تاثیر پروتوتوکسین فعال شدهٔ اپسیلون *Cl. perfringens* تیپ D بر روی وزن و قد جنین‌های موش سفید کوچک آزمایشگاهی

● رضا پیله‌چیان لنگرودی، ● محمود اردهالی، ● محسن شوشتری، ● عبدالوهاب فرزان و ● عباس عزی
اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

تاثیر پروتوتوکسین فعال شده *Cl. perfringes* تیپ D بر روی اندام‌زائی جنینهای موش سفید مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه فیلترات و پروتوتوکسین اثرات پروتوتوکسین فعال شده در زیر حد LD_{50} بر روی اندام‌زائی جنین مورد بررسی قرار گرفت. در تجربیات از حیوانات ماده‌ای که در پوش مهبلی (Vaginal plug) در آنها مشاهده شده بود، استفاده گردید که در دو گروه تجربی قبل از لانه گزینی (Pre implantation) و بعد از لانه گزینی (Post Implantation) مورد تزریق ۰/۵CC پروتوتوکسین به رقت ۰/۰۰۰۱ mg/ml قرار گرفتند (رقیق شده در نرمال سالین) برای هر گروه تجربی یک گروه شاهد در نظر گرفته شد که فقط دز مشابهی، نرمال سالین دریافت کردند. به گروه اول در روز سوم حاملگی (مرحله بلاستوسیست) و به گروه دوم در روز هفتم حاملگی یک دز منفرد پروتوتوکسین (رقت ذکر شده) تزریق گردید. جنینها در روز پانزدهم حاملگی برداشت شده و مورد بررسی قرار گرفتند. کاهش وزن و کاهش قد (C-R) در جنین‌های تجربی در مقایسه با جنینهای شاهد مشاهده گردید. داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و مشخص شد که تفاوت مشاهده شده بین وزن و قد جنینهای تجربی و جنینهای شاهد در هر دو گروه قبل و بعد از لانه گزینی کاملاً معنی‌دار است. هیچ گزارشی مبنی بر انجام چنین پژوهشی در داخل و یا خارج از کشور تاکنون ارائه نشده است، لذا نتایج موجود در این مقاله در مورد اندام‌زائی جنین موش برای اولین بار گزارش می‌گردد.

مقدمه

پدیده ناهنجاری‌زائی (Teratogenicity) یک پدیده آستانه‌ای است، بدین معنی که بسیاری از مواد تراتوژن، در دز معینی، اثرات خود را روی تعداد زیادی سلول بجای می‌گذارند و میزان عمل و شدت اثر آنها با افزایش دز، زیاد می‌شود. بسیاری از مواد تراتوژن که بر روی جنین پستانداران موثرند، دارای یک دز آستانه هستند که در زیر این دز، بی‌اثربوده‌لیکن با افزایش دز از حد آستانه روی‌درصدبیشتری‌از جنینهاتاثیر می‌گذارند.

مطالعات Khera در سال ۱۹۸۴ نشان می‌دهد که مسمومیتهای مادری در اثر عوامل تراتوژن در نژادهای مختلف موش می‌تواند به صورت نقائص جنینی نظیر کاهش وزن بدن، مرگ جنین، اگزنسفالی، Open eye، تشکیل نیمی از هر مهره (Hemivertebra)، چسبیدن کمان مهره‌های تنه‌ای، گردنی و کمری به یکدیگر، ترکیب، کاهش و یا افزایش دنده‌ها و نقائص در استخوان جناغ سینه دیده شود (Khera ۱۹۸۴).

در این تحقیق اثرات تراتوژنیک فیلترات لیوفیلیزه *Cl. perfringes* تیپ D بر روی اندام‌زائی جنین موش مورد بررسی قرار گرفت. *Cl. perfringes* تیپ D عامل ایجاد انتروتوکسمی گوسفندان بوده و اولین بار در سال ۱۹۳۳ توکسین آن توسط Wilsdon توصیف گردیده (EVA Sorlans ۱۹۶۰) این توکسین در سال ۱۹۳۳ توسط Glenny، Barr، Jones، Dalling و Ross بنام اپسیلون نامیده‌شد (Clenny ۱۹۴۷ و Batty) اپسیلون ابتدا به صورت پروتوتوکسین بوده و پس از اینکه یک قطعه پپتید کوچک ۱۴ اسید آمینه‌ای از پایانه آمین آن، توسط تریپسین کنده شود، به توکسین فعال تبدیل می‌گردد. (Boarer ۱۹۸۸ وهمکاران).

اثرات فیلترات *Cl. perfringes* تیپ D بر روی نفوذپذیری روده موش Batty ۱۹۶۵ و Bullen)، همچنین تاثیر توکسین اپسیلون *Cl. perfringes* تیپ D بر روی سلولهای موش، خوکچه هندی و خرگوش در شرایط In vitro (Buxton ۱۹۷۸) مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات میکروسکوپی الکترونی در مورد مکانهای اتصالی توکسین اپسیلون در موش (۱۹۷۸ Buxton)، اثر توکسین اپسیلون بر روی سیستم قلبی عروقی در رات (Sakurai ۱۹۸۳ و همکاران)، القاء انقباض در ایلئوم رات (Sakuri ۱۹۸۹ و همکاران)، همچنین توزیع توکسین اپسیلون نشانه شده *Cl. perfringes* تیپ D در موش (Masahiro Nagaha Sakurai ۱۹۹۱) مطالعه و بررسی شده‌است.

در ایران *Cl. perfringes* تیپ D از خاک جدا شده‌است و بررسیهای انجام شده نشان می‌دهد که در ۱۵۸ نمونه مورد مطالعه، ۱۵ سوش توکسیژنیک تیپ D وجود داشته‌است، (Ardehali, Moosawi, ۱۹۹۴) Pilehchian و آنتی توکسین استاندارد *Cl. perfringes* تیپ D تولید شده‌است (۱۹۹۴ Moosawi, Ardehali, Pilehchian).

در تحقیق حاضر اثرات پروتوتوکسین لیوفیلیزه *Cl. perfringes* تیپ D که در هنگام تزریق، تریپسینه و فعال می‌شود، بر روی اندام‌زائی جنینهای موش مورد مطالعه قرار گرفته‌است.

مواد و روشها

۱- محیط کشت

از محیط کشت تهیه شده در فرمانتور به عنوان محیط پایه برای رشد باکتری و تهیه پروتوتوکسین استفاده شد. محیط کشت حاوی ۲/۵٪ پپتون B، ۱٪ تامپون (Na_2Hpo_4)، ۰/۲۵٪ نمک (NaCl)، ویتامین و عناصر ضروری (Trace elements) که به میزان ۰/۷٪ و به صورت محلول (Trace-Vitamin solution) بکار گرفته شد و دکسترین به میزان ۱٪ این محیط کشت در 121^{c} به مدت ۳۰ دقیقه استریل شده، سپس تا 37^{c} خنک و با ۲٪ سوش *Cl. perfringes* تیپ D تلقیح گردید (C. N. Type D 401) دکسترین و محلول T.V. در هنگام تلقیح به محیط اضافه شده پس از ۵ ساعت انکوباسیون و بلافاصله پس از اتمام دوره رشد (که از روی ثبات دستگاه قابل کنترل است) ۲ لیتر از کشت برداشت شده و مابقی با فرمل به میزان شش در هزار فرمله شد.

۲- استحصال پروتوتوکسین و توکسین

۲ لیتر کشت برداشت شده، به یخچال 4^{c} منتقل گردید و پس از یک شب از یخچال خارج و برای مدت ۱ ساعت (در ۳۰۰۰ RPM) سانتریفوژ شده، جرمهای باکتریائی خارج و مایع روئی (فیلترات) برای ادامه کار در نظر گرفته شد.

براساس روشی که توسط Habeeb در سال ۱۹۶۳ و Thomson در سال ۱۹۶۳ توصیف شده‌بود، به میزان ۷۰٪ (۷۰۰ گرم در لیتر) سولفات آمونیوم به فیلترات افزوده و به آرامی مخلوط و برای یک شب در یخچال قرار دادیم. پروتئین‌های جمع‌آوری شده توسط سولفات آمونیوم از فیلترات جدا شده، سپس در مقابل آب شهر دیالیز گردید. از معرف نسلر (Nessler) برای اتمام عمل دیالیز استفاده شده. پروتوتوکسین دیالیز

شده را توسط پلی‌اتیلن گلیکول (Carbowax M. W. 6000) محصول BDL انگلستان، تفلیظ و به حجم، ۲۰cc رسانیده، سپس در مقادیر ۲ سانتیمترمکعبی در ویالهای ۱۰ سانتیمتر مکعبی ریخته و لیوفیلیزه نمودیم.

کلیه عملیات استخراج پروتوتوکسین یک مرتبه به شرح فوق و یک مرتبه دیگر با نمونه دیگری از همان کشت به این روش انجام گرفت که ابتدا به میزان ۰/۱٪ تریپین دیفکو (۱ میلی‌گرم تریپسین برای ۱۰۰ میلی‌گرم پروتوتوکسین) به آن افزوده و پس از یک ساعت انکوباسیون در اتو ۳۷°c، آن در معرض سولفات آمونیوم قرار گرفت و بقیه عملیات به شرح فوق صورت پذیرفت. بنابراین طبق روش اول پروتوتوکسین لیوفیلیزه و طبق روش دوم پروتوتوکسین فعال شده بدست آمد. عملیات خلوص در همین جا متوقف گردیده و همین مجموعه توکسین که توکسین اپسیلون آن، توکسین اصلی است جهت تجربیات استفاده گردید.

پروتوتوکسین بدست آمده طی روش اول در هر مرحله از تجربیات ابتدا با میزان ۱ میلی‌گرم تریپسین برای ۱۰۰ میلی‌گرم آن، فعال شده، سپس مورد استفاده قرار می‌گرفت.

۳- حیوانات

موش سفید آزمایشگاهی نژاد N.M.R.I. (تهیه شده از مؤسسه تحقیقاتی رازی).

۴- تجربیات اندام‌زائی

موشهای حامله برای مراحل قبل از لانه‌گزینی و بعد از لانه گزینی در نظر گرفته شدند و برای هر یک از مراحل دو گروه تجربی و شاهد تعیین گردید (Pilehchian ۱۹۸۹ و Parivar) حیوانات تجربی مورد تزریق $\frac{1}{2}$cc توکسین رقیق شده و کنترل آنها مورد تزریق نرمال سالین با دزی مشابه قرار گرفتند. تزریق گروههای قبل از لانه گزینی در روز سوم و گروههای بعد از لانه گزینی در روز هفتم حاملگی انجام شد (روز مشاهده در پوش مهبلی روز صر در نظر گرفته شد). جنینها در روز ۱۵ حاملگی از رحم خارج و به فرمالین ۱۰٪ انتقال داده شدند. مشاهدات میکروسکوپیک از نظر بررسی وجود ناهنجاری‌های احتمالی با استفاده از میکروسکوپ استریو، اندازه‌گیری وزن با استفاده از ترازوی دیجیتال (با حساسیت تا ۱۰ میلی‌گرم) و اندازه‌گیری قد C-R (Crown - Rump) با کولیس و بررسیهای میکروسکوپیک به صورت تهیه مقاطع بافت شناختی از جنینها و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین صورت گرفت.

۵- تجزیه و تحلیل‌های آماری

با تکیه بر مشاهدات تجربی و شاهد در گروههای قبل از لانه گزینی و بعد از لانه گزینی تحلیلهای آماری انجام گردید. به این ترتیب که از داده‌های حاصله میانگین گرفته شد میانگین وزن و میانگین قد جنینهای هر موش به عنوان داده اصلی تلقی گردیده و تست آماری به روش تعیین t-student test انجام گرفت و میزان احتمال با استفاده از جدول P برای t به دست آمد.

موش جنینهای خود را حفظ کرده بودند که در دو مورد آنها نیز تعداد جنینها به ترتیب ۳ و ۴ عدد بود.

همچنین در گروه تجربی بعد از لانه‌گزینی که حاملگی با دیدن در پوش مهبلی تائید شده بود از ۱۴ حیوان مورد آزمایش که در روز ۷ توکسین دریافت داشته بودند، در روز ۱۵ حاملگی فقط ۸ حیوان جنین داشتند که در آنها نیز چند مورد به ترتیب دارای ۱، ۳، ۴ و ۵ جنین بودند در حالی که در گروههای شاهد به استثناء ۱ مورد فقدان جنین در گروه شاهد بعد از لانه گزینی، مابقی حیواناتی که حاملگی در آنها با دیدن درپوش مهبلی تائید شده بود و فقط نرمال سالین دریافت داشته بودند، در روز ۱۵ حاملگی دارای جنین بوده و جنین‌هایشان حداقل ۵ و حداکثر ۱۱ عدد بود.

لذا می‌توان این نتیجه را به دست آورد که توکسین علاوه بر اینکه تعداد جنین‌ها را کاهش داده‌است

جدول شماره ۱- بررسی کلی همه گروههای موشهای تحت آزمایش

گروههای آزمایشی / مشاهدات	قبل از لانه‌گزینی (تزریق در روز ۳ حاملگی)		بعد از لانه گزینی (تزریق در روز ۷ حاملگی)	
	تجربی	شاهد	تجربی	شاهد
نوع و دز تزریق	$\frac{1}{2}$cc توکسین ۰/۰۰۰۱mg/ml	$\frac{1}{2}$cc نرمال سالین	$\frac{1}{2}$cc توکسین ۰/۰۰۰۱mg/ml	$\frac{1}{2}$cc نرمال سالین
تعداد موشهای دارای درپوش مهبلی	۱۲	۳	۱۴	۸
تعداد موشهای جنین‌دار	۴	۳	۸	۷
تعداد موشهای فاقد جنین	۸	۰	۶	۱
تعداد جنینها	۲۶	۲۵	۵۶	۶۰

نتیجه

طی محاسبات به عمل آمده در این تحقیق میزان LD_{50} برای یک موش ۲۰ - ۱۸ گرمی برابر ۰/۰۰۰۲۱۵ mg/ml و یا ۰/۰۱۰۷ mg/kg وزن بدن موش تعیین گردید. بنابراین دز ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم در هر سانتیمتر مکعب آزمایشهای اندام‌زائی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسیهای انجام شده بر روی ۳۷ موش که حاملگی در آنها با دیدن درپوش مهبلی تائید شده بود در ۴ گروه مختلف قرار گرفته بودند در جدول ۱ خلاصه شده‌است.

همانگونه که از جدول شماره ۳ استنباط می‌گردد از ۱۲ موشی که حاملگی در آنها با دیدن درپوش مهبلی تائید شده بود و در گروه تجربی قبل از لانه گزینی قرار داشتند پس از دریافت توکسین در روز سوم حاملگی، در روز ۱۵ حاملگی ۸ موش فاقد جنین بوده و فقط چهار احتمالاً باعث از بین رفتن کامل تمامی جنینهای یک موش نیز می‌تواند باشد.

در بررسیهای مورفولوژیک، جنینها هیچگونه نقصی از نظر ظاهری نشان ندادند. البته موارد استثنائی وجود دارد، لیکن قابل بررسیهای آماری نیستند بنابراین برای بررسی در مورد اثرات احتمالی کاهش دهنده رشد و نمو جنینها اندازه‌گیری وزن و قد (C-R) به عمل آمد. (جداول شماره ۲ و ۳) خلاصه این نتایج را نشان می‌دهند.

از بررسیهای جداول شماره ۲ و ۳ این نتیجه حاصل می‌شود که رشد و نمو جنینهای تجربی هر دو گروه قبل از لانه‌گزینی و بعد از لانه‌گزینی تحت اثر توکسین متوقف نشده، لیکن به تعویق افتاده‌است. جهت تائید هر چه بیشتر به تعویق افتادن رشد و نمو جنین‌های تجربی، با استفاده از میانگین‌های مطرح

جدول شماره ۲- میانگین وزن و قد($\bar{X}\pm ds$) در مورد جنینهای هر یک از موشهای تجربی و شاهد گروه قبل از لانه‌گزینی

گروههای آزمایشی / مشاهدات	تجربی ۴ موش جنین‌دار				شاهد ۴ موش جنین‌دار	
تعداد جنینهای هر موش	۳	۴	۱۱	۸	۸	۸۹
وزن $\bar{X}\pm ds$ mg	۰/۳۶۷±۰/۰۳۹	۰/۳۴۸±۰/۰۵۸	۰/۴۶۱ ±۰/۰۴۸	۰/۳۴۷±۰/۰۵۶	۰/۴۸۵±۰/۰۴۱	۰/۵۲۸±۰/۰۳۳
قد $\bar{X}\pm$dsmm(C-R)	۱۳/۴۸±۰/۵۷۹	۱۳/۱۳±۰/۶۸۲	۱۴/۳۱±۶۹۳	۱۲/۹۴±۰/۸۹۱	۱۴/۲۹±۰/۸۴۸	۱۵/۲۳ ±۰/۷۳۴

جدول شماره ۳- میانگین وزن و قد($\bar{X}\pm ds$) در مورد جنینهای هر یک از موشهای تجربی و کنترل گروه بعد از لانه‌گزینی

گروههای آزمایشی / مشاهدات	تجربی ۸ موش جنین‌دار							کنترل ۷ موش جنین‌دار						
تعداد جنینهای هر موش	۱۰	۱۳	۱۲	۱۴	۱	۳	۵	۶	۱۰	۹	۹	۱۱	۹	۸	۵
$\bar{X}\pm$sd	۰/۲۹۱	۰/۴۹۱	۰/۴۴۹	۰/۳۹۷	۰/۲۷۲	۰/۳۶۶	۰/۳۳۶	۰/۳۸۶	۰/۴۷۷	۰/۴۱۳	۰/۵۲۹	۰/۴۶۷	۰/۴۳۲	۰/۴۵۶	۰/۴۶۷
وزن mg	±۰/۰۷۴	±۰/۰۶۰	±۰/۰۸۰	±۰/۰۴۴		۰/۰۸۳	±۰/۰۸۱	±۰/۰۷۳	±۰/۰۴۱	±۰/۰۴۱	±۰/۰۵۰	±۰/۰۸۱	±۰/۰۴۲	±۰/۰۵۲	±۰/۰۷۱
$\bar{X}\pm$ds	۱۲/۸۱	۱۳/۸۸	۱۴/۲۱	۱۳/۸۳	۱۲/۹۵	۱۳/۶۶	۱۳/۱۶	۱۴/۰۲	۱۴/۳۷	۱۳/۱۳	۱۵/۲۳	۱۴/۲	۱۳/۷۲	۱۴/۵۸	۱۴/۲۳
قد mm(C-R)	±۰/۶۹۰	±۰/۵۹۰	±۱/۲۱۸	±۰/۹۸۷		±۱/۰۲۰	±۰/۵۶۲	±۱/۴۴۰	±۰/۷۳۶	±۰/۵۶۶	±۰/۷۳۴	±۰/۴۳۲	±۰/۹۵۲	±۰/۶۸۴	±۰/۸۵۸

شده در جداول شماره ۲ و ۳ در مورد وزن و اندازه‌گیری C-R، تجزیه و تحلیلهای آماری به روش t-test صورت پذیرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیلهای آماری در جداول شماره ۴ و ۵ دیده می‌شود.

بحث

همانطور که از جداول شماره ۴ و ۵ استنباط می‌گردد، میزان احتمال P برای وزن و قد ۲ گروه تجربی قبل از لانه‌گزینی بیش از ۹۵٪ بوده و بر این اساس

جدول شماره ۴- نتایج تحلیلهای آماری در مورد وزن و قد جنینهای تجربی و کنترل گروه قبل از لانه‌گزینی ($\bar{X} \pm sd$)

مشاهدات	قد C - R (mm)	وزن (mg)
کنترل	۱۴/۷۰/۴۸۱	۰/۴۸۰۰/۰۴۱
تجربی	۱۳/۴۶۰/۶۰۶	۰/۳۸۰۰/۰۵۴
t	۳/۲۳۷	۲/۷
درجه آزادی	۵	۵
P= احتمال	P<۰/۰۵	P<۰/۰۵

جدول شماره ۵- نتایج تحلیلهای آماری در مورد وزن و قد جنینهای تجربی و کنترل گروه بعد از لانه‌گزینی ($\bar{X} \pm sd$)

مشاهدات	قد C - R (mm)	وزن (mg)
کنترل	۱۴/۲۳۴±۰/۶۱۲	۰/۴۶۳±۰/۰۳۶
تجربی	۱۳/۵۶۵±۰/۵۲۲	۰/۳۹۳±۰/۰۸۲
t	۲/۲۹۱	۳
درجه آزادی	۱۳	۱۳
P= احتمال	P<۰/۰۵	P<۰/۰۲

اختلاف مشاهده شده بین گروههائی که تحت تزریق پروتوتوکسین قرار گرفته بودند و گروههای شاهد کاملاً معنی‌دار بوده و حاصل از تجربیات انجام شده می‌باشد.

براساس جداول شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ مشخص می‌شود که پروتوتوکسین لیوفیلزه که در هنگام تزریق تریپسینه و فعال می‌گردد، در دز ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم بر سانتیمتر مکعب که برابر ۰/۱ میکروگرم بر سانتیمتر می‌باشد، باعث به تعویق انداختن رشد و نمو طبیعی در جنین موش می‌گردد. از آنجا که براساس بررسی‌های انجام شده، مطالعه اثر توکسین بر روی اندامزائی تاکنون صورت نپذیرفته و پژوهش حاضر، اولین گزارش را در این مورد ارائه نموده‌است، لذا مکانیسم این فعالیت توکسین هنوز مطالعه نشده و مشخص نیست.

بنابراین پیشنهاد می‌شود که مکانیسم زیر در این فعالیت نقش داشته‌باشد.

براساس مطالعات Buxton در سال ۱۹۷۸ توکسین باعث افزایش غلظت آدنوزین ۳-۵ مونوفسفات حلقوی cAmp در پلاسمای موش می‌گردد. انتروتوکسین مقاوم به حرارت *E. Coli*، انتروتوکسین *V. cholera* و دلتا توکسین *Sta. aureus* نیز تولید cAmp را در In vitro در سلولهای ایلئال - موکوزال خوکچه هندی افزایش می‌دهند، با این تفاوت که دلتا توکسین *Sta. aureus* برخلاف آن دو مشابه توکسین اپسیلون، سیتوتوکسیک نیز می‌باشد، لذا براساس مطالعات Buxton، توکسین اپسیلون *Cl. perfringes* تیپ D انتروتوکسینی است که می‌تواند با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی سطح سلولی در سلولهای معینی مانند رگهای خونی، غشاء آپیکال سلولهای پوشش دهنده لوپ هنله و لوله‌های در هم پیچیده دور در کلیه و سلولهای سینوزوئیدی کبد موش، از طریق مکانیسمی که توسط سیستم Adenyl cylase-cAmp میانجیگری می‌شود، صدمات وسیعی ایجاد نماید. با توجه به اینکه براساس مطالعات دیگری از همین دانشمند، توکسین در اتصال با بسیاری از رگهای مغز موش مانند سطح لومینال اندوتلیوم رگهای خونی (غشائی که با خون در تماس است) تالاموس، کورتکس مغز، هسته‌های سفید مخچه، پایه‌های مخچه، پل دماغی و پرده‌های مغز و مخچه، برخی از رگهای خونی کبد مانند معدودی از سیاهرگهای بزرگ، بسیاری از سیاهرگهای مرکزی لوبولها و سینوزوئیدهای کبدی دیده می‌شود، لذا احتمال اینکه در پژوهش حاضر، رگهای خونی جفت، سینوزوئیدهای جفت و رگهای خونی بندناف نیز تحت تاثیر این اثرات مخرب توکسین قرار گرفته باشند وجود دارد و این خود می‌تواند دلیلی بر عدم وجود جنین در موشهائی که در گروههای تجربی قبل و بعد از لانه گزینی، در پوش مهبلی آنها دیده شده ولی فاقد جنین بوده‌اند (جدول شماره ۱) باشد. همچنین می‌تواند توجیه کننده تعداد کم جنین در گروههای تجربی که دز ۰/۱ میکروگرم بر هر سانتیمتر مکعب پروتوتوکسین را دریافت کرده‌اند (جداول شماره ۲ و ۳) بوده و نیز با عبور از جفت (به دلیل وزن مولکولی در حدود ۳۸ kd) به بدن جنین وارد شده و پس از ا تصال به گیرنده‌های سطح سلولی، سلولهای اندوتلیوم قسمتهای مختلف مغز جنین (در مراحل ابتدائی) و یا سایر سلولهای بدن جنین (درمراحل پیشرفته‌تر دوران جنینی) باعث به تعویق افتادن رشد و نمو جنینها گردد. با توجه به اینکه سیستم اعصاب مرکزی (CNS)اولین سیستمی است که جزئیات آن و به طور کلی جزئیات این مکانیسم پیشنهادی می‌بایستی طی پژوهش‌های آینده روشن گردد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین وظیفه خود می‌دانند که بدین وسیله تشکر خود را از جناب آقای دکتر جهانگیر اکبرزاده که مساعدتهای ممکن جهت تشخیص حیوانات مورد نیاز این پژوهش را نمودند و کلیه همکاران ایشان در بخش تحقیق، تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و همچنین از آقای دکتر ابوالفضل اکبری به خاطر راهنمائی‌هایشان در مورد انجام تست LD_{50} ابراز دارند.

منابع مورد استفاده

1- Ardehali, M.; Moosawi, M.; and Pilehchian, R. 1991. Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from soil. XXIV World Veterinary Congress. August 18 to 23, Brazil Abstracts 7.8.2.
2-Barrow, P. 1990. Laboratory animal handbooks 11, Technical procedures in reproduction toxicology. London. Royal society of medicine services limited for laboratory animal Ltd.
3- Batty I. and A. T. Glenny, 1947. Titration of *Cl. welchii* epsilon toxins and antitoxin, The British Journal of experimental pathology, Vol. XXVIII, P. 110.
4- Boarer, C.D.H., M.G. Sojika, V.J. Wbite and P. L. Roeder. 1988. The production and evaluation of monoclonal antibodies to *Clostriduim perfringens* type D toxin. Journal of biological standardization, 1988, 16, 207-218.
5- Bullen J.J. and Ireen Batty, 1965. The effect of *Clostridium welchii* type D culture filtrates on the permeability of the mouse intestine. The Journal of pathology and Bacteriology V. 71, 311-323.
6- Buxton, D. 1978. The use of an immunoperoxidase technique to investigate by light and electron microscopy the sites of binding of *Clostridium welchii* type - D epsilon toxin in mice J. Med. Microbiology Vol.11 289-292.
7- Buxton, D. 1987. Further studies on the mode of action of *Clostridium welchii* type - D epsilon toxin. J. Med. Microbiol. Vol.11 292-298.
8- Buxton, D. 1978. In-Vitro effects of *Clostridium wehchii* type - D epsilon toxin on guinea-pig, mouse, rabbit and sheep cells J. Med. Microbiol Vol.11 299-302.
9- Criner, L. A. 1961. Entrotoxemia of sheep. I. Effects of *Clostridium perfringens* type D toxin on the brains of sheep and mice American Jouranl of Veterinary Research. Vol. 22, 429-443. 1961.
10- Habeeb, A, F. S.A. 1963. Some studies on the chemical modification of 3- toxin of *Clostridium perfringens* type D. Biochemica et Biophysica Acta Vol. 74 113-121.
11- Khera, K.S. 1984. Maternal toxicity, A possible factor in fetal malformation in mice. Teratology Vol. 29 411-416.
12- Moosawi M., M. Ardehali and R. Pilehchian, 1994. Preparation of standard *Clostridium perfringens* Antitoxin in the sheep. Arch. Inst. Razi Vol. 44/45. 101-105.
13- Naghama M. and J. Sakurai, Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. Toxicon Vol. 29. No. 2 211-217.
14- Orlans EVA S.C., B. Richards and V. A. Jones. 1960. *Clostridium wehchii* epsilon-toxin and antitoxin immunology Vol. III No. 1.
15- Parivar K. and R. Pilehchian, 1989. The effect of cadmium chloride on the organogenesis of laboratory mice. Cell differentiation and development, CDDEE 8 27 (Suppl.) S1 - S248, S47 (154).
16- Sakurai J., M. Nagahama and Y. Fujii, Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats, Infection and immunity, Vol. 42 No.3 1183-1186. Dec.
17- Sakurai J., M. Nagahama and T. Takahashi, 1989. Contraction induced by *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the isolated rat ileum. FEMS Microbiology letters 58, 269-272.
18- Thomson R. O., 1962. Cyrstalline 3-prototoxin from *Clostridium welchii*, Nature N. 4810 January 6.
19- Thomson R. O., 1963. The fractionation of *Clostridium welchii* 3- antigen on cellulose ion exchangers. J. Gen. Microbiol, Vol. 31 79-90.