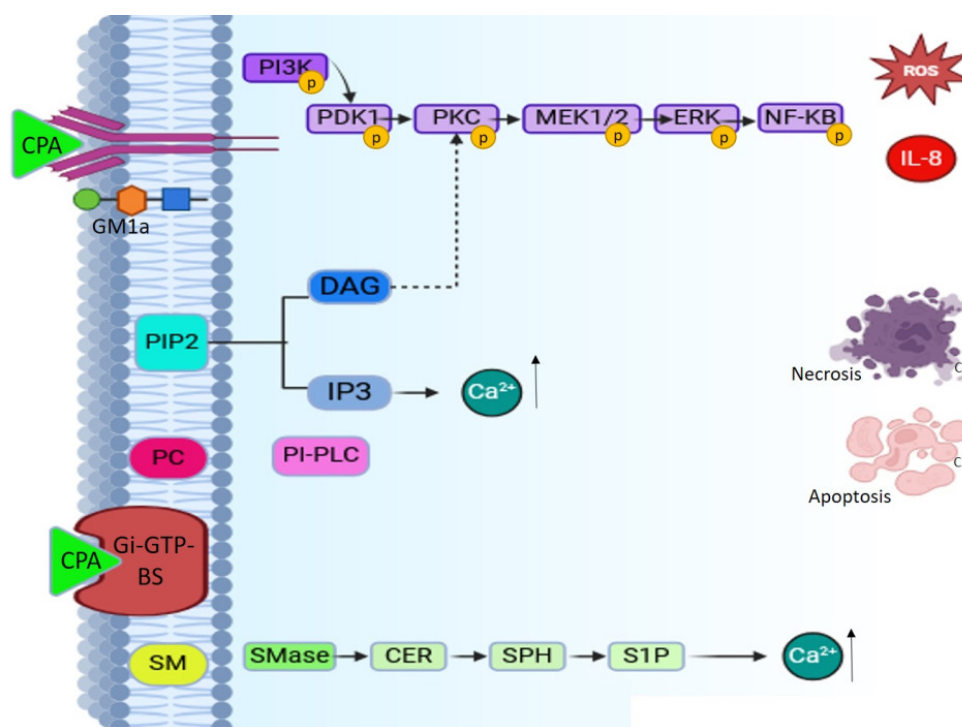
توکسین آلفا از سه دامنه تشکیل شده است:

- دامنه آمینی: این دامنه حاوی فعالیت کاتالیتیکی است که هیدرولیز فسفاتیدیل کولین و اسفنگومیلین را کاتالیز می‌کند (۲۴).

تشخیص کلستریدیوم پرفرنجنس براساس علائم بالینی و تغییرات پس از مرگ است (۱۷) و تشخیص قطعی آنتریتوکسمی مستلزم شناسایی توکسین‌ها در محتویات روده است که یکی از مشکلات اصلی در تشخیص، غیرفعال شدن احتمالی توکسین‌ها پس از مرگ حیوان است (۱۸). آنتریتوکسمی معمولاً درمان‌ناپذیر است، اما با استفاده از واکسیناسیون می‌توان با آن مقابله کرد (۱۹). واکسن‌های دامپزشکی که در بازار موجودند، معمولاً ترکیبی از چندین نوع آنتی‌ژن را شامل می‌شوند، باوجوداین، در حال حاضر هیچ واکسن تجاری‌ای وجود ندارد که بتواند از دام‌ها در برابر توکسین یوتا، آنتریتوکسین و توکسین بتا شبه آنتریت نکروتیک محافظت کند، اما می‌توان با استفاده از واکسن‌های توکسوئید یا باکتری-توکسوئید از شیوع تیپ‌های B، C و D پیشگیری کرد (۱۵). همچنین کارایی واکسیناسیون در نشخوارکنندگان کوچک و خوک بهتر از نشخوارکنندگان بزرگ است، و یکی از مسئله‌های اصلی در توسعه و پیشرفت واکسن‌های جدید، نبودن مدل تجربی دقیق و تکرارپذیر برای بیماری آنتریتوکسمی است (۲۰). طبق مطالعات انجام‌شده بسیاری از متخصصان معتقدند که فناوری آنتی‌ژن‌های نو ترکیب می‌تواند راهکار مؤثری برای بهبود کیفیت واکسن‌ها و غلبه بر مشکلات موجود در تولید واکسن‌ها باشد (۲۱، ۲۲). در این مطالعه

(4,5-biphosphate) و تولید دی‌آسیل گلیسرول (DAG: diacylglycerol) و اینوزیتول تری‌فسفات (IP3: Inositol 1,4,5-phosphate) منجر شود که در نهایت باعث افزایش کلسیم درون سلولی می‌شود، همچنین عمل اسفنگو میلینازها نیز به تشکیل سرامید (CER: ceramide)، اسفنگوزین (SPH: sphingosine) و اسفنگوزین-۱-فسفات (S1P: sphingosine 1-phosphate) منجر می‌شود (۲۸). این محصولات ثانویه تنظیم‌کننده فعالیت‌های سلولی هستند و باعث تجمع یون‌های کلسیم داخل سلولی (iCa^{2+}) می‌شوند که می‌توانند در آپوپتوز و نکروز نقش داشته باشند. علاوه بر این، همان‌طور که اشاره شد، توکسین آلفا با گیرنده تروپومیوزین کیناز A تعامل دارد و می‌تواند گیرنده تروپومیوزین کیناز (A TrkA: Tropomyosin receptor kinase A) را فعال کند، به این صورت که فسفریلاسیون فسفوانیزیتیدتری کیناز (PI3K: Phosphoinositide 3-kinase) از طریق گیرنده تروپومیوزین کیناز A به فسفریلاسیون و فعال‌سازی کیناز وابسته به فسفوانیزیتید ۱ (PDK-1: Phosphoinositide dependent kinase 1)، پروتئین کیناز C (C PKC: protein kinase C)، کیناز فعال‌کننده MAPK (MEK1/2: extracellular signal regulated kinase)، و فاکتور رونویسی (Nuclear NF-kB factor kappa light chain enhancer of activated B cells) منجر می‌شود، که این مسیرهای سیگنالینگ در تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS: Reactive oxygen species) و اینترلوکین ۸ (IL-8: interleukin-8) دخیل‌اند و می‌توانند التهاب و آسیب بافتی را افزایش دهند. غلظت بیشتر توکسین آلفا باعث آسیب غشا و لیز سلولی می‌شود و به نکروز می‌انجامد و غلظت‌های کمتر توکسین آلفا از طریق مکانیسم‌های MEK/ERK و با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آپوپتوز را القا می‌کند و همچنین می‌تواند به لیزوزوم‌ها آسیب برساند و به آزاد شدن پروتئازهای لیزوزومی درگیر در آپوپتوز منجر شود (شکل ۲). اثرات توکسین آلفا بسته به نوع سلول درگیر به دلیل تفاوت در ترکیب غشا، مسیرهای سیگنالینگ و غلظت توکسین متفاوت است (۲۵، ۲۸، ۲۹). شکل ۳ شرحی تصویری بر عملکرد آلفا توکسین بر روی سلول را نشان می‌دهد.

- دامنه کربوکسیلی: این دامنه مسئول اتصال توکسین به غشای سلول هدف در حضور یون‌های کلسیم است که تعامل توکسین را با غشای هدف تسهیل می‌کند، همچنین ناحیه‌ای برای ایجاد پاسخ ایمنی علیه توکسین به شمار می‌رود (۲۵).
 - دامنه L: بین دو دامنه آمینی و کربوکسیلی، یک دامنه حلقه مرکزی وجود دارد که به گانگلیوزید GM1a متصل می‌شود که جزء غشای سلول میزبان است، به این صورت که اتصال توکسین آلفا به GM1a باعث تجمع این گانگلیوزید در غشای سلولی می‌شود و ممکن است در تمایل توکسین به انواع خاصی از سلول‌ها نقش داشته باشد (۲۴، ۲۵).
- برای ساخت واکسن علیه توکسین آلفا می‌توان با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، هریک از دامنه‌های انتهایی آمینی یا کربوکسیلی را جداگانه در باکتری /شریشیا کلی تولید کرد، این دامنه‌ها به تنهایی سمی نیستند، اما وقتی به بدن حیوانی مانند موش تزریق می‌شوند، سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند و باعث تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌شوند که علیه توکسین آلفا عمل می‌کنند، مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌هایی که برای محافظت در برابر توکسین علیه دامنه انتهایی کربوکسیلی تولید می‌شوند، موثرتر از آنتی‌بادی‌هایی هستند که علیه دامنه انتهایی آمینی تولید می‌شوند، این به این دلیل است که دامنه انتهایی کربوکسیلی برای ورود توکسین به سلول ضروری است. همچنین برای تولید واکسن می‌توان از کل توکسین استفاده کرد و با ایجاد تغییرات جزئی آن را به گونه‌ای تغییر داد که سمیت خود را از دست بدهد، اما همچنان بتواند سیستم ایمنی را تحریک کند، این واکسن‌ها ایمنی درازمدت در برابر بیماری ایجاد می‌کنند (۲۶).
- توکسین آلفا به‌طور مستقیم فسفاتیدیل کولین (PC) و اسفنگومیلین (SM) را در غشای پلاسمایی هیدرولیز می‌کند (۲۵)، همچنین می‌تواند به‌طور غیرمستقیم آنزیم‌های میزبان با فعالیت‌های فسفولیپاز و اسفنگومیلیناز مشابه را از طریق تعامل با پروتئین‌های اتصال‌دهنده GTP تیپ Gi (Gi-type GTP-binding protein) که از خانواده G پروتئین‌ها هستند، فعال کند (۲۷) و باعث فعال شدن فسفولیپازهای اندوژن (PI-PLC: phosphatidylinositol phospholipase C) و اسفنگو میلینازها (SMase: sphingomyelinase) شود. فعال‌سازی فسفولیپاز C ناشی از توکسین آلفا می‌تواند به هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ بی‌فسفات (PIP2: phosphatidylinositol



شکل ۳- مسیرهای داخل سلولی درگیر در عملکرد توکسین آلفا (CPA) را نشان می‌دهد که توکسین آلفا به‌طور مستقیم از طریق هیدرولیز اسفنگومیلین‌ها (SM) و فسفاتیدیل کولین‌ها (CP) و به‌طور غیر مستقیم با فعال‌سازی پروتئین‌های Gi-GTP-BPs باعث فعال‌سازی فسفولیپاز و اسفنگومیلینازهای داخل سلولی می‌شوند و فعالیت آن‌ها نیز موجب تولید محصولات ثانویه و فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ می‌شوند، علاوه‌براین، توکسین آلفا با گیرنده ترومپوموزین کیناز A (TrkA) باعث فعال‌سازی مسیرهای MEK/ERK و فاکتور NF-kB و در نهایت باعث تولید اکسیژن فعال (ROS) و اینترلوکین ۸ (IL-8) می‌شود (۲۵، ۲۸).

می‌کند (۳، ۳۰). دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها ۴۰۰ kg/ng است (۲۳). توالی اسیدآمینه این توکسین همسانی قابل توجهی با توکسین دلتا و توکسین‌های تشکیل‌دهنده منافذ بتا (β-PFTs) استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد (۳۰).

توکسین بتا به تریپسین حساس است (۱۵) و به همین دلیل بیشتر در نوزادان بیماری‌زاست، چون آغوز خاصیت ضد تریپسینی دارد (۲) و وجود مهارکننده‌های تریپسین در روده موجب تداوم توکسین بتا و در نتیجه آسیب به اپیتلیوم روده می‌شود (۳۰). برای تولید واکسن علیه توکسین بتا می‌توان با ایجاد جهش‌های نقطه‌ای تغییرات کوچکی در ساختار ژنتیکی توکسین ایجاد کرد تا سمیت آن کاهش یابد یا طبق مطالعات انجام شده می‌توان با بیان کل توکسین بتا در باکتری /شریشیا کلی یا با بیان دامنه انتهای کربوکسیلی آن به تولید واکسن پرداخت، به این دلیل که دامنه انتهای کربوکسیلی این توکسین نقش مهمی در اتصال توکسین به سلول میزبان دارد و حاوی اپی‌توپ‌های

توکسین بتا

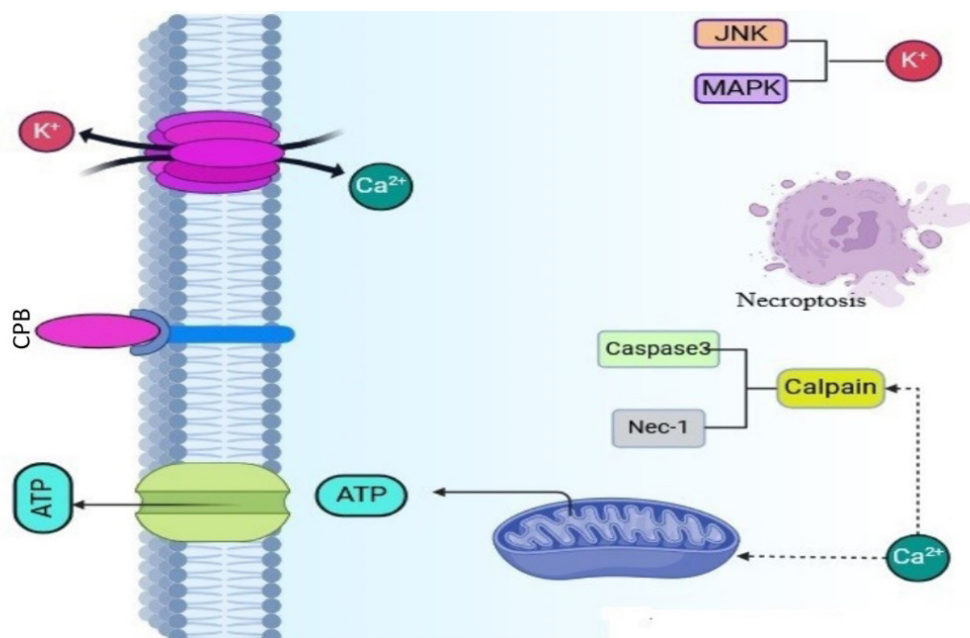
توکسین بتا توسط سویه‌های تیپ B و C از کلستریدیوم پرفرنجنس تولید می‌شود و ژن (cpb) کدکننده توکسین بتا است که روی پلاسمیدهای بدخیم قرار دارد (۱۱) و این پلاسمیدها ممکن است حاوی ژن‌های توکسین‌های دیگری مانند آنتریتوکسین یا توکسین بزرگ کلستریدیوم پرفرنجنس (TpeL: toxin perfringens Large) باشند، همچنین بتا یک توکسین قوی است که می‌تواند آسیب قابل توجهی به اپیتلیوم روده و عروق کوچک وارد کند (۲۴). این توکسین ابتدا به‌عنوان پروتوتوکسین با ۳۳۶ اسیدآمینه و وزن مولکولی kDa ۳۷ ترشح می‌شود و در طول ترشح پس از حذف توالی سیگنال که دارای ۲۷ اسیدآمینه است به شکل فعال خود با وزن مولکولی تقریباً ۳۵ kDa تبدیل می‌شود (۳) و منافذی با وزن مولکولی ۲۲۸ kDa و قطر ۱۲ Å، در دامنه‌های کوچک لیپیدی متشکل از فسفاتیدیل کولین و کلسترول در غشای پلاسمایی سلول‌های حساس ایجاد

سطح پتاسیم درون سلولی (K^+) با فعال شدن MAPK (Mitogen activated protein kinase) و JNK (C-Jun N-terminal kinase) مرتبط است (شکل ۴) که این دو در بقای سلول میزبان و مسیرهای دفاعی نقش دارند (۲۴). درحالی که توکسین بتا نقش مهمی در پاتوژنز کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ C ایفا می کند، نقش آن در پاتوژنز تیپ B به خوبی درک نشده و شواهد نشان می دهد که کشندگی ناشی از اثرات ترکیبی توکسین بتا و توکسین اپسیلون است (۱۵). در سطح سلولی، توکسین بتا باعث نکروز و خونریزی در روده کوچک و بزرگ می شود (۱۱) و همچنین گزارش شده که توکسین بتا مسئول آنروتوکسمی در موش است (۳۲).

توکسین اپسیلون

توکسین اپسیلون توسط سویه های تیپ B و D کلاستریدیوم پرفرنجنس تولید می شود و مسئول ایجاد بیماری آنروتوکسمی سریع و مرگبار در دام ها است (۳۳، ۳۴). اپسیلون توکسین اصلی کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ D است که به این بیماری منجر می شود (۳۵). این توکسین حاوی ۲۹۶ اسید آمینه (۳۶) و دارای وزن مولکولی kDa

مهمی برای تولید آنتی بادی های محافظتی است، همچنین می توان با استفاده از آنتی ژن های کایمیریک که از ترکیب توکسین بتا با سایر توکسین های باکتریایی یا بخش هایی از آن ها به دست می آیند باعث افزایش ایمنی زایی و پایداری واکسن شد (۲۱). توکسین بتا به گیرنده لیگاندی P2X7 همراه با آدنوزین تری فسفات (ATP) متصل می شود. این اتصال به آزاد شدن آدنوزین تری فسفات از سلول از طریق کانال پانکسین ۱ (Pannexin1) منجر می شود، این آزادسازی با لیز سلولی مرتبط نیست، ولی موجب تحریک بیشتر اتصال توکسین بتا و افزایش سطح کلسیم داخل سلولی (Ca^{2+}) و سمیت سلولی می شود (۳۱). افزایش Ca^{2+} با فعال شدن کالپین ها (calpain) که خانواده ای از پروتئازهای سیستمی هستند باعث نکروپتوز (Necroptosis) می شود. همچنین فعال سازی کاسپاز ۳- نیز با کالپین ها مرتبط است، اما میزان فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ کم است و چون این آنزیم یکی از آنزیم های کلیدی در آپوپتوز است، بنابراین آپوپتوز نقش مهمی در این فرایند ندارد (۲۹). علاوه بر این، در این مسیر مهارکننده ۱-Nec (Necrostatin-1) از افزایش کلسیم Ca^{2+} و فعال شدن کالپین و مسیر نکروز جلوگیری می کند. کاهش



شکل ۴- مسیرهای داخل سلولی درگیر در عملکرد توکسین بتا (CPB) را نشان می دهد که اتصال توکسین بتا به گیرنده $p2x7$ باعث افزایش انتشار آدنوزین تری فسفات (ATP) از کانال پانکسین ۱ می شود که خود محرک افزایش تشکیل فرم الیگومری و تشکیل منافذ است، این منافذ باعث افزایش یون کلسیم و نکروپتوز می شوند و با کاهش پتاسیم که با فعال سازی MAPK و JNK همراه است که به فعال سازی مسیرهای دفاعی سلول میزبان منجر می شوند (۲۹، ۳۱).

۳۲/۹ است (۳۷)، و دوز کشنده آن (LD50) در موش‌ها ۱۰۰ ng/kg است (۲۳). سویه‌های تیپ D دارای حداقل پنج پلاسمید با اندازه ۴۸ تا ۱۱۰ کیلوباز و سویه‌های تیپ B دارای یک پلاسمید با اندازه ۶۵ کیلوباز حاوی توکسین اپسیلون هستند (۳۸). توکسین اپسیلون متعلق به خانواده توکسین‌های منفذساز آنرولیزین و از پروتئین‌های تشکیل‌دهنده منافذ بتا است و به‌عنوان سومین توکسین کلستریدیایی قوی شناخته می‌شود (۱۵، ۳۹) و شامل سه دامنه در ساختار پروتئینی خود است (۳۹)، دامنه اول آن مسئول برهم‌کنش با گیرنده سلول میزبان است، دامنه دوم تعامل توکسین با گیرنده آن را تثبیت و هپتامریزاسیون را آغاز می‌کند و دامنه سوم مسئول برهم‌کنش بین مونومرها برای تشکیل منافذ بر روی غشای سلول میزبان است (۴۰). همچنین تنوع ساختاری بیشتری بین دامنه‌های انتهایی آمینی توکسین اپسیلون نسبت به دامنه‌های انتهایی کربوکسیلی آن وجود دارد (۳۷). توکسین اپسیلون یک پروتوکسین کمی سمی است که برای فعال شدن به آنزیم‌های پروتئولیتیک نیاز دارد (۱۸) و عملکرد آن به این صورت است که این توکسین ابتدا به‌عنوان یک پروتوکسین نسبتاً غیرفعال ترشح می‌شود و توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک از جمله پروتئازهای گوارشی مانند تریپسین یا کیموتریپسین به یک توکسین قوی و مقاوم در برابر حرارت تبدیل می‌شود. همچنین پروتئاز لامبدا که خود باکتری آن را تولید می‌کند نیز ممکن است در برخی سویه‌ها توکسین اپسیلون را فعال کند. در فرایند فعال‌سازی پروپیتیدهای N و C ترمینال را آزاد می‌کند و به از دست دادن ۱۳ اسیدآمینه از انتهای آمینی و ۲۹ اسیدآمینه از انتهای کربوکسیلی منجر می‌شود و سمیت توکسین را تا ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌دهد. محل‌های اثر متفاوتی برای اثر پروتئازها وجود دارد که هر کدام می‌توانند در محل خاصی بر توکسین اثر کنند و به همین دلیل است که توکسین فعال‌شده ممکن است در چندین ایزوفرم وجود داشته باشد (۳۶، ۳۷، ۳۹). در نهایت توکسین فعال‌شده بسیار سمی است و می‌تواند اثرات کشنده داشته باشد (۳۴) و وزن مولکولی آن حدود ۲۷ kDa است (۲۱). به‌طور معمول آنتریتوکسمی ناشی از توکسین اپسیلون یا همان بیماری قلوه نرمی در بره‌های نوزاد مشاهده نمی‌شود، زیرا آغوز حاوی آنتی‌تریپسین است که مانع فعال شدن توکسین اپسیلون می‌شود (۲). توکسین اپسیلون خاصیت آنزیمی ندارد و قدرت آن ناشی از آسیب هدفمند به سلول‌های حامل گیرنده میلین و پروتئین‌های لنفوسیتی

است (۴۱). در این توکسین، پروتوتوکسین غیرفعال و توکسین فعال هر دو می‌توانند به سلول‌ها متصل شوند، اما فقط توکسین‌های فعال‌شده توانایی ایجاد پیش‌منفذ هپتامریک و منافذ را بر روی سطح غشای سلولی دارند (۴۲).

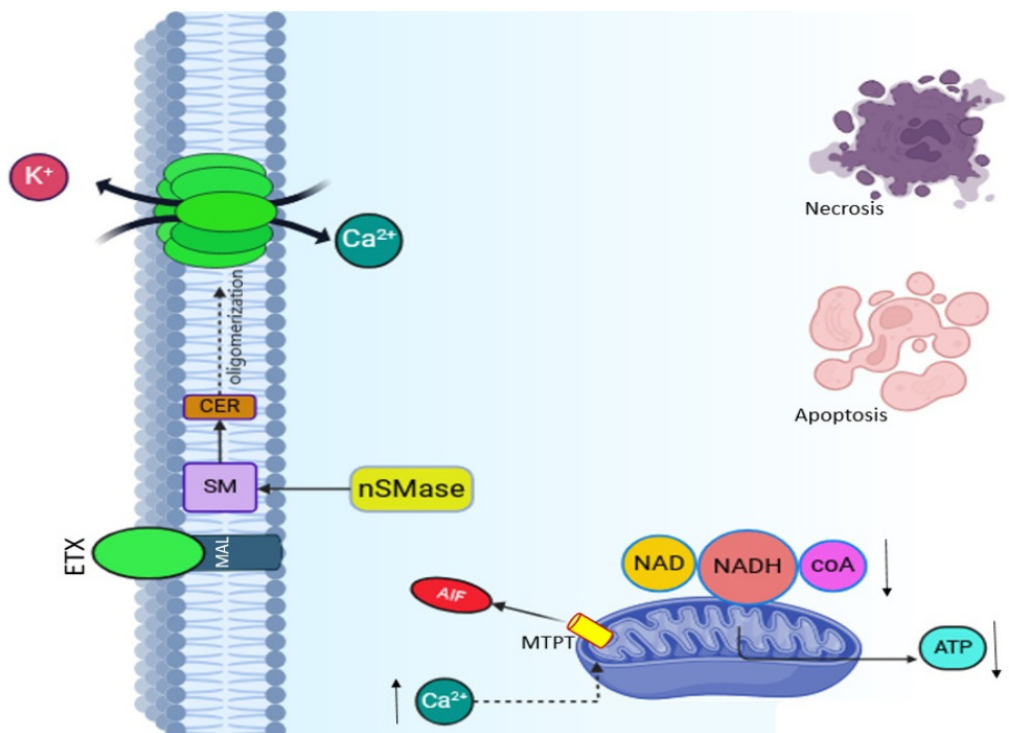
توکسین اپسیلون از نظر ساختاری به آنتریتوکسین کلستریدیوم پرفرنجنس و توکسین آلفای کلستریدیوم سپتیکوم شباهت دارد (۲). توکسین اپسیلون پروتئین پیچیده‌ای است که ساختار بسیار خاصی دارد، به همین دلیل نمی‌توان به‌راحتی از آن واکسن تولید کرد و طی پژوهش‌های صورت‌گرفته، پژوهشگران به این نتیجه رسیده‌اند که با استفاده از مهندسی ژنتیک و با ایجاد تغییرات کوچک و هدفمند در ساختار این توکسین، می‌توان آن را به یک واکسن ایمن تبدیل کرد و بدون از دست دادن خاصیت ایمنی‌زایی، سمیت آن را از بین برد (۲۶) و طبق همین مطالعات برای تولید واکسن علیه توکسین اپسیلون می‌توان با ایجاد جهش‌های نقطه‌ای تغییرات کوچکی در ساختار ژنتیکی توکسین ایجاد کرد تا سمیت آن کاهش یابد یا با استفاده از آنتی‌ژن‌های کایمیریک که از ترکیب توکسین اپسیلون با سایر توکسین‌های باکتریایی یا بخش‌هایی از آن‌ها به دست می‌آیند می‌توان باعث افزایش ایمنی‌زایی و پایداری در واکسن شد. همچنین استفاده از فرم پروتوکسین آن در واکسن می‌تواند باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی‌تر و طولانی‌مدت‌تری شود (۲۱).

عملکرد این توکسین به این صورت است که ابتدا به گیرنده‌های میلین و پروتئین‌های لنفوسیتی (MAL: Myelin and lymphocyte) در سطح سلول متصل می‌شود (۴۱)، این اتصال ممکن است اسفنگومیلیناز خنثی (nSMase) را فعال کند و باعث هیدرولیز اسفنگومیلین (SM) برای تولید سرامید (CER) شود؛ سرامید نقش مهمی در فرایندهای سلولی مختلف، از جمله آپوپتوز و سیگنال‌دهی سلولی دارد و می‌تواند تشکیل ساختار الیگومری توکسین اپسیلون را تسهیل کند، که الیگومریزاسیون به ایجاد منافذ هپتامری در غشای سلولی و از دست دادن سریع یون‌های پتاسیم داخل سلولی (iK^+)، ورود یون‌های کلرید (Cl^-) و یون‌های سدیم (Na^+) منجر می‌شود و هموستاز سلولی و سیگنال‌دهی را مختل می‌کنند و در نهایت به افزایش سطح کلسیم داخل سلولی (iCa^{2+}) می‌انجامد. افزایش iCa^{2+} می‌تواند اثرات مختلفی بر عملکرد سلول داشته باشد، از جمله فعال شدن آنزیم‌ها و مسیرهای سیگنالینگ، همچنین سلول‌های متأثر از

توکسین یوتا

توکسین یوتا که توسط دو ژن مجزا iap با ۱۱۶۰ نوکلئوتید و iab با ۲۶۳۰ نوکلئوتید روی پلاسمیدهای مزدوج بزرگ کدگذاری می‌شوند (۴۳، ۱۵) و در ایجاد بیماری آنتروتوکسمی در گوساله‌ها و بره‌ها نیز نقش دارند (۳۳). این توکسین توسط کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ E تولید و به افزایش نفوذپذیری مویرگی منجر می‌شود (۱۸). تاکنون، واکسن مؤثری برای پیشگیری از بیماری ناشی از کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ E تولید نشده است (۱۵). این توکسین از دو پلی‌پپتید مستقل تشکیل شده است: توکسین یوتا a که یک جزء آنزیمی با وزن مولکولی ۴۷/۵ و ۴۵۴ اسیدآمینه است و با انتقال آدنوزین دی فسفات (ADP) باعث فعال شدن توکسین می‌شود و دارای ۲ دامنه است که دامنه انتهایی آمینی، که مسئول برقراری ارتباط با بخش دیگر توکسین، یعنی بخش b است، و دامنه انتهایی کربوکسیلی C که مسئول فعالیت آنزیمی را دربرمی‌گیرد، به این معنا که این بخش مسئول اضافه کردن یک گروه ADP-ریبوز

توکسین اپسیلون، کوآنزیم‌های مهم مورد نیاز برای تولید انرژی مانند NADH, NAD⁺: Nicotinamide (adenine dinucleotide) و کوآنزیم A (CoA: coenzyme A) را از دست می‌دهند و این از دست دادن به تشکیل منافذ گذردهی انتقالی میتوکندریایی (MPTP: mitochondrial permeability transition pore) کمک می‌کند و باز شدن این منافذ می‌تواند به اختلال عملکرد میتوکندری و آپوپتوز منجر شود و انتقال فاکتور القاکننده آپوپتوز (AIF: Apoptosis inducing factor) از میتوکندری به هسته را تسهیل کند (شکل ۵). AIF یک عامل مرگ سلولی مستقل از کاسپاز است که می‌تواند آپوپتوز را القا کند. همچنین این توکسین می‌تواند با ایجاد اختلال در مسیر تولید انرژی سلول باعث کاهش ATP و نکروز سلولی شود (۲، ۴۱). در نتیجه مرگ سلولی ناشی از توکسین اپسیلون شامل ترکیبی از ویژگی‌های نکروز، اختلال عملکرد میتوکندری و فعال شدن مسیرهای آپوپتوز است (۲۴).



شکل ۵- مسیرهای داخل سلولی درگیر در عملکرد توکسین اپسیلون (ETX) را نشان می‌دهد که در آن توکسین اپسیلون ابتدا به گیرنده میلینی و پروتئین‌های لنفوسیتی (MAL) روی سطح سلول متصل می‌شود و می‌تواند به فعال‌سازی اسفنگومیلینازهای ختشی و تولید سرامید منجر شود، سپس توکسین‌های اپسیلون به صورت الیگومرهای تجمع کرده، منافذی را در غشای سلولی ایجاد می‌کنند، این منافذ باعث اختلال در تعادل یونی سلول می‌شوند و می‌توانند به اختلال در عملکرد سلولی و مرگ سلولی منجر شوند. همچنین فرایند آپوپتوز نیز از طریق انتقال فاکتور القای آپوپتوز (AIF) از میتوکندری به هسته سلول انجام می‌شود (۴۱، ۲۴).

فعالیت ریبوزیل‌کننده ADP خود را اعمال می‌کند. این فعالیت به دپلیمیرزاسیون اکتین منجر می‌شود، پروتئینی که در اسکلت سلولی دخیل است، و دپلیمیرزاسیون اکتین به تغییرات مورفولوژیکی می‌انجامد (شکل ۶)، (۴۸) و پایداری سیتوزولی Ia، احتمالاً از طریق اثرات آن بر دپلیمیرزاسیون اکتین، باعث فعال شدن تأخیری کاسپاز ۳ می‌شود که یک آنزیم کلیدی است که در آپوپتوز نقش دارد (۲۴).

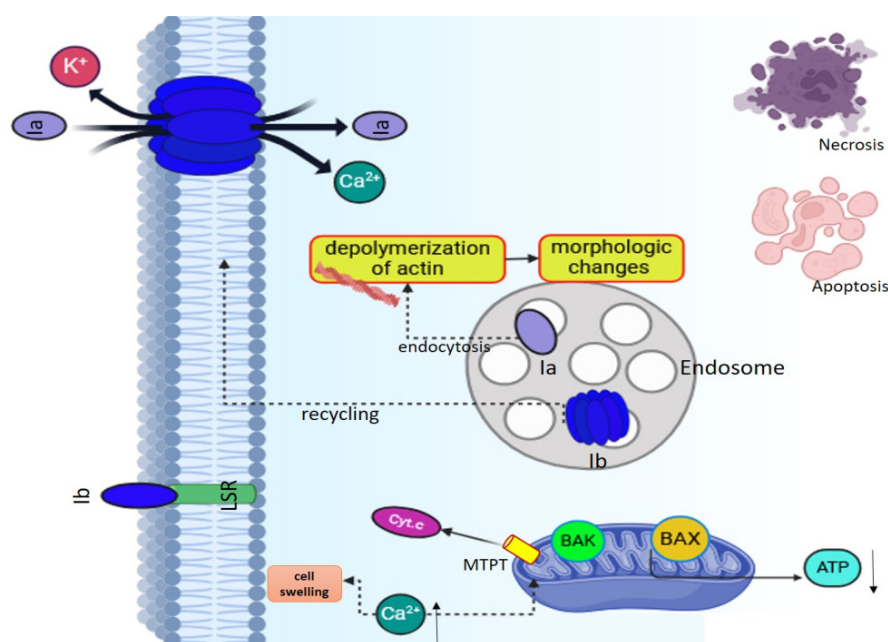
توکسین بتای شبه‌آنتریت نکروتیک

توکسین رایج دیگری که توسط کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ G تولید می‌شود، توکسین بتای شبه‌آنتریت نکروزه (NetB) است و توسط ژن netB (۲۴) بر روی پلاسمیدهای بزرگ و مزدوج کدگذاری می‌شود (۱۸). توکسین بتای شبه‌آنتریت نکروتیک یک توکسین بتای منفذساز با وزن مولکولی ۳۳ kDa و ۳۲۳ اسیدآمینه است (۱۲) و به توکسین بتا شباهت دارد (۴۵). این توکسین با فشار اسمزی و نکروز سلولی موجب لیز سلولی می‌شود و تحت عوامل خاصی به ایجاد آنتریت نکروتیک در پرندگان می‌انجامد (۴۹). مکانیسم اثر اولیه توکسین به این صورت است که در نخستین مرحله توکسین به گیرنده‌ای ناشناخته در سطح انتروسیت‌ها متصل می‌شود و پس از این اتصال، مولکول‌های این توکسین به ساختار هپتامری تبدیل می‌شوند و منافذی در غشای سلولی ایجاد می‌کنند. این منافذ دارای قطر تقریباً ۶۲ Å هستند و ورود یون‌هایی از جمله سدیم (Na^+)، کلرید (Cl^-) و کلسیم (Ca^{2+}) را امکان‌پذیر می‌کنند که باعث اختلال در تعادل یونی و تعادل اسمزی سلول و در نهایت موجب لیز سلول و آزاد شدن محتویات سلولی می‌شود (شکل ۷) (۲۴، ۴۵).

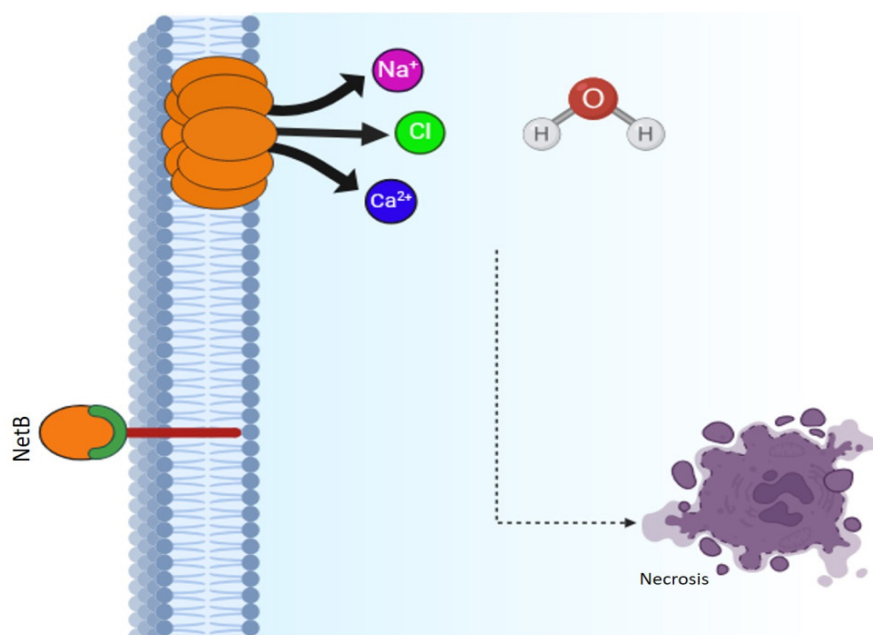
انتریتوکسین

در حال حاضر تحقیقات نشان می‌دهند که تنها یک اقلیت کوچک، کمتر از ۵٪ از گونه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس انتریتوکسین تولید می‌کنند که می‌تواند به ایجاد مسمومیت‌های غذایی منجر شود (۷). انتریتوکسین یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای با وزن مولکولی ۳۵/۵ kDa است (۴۵، ۱۵) و به عنوان یک توکسین منفذساز شناخته می‌شود و دارای یک گروه سولفیدریل آزاد است (۱۲) دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها ۱۴۰ ng/kg است (۲۳). این توکسین از ۳۱۹

به یک پروتئین خاص در سلول میزبان است، توکسین یوتا b: یک جزء اتصال‌دهنده با وزن مولکولی ۷۱/۵ و ۸۷۵ اسیدآمینه است که در اتصال و درونی‌سازی این توکسین به داخل سلول نقش دارد، به این صورت که ابتدا به صورت غیرفعال تولید می‌شود و برای فعال شدن نیاز به تغییراتی دارد که شامل برش پروتئینی توسط آنزیم‌هایی مانند تریپسین یا کیموتریپسین است، این برش باعث حذف یک قسمت کوچک از توکسین یوتا b می‌شود و شکل فعال آن را ایجاد می‌کند (۳، ۴۶-۴۴) و در ادامه بخش b به یک گیرنده سطحی روی سلول‌های هدف متصل و سپس هپتامریزه می‌شود و باعث تشکیل منفذ می‌شود و به جزء آنزیمی a اجازه می‌دهد تا به سیتوزول منتقل شود و به این ترتیب به مختل شدن اسکلت سلولی منجر می‌شود، این دو جزء توکسین یوتا از نظر ایمنی و بیوشیمیایی قابل تمایز از یکدیگرند، اما فعالیت آن‌ها به همدیگر کمک می‌کند تا اثرات سمی توکسین را ایجاد کنند (۴۴). دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها در توکسین یوتا a $620 \mu\text{g/kg}$ و در توکسین یوتا b $940 \mu\text{g/kg}$ است (۲۳). عملکرد آن به این صورت است که توکسین یوتا به گیرنده لیپوپروتئینی تحریک‌شده با لیپولیز LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor) روی سطح سلول متصل می‌شود که به عنوان یک گیرنده سلولی برای توکسین یوتا b شناسایی شده است. این اتصال باعث الیگومریزاسیون بخش b در قسمت لیپید رفت غشا به یک ساختار هپتامری می‌شود که به تشکیل منافذی در غشای سلولی منجر می‌شود که این منافذ امکان حرکت یون‌ها و جابه‌جایی بخش a را فراهم می‌کند. سمیت سلولی ناشی از توکسین یوتا، ویژگی‌های نکروز، از جمله کاهش ATP، افزایش نفوذپذیری سلولی و تورم سلولی را سبب می‌شود. همچنین فعال شدن پروتئین‌های Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) و Bax (Bcl-2 associated x protein) به آزاد شدن سیتوکروم C (Cytochrome c) از میتوکندری و اختلال عملکرد میتوکندری منجر (۲۹) و باعث افزایش فسفات معدنی (IP) و تورم سلول (۴۷) و القای آپوپتوز می‌شود. در ادامه هر دو بخش a و b از طریق یک مسیر وابسته به پروتئین‌های Rho به وزیکول‌های اندوسیتوزی و اندوزوم می‌رسند، سپس قسمت کوچکی از بخش b به غشای پلازما بازیافت و باعث جذب بیشتر Ia و انتقال آن از اندوزوم‌های دیررس به سیتوپلاسم می‌شود و هنگامی که Ia در سیتوپلاسم قرار گرفت،



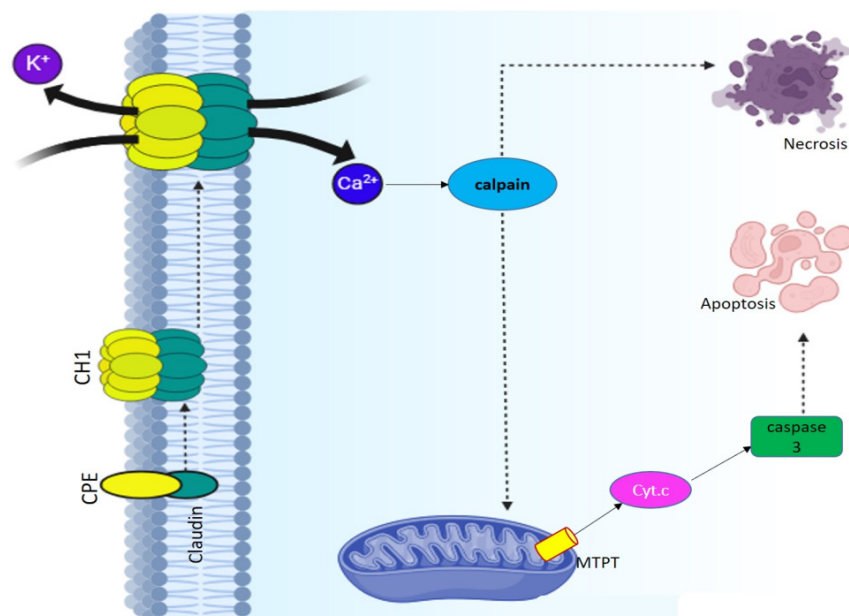
شکل ۶- مسیرهای داخل سلولی درگیر در عملکرد توکسین یوتا (ITX) را نشان می‌دهد که در آن جزء Ib توکسین ابتدا به یک گیرنده LSR بر روی سطح سلول متصل می‌شود و در قسمت لیپید رفت غشا، مولکول‌های جزء Ib به یکدیگر متصل می‌شوند و یک الیگومر هفت‌تایی را تشکیل می‌دهند که باعث ورود یونها و به هم خوردن تعادل یونی سلول و مرگ سلولی و همچنین باعث ورود جزء Ia می‌شود که پس از ورود جزء Ia از طریق منفذ ایجادشده هر دو جزء Ia و Ib به درون اندوزوم‌ها وارد می‌شوند و سپس بخش کوچکی از Ib به غشای پلاسمایی بازگردانده و جزء Ia به سیتوپلاسم سلول وارد می‌شود و به پروتئین اکتین متصل شده، باعث دپلیمریزه شدن اکتین و اختلال در اسکلت سلولی و تغییرات مورفولوژیکی سلول و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۲۹، ۴۷).



شکل ۷- مسیرهای داخل سلولی درگیر در عملکرد توکسین بتای شبه‌آنتریت نکروزه (NetB) را نشان می‌دهد که در آن این توکسین منافذ آبدوست هپتامری را تشکیل می‌دهد و باعث ورود یون‌هایی مانند Na^+ ، Cl^- و Ca^{2+} و آب و در نهایت موجب لیز سلولی می‌شود (۲۴، ۴۵).

(۵۱). در نتیجه اتصال اولیه آنترتوکسین به پروتئین‌های کلودین به تشکیل یک کمپلکس کوچک با وزن مولکولی ۹۰ kDa منجر می‌شود، در نهایت شش کمپلکس کوچک با هم تعامل می‌کنند و کمپلکس بزرگی با وزن ۴۵۰ kDa به نام CH-1 تشکیل می‌دهند که در ادامه ساختارهای سنجاق‌سری بتا را تشکیل می‌دهند و سپس این ساختارها به شکل بشکه درمی‌آیند و به سرعت وارد غشای پلاسمایی سلول هدف می‌شوند و منافذ نفوذکننده کاتیون‌ها را تشکیل می‌دهند و به این ترتیب ورود یون‌های کلسیم (Ca^{2+}) از طریق منافذ رخ می‌دهد و افزایش کلسیم داخل سلولی باعث تحریک فعالیت کالپین‌ها می‌شود که خانواده‌ای از پروتئازها هستند و در نهایت به فعال شدن کاسپاز ۳ منجر می‌شود که آنزیم اصلی درگیر در آپوپتوز است. همچنین مسیر دیگر مرگ سلولی، ناشی از آنترتوکسین ممکن است ویژگی‌های نکروز، از جمله تورم سلولی و آسیب غشایی را سبب شود (۵۱، ۵۲) (شکل ۸). تعامل بین این مسیرها و مشارکت آن‌ها در پاسخ سلولی به آنترتوکسین بسته به نوع سلول و سایر عوامل متفاوت است و درک آن برای توسعه استراتژی‌های درمانی و تولید واکسن علیه عفونت‌های ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس ضروری است (۵۱).

اسیدآمینه تشکیل شده است و به ۲ دامنه تقسیم می‌شود، یک دامنه N ترمینال که مسئول تشکیل منافذ و ایجاد سمیت سلولی است و یک دامنه C ترمینال که در اتصال به گیرنده‌ها نقش دارد (۳). ژن cpe که مسئول تولید این توکسین است، معمولاً بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار دارد (۳) و مسئول علائم گوارشی است (۵۰) و در سویه‌های مختلف C، D، E، F کلستریدیوم پرفرنجنس شناسایی شده است، اما در تیپ E این ژن غیرفعال است (۱۵). همچنین طبق مطالعات انجام‌شده آنترتوکسین می‌تواند در خون جذب شده، باعث القای آنترتوکسمی شود (۶). این توکسین فقط در حین اسپورزایی تولید و در ابتدای این فرایند انباشته می‌شود و در زمان پایان اسپورزایی که سلول‌ها لیز می‌شوند، توکسین از سلول خارج و در محیط اطراف آزاد می‌شود. با توجه به اینکه کلستریدیوم پرفرنجنس در محیط‌های کشت استاندارد اسپورزایی ضعیفی دارد، همین موضوع شناسایی سویه‌های آنترتوکسیژنیک براساس تشخیص آنترتوکسین را دشوار می‌کند (۵۰). عملکرد این توکسین به این صورت است که ابتدا به گیرنده‌های کلودین روی سطح سلول‌های هدف متصل می‌شود و منافذی را در غشای سلولی ایجاد می‌کند و به ورود غیرقابل کنترل کلسیم به درون سلول منجر شده، در نهایت باعث نکروز می‌شود



شکل ۸- مسیرهای داخل سلولی درگیر در عملکرد آنترتوکسین (CPE) را نشان می‌دهد که آنترتوکسین به گیرنده‌های کلودین متصل می‌شود و پیش‌منفذ را تشکیل می‌دهد، سپس این ساختارها به شکل بشکه درمی‌آیند و منافذ تشکیل می‌دهند و باعث ورود یون کلسیم و مرگ سلولی می‌شوند (۵۱، ۵۲).

(۳، ۱۲). این توکسین به‌طور ویژه به غشاهای یوکاریوتی حاوی کلسترول متصل می‌شود و عملکرد سیتوتوکسینی خود را به نمایش می‌گذارد (۳).

توکسین بزرگ کلستریدیوم پرفرنجنس

(TpeL: toxin perfringens Large)

TpeL توکسین بزرگ و تک‌پیتیدی، با وزن مولکولی ۲۰۶ kDa است که با پلاسمیدهای بزرگ کدگذاری شده و توسط سویه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A، B، C تولید می‌شود. این توکسین جزء خانواده توکسین‌های گلیکوزیل‌کننده تخریب‌کننده است و دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها ۱۱ µg/kg است (۲۳).

توکسین NetF

NetF یک پروتئین تک‌زنجیره‌ای با وزن مولکولی ۳۱/۷ kDa است و یک توکسین همولیزین از خانواده β-PFT هاست و توسط برخی سویه‌های تیپ A تولید می‌شود. این توکسین به یک سیالوپروتئین روی سطح غشاهای بیولوژیکی متصل می‌شود و منافذ حاوی ۶-۸ مونومر NetF را تشکیل می‌دهد که ۴ تا ۶ نانومتر قطر دارند (۶).

انتروتوکسین دوتایی

(BEC: binary enterotoxin of *C. perfringens*)

BEC توکسین جدیدی است که از دو جزء تشکیل شده: یک جزء A که مسئول فعالیت آنزیمی و سمی آن است با وزن مولکولی ۴۷ kDa و جزء B که مسئول اتصال سلولی است و ورود توکسین به سلول‌های میزبان را تسهیل می‌کند و وزن مولکولی آن ۸۳ kDa است. این توکسین توسط سویه‌های خاصی از کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A تولید می‌شود (۶).

توکسین دل‌تا

توکسین دل‌تا یک پروتئین تک‌زنجیره‌ای با وزن مولکولی ۳۲ kDa است (۶) و توسط کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ B، C تولید می‌شود و یک نوع توکسین همولیزین از خانواده β-PFT هاست که باعث تجزیه گلبول‌های قرمز می‌شود (۱۴) و منافذ نسبتاً بزرگی با قطر حدود ۴ nm بر روی غشاهای سلولی ایجاد می‌کند (۶).

با توجه به اینکه سایر توکسین‌های ذکر شده که به وسیله کلستریدیوم پرفرنجنس تولید می‌شوند، به‌طور مستقیم برای شناسایی تیپ‌های این باکتری استفاده نمی‌شوند و عملکرد آن‌ها به‌صورت همکاری و هم‌افزایی با توکسین‌های اصلی است، در نتیجه بر بیان و سطح تولید توکسین‌های اصلی و تشدید عوامل بیماری‌زایی ناشی از آن‌ها تأثیر می‌گذارند و باعث پیشرفت بیماری می‌شوند (۴۵).

توکسین بتای ۲

توکسین بتای ۲ یک توکسین منفذساز است که می‌تواند توسط تمامی تیپ‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تولید شود، این توکسین به‌صورت یک پروتوکسین ۲۶۵ اسید آمینه ترشح می‌شود و زمانی که وارد دستگاه گوارش حیوانات می‌شود فعال می‌گردد، توکسین فعال آن تقریباً دارای وزن مولکولی ۲۷ kDa است (۳، ۵۳) از نظر رفتاری شباهت‌هایی به توکسین بتا دارد و می‌تواند باعث تغییر شکل سلول‌ها و جدا شدن آن‌ها از ماتریکس سلولی شود. بررسی‌ها نشان داده که اثرات این توکسین در ایجاد ضایعات ناشی از سویه تیپ C اندک است (۳). دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها ۰/۳ µg/kg است (۴۳). همچنین نتایج تحقیقات انجام‌شده نقش هم‌افزایی درون‌سلولی توکسین بتای ۲ و توکسین آلفا کلستریدیوم پرفرنجنس را در تولید ضایعات نکروزه و خونریزی‌دهنده روده کوچک در سندرم آنتروتوکسمی گاوی نشان می‌دهند (۵۴).

توکسین پرفرینگولیزین O یا تتا توکسین

توکسین پرفرینگولیزین O که با نام توکسین تتا نیز شناخته می‌شود توسط تمام سویه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تولید می‌شود (۳) زن (pfoA) مسئول تولید پرفرینگولیزین O است (۴۵). وزن مولکولی این توکسین ۴۵ kDa و از چهار دامنه تشکیل شده است (۱۲). که دامنه چهارم آن واسطه اتصال توکسین به غشای پلاسمایی سلول یوکاریوتی است (۴۵). دوز کشنده این توکسین (LD50) در موش‌ها ۱۳-۱۶ µg/kg است (۲۳). با توجه به نتایج مطالعات انجام‌شده توکسین آلفا و پرفرینگولیزین O اثرات هم‌افزایی دارند، و همچنین هر دو توکسین می‌توانند اثرات کشنده توکسین اپسیلون را در طول آنتروتوکسمی در میزبان‌های طبیعی مانند گوسفند و بز تقویت کنند (۳، ۲۴). پرفرینگولیزین O با اتصال به فسفولیپیدهای غشا و ایجاد کمپلکس‌های بزرگ باعث تشکیل منافذ در غشای سلول‌ها می‌شود

توکسین کاپا

توکسین کاپا کلاژناز است و باعث نکروز بافتی و به‌خصوص تخریب عروق خونی و بافت همبند می‌شود. وزن مولکولی آن تقریباً ۸۰kDa است. این توکسین عمدتاً توسط کلستریدیوم پرفرنجنس‌های تیپ A، D و E تولید می‌شود، باوجوداین، گزارش‌هایی مبنی بر تولید این توکسین از تیپ‌های B و C نیز گزارش شده است (۶، ۱۴).

سایر توکسین‌ها

توکسین لامبدا یک پروتئاز غیراختصاصی با وزن مولکولی ۳۶kDa است که توسط کلستریدیوم پرفرنجنس‌های تیپ B، E و برخی از سویه‌های تیپ D تولید می‌شود. توکسین مو (Mu) از خانواده هیالورونیداز (Hyaluronidase) با وزن مولکولی ۱۸۲/۶kDa است که بیشتر توسط سویه‌های تیپ B تولید می‌شود، اما توسط سویه‌های تیپ A و D و طبق برخی گزارش‌ها، توسط تیپ C نیز تولید می‌شود. توکسین نو (Nu) یک توکسین همولیتیک دئوکسی ریبونوکلاز است و باعث نکروز بافتی می‌شود و به‌وسیله کلستریدیوم پرفرنجنس‌های تیپ A-E و غالباً توسط تیپ‌های A و C تولید می‌شود (۳، ۶، ۱۴).

بحث

هریک از توکسین‌های تولیدشده توسط باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس با طیف وسیعی از بیماری‌ها مرتبط‌اند که غالباً کشنده‌اند (۲۱). شرایط بهینه برای تولید توکسین‌ها زمانی فراهم می‌شود که مقادیر زیادی مواد غنی از کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها مصرف شود یا زمانی که رژیم غذایی به‌طور ناگهانی تغییر کند و الگوی طبیعی سازگاری باکتری‌های روده‌ای مختل شود (۱۸). توکسین‌های اصلی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس را می‌توان از نظر عملکردی در سه دسته کلی جای داد: توکسین‌های آسیب‌رسان به غشای سلولی مانند توکسین آلفا، توکسین‌های داخل سلولی که باعث اختلال در اسکلت سلولی می‌شوند، مانند توکسین یوتا و توکسین‌های ایجادکننده منافذ مانند توکسین‌های بتا، اپسیلون، بتا شبه‌آنتریت نکروزه و آنتریتوکسین (۵۵).

طبق مطالعات انجام‌شده توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون توکسین‌های اصلی درگیر در بیماری‌زایی این باکتری هستند (۲۲) و بیشتر بیماری‌های ناشی از این باکتری به‌واسطه یک یا چند توکسین که

به‌صورت هم‌افزایی با هم عمل می‌کنند، ایجاد می‌شوند (۱۵). در بیماری آنتریتوکسمی، عملکرد توکسین‌های دخیل به این صورت است که ابتدا در روده باعث آسیب بافت روده می‌شوند و سپس با ورود به گردش خون بر اندام‌های غیر روده‌ای نیز تأثیر می‌گذارند (۱) و در نهایت به مکانیسم‌های مختلف مرگ سلولی همچون نکروز، آپوپتوز و نکروپتوز منجر می‌شوند (۲۴)، همچنین انواع آنتریتوکسمی ناشی از این باکتری از نظر بالینی و آسیب‌شناسی براساس تیپ باکتری و توکسین‌های خاص تولیدشده توسط آن متفاوت است (۵).

با توجه به این‌که بیشتر توکسین‌های این باکتری در وهله اول به گیرنده‌هایی واقع در غشای پلاسمایی سلول میزبان متصل می‌شوند و بر آن‌ها اثر می‌گذارند (۲۴)، بررسی این مرحله می‌تواند هدف درمانی آشکاری برای درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری باشد (۵۲). به‌طور کلی بسیاری از تحقیقات در زمینه باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس و بررسی خصوصیات و مکانیسم عمل توکسین‌های تولیدشده توسط آن، با هدف بهبود و توسعه واکسن‌های مورد استفاده در دام‌ها انجام شده است (۲۶) و شناسایی و تشخیص انواع مختلف باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس برای توسعه واکسن‌ها مهم است (۵۶)، و یکی از چالش‌های اصلی در زمینه توسعه، طراحی واکسنی است که بتواند سیستم ایمنی بدن را به بهترین شکل ممکن تحریک کند (۱۲).

تقدیر و تشکر

این طرح با حمایت‌های مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج از طرح شماره ۰۲۰۲۳-۰۱۹-۱۸-۱۸-۰۱۱ که این مقاله نیز جزئی از آن است، صورت گرفته است. از این‌رو، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج در این خصوص سپاسگزاری کنند. لازم است توضیح داده شود که تمامی شکل‌های مکانیسم اثر توکسین‌ها توسط آيسان حیرانی با بهره‌گیری از منابع یادشده بازآرایی شده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

15. Zaragoza NE, Orellana CA, Moonen GA, Moutafis G, Marcellin E. Vaccine Production to Protect Animals Against Pathogenic Clostridia. *Toxins (Basel)*. 2019;11(9):525. <https://doi.org/10.3390/toxins11090525>.
16. Li J, Adams V, Bannam TL, Miyamoto K, Garcia JP, Uzal FA, et al. Toxin plasmids of Clostridium perfringens. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(2):208-33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00062-12>.
17. Niilo L. Bovine "Enterotoxemia". III. Factors Affecting the Stability of the Toxins of Clostridium Perfringens Types A, C and D. *Can Vet J*. 1965;6(2):38.
18. Fleming S. Enterotoxemia in neonatal calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1985;1(3):509-14. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)31299-8](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31299-8).
19. Ahmadi Rahnemoon A, Esmaeilzadeh S, Mohammadian B, Ghorbanpoor M, Ghadrddan Mashhadi A. Ovine enterotoxemia in Ahvaz region, pathological, bacteriological, serological and molecular studies. *Majallahi Dampizishkii Iran*. 2020;16(3):25-39. <https://doi.org/10.22055/ivj.2019.172460.2119>.
20. Lebrun M, Mainil JG, Linden A. Cattle enterotoxaemia and Clostridium perfringens: description, diagnosis and prophylaxis. *Vet Rec*. 2010;167(1):13-22. <https://doi.org/10.1136/vr.167.1.12>.
21. Ferreira MR, Moreira GM, Cunha CE, Mendonca M, Salvarani FM, Moreira AN, et al. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of Clostridium perfringens: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. *Toxins (Basel)*. 2016;8(11):340. <https://doi.org/10.3390/toxins8110340>.
22. Moreira GM, Salvarani FM, da Cunha CE, Mendonca M, Moreira AN, Goncalves LA, et al. Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against Clostridium perfringens Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. *Sci Rep*. 2016;6(1):22816. <https://doi.org/10.1038/srep22816>.
23. Theoret JR, McClane BA. *Toxins of Clostridium perfringens*: Wiley-Blackwell Ames, IA; 2016.
24. Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of Action and Cell Death Associated with Clostridium perfringens Toxins. *Toxins (Basel)*. 2018;10(5):212. <https://doi.org/10.3390/toxins10050212>.
25. Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M. Membrane-Binding Mechanism of Clostridium perfringens Alpha-Toxin. *Toxins (Basel)*. 2015;7(12):5268-75. <https://doi.org/10.3390/toxins7124880>.
26. Titball RW. Clostridium perfringens vaccines. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 4:D44-7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.047>.
27. Oda M, Matsuno T, Shiihara R, Ochi S, Yamauchi R, Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM. Alimentary system. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2; 2016. p. 1.
2. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Clinical Veterinary Microbiology E-Book: Clinical Veterinary Microbiology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Uzal F, Vidal J, McClane B, Gurjar A. Clostridium perfringens toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxinology J*. 2010;2:24.
4. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(2):216-34. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.216>.
5. Uzal FA, Songer JG. Diagnosis of Clostridium perfringens intestinal infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest*. 2008;20(3):253-65. <https://doi.org/10.1177/104063870802000301>.
6. Mehdizadeh Gohari I, M AN, Li J, Shrestha A, Uzal F, B AM. Pathogenicity and virulence of Clostridium perfringens. *Virulence*. 2021;12(1):723-53. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>.
7. Heikinheimo A. Diagnostics and molecular epidemiology of cpe-positive Clostridium perfringens type A. 2008.
8. Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR. *Clostridial diseases of animals*: John Wiley & Sons; 2016.
9. Haralambie M-G, Țarnă A, Coroian A, Balta I, Ștef L, Corcionivoschi N. A short overview of Clostridium perfringens: Relevancy, Toxinotypes, Clinical Impacts, and the Challenges of Biofilm Formation. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. 2024;57(1):70-.
10. Liang Q, Cao L, Zhu C, Kong Q, Sun H, Zhang F, et al. Characterization of recombinant antimicrobial peptide BMGlv2 heterologously expressed in Trichoderma reesei. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18):10291.
11. Fu Y, Alenezi T, Sun X. Clostridium perfringens-induced necrotic diseases: an overview. *Immuno*. 2022;2(2):387-407.
12. Khiav LA, Zahmatkesh A. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. *Trop Anim Health Prod*. 2021;53(2). <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02728-w>.
13. Rood JJ, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018;53:5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>.
14. McDonel JL. Clostridium perfringens toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol Ther*. 1980;10(3):617-55. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(80\)90031-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(80)90031-5).

- Saito Y, et al. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Lipid Res*. 2008;49(5):1039-47.<https://doi.org/10.1194/jlr.M700587-JLR200>.
28. Sakurai J, Nagahama M, Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem*. 2004;136(5):569-74.<https://doi.org/10.1093/jb/mvh161>.
29. Raza A, Sumaira G, Khan A, Mahmood S, Goshi S, Khalid R, et al. Mechanisms of Action of Toxins Released by *Clostridium perfringens*. *BioScientific Review*. 2024;6(1):16-33.<https://doi.org/10.32350/BSR.61.i>.
30. Nagahama M OS, Oda M, Miyamoto K, Takehara M, Kobayashi K. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins (Basel)*. 2015;7(2):396-406. <https://doi.org/10.3390/toxins7020396>.
31. Seike S, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M. Role of pannexin 1 in *Clostridium perfringens* beta-toxin-caused cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(12):3150-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2016.10.003>.
32. Uzal FA, Saputo J, Sayeed S, Vidal JE, Fisher DJ, Poon R, et al. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C Enterotoxemias. *Infect Immun*. 2009;77(12):5291-9.<https://doi.org/10.1128/IAI.00825-09>.
33. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(1):66-98.<https://doi.org/10.1128/CMR.3.1.66>.
34. Hunter S, Clarke I, Kelly D, Titball R. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1992;60(1):102-10.<https://doi.org/10.1128/iai.60.1.102-110.1992>.
35. Xin W, Wang J. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: Toxic effects and mechanisms of action. *Biosafe Health*. 2019;1(2):71-5.<https://doi.org/10.1016/j.bshealth.2019.09.004>.
36. Bhowan AS, Habeeb AF. Structural studies on epsilon-prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to epsilon-toxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;78(3):889-96.[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(77\)90506-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(77)90506-x).
37. Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, Naylor CE, Basak AK, Titball RW. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J*. 2011;278(23):4589-601.<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>.
38. Nagahama M, Oda M, Tsuge H, & Kobayashi K. Enteric Toxins of *Clostridium perfringens*: Beta Toxin, TpeL, Epsilon Toxin and Iota Toxin 2015. 997-1013 p.
39. Titball RW. The Molecular Architecture and Mode of Action of *Clostridium perfringens* epsilon-Toxin. *Toxins (Basel)*. 2024;16(4):180.<https://doi.org/10.3390/toxins16040180>.
40. Alves GG, Machado de Avila RA, Chavez-Olortegui CD, Lobato FC. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*. 2014;30:102-7.<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.016>.
41. Nagahama M, Hara H, Fernandez-Miyakawa M, Itohayashi Y, Sakurai J. Oligomerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin is dependent upon membrane fluidity in liposomes. *Biochemistry*. 2006;45(1):296-302.<https://doi.org/10.1021/bi051805s>.
42. Robertson SL, Li J, Uzal FA, McClane BA. Evidence for a prepore stage in the action of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *PLoS One*. 2011;6(7):e22053.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022053>.
43. Uzal F. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxinology J*. 2013;3(1):24-42.
44. Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oda M, Sakaguchi Y, Hisatsune J, et al. Cellular Entry of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin and *Clostridium botulinum* C2 Toxin. *Toxins (Basel)*. 2017;9(8):247.<https://doi.org/10.3390/toxins9080247>.
45. Camargo A, Ramirez JD, Kiu R, Hall LJ, Munoz M. Unveiling the pathogenic mechanisms of *Clostridium perfringens* toxins and virulence factors. *Emerg Microbes Infect*. 2024;13(1):2341968.<https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2341968>.
46. Lan-Xin O, Bijin Y, Mingfei S, Nanshan Q, Juan L, Minna L, et al. Mechanisms of Intestinal Epithelial Cell Damage by *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 2024:102856.<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2024.102856>.
47. Nagahama M, Umezaki M, Oda M, Kobayashi K, Tone S, Suda T, et al. *Clostridium perfringens* iota-toxin b induces rapid cell necrosis. *Infect Immun*. 2011;79(11):4353-60.<https://doi.org/10.1128/IAI.05677-11>.
48. Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins (Basel)* 1: 208–228. 2009.
49. Rood JJ, Keyburn AL, Moore RJ. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. *Avian Pathol*. 2016;45(3):295-301.<https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1158781>.
50. McClane BA. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon*. 1996;34(11-12):1335-43.[https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(96\)00101-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00101-8).
51. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins (Basel)*. 2016;8(3):73.<https://doi.org/10.3390/toxins8030073>.

org/10.3390/toxins8030073.

52. Freedman JC, Hendricks MR, McClane BA. The Potential Therapeutic Agent Mepacrine Protects Caco-2 Cells against Clostridium perfringens Enterotoxin Action. mSphere. 2017;2(4):10.1128/msphere. 00352-17.10.1128/msphere.00352-17.

53. El-sify A. A review on Clostridium perfringens toxins with special reference to Beta 2 toxin. JCVR. 2015;9(1):85-100.https://doi.org/10.21608/jcvr.2015.37191.

54. Manteca C, Daube G, Jauniaux T, Linden A, Pirson V, Detilleux J, et al. A role for the Clostridium perfringens β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? Vet Microbiol. 2002;86(3):191-202.https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00008-1.

55. Revitt-Mills SA, Rood, J. I., & Adams, V. Clostridium perfringens extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. Microbiol Aust. 2015;36(3):114-7.https://doi.org/10.1071/MA15039.

56. Ahsani M, Bafti MS, Esmailzadeh A, Mohammadabadi M. Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Rumin

Res. 2011;95(1):65-9.https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.09.001

* در این مطالعه از طریق سایت swiss-model به ساختارهای سه بعدی توکسین‌ها دسترسی پیدا کرد.

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9RF12

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9L403?template=7q9y

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/E7D8R1

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q46221?template=6klo

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P01558?template=2xh6

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9L403?template=4h56.1.A&range=27-309