

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE**



**TKIVNA I KRVNA DISTRIBUCIJA TOKSIKOLOŠKI
AKTIVNIH JEDINJENJA IZ RICINUSA (*RICINUS
COMMUNIS L.1753, Euphorbiaceae*) I NJIHOV
SUDSKOMEDICINSKI ZNAČAJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Vladimir Pilija

Kandidat: Asist.dr Radosav Radosavkić

Novi Sad, 2017. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|---|--|
| Redni broj: RBR | |
| Identifikacioni broj: IBR | |
| Tip dokumentacije: TD | Monografska dokumentacija |
| Tip zapisa: TZ | Tekstualni štampani materijal |
| Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR | Doktorska disertacija |
| Ime i prezime autora: AU | Radosav Radosavkić |
| Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN | Prof. dr Vladimir Pilija, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu |
| Naslov rada: NR | Tkivna i krvna distribucija toksikološki aktivnih jedinjenja iz ricinusa (<i>Ricinus communis</i> L. 1753, Euphorbiaceae) i njihov sudskomedicinski značaj |
| Jezik publikacije: JP | Srpski (latinica) |
| Jezik izvoda: JI | srp. / eng. |
| Zemlja publikovanja: ZP | Republika Srbija |
| Uže geografsko područje: UGP | Vojvodina |
| Godina: GO | 2017. |
| Izdavač: IZ | autorski reprint |
| Mesto i adresa: MA | 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3 |

| | |
|--|---|
| Fizički opis rada: FO | broj poglavlja 8 / stranica 129 / slika 69/ tabela 12/ grafikona 11 / referenci 271/ |
| Naučna oblast: NO | Medicina |
| Naučna disciplina: ND | Sudska medicina |
| Predmetna odrednica, ključne reči: PO | ricinus; ricin; alkaloidi; forenzička toksikologija; toksokinetika; gasna hromatografija-masena spektrometrija; trovanje biljkama; morfološke i mikroskopske promene; laboratorijske životinje; autopsija; sudska medicina |
| UDK | 340.66/.67:615.099 633.85:543.544]:612.085.1 |
| Čuva se: ČU | Biblioteka medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad |
| Važna napomena: VN | |
| Izvod: IZ | <p>Ricin je prirodni protein, toksin koji spada među najpristupačnije i najsmrtonosnije otrove. Nalazi se u biljci Ricinus (<i>Ricinus communis</i>), sa najvećim sadržajem u semenu (1-5 %). Ricin se smatra potencijalnim bioterorističkim oružjem i prema riziku za ljudsko zdravlje svrstan je u B kategoriju biološkog oružja. U novije vreme korišćen je za konstruisanje imunotoksina protiv tumorskih ćelija u terapiji maligniteta. Dokumentovana su mnoga trovanja ricinom, kako zadesna, tako i samoubilačka i ubilačka. U tu svrhu koristilo se intaktno seme ricinusa ili ekstrahovani ricin.</p> <p>Osim ricina, u semenu ricinusa je prisutan toksični alkaloid ricinin u količini 0.3-0.8 %. Ricinus je jedini poznati prirodni izvor ricinina, koji se ko-ekstrahuje sa ricinom iz semena biljke. Ricinin se jednostavno detektuje u kliničkim uzorcima metodom tečne hromatografije i masene spektrometrije i, s obzirom na komplikovanu identifikaciju ricina u biološkim uzorcima, smatra se biomarkerom za intoksikaciju ricinusom, odnosno ricinom.</p> <p>Osnovni ciljevi ovog istraživanja su da se uz pomoć HS-GC metode i patohistološkom</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>analizom dokaže prisustvo ricinina u krvi laboratorijskih pacova u odnosu na vremenski interval koji je protekao od oralne aplikacije suspenzije do vremena žrtvovanja, da se odredi distribucija i koncentracija ricinina u organima laboratorijskih pacova u različitim vremenima žrtvovanja, kao i da se utvrdi da li postoji značajna razlika u razvoju patomorfoloških promena na organima laboratorijskih pacova u različitim vremenima žrtvovanja.</p> <p>Istraživanje je bilo otvoreno, randomizirano i prospektivnog tipa.</p> <p>Laboratorijski pacovi su u istom vremenu oralno tretirani suspenzijom koja je sadržaja subletalnu koncentraciju ricina. Nakon žrtvovanja u precizno definisanim vremenskim intervalima uzeti su uzorci krvi i unutrašnjih organa radi daljih analiza. Odgovarajući uzorci su analizirani metodom HC-GS u cilju određivanja koncentracije i distribucije ricinina, kao pouzdanog markera trovanja ricinom, u krvi i unutrašnjim organima. Takođe je izvršena patohistološka analiza uzoraka tkiva unutrašnjih organa u cilju utvrđivanja promena izazvanim delovanjem ricina u odnosu na vreme proteklo od aplikacije suspenzije. Dobijeni rezultati su obrađeni odgovarajućim statističkim metodama.</p> <p>Rezultati istraživanja omogućavaju standardizaciju postupaka odabira reprezentativnih uzoraka prilikom sumnje na trovanje ricinusom i metode dokazivanja akutnog trovanja. Na taj način može se pouzdano i efikasno dokazati trovanje ricinusom.</p> |
| Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP | 12.05.2016. |
| Datum odbrane: DO | |

| | |
|---|--|
| <p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p> | <p>predsednik: član: član:</p> |
|---|--|

University of Novi Sad
Faculty of Medicine

Key word documentation

| | |
|--------------------------------|---|
| Accession number: ANO | |
| Identification number: INO | |
| Document type: DT | Monograph documentation |
| Type of record: TR | Textual printed material |
| Contents code: CC | Ph.D. thesis |
| Author: AU | Radosav Radosavkić |
| Mentor: MN | Professor Vladimir Piliija, MD, PhD |
| Title: TI | Tissue and blood distribution toxicologically active compounds from castor bean (<i>Ricinus communis</i> L. 1753, Euphorbiaceae) and their forensic importance |
| Language of text: LT | Serbian latin |
| Language of abstract: LA | eng. / srp. |
| Country of publication: CP | Republic of Serbia |
| Locality of publication: LP | Vojvodina |
| Publication year: PY | 2017. |
| Publisher: PU | Author reprint |
| Publication place: PP | 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3 |
| Physical description: PD | Number of chapters 8/ pages 129/ pictures 69/ tables 12/ graphs 11/ references 271 |
| Scientific field SF | Medical science |

| | |
|-----------------------------|--|
| Scientific discipline SD | Forensic medicine |
| Subject, Key words SKW | Ricinus; Ricin; Alkaloids; Forensic Toxicology; Toxicokinetics; Gas Chromatography-Mass Spectrometry; Plant Poisoning; Morphological and Microscopic Findings; Animals, Laboratory; Autopsy; Forensic Medicine |
| UC | 340.66/.67:615.099 633.85:543.544]:612.085.1 |
| Holding data: HD | Library of Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad |
| Note: N | None |
| Abstract: AB | <p>Ricin is a naturally occurring protein, a toxin which belongs to the category of the most accessible and the most lethal poisons. It is obtained from the castor oil plant (<i>Ricinus communis</i>), whose seeds contain its highest content (1-5%). Ricin is also thought to be a potential weapon of bioterrorism and taking into account the risk for human health, it is classified as a biological weapon category B. Lately it has been used for the construction of the immunotoxins against tumor cells in the therapy of malignant diseases. Numerous poisonings using ricin have been documented, not only accidental poisoning, but also in case of suicides and homicides. In those cases, intact ricin seeds or extracted ricin were used.</p> <p>Apart from ricin, castor oil plants also contain a toxic alkaloid ricinine (0.3-0.8%). Castor oil plants are the only known natural source of ricinine, which is co-extracted with ricin from the seeds of this plant. Ricinine is simply detected in clinical samples by using the method of liquid chromatography and mass spectrometry. Taking into account a complicated identification of ricin in biological samples, it is considered to be a biomarker for the intoxication by castor oil plant, or ricin itself.</p> <p>The main aim of this research is to use the HS-GC method and pathohistological analysis in proving the existence of ricinine in the blood of experimental rats in relation to the time interval between the oral application of solution of castor seeds in water and the time of</p> |

| | |
|------------------------------|---|
| | <p>sacrificing, to determine the distribution and concentration of ricinine in the organs of experimental rats, as well as to establish whether there was a significant difference in the development of pathomorphological changes on the organs of experimental rats at various points of sacrificing.</p> <p>The research was open, randomised and prospective.</p> <p>Experimental rats were simultaneously orally tested by the solution which contained sublethal concentration of ricin. After sacrificing, blood samples were taken from inner organs in specifically defined intervals of time and used for further analysis. The appropriate samples were analysed by HC-GS method in order to determine the concentration and distribution of ricinine as a reliable marker of ricin poisoning in blood and inner organs. Also, pathohistological analysis of the samples of inner organ tissues was made with the purpose of establishing the changes caused by the effects of ricinine in relation to time which passed from the application of the solution. The obtained results were processed by appropriate statistical methods.</p> <p>The results of this research allow for the standardisation of the actions in selecting the representative samples in case there is a possibility of ricin poisoning and the method of proving the acute poisoning. Following these steps, ricin poisoning can be proved in a reliable and an efficient way.</p> |
| Accepted on Senate on: AS | 12.05.2016. |
| Defended: DE | |
| Thesis Defend Board: DB | president: member: member: |

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Ricinus – opšte karakteristike biljke..... | 1 |
| 1.1.1. Istorijat..... | 4 |
| 1.1.2. Upotreba..... | 4 |
| 1.2. Ricin..... | 6 |
| 1.2.1. Istorijat..... | 6 |
| 1.2.2. Toksičnost, toksokinetika, toksodinamika..... | 8 |
| 1.2.3. Struktura ricina..... | 9 |
| 1.2.4. Biosinteza ricina..... | 12 |
| 1.2.5. Unutarćelijski transport i mehanizam delovanja..... | 12 |
| 1.3. Ricinus komunis aglutinin..... | 16 |
| 1.4. Ricinin..... | 16 |
| 1.5. Simptomi i znaci trovanja ricinom..... | 18 |
| 1.5.1. Oralna intoksikacija..... | 18 |
| 1.5.2. Intramuskularna i supkutana intoksikacija..... | 19 |
| 1.5.3. Intravenska intoksikacija..... | 20 |
| 1.5.4. Inhalacija..... | 21 |
| 1.6. Slučaj trovanja Georgija Markova..... | 24 |
| 1.7. Slučajevi zloupotrebe ricina..... | 26 |
| 1.8. Slučajevi zadesnog trovanja ricinom..... | 30 |
| 1.9. Slučajevi namernog trovanja u cilju samoubistva..... | 33 |
| 1.10. Slučajevi trovanja životinja ricinom..... | 34 |
| 1.11. Primena ricina u tretmanu maligniteta..... | 36 |
| 1.12. Dijagnostikovanje trovanja ricinom..... | 38 |
| 1.13. Terapija u slučaju trovanja ricinusom..... | 39 |
| 1.14. Profilaksa trovanja..... | 40 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 41 |

| | |
|--|----|
| 3. RADNE HIPOTEZE | 42 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 43 |
| 4.1. Eksperimentalne životinje..... | 43 |
| 4.2. Analiza semena biljke <i>Ricinus communis</i> L..... | 43 |
| 4.3. Postupak pripreme semena biljke <i>Ricinus communis</i> L..... | 45 |
| 4.4. Eksperimentalni protokol..... | 45 |
| 4.4.1. Hemijsko-toksikološka analiza..... | 47 |
| 4.4.1.1. Postupak čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE - Solid Phase Extraction) bioloških uzoraka..... | 47 |
| 4.4.1.2. Kvantitativna GC-MS analiza..... | 48 |
| 4.4.1.3. Kvantitativna GC-MS analiza semena <i>Ricinus communis</i> L..... | 48 |
| 4.4.1.4. Kvantitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka..... | 49 |
| 4.4.2. Patohistološka analiza..... | 50 |
| 5. REZULTATI | 51 |
| 5.1. Koncentracija ricinina u organima eksperimentalnih životinja..... | 51 |
| 5.1.1. Koncentracija ricinina u krvi eksperimentalnih životinja..... | 51 |
| 5.1.1.1. Analiza povezanosti koncentracije ricinina u krvi i vremena žrtvovanja-regresioni model..... | 54 |
| 5.1.2. Koncentracija ricinina u plućima eksperimentalnih životinja..... | 56 |
| 5.1.2.1. Analiza povezanosti koncentracije ricinina u plućima i vremena žrtvovanja-regresioni model..... | 59 |
| 5.1.3. Koncentracija ricinina u bubrežima eksperimentalnih životinja..... | 61 |
| 5.1.3.1. Analiza povezanosti koncentracije ricinina u bubrežima i vremena žrtvovanja - regresioni model..... | 64 |
| 5.1.4. Koncentracija ricinina u jetri eksperimentalnih životinja..... | 66 |
| 5.1.4.1. Analiza povezanosti koncentracije ricinina u jetri i vremena žrtvovanja - regresioni model..... | 69 |
| 5.1.5. Koncentracija ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja..... | 71 |
| 5.1.5.1. Analiza povezanosti koncentracije ricinina u mozgu i vremena žrtvovanja-egresioni model..... | 74 |

| | |
|--|------------|
| 5.1.6. Međusobna korelacija koncentracija ricinina u organima eksperimentalnih životinja..... | 76 |
| 5.2. Patohistološka analiza uzoraka tkiva..... | 78 |
| 5.2.1 Patohistološki nalaz na organima eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja..... | 92 |
| 6. DISKUSIJA..... | 95 |
| 6.1. Analiza promene koncentracije ricinina u organima eksperimentalnih životinja u zavisnosti od vremena proteklog od aplikacije suspenzije..... | 95 |
| 6.2. Analiza progresije patohistoloških promena na organima eksperimentalnih životinja u zavisnosti od vremena proteklog od aplikacije suspenzije..... | 103 |
| 7. ZAKLJUČCI..... | 106 |
| 8. LITERATURA..... | 107 |

1. UVOD

1.1. RICINUS – opšte karakteristike biljke

Ricinus (*Ricinus communis*) je jednogodišnja ili višegodišnja biljka iz porodice *Euphorbiaceae* i jedna je od najotrovnijih poznatih biljaka. Poreklom je iz Severne Afrike, a vremenom je prenetu u Evropu, Aziju i Ameriku.^{1,2} U tropskim predelima raste kao višegodišnja drvenasta biljka i može dostići visinu od 10-12 m, dok se kod nas gaji kao jednogodišnja ukrasna biljka i, ukoliko mu uslovi odgovaraju, može dostići visinu od preko 2 m. Uopšteno govoreći, višegodišnje sorte ricinusa su visoke, dok su jednogodišnje sorte uglavnom patuljaste. Ricinus je u narodu poznat pod nazivima: veliki božur, hristova palma, crveni čičak, krpelj biljka, morska kudeljka i skočac.

Iako se gaji uglavnom u tropskim i suptropskim predelima, ricinus se može naći širom sveta, u predelima sa različitim klimatskim uslovima. Kod nas se najviše gaji u Banatu i Bačkoj. Najbolje uspeva na rastresitom i vlažnom zemljištu kao što je peščana ilovača, ali može da se gaji na gotovo svim tipovima zemljišta. Toleriše pH zemljišta u rasponu od 4.5 do 8.3. i godišnju temperaturu zemljišta od 7 do 27,8 °C.³ U pogledu fotoperioda ricinus je prevashodno biljka dugod dana. Može da se prilagodi i normalno cveta u uslovima trajanja dnevne svetlosti od 12 do 18 časova. Ukoliko je dnevna svetlost redukovana na manje od 9 časova rast i razvoj biljke je značajno usporen.⁴



Slika 1. Izgled biljke ricinusa

Ricinus je žbunasta biljka, visoka najčešće 1-4 m, uspravne i snažne stabljike (slika 1). Izgled biljke može da varira u zavisnosti od perioda rasta, boje lišća i stabljike, veličine i boje zrna i sadržaja ulja u zrnju.² Na biljci su najupečatljiviji krupni, zelenkasti listovi. Oni su cilindrični ili ovalni, nazubljene ivice, purpuraste petiole, naizmenično raspoređeni na dugim drškama.

Tokom jednog vegetativnog perioda boja listova može da se menja od zelene do crvene. Iako većina vrsta ima zelene listove, kod nas se uglavnom sreću one sa crvenim listovima, baš zbog svoje dekorativnosti.



Slika 2. Izgled cveta ricinusa

Cvetovi ricinusa su crveni, jednopolni, krupni, dužine 20-70 cm u zavisnosti od vrste i podneblja u kojem se biljka uzgaja, rastu najčešće u formi grozda i izgledom podsećaju na cvet čička (slika 2). Muški cvetovi rastu na kratkim drškama i nalaze se pri osnovi, dok su ženski cvetovi bez drške i nalaze se raspoređeni iznad muških.



Slika 3. Izgled mahune ricinusa

Plod ricinusa je u vidu mahuna grupisanih u grozdove. Mahune su crvene ili zelene, u zavisnosti od vrste ricinusa, prekrivene mekanim, oštrim bodljama (slika 3). Oblik mahune najviše podseća na kesten, s tim što su kod ricinusa bodlje blago savijene na vrhu. U svakoj mahuni nalaze se tri zrna.^{2,5,6,7}

Zrna su izdužena, ovalna ili približno četvrtasta, sa bradavičastim izraštajem na vrhu, tzv. karunkulom. Imaju gladak i sjajan omotač i beličasto jezgro. Mogu biti smeđa, smeđe-crvena, crvena ili crna (slika 4).



Slika 4. Izgled zrna ricinusa

Različite su veličine, dugačka od svega nekoliko mm do preko 250 mm i široka 5-16 mm. Takođe variraju u težini, pa tako 100 zrna može imati težinu od 9 g do 100 g.⁸ Varijacije ne postoje samo između različitih sorti, nego i između različitih grozdova na istoj biljci (slika 5). U suštini, što je manje zrna na biljci njihova težina se povećava.⁹ Kod nekih vrsta ricinusa zrno tokom rasta može imati period mirovanja od nekoliko meseci, a sveže zasađena zrna sazrevaju bez nekog posebnog tretmana pri uzgajanju. Uopšteno, biljke koje imaju veliko zrno sazrevaju brže nego biljke sa malim zrnom.¹⁰



Slika 5. Izgled zrna ricinusa

1.1.1. Istorijat

Poznato je da su ricinus uzgajali stari Egipćani, Rimljani i Grci, pre svega zbog lubrikantskih i laksativnih efekata ricinusovog ulja.^{11,12,13} Pominjao ga je antički lekar Hipokrat, a istoričar Herodot je pisao da su ricinusovo ulje koristili još Egipćani, za osvetljenje i kao melem. U I veku nove ere, grčki lekar i botaničar Dioskorid opisao je ricinus kao biljku i proces ekstrakcije masnog ulja. Plinije je istakao da je ricinusovo ulje korišćeno vekovima kao laksativno sredstvo. U srednjem veku, ricinus se koristio za lečenje oboljenja kože i kao lek posle odstranjivanja stranih tela iz povređenog oka. U Iranu, Indiji i Kini ricinusovo ulje se od davnina koristilo u medicinske svrhe kao laksativ, ali i kao gorivo za lampe.

Za vreme I svetskog rata ricinusovo ulje je zbog dobrih lubrikanstkih karakteristika imalo primenu u avionskoj industriji. Tokom II svetskog rata vlada Sjedinjenih američkih država je zbog nedostatka ricinusovog ulja subvencionisala poljoprivrednu proizvodnju ricinusa u Kaliforniji. To subvencionisanje proizvodnje bilo je na snazi do šezdesetih godina prošlog veka, kada je ricinusovo ulje zamenjeno sintetičkim.¹⁴

Ricinus se, takođe, od davnina koristio kao otrovno sredstvo za ubilačke i samoubilačke namene.¹³ Jedan od najbrutalnijih primera zloupotrebe ricinusa je upotreba ricinusovog ulja kao sredstva prinude i zlostavljanja od strane Musolinijevog režima u Italiji. Disidenti i protivnici režima bili su primoravani da unose ulje u velikim količinama, sa posledičnim teškim oštećenjima zdravlja koji su se često završavali smrtno.

1.1.2. Upotreba

Danas se ricinus industrijski gaji u tropskim i suptropskim predelima, pre svega u Brazilu, Indiji, Ekvadoru, Tajlandu i Etiopiji, ali se kao ukrasna biljka može naći širom sveta, nezavisno od klimatskih uslova.^{15,16,17} Godišnje se proizvede oko 1.000.000 metričkih tona zrna ricinusa (1 metrička tona=1000 kg).^{18,19}

Ricinus je najpoznatiji kao izvor ricinusovog ulja koje se dobija hladnim ceđenjem zrelog i oljuštenog semena. Seme ricinusa sadrži oko 40% ricinusovog ulja.²⁰ To je bistra, bezbojna ili svetložuta tečnost, slabog mirisa, blagog i neprijatnog ukusa, koja na temperaturi ispod nule prelazi u čvrsto stanje. Da bi se neutralisao neprijatan miris dodaju mu se razni korigenti koji daju miris limuna ili mentola. Pored ulja, seme sadrži i oko 20 %

belančevina, šećere, jabučnu kiselinu, 0,2 % otrovnog alkaloida ricinina i toksični albumin ricin, zbog koga je seme izrazito otrovno. Međutim, kako je ricin hidrosolubiln i inaktivise se na visokoj temperaturi, ricinusovo ulje je, nakon odgovarajuće termičke obrade, bezbedno za primenu.

Ricinusovo ulje je jedinstveno među biljnim uljima jer je jedini komercijalni izvor ricinolne kiseline. Sastoji se od estara koji sadrže glicerol i više masne kiseline.²¹ Ulje poreklom iz višegodišnjih biljaka ricinusa koristi se u industrijske svrhe, dok se ulje iz jednogodišnjih biljaka koristi u medicinske svrhe.²² Zbog visokog udela masne ricinolne kiseline (oko 80 %) ricinusovo ulje se koristi kao sirovina u proizvodnji lubrikanata, boja i lakova, mastila i tinti, ulja za lampe, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda, tečnosti za hidraulične kočnice, u proizvodnji insekticida itd.^{19,21-23} U poslednje vreme sve više se istražuje mogućnost proizvodnje biodizel goriva iz ricinusa. Zrno je nakon ekstrakcije ulja bogat izvor proteina i azota i koristi se kao dodatak ishrani stoke, ovaca, pilića i ribe, kao i za proizvodnju stočnih đubriva. Lišće ricinusa koristi se u ishrani stoke jer povećava prinos mleka. Takođe, dokazano je da lišće podstiče produkciju mleka kod dojilja ukoliko se nanese u vidu prethodno pripremljene smese preko grudi ili se popije kao sok.^{22,24-34}

Najpoznatija je primena ricinusovog ulja kao laksativnog sredstva u medicini. Ima blago i izuzetno efikasno laksativno dejstvo i pogodno je za primenu kod odojčadi i male dece, kao i u vreme trudnoće, jer ne nadražuje i ne izaziva grčeve. Zapravo, ricinusovo ulje je verovatno najbezbedniji i najpouzdaniji poznati laksativ u tretmanu opstipacije.²²

Skorašnja istraživanja pokazuju da ricinus ima širok spektar farmakoloških dejstava: snižava nivo glukoze u krvi kod laboratorijskih pacova, ima antimikrobno i antifungalno dejstvo kod pacijenata koji boluju od oralnog karcinoma, može da se koristi kao insekticid protiv termita, kao antioksidant, deluje antiinflamatorno i inhibiše peroksidaciju lipida te tako dovodi do eliminacije slobodnih radikala iz organizma, ima centralno analgetsko, antitumorsko i citotoksično dejstvo, a deluje i stimulatивно na koštanu regeneraciju.³⁵⁻⁴⁶ Međutim, široka upotreba ricinusa je ograničena zbog straha od intoksikacije toksinima koji se nalaze u zrnu, ricinom i ricininom, čak i pored njihove deaktivacije odgovarajućom obradom na visokoj temperaturi.

1.2. RICIN

Ricin spada među najsmrtonosnije poznate prirodne toksine i može da dovede do smrti za manje od jednog minuta nakon intoksikacije.⁴⁷⁻⁵⁰ To je proteinski otrov i ima molekulsku masu od 60-65 kDa.^{15,51} Nalazi se u semenu ricinusa i čini 1-5% ukupne težine semena.^{52,53} Prečišćeni ricin je beli prah bez boje, mirisa i ukusa, rastvorljiv u vodi. Stabilan je u širokom rasponu PH. Vodeni rastvor ricina inaktivira se zagrevanjem na 80°C u trajanju od 1h, a ako je u formi praha ili sirovoj formi za inaktivaciju je potrebna viša temperatura i duži period zagrevanja.⁵⁴⁻⁵⁶

1.2.1. Istorijat



Slika 6. Herman Stilmark

Prvi toksikološki rad na ricinu izveo je Herman Stilmark (slika 6) na Dorpat Univerzitetu u Estoniji 1888 godine. Stilmark je u okviru svoje doktorske disertacije, pod mentorstvom profesora Rudolfa Koberta, pokušavao da objasni na čemu se zasnivaju dobro poznata toksična svojstva ricinusa. U tom cilju pomešao je ekstrakt semena ricinusa sa krvlju i ustanovio da su eritrociti počeli da aglutinišu. Otkrio je da toksični efekti ricinusa potiču od proteina kojeg je nazvao ricin. Uspeo je da prečisti ricin u visokom stepenu i otkrio je da izaziva aglutinaciju eritrocita i precipitaciju serumskih proteina.⁵⁷ Smatra se da Stilmarkova doktorska disertacija predstavlja začetak nove naučne grane – lektinologije.

Pol Erlih je 1891. istraživao ricin i abrin u pionirskom istraživanju koje se smatra osnovom imunologije.⁵⁸ Erlih je vođen saznanjem da indijski farmeri vekovima dodaju u ishranu stoke male količine zrna abrusa kako bi je zaštitili od trovanja abrinom. Zbog toga je govedima oralno davao malu dozu ricinusa, a potom nastavio vakcinisanje potkožnim injekcijama toksina. Eksperimentima na serumima

imunizovanih životinja Erlih je dokazao da je imunitet specifičan, povezan sa serumskim proteinima i može da se prenese preko mleka na potomke.

Do sredine 20. veka vladalo je slabo interesovanje za toksine poreklom iz biljaka jer je sva pažnja bila usmerena na bakterijske toksine. Otkriće da inhibiše sintezu proteina i eventualno može imati značajnu ulogu u tretmanu malignih oboljenja ponovo je usmerilo pažnju na ricin. Eksperimentima na kunićima dokazano je da ricin sprečava elongaciju novonastajućeg polipeptidnog lanca i na taj način dovodi do inhibicije sinteze proteina.⁵⁹

Krajem I svetskog rata Centar za hemijsko naoružanje u Sjedinjenim američkim državama razmatrao je ricin kao potencijalno biološko oružje, sa ciljem da se ricin upotrebi kao oružje za masovno uništenje. Imajući na umu izuzetno visoku inhalatornu toksičnost ricina vršeni su eksperimenti sa adherisanjem ricina na šrapnele i stvaranje oblaka aerosola prilikom eksplozije bombi.⁶⁰

Tokom II svetskog rata vojske Sjedinjenih američkih država i Velike Britanije ponovo su radile na stvaranju bombe koja sadrži ricin (šifrovano ime je bilo „supstanca W“ ili „W bomba“). Pored obavljenih testiranja bomba nikad nije upotrebljena tokom ratnih dejstava, a sa proizvodnjom materijala je nastavljeno sve do sedamdesetih godina prošlog veka, tačnije 1975. kada je doneta Konvencija o zabrani razvoja, produkcije i skladištenja biološkog naoružanja.^{7,61-63} Postoje podaci da je Irak proizvodio i koristio ricin u ratu protiv Irana.^{64,65} Danas je ricin zabranjena supstanca na osnovu Povelje o hemijskom oružju i Povelje o biološkom oružju, a njegovo posedovanje i prečišćavanje je pod striktnom kontrolom Organizacije za zabranu hemijskog oružja (OPCW).

Zbog visoke toksičnosti, široke rasprostranjenosti i lake dostupnosti biljke, kao i relativno lake pripreme sirovog ekstrakta iz semena, ricin se danas ubraja u potencijalne bioterorističke agense. Zbog toga je od strane Centra za kontrolu i prevenciju bolesti svrstan u B kategoriju potencijalnih bioterorističkih supstanci.^{66,67}

Poslednjih godina ricin se, s obzirom na inhibišući efekat sinteze proteina, istražuje kao mogući agens u hemoterapiji određenih formi karcinoma.⁶⁸⁻⁷¹ Problem u ovim istraživanjima predstavljaju ozbiljne nuspojave terapije, kao što su nespecifična hepatotoksičnost i sindrom povećane vaskularne propustljivosti, nastale usled neselektivnog vezivanja ricina za ćelije.⁷²⁻⁷⁵

1.2.2. Toksičnost, toksokinetika, toksodinamika

Delovanje ricina je vremenski i koncentracijski zavisno.^{76,77} Prvi simptomi javljaju se 4-6 časova nakon intoksikacije, ali vreme pojave simptoma može biti odloženo i do 10 časova.^{12,78-80}

Intravenska aplikacija:

Kod miševa, srednja letalna doza (LD50) iznosi 2-8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,^{77,81-86} kod pacova 0,35-0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kod zečeva 0,03-0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i kod pasa 1,65-1,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$.⁸⁵ Kod ljudi LD50 je 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a minimalna letalna doza je između 0,7-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.⁷

Intraperitonealni aplikacija:

Kod miševa LD50 varira od 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 36 $\mu\text{g}/\text{kg}$.^{42,76,82,86,87}

Inhalacija:

Kod miševa 2,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 9,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kod dve različite vrste miševa.^{49,88} Kod pacova 3,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 9,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$.^{48,89,90} Kod ljudi 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.⁷

Oralna aplikacija:

Ricin je oko 1000 puta manje toksičan kada se unese oralno u odnosu na untravenski put unošenja, odnosno inhalaciju. Srednja letalna doza kod miševa je 30 mg/kg ,^{86,91,92} a kod pacova 20-30 mg/kg . Kod ljudi nakon oralnog unošenja ricina srednja letalna doza je 1-20 mg/kg .^{7,93-95}

Razlike u toksičnosti ricina potiču od više faktora: regiona u kom se biljka uzgaja, godišnjeg doba i stadijuma rasta u kom se biljka nalazi (stadijuma germinacije), veličine, težine i vlažnosti semena, kao i stepena mastikacije semena. Pored toga, toksičnost ricina zavisi i od starosti i težine pacijenta, komorbiditeta i želudačnog sadržaja.^{12,51,52,78, 94,96-99} Poznato je da su na delovanje ricina najosetljiviji konji, a najmanje su osetljivi živina i žabe.^{7,51} Broj zrna ricinusa koje je potrebno uneti u organizam da bi se izazvali ozbiljni simptomi trovanja kod čoveka varira od jedne polovine zrna pa sve do 30 zrna.^{12,78} Prema literaturnim podacima, najmanji broj oralno unetih zrna koji je izazvao smrt kod čoveka bio

je 2 zrna.⁷⁸ Maksimalna količina ricina koja se može dobiti iz jednog zrna je oko 10 mg, što odgovara maksimalnoj dozi od oko 140 µg/kg telesne težine.⁵²

Toksični efekti ricina najviše zavise od načina - puta unošenja u organizam. Smatra se da je ricin 1000 puta toksičniji kada se unese intravenski ili inhalacijom nego oralno.^{7,52} Niža toksičnost ricina prilikom oralne ingestije ukazuje na slabu apsorpciju ili moguću delimičnu enzimsku razgradnju u želucu. Na životinjskom modelu pokazano je da je 24 časova nakon oralnog uzimanja velika količina unetog ricina nađena u debelom crevu, što ukazuje na to da se on neapsorbovan eliminiše putem fecesa. Veća toksičnost kod drugih puteva unošenja mogla bi se objasniti širokom rasprostranjenošću receptora za toksin na površini određenih tipova ćelija. Resorpcija ricina preko kože malo je verovatna, osim ukoliko koža nije prethodno povređena.^{88,100,101}

Prilikom oralnog unošenja zrna ricinusa od presudnog značaja za oslobađanje ricina je njihova delipidacija i varenje. Ukoliko se zrna progutaju cela, bez žvakanja, rizik od intoksikacije je vrlo mali jer zrna imaju čvrst omotač, poput školjke, te prolaze neoštećena kroz digestivni trakt. Sažvakano i nedevojlno zrelo zrno ricinusa je neuporedivo toksičnije nego nesažvakano i zrelo zrno.^{102,103}

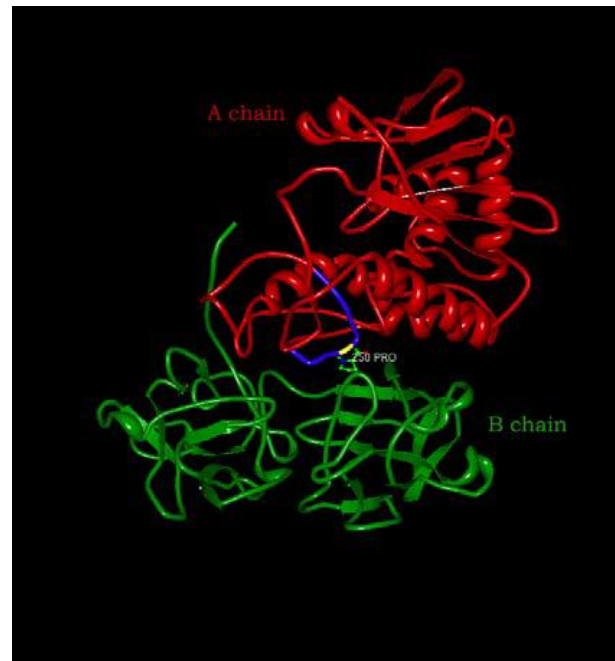
Ricin se, 2 časa nakon ingestije, resorbuje u krvne i limfne sudove. Akumulira se u jetri u slezini. Eksperimentalno je dokazano da se ricin može detektovati u fecesu 2 časa nakon oralne ingestije semena, dok se oko 45% unete količine ricina eliminiše nepromenjeno. Ricin unet u vidu supkutane ili intramuskularne injekcije eliminiše se urinom tokom naredna 24 časa, pri čemu je eliminacija fecesom u tom slučaju manja od 2%.^{7,86,104}

1.2.3. Struktura ricina

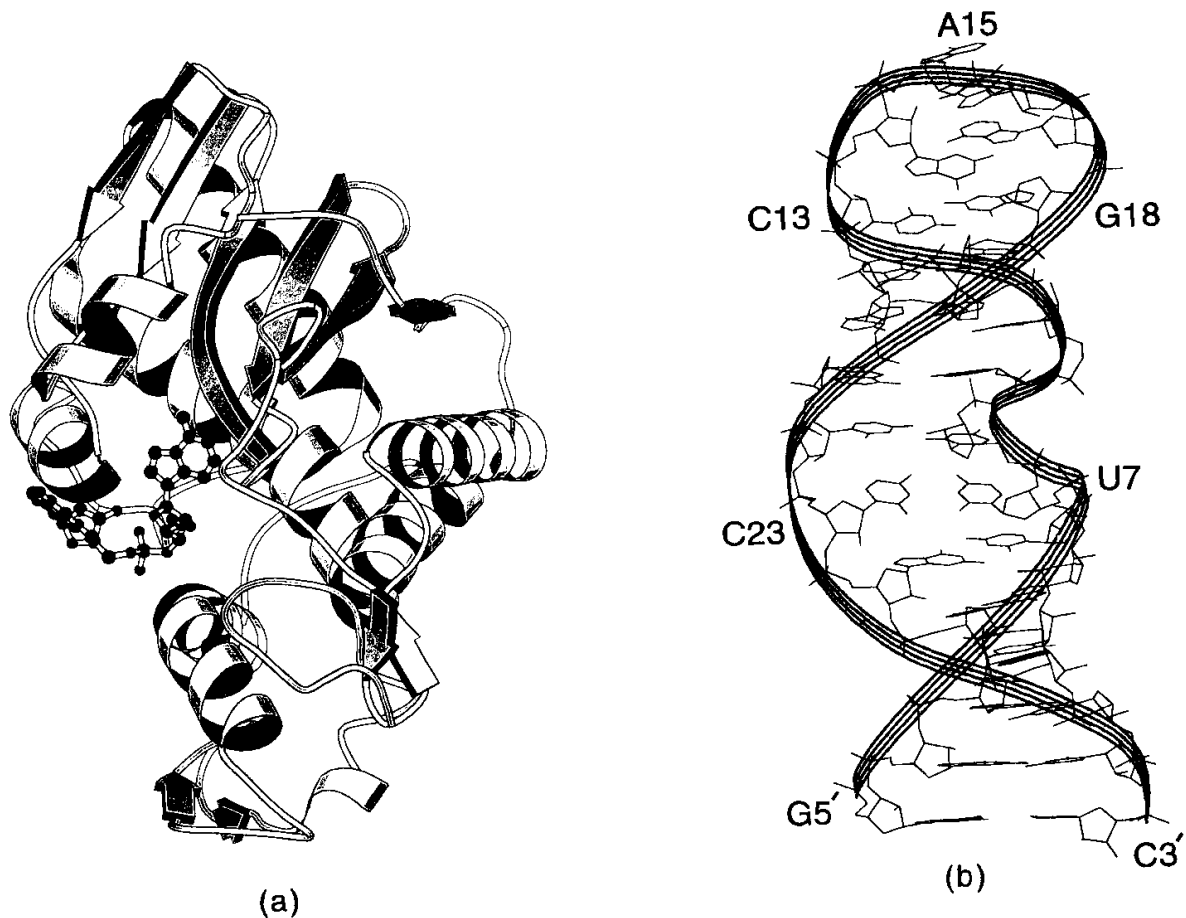
Ricin spada u grupu najefikasnijih prirodnih toksina koji dovode do inaktivacije ribozoma, što kao posledicu ima ćelijsku smrt.⁵¹ Zapravo, ricin je verovatno prvi identifikovani ribozom-inaktivirajući protein (RIP) i prema klasifikaciji spada u II klasu ove grupe proteina (RIP II).¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Ricin je tipičan predstavnik takozvanih AB toksina, koji se sastoje od dva lanca (A i B podjedinica) kao što su i toksin difterije, botulinum toksin i toksin antraksa (slika 7). Sastoji se od A lanca koji je enzimski aktivan i ima molekulsku težinu od (32 kDa) i šećer-

vezujućeg B lanca sa molekulskom težinom od 34 kDa, povezanih disulfidnom vezom.^{58,104,108-110}



Slika 7. Kristalografska struktura ricina. Enzimski aktivan A lanac je crven, dok je vezujući B lanac zelen. Hidrofobni region A lanca je označen plavim, a prolin P250 žutim. A lanac ricina je zapravo N-glikozidna hidrolaza. Sastoji se od 267 amino kiselina sa tri strukturna domena i gotovo 50% polipeptida organizovanih u 8 alfa-heliksa i 8 beta-listova.¹¹¹⁻¹¹⁴ Tri strukturna domena formiraju isturenu pukotinu - aktivno mesto koje okupira adeninski prsten supstrata (Slika 8).



Slika 8. Struktura A lanca ricina.

B lanac je lektin sastavljen od 262 aminokiseline. Formiran je u obliku osovine i ima sposobnost da se vezuje za terminalne galaktozne ostatke (rezidue) na ćelijskoj površini. Veći broj oligosaharidnih ostataka, kao što su N-acetilglukozaminski i galaktozni ostaci na glikolipidima i glikoproteinima, receptori su za B lanac ricina. Ovi oligosaharidi su široko rasprostranjeni na ćelijskoj površini sisara. Dokazano je da se 10^6 do 10^8 molekula ricina može vezati za jednu ćeliju. Takođe, smatra se da jedan molekul ricina može inaktivisati oko 2000 ribozoma u minuti, te je jasno da ulazak samo nekoliko molekula ricina u citosol ima dramatične efekte na ćeliju. U suštini, sposobnost ricina da dospe u citosol zavisi upravo od interakcije između B lanca i već spomenutih oligosaharidnih ostataka. ^{81,106,109,115-124}

1.2.4. Biosinteza ricina

Biosinteza ricina odvija se u endospermalnim ćelijama zrelog ricinusovog semena, gde se ricin skladišti u subcelularnim vakuolama nazvanim proteinska tela. Ricin se najpre sintetise kao preproricin sastavljen od zrelih A i B lanaca, zajedno sa aminoterminalnom signalnom sekvencom. Ova sekvenca se cepa nakon ulaska preproricina u endoplazmatski retikulum. U endoplazmatskom retikulumu dolazi do enzimske modifikacije preproricina koja se odvija na četiri lokacije, po dve na svakom A i B lancu. Aktivnošću disulfid-izomeraze formira se pet disulfidnih veza, četiri u okviru B lanca i jedna koja povezuje A i B lanac. Preproricin nema enzimsku aktivnost zato što B lanac blokira enzimski aktivno mesto A lanca. Oligosaharidna modifikacija preproricina odvija se u Goldžijevom kompleksu pre njegovog transporta u proteinska tela. Toksin se nalazi uskladišten u proteinskim telima dok zrelo seme ne počne da klija. Nakon nekoliko dana klijanja preproricin podleže procesu hidrolize, a od nastalih aminokiselina stvara se enzimski aktivan protein – ricin.¹²⁵⁻¹³⁴

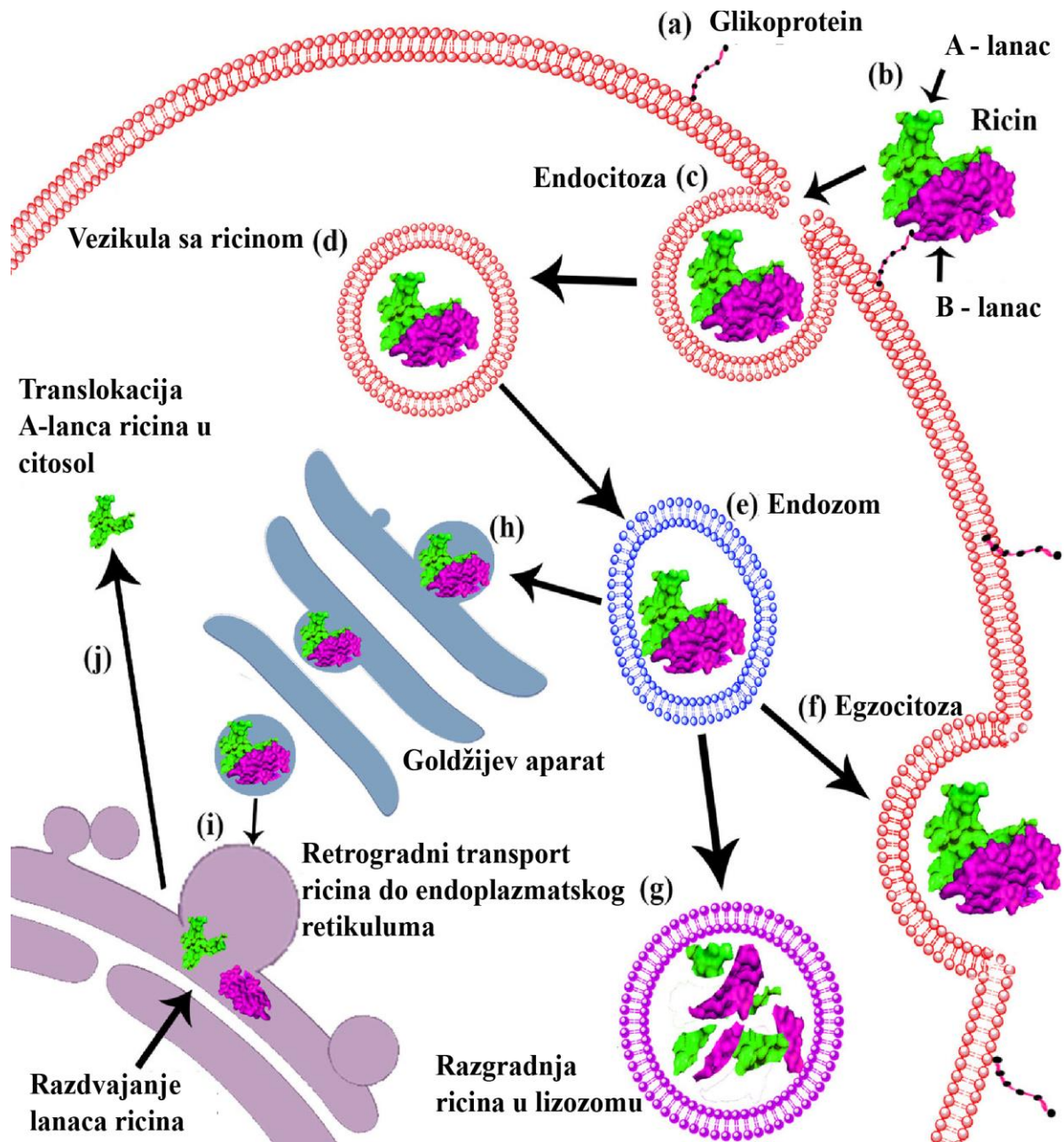
1.2.5. Unutarćelijski transport i mehanizam delovanja

Nakon vezivanja B lanca za oligosaharidne ostatke na površini ćelije, ricin se u ćeliju preuzima endocitozom. Pošto se vezuje za različite komponente na ćelijskoj površini može da se unese različitim načinima endocitoze. Klattrin-zavisna endocitoza je prvi opisan način ulaska ricina u ćeliju, dokumentovan na Vero ćelijama (bubrežne ćelije afričkog zelenog majmuna). Endocitoza ricina može biti posredovana klattrin-nezavisnim i kaveole-nezavisnim mehanizmom, a eksperimentalno je dokazano da ricin može podleći mehanizmu endocitoze čak i kada je holesterol ekstrahovan iz ćelijske membrane.¹³⁵⁻¹⁴²

Nakon ulaska u ćeliju ricin najpre dospeva do ranih endozoma. Veći deo unetog ricina se potom vraća nazad na ćelijsku površinu, gde započinje proces njegove degradacije. Ricin se potom prenosi do kasnih endozoma - lizozoma gde se završava njegova degradacija. Samo mali deo ricina (oko 5%) transportuje se od ranih endozoma do Goldžijevog aparata i taj transport je regulisan nivoom intracelularnog kalcijuma. Šiga toksin je prvi toksin za koji je dokazan transport od ćelijske površine preko endozoma do Goldžijevog aparata i endoplazmatskog retikuluma. Kasnije je isti tip retrogradnog transporta dokazan i za kolera toksin i ricin.¹⁴³⁻¹⁵³

Transport ricina do Goldžijevog aparata predstavlja ključnu tačku u slučajevima intoksikacije i to je dokazano eksperimentima u kojima je korišćen Brefeldin A, supstanca koja izaziva raspadanje Goldžijevog aparata. U spomenutim eksperimentima dokazano je da Brefeldin A potpuno blokira transport ricina do Goldžijevog aparata i na taj način prevenira oštećenje ćelija. Druga supstanca koja deluje na transport ricina do Goldžijevog aparata je monensin. I u eksperimentima u kojima je korišćena ova supstanca dokazano je da toksični efekat ricina korelira sa njegovim transportom do Goldžijevog aparata. Pored ovoga, dokazano je da je na temperaturi ispod 18°C transport toksina do organela inhibiran i da su ćelije tako zaštićene od delovanja ricina.¹⁵⁴⁻¹⁵⁹

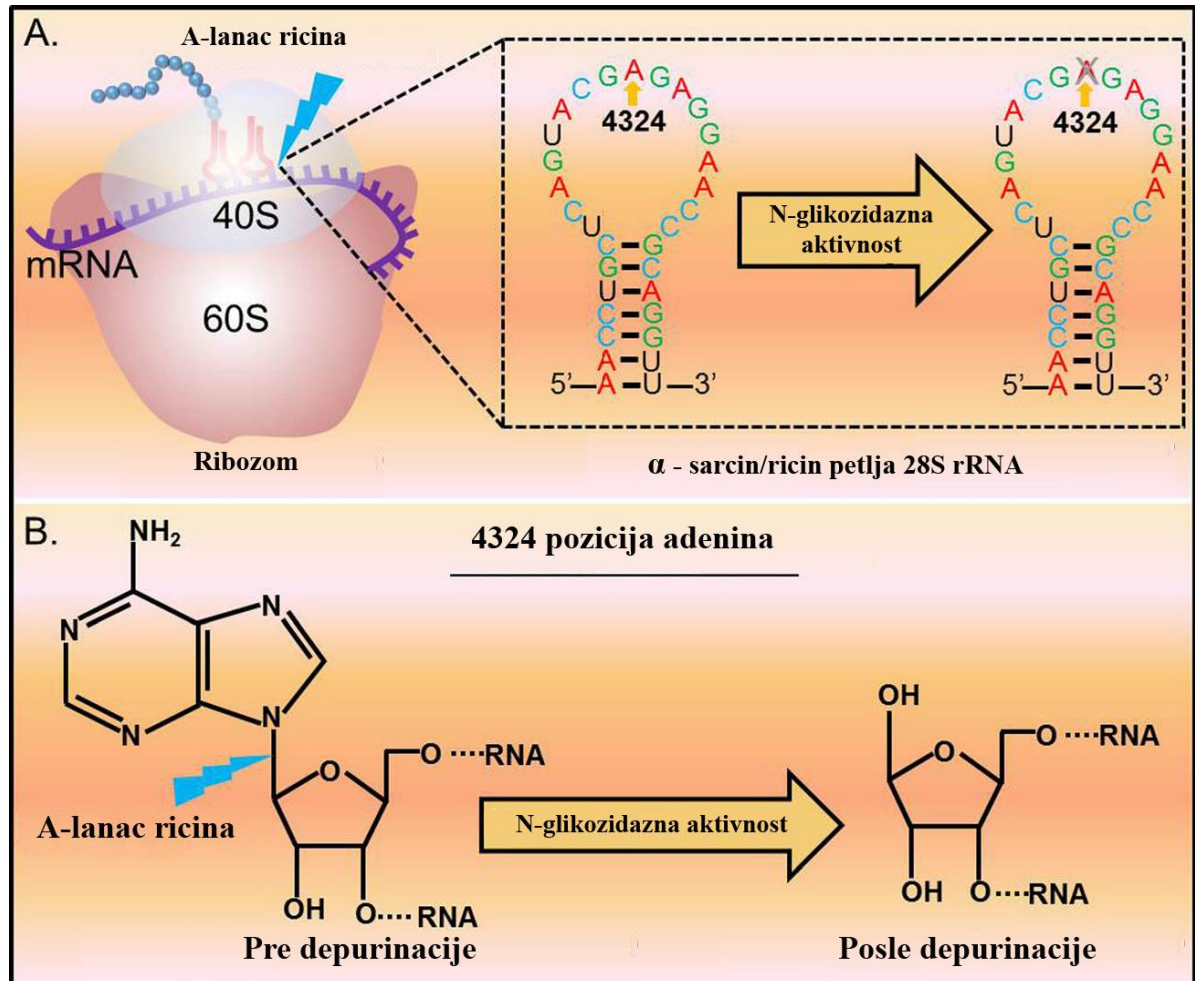
Ricin se transportuje od Goldžijevog aparata do endoplazmatskog retikuluma posredstvom jednog ili više pratećih proteina, najverovatnije kalretikulina. U endoplazmatskom retikulumu ricin još uvek grade A i B lanac povezani disulfidnom vezom. Delovanjem disulfidne izomeraze dolazi do cepanje disulfidne veze i razdvajanja lanaca. A lanac podleže procesu koji se naziva „proces degradacije povezan sa endoplazmatskim retikulumom“ tokom kojeg pod dejstvom protein-disulfid-izomeraze dolazi do redukcije A lanca odstranjenjem nepotrebnih proteina. Tek nakon ovog procesa A lanac se transportuje u citosol. Nakon retranslokacije u citosol A lanac se vezuje za ribozomalnu stabljiku (*Ribosomal Stalk Protein*) na ribozomima (slika 9).¹⁶⁰⁻¹⁶⁷



Slika 9. Proces ulaska u ćeliju i intracelularni transport ricina. a) Ricin se vezuje za receptore na ćelijskoj površini pomoću B lanca (b) i ulazi u ćeliju procesom endocitoze (c,d,e). Nakon endocitoze veći deo molekula ricina vraća se na ćelijsku površinu (f) dok se određena količina ricina razgradi nakon spajanja endozoma i lizozoma (g). Oko 5% unete količine ricina transportuje se retrogradno do Goldžijevog kompleksa (h) i potom do Endoplazmatskog retikuluma (i). U endoplazmatskom retikulumu dolazi do razdvajanja A i

B lanca, a lanac A se oslobađa u citosol gde započinje njegovo citotoksično dejstvo inhibicijom sinteze proteina u ribozomima.

Ciljno mesto delovanja ricina je 28S ribozomalna RNA u 60S subjedinici ribozoma, gde dolazi do cepanja specifičnog adeninskog ostatka označenog sa A4324. Naime, adeninski prsten biva uklješten između dva tirozinska prstena u katalitičkoj pukotini enzima, te dolazi do njegove hidrolize N-glikozidaznom aktivnošću A lanca (slika 10). Na taj način se blokira vezivanje faktora-2 elongacije i samim tim sinteza proteina. Pored inhibicije sinteze proteina opisano je još nekoliko mehanizama delovanja ricina kao što su indukcija apoptoze, direktno oštećene ćelijske membrane, izmena strukture i funkcije ćelijske membrane i oslobađanje medijatora zapaljenja iz grupe citokina.¹⁶⁸⁻¹⁷²



Slika 10. Mehanizam delovanja ricina: U citosolu A lanac ricina inaktiviše ribozome depurinacijom 28S ribozomalne RNA u 60S podjedinici ribozoma. a) Ricin pomera adenin

sa pozicije 4324 alfa sarcin/ricin petlje 28S ribozomalne RNA svojom N-glikozidaznom aktivnošću b) Izgled adeninskog 4324 mesta pre i posle depurinacije N-glikozidaznom aktivnošću A lanca

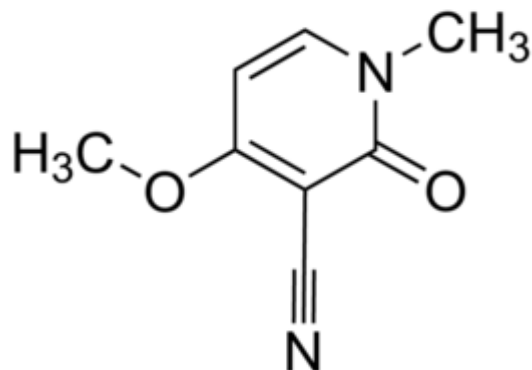
1.3. RICINUS KOMUNIS AGLUTININ

Razumevanje ricina komplikovano je prisustvom homolognog proteina, Ricinus komunis aglutinina. Istovremeno postojanje dva vrlo slična proteina dokazano je nakon unapređenja metoda separacije i molekulske identifikacije dva različita gena. Takođe je dokazano da se familija gena za ricin sastoji od 6-8 gena.^{81,130,173,174}

Ricinus komunis aglutinin je sličan ricinu, ali ima znatno niži stepen toksičnosti. Dok se ricin sastoji iz po jednog A i B lanca i ima molekulsku masu od 60 kDa, ricinus komunis aglutinin se sastoji od dva A i dva B lanca i ima molekulsku masu od 120 kDa. Iako se oba proteina vezuju za identične oligosaharide na ćelijskoj površini, ricin pokazuje selektivno i specifično vezivanje za N-acetilglukozaminske oligosaharide, za razliku od aglutinina čije je vezivanje neselektivno. Ovaj protein nije direktno citotoksičan, smatra se da ima 100-2000 puta nižu toksičnost nego ricin i ta razlika u citotoksičnosti najverovatnije potiče zbog razlike u vezivanju B lanca ricina i aglutinina. Sa druge strane, ricinus komunis aglutinin pokazuje mnogo snažnije hemaglutininsko dejstvo nego ricin. Ima snažan afinitet za eritrocite, te dovodi do aglutinacije i posledične hemolize. Slabo se resorbuje iz želuca i prouzrokuje signifikantne hemolitičke efekte samo nakon intravenske aplikacije.^{51,76,81,175-183}

1.4. RICININ

Pored visokotoksičnog proteina ricina i mnogo manje toksičnog ricinus komunis aglutinina u ricinusu se nalazi još jedna toksična supstanca, alkaloid ricinin. Ricinin (1,2-dihydro-4-methoxy-1-methyl-2-oxo-3-pyridine-carbonitrile) je piperidinski alkaloid male molekulske mase (MW=164.2 g/mol) (slika 11).



Slika 11. Hemijska struktura ricinina

Otkrio ga je Tuson u semenu ricinusa dok je istraživao medicinski aktivne sastojke biljke, pre nego što je ricin bio otkriven. Isti istraživač mu je dao ime ricinin. Nakon toga je otkrivena njegova hemijska struktura kao i biosinteza i metabolizam.¹⁸⁴⁻¹⁸⁷

Ricinin se može pronaći u svim delovima biljke, a pre svega u zrnu i lišću. Smatra se da se u zrnu ricinusa nalazi oko 0,3 - 0,8 % ricinina. Ricinus je jedini poznati prirodni izvor ricinina, koji se zajedno sa ricinom ekstrahuje iz semena biljke. Nivo ricinina u biljci opada sa starenjem biljke. Takođe je dokazano da se nivo ricinina snižava u listovima biljaka koji su bili zaštićeni od svetla, dok su listovi koji su bili izloženi svetlu pokazivali uobičajen, pa čak i nešto povećan nivo ricinina.^{188,189}

Ricinin može da izazove mučninu, povraćanje, različite toksične reakcije uključujući oštećenja jetre i bubrega, konvulzije, hipotenziju i eventualno smrtni ishod.^{16,190} Na eksperimentalnom životinjskom modelu ricinin prouzrokuje hiperaktivnost, kloničko-tonične grčeve i posledično smrt usled respiratornog zatajivanja. Posедуje izuzetno jaka insekticidna svojstva i u nekim državama se koristi kao sredstvo za istrebljivanje mrava. Zbog stimulativnog delovanja na kognitivne funkcije danas se razmatra upotreba ricininina u lečenju amnezije.¹⁹¹ Srednja letalna doza ricinina kod miševa je 340 mg/kg prilikom intraperitonealne aplikacije i 3 g/kg prilikom oralne aplikacije.¹⁶ Ricinin se lako ekstrahuje iz bioloških uzoraka i može se koristiti kao marker za dokazivanje intoksikacije ricinom.^{188,190,192}

1.5. SIMPTOMI I ZNACI TROVANJA RICINOM

Eksperimenti sprovedeni na životinjama pokazuju da simptomi trovanja i patološke promene na organima u slučajevima intoksikacije ricinom zavise, pre svega, od puta unošenja ricina u organizam.

1.5.1. Oralna intoksikacija

Ricin je najmanje toksičan prilikom oralnog unošenja u organizam, pre svega zbog loše apsorpcije toksina i moguće delimične enzimске razgradnje u digestivnom traktu. Eksperimentalno (na životinjskom modelu) dokazano je da 24 časa nakon oralnog uzimanja veći deo unetog ricina može da se registruje u debelom crevu.¹⁰⁰

Slučajevi oralne intoksikacije ricinom povezani su sa ingestijom semena ricinusa, a ozbiljnost intoksikacije zavisi pre svega od stepena mastikacije semena. Zrna koja su progutana cela – nesažvakana mogu proći neoštećena kroz digestivni trakt jer opna sprečava oslobađanje toksina, dok žvakanje semena dovodi do pucanja opne i njegovog oslobađanja. Literaturni podaci pokazuju da se većina slučajeva ingestije semena ricinusa u Sjedinjenim američkim državama ne završava fatalno, sa nekoliko opisanih slučajeva smrtnog trovanja ricinom u drugim državama.¹⁹³

U slučajevima oralne intoksikacije semenom ricinusa simptomi trovanja se obično javljaju nekoliko časova nakon ingestije. Prvi simptom je najčešće orofaringealna iritacija, praćena povraćanjem, bolovima u truhu i dijarejom. Mogu se javiti i hematemeza, dijareja praćena krvarenjem ili melena. Ovi simptomi praćeni su gubitkom tečnosti i elektrolitskim disbalansom, koji se manifestuju u vidu hipotenzije, tahikardije, tahipneje, znojenja, dehidracije i periferne cijanoze. Često se registruju znaci početnog oštećenja bubrežne funkcije koje može progredirati do teškog oštećenja. U ozbiljnijim slučajevima intoksikacije razvija se hipovolemijski šok praćen oligurijom i anurijom, eventualno i proteinurijom i hematurijom, a u urinu se mogu registrovati hijaline formacije.^{12,93,94,95,194,195}

U slučajevima oralne intoksikacije delovanju ricina naročito su podležne ćelije retikuloendotelnog sistema, kao što su makrofagi i Kupferove ćelije, a to se objašnjava prisustvom manoznog receptora na površini navedenih ćelijskih tipova.¹⁹⁶ U većini slučajeva javlja se određeni stepen prolaznog oštećenja jetre, koje se laboratorijski

manifestuje povećanom aktivnošću jetrenih transaminaza i laktat-dehidrogenaze, dok se povišene vrednosti bilirubina registruju u izolovanim slučajevima. Karakteristično je da test jetrene funkcije može ostati u normalnim granicama čak i više dana nakon intoksikacije. Drugi simptomi i znaci intoksikacije uključuju dezorijentaciju, konfuziju, malaksalost, glavobolju, grčeve u mišićima, konvulzije, intravaskularnu hemolizu, bradikardiju, hipertoniju, miozu, midrijazu i zamagljen vid.^{12,51,78,80,93-95}

U laboratorijskim nalazima najčešće se registruju metabolička acidoza, leukocitoza, hiperglikemija ili hipoglikemija, hipofosfatemija i povišena aktivnost kreatin kinaze. Mogu se uočiti promene u EKG-u, to su najčešće prolazni EKG poremećaji u vidu produženja QT intervala ili nepravilnosti u intraventrikularnom sprovođenju i one su najverovatnije posledica metaboličkih poremećaja.^{78,94,197}

U fatalnim slučajevima trovanja ricinom smrt nastupa trećeg dana ili nešto kasnije zbog multiorganskog zatajivanja. Praktično svi do sada dokumentovani ozbiljni ili fatalni slučajevi trovanja ricinom imali su istu kliničku sliku: naglo nastala (manje od nekoliko časova) mučnina, povraćanje i bolovi u truhu praćeni dijarejom, krvarenjem iz debelog creva, anurijom, grčevima, dilatacijom zenica, groznicom, žeđanjem, suvim grlom, glavoboljom, vaskularnim kolapsom i posledičnim razvojem šoka. Do smrtnog ishoda obično je dolazilo nakon nekoliko dana. Najčešći obdukcioni nalaz prilikom oralne intoksikacije ricinusom bio je: multifokalne ulceracije i krvarenje na sluznici želuca i tankog creva, nekroza mezenterijalnih limfnih žlezda, slezine i jetre, te difuzni splenitis i nefritis.⁶¹

1.5.2. Intramuskularna i supkutana intoksikacija

Intramuskularna ili supkutana injekcija visokih doza ricina kod ljudi kao posledicu ima ozbiljnu nekrozu limfnog tkiva, krvarenje u digestivnom traktu (tanko crevo), nekrozu jetre, difuzni nefritis i difuzni splenitis. Na mestu administracije ricina može se razviti teška nekroza tkiva, što predstavlja predisponirajuće mesto razvoja sekundarne infekcije praćene razvojem septičnog stanja.¹⁹⁸

U literaturi je opisan slučaj dvadesetogodišnjeg muškarca koji je pokušao samoubistvo supkutanim ubrizgavanjem rastvora ricinusa. Primljen je u bolnicu 36 časova nakon injekcije i konstatovana je generalizovana slabost, mučnina, vrtoglavica, glavobolja,

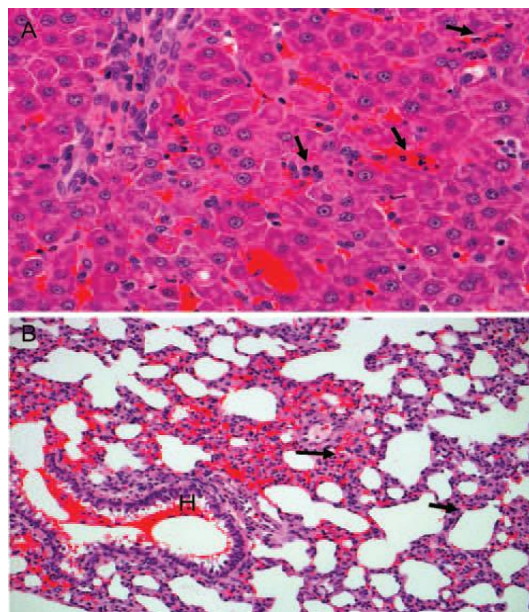
bol u grudima i trbuhu, mialgija sa parestezijama u ekstremitetima. Detaljnom pretragom su utvrđeni hipotenzija, anurija, metabolička acidoza i hematohezija (prisustvo sveže krvi u stolici). Vrlo brzo se razvila hemoragijska dijateza sa oštećenjima funkcije jetre i bubrega. Uprkos intenzivnom tretmanu pacijent je doživeo srčani zastoj, a mere reanimacije su bile bezuspešne. Obdukcijom su nađeni krvareći fokusi u mozgu, miokardu i pleuri.¹⁹⁹

U drugom slučaju, tridesetšestogodišnji hemičar je sebi intramuskularno ubrizgao dve injekcije napravljene od po jednog zrna ricinusa. Pretpostavlja se da je ubrizgao oko 150 mg ricina. Kao što je ranije navedeno, maksimalna količina ricina koja se može dobiti iz jednog zrna je oko 10 mg, što odgovara maksimalnoj dozi od ne više od 140 µg/kg telesne težine. 10 časova nakon injekcije pacijent se žalio na glavobolju i mišićnu ukočenost, a nakon toga javili su se anoreksija i mučnina, sinusna tahikardija, crvenilo oko mesta uboda na koži i lokalna limfadenopatija. Laboratorijskim pretragama utvrđena je povišena vrednost jetrene transaminaze. Pacijent je, uz odgovarajuću simptomatsku terapiju, nakon 10 dana otpušten iz bolnice.²⁰⁰

1.5.3 Intravenska intoksikacija

Prilikom eksperimentalnog proučavanja ricina kao hemoterapeutskog agensa intravenski je aplikovan ricin u dozi od oko 0,5 µg/kg. U tim slučajevima pacijenti su imali simptome slične prehladi sa izraženom malaksalošću, umorom i bolovima u mišićima, te mučninom i povraćanjem u manjoj meri.²⁰¹ U eksperimentima u kojima je A lanac ricina proučavan u tretmanu maligniteta najznačajnija nuspojava je bio „sindrom povećane vaskularne propustljivosti“, sa pojavama kao što su hipoalbuminemija, povećane težine povezano sa tkivnim edemima, poremećaji plućne funkcije, efuzija pleure i perikarda, edem pluća, bubrežna insuficijencija, poremećaj rada srca i hipotenzija. Ostali simptomi uključivali su slabost, malaksalost, bolove u mišićima usled povišenih vrednosti kreatin kinaze, bolove u zglobovima, trombocitopeniju i povremeno alergijsku reakciju koja se javljala prilikom intravenske administracije – infuzije. U studiji od 56 pacijenata tretiranih A lancem ricina, kod 12 pacijenata je istraživanje prekidano ili završeno zbog ozbiljnih neželjenih efekata, a 2 pacijenta su preminula zbog „sindroma povećane vaskularne propustljivosti“.^{202,203}

Prilikom intravenzne administracije ricina kod pacova histopatološkom analizom dokazana je neutrofilna infiltracija u jetrenim sinusoidima, uz izraženu vaskularnu kongestiju. U plućima je bila prisutna vaskularna kongestija, neutrofilna infiltracija i fokalna krvarenja u alveolama (slika 12).²⁰⁴



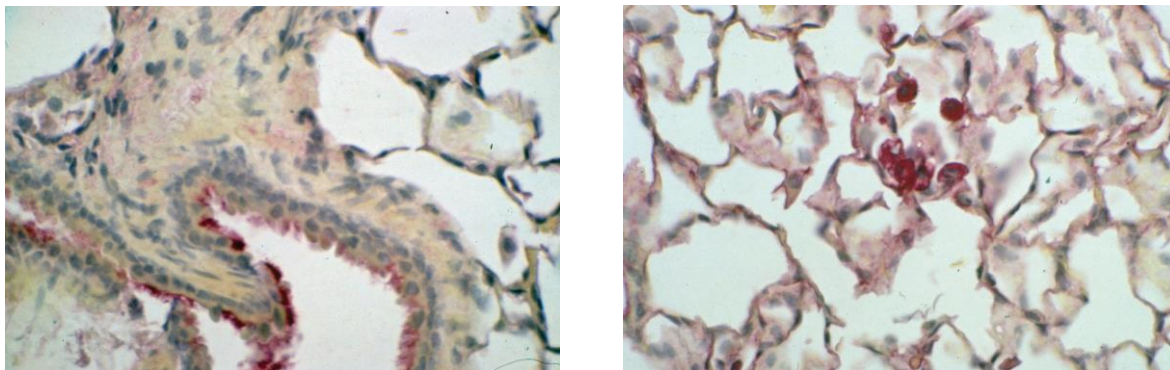
Slika 12. Neutrofilna infiltracija i krvarenje u jetri i plućima pacova nakon intravenzne aplikacije ricina

Novija istraživanja pokazuju da intravenska administracija ricina dovodi do naglog porasta nivoa insulina u krvi, praćenog razvojem hipoglikemije. Navedeni mehanizam može da dovede do smrtnog ishoda 12-36 časova nakon unošenja ricina u organizam.²⁰⁵

1.5.4. Inhalacija

Dokumentovana je pojava alergijske reakcije kod radnika izloženih prašini, koji su radili na poljima ricinusa. U kliničkoj slici karakteristična je nagla pojava kongestije gornjih disajnih puteva praćenih kihanjem, svrabom u očima, urtikarijama na koži i osećajem stezanja u grudima.²⁰⁶ U mnogo ozbiljnijim slučajevima u plućima se registruje vizing koji može da traje nekoliko časova i bude uvod u razvoj bronhijalne astme. Kod osoba izloženih aerosolu ricina stanje se popravlja primenom simptomatske terapije i sklanjanjem iz okoline u kojoj se nalazi alergen. Ovi pacijenti kasnije mogu da imaju

pozitivan kožni test, poseduju specifična IgE antitela na ricinus i pozitivno odgovaraju na inhalatorni test polenom koji sadrži ricinus. Eksperimenti na miševima su pokazali da se udahnuti ricin taloži u dušniku i plućima, a ricinski depoziti su zavisni od veličine partikula aerosola. Imunohistohemijski eksperimenti na pacovima izloženim aerosolu ricina pokazali su da se udahnuti ricin vezuje za cilijarne ćelije bronhijalnog epitela, alveolarne makrofage i alveolarne granične ćelije (slika 13).⁴⁹

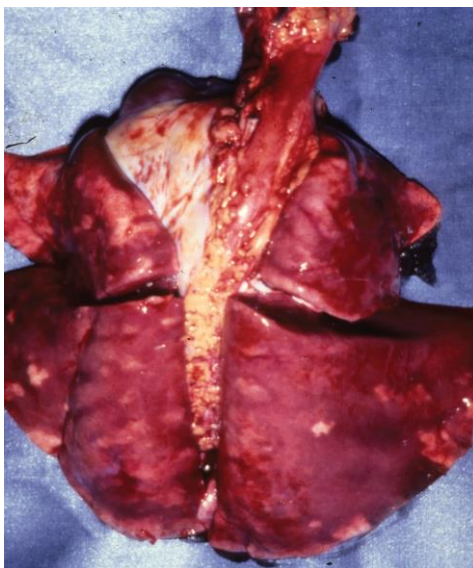


Slika 13. Ricin u plućima pacova nakon udisanja aerosola

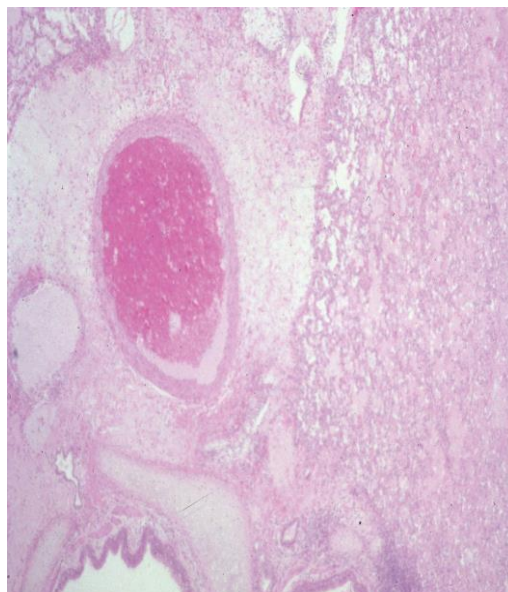
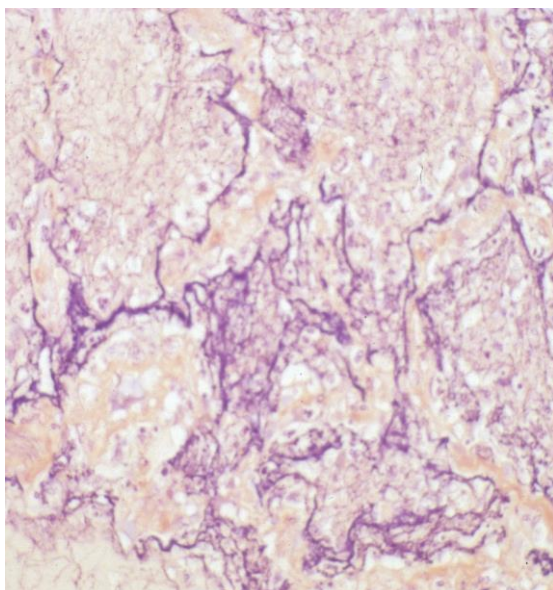
Inhalacija aerosola kod pacova dovodi do difuzne nekrotizirajuće pneumonije, sa intersticijalnom i alveolarnom inflamacijom i edemom.²⁰⁷ U prvih 8 časova nakon inhalacije aerosola nema značajnih promena na plućima. Oko 12 časova nakon inhalacije dolazi do porasta broja inflamatornih ćelija i nivoa ukupnih proteina, što ukazuje na povećanu propustljivost respiratorne membrane i citotoksični efekat na ćelije. Ovaj nalaz na plućima u korelaciji je sa porastom nivoa inflamatornih parametara u krvi. Nakon 18 časova dolazi do pojave tečnosti u alveolama, kao i povećanja volumena ekstravaskularne plućne tečnosti, sve do 30 časova od izlaganja. Posle 30 časova prisutni su arterijska hipoksemija i acidoza, sa znatnim porastom količine alveolarne tečnosti. Simptomi inhalacije aerosola ricina kod sisara zavisni su od doze, a vreme do pojave prvih simptoma može biti 8-24 časova. Nakon toga se javlja anoreksija i progresivno smanjivanje fizičke aktivnosti. Smrt nastupa 36-48 časova od izlaganja aerosolu.

U eksperimentu na majmunima pokazano je da su sve životinje imale akutnu srednju do tešku fibrinopurulentnu pneumoniju, sa različitim stepenima nekroze i akutne

inflamacije disajnih puteva, difuznom tečnošću u alveolama i peribronhijalnim edemom, akutnim traheitisom i purulentnim mediastinalnim limfadenitisom (slike 14 i 15).²⁰⁸

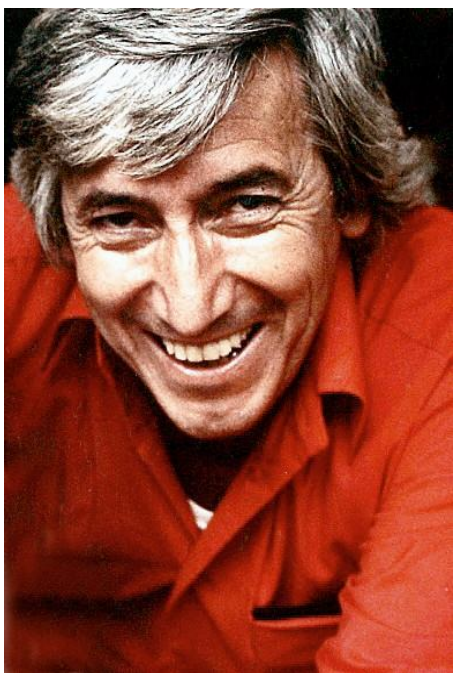


Slika 14. Pluća majmuna izloženog aerosolu ricina. Pluća su edematozna, sa udruženom nekrozom i krvarenjima



Slika 15. Pluća majmuna izloženog aerosolu ricina. Histološki, mikroskopske promene se karakterišu fibropurulentnom pneumonijom, kao i perivaskularnim i peribronhijalnim edemom.

1.6. SLUČAJ TROVANJA GEORGIJA MARKOVA



Slika 16. Georgi Markov

Markov, bugarski disident, rođen je 1929. u Sofiji (slika 16). Studirao je industrijsku hemiju, ali je bio poznat kao dramski pisac i novelist. Borio se protiv komunističkog režima u Bugarskoj i mnoga njegova dela bila su zabranjena za objavljivanje zbog kritika uperenih protiv komunista i njihovog lidera Todora Živkova. Markov je napustio Bugarsku 1969. Najpre je otišao u Italiju, a potom se nastanio u Londonu gde je radio kao radio voditelj i novinar u bugarskoj sekciji BBC-a. U Londonu je nastavio da piše protiv bugarskog režima, a sam njegov odlazak je značio da je postao nepoželjan u svojoj domovini. Sve do 1989. bilo je zabranjeno da se njegovo ime spomene u bugarskim medijima. Zbog stalnih i sve žešćih kritika Markov je postao neprijatelj komunističke partije. U prilog tome govori dokument sa kojeg je nedavno skinuta oznaka poverljivosti i u kome se bugarska tajna služba žalila ruskom KGB-u zbog negativnog uticaja koji Markov ima po partiju time što ohrabruje pobunu. Markov je bio pod prismotrom tajnih službi, o čemu svedoči dokument pod kodiranim imenom „*Wanderer*“ i u to vreme je dobijao telefonskim putem vreme smrti.

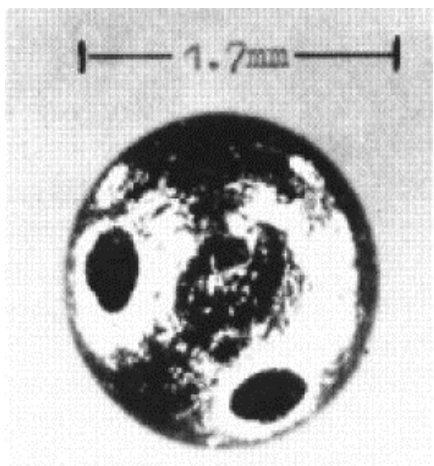
7. septembra 1978. oko 13,30 časova, dok je čekao na autobuskoj stanici na putu za posao, Markov je iznenada osetio oštar bol u zadnjem delu desnog lista, koji je kasnije opisao kao da je ubod insekta. Uočio je čoveka pored sebe koji je sklapao kišobran i izvinuo mu se sa upadljivim stranim akcentom pre nego što je užurbano prešao ulicu i ušao u taksi (Slika 17). Nakon što je došao na posao Markov je osećao jak bol u listu i uočio je crvenu tačku nalik na bubuljicu na zadnjoj strani lista. Takođe je uočio krv na pantalonama. U sledećim satima osećao se sve lošije, a tegobe su se pogoršale iste večeri, sa pojavom temperature i povraćanja. Sledećeg dana u 11,13 časova Markov je primljen u bolnicu gde je zabeleženo da je odavao utisak teškog bolesnika. Imao je visoku temperaturu, puls mu je

bio ubrzan i pravilan, a krvni pritisak u granicama normale. Uočene su uvećane limfne žlezde u desnoj preponi kao i polje inflamacije prečnika 6 cm, sa ubodnom tačkom prečnika 2 mm u centru na zadnjoj strani desnog lista. Pacijentovo stanje se naglo pogoršavalo, praćeno padom krvnog pritiska, te je bila postavljena dijagnoza septičnog šoka. Sledećeg dana puls je bio ubrzan oko 160/min, a pacijent je bio pothlađen, sa znojenjem i poremećajem svesti, te znatnim povećanjem broja leukocita u krvi. Uskoro se pojavilo učestalo povraćanje krvavog sadržaja praćeno anurijom. Četvrtog dana u bolnici na EKG-u je bio uočljiv kompletan blok provođenja, a srčani zastoj je nastupio u 9,45 časova. Zanimljivo je da se napad na Markova dogodio baš 7. septembra, kada je rođ endan bugarskog diktatora Todora Živkova.



Slika 17. Shematski prikaz kišobrana kakvim je ubijen Markov

Prilikom obdukcije je potkožno, u desnom listu Markova, pronađena metalna kuglica, prečnika 1,53 mm (Slika 18). Analizom je utvrđeno da je kuglica napravljena od



Slika 18. Kuglica sa ricinom

smese koja je sadržala 90% platine i 10% iridijuma. Kuglica je imala dve male rupe, svaka prečnika 0,34 mm. Utvrđeno je da je šupljina u kuglici u koju se mogao smestiti otvor bila zapremine 0,28 mm³. Međutim, iz kuglice nije bilo moguće izolovati bilo kakvu otrovnu supstancu. Pretpostavka je da su rupe na kuglici bile prekrivene nekom vrste šećerne smese, stvarajući mehurić u šupljinama kuglice u kom je bio smešten otrov. Ovaj „prekrivač“ je bio dizajniran tako da se istopi na telesnoj temperaturi

od 37°C. Kada je kuglica dospela u telo Markova šećerni prekrivač se otopio i otrov je dospao u krvotok. Kako ricin nije bilo moguće dokazati dijagnoza trovanja postavljena je na osnovu simptoma i izuzetno visoke toksičnosti za tako malu zapreminu otrova. Da bi se potkrepila postavljena dijagnoza izveden je eksperiment na svinji kojoj je aplikovana nešto veća doza ricina nego što se pretpostavljalo da je u Markovljevom slučaju.²⁰⁹ Vrlo brzo, posle nekoliko časova, životinja je razvila identične simptome bolesti kao Markov i uginula je nakon 26 časova. Na taj način je zaključeno da je Markov ubijen sitnom metalnom kuglom u kojoj je bilo 0.2 - 0.5 mg ricina. Kišobran kojim je Markov ubijen nikada nije pronađen, kao ni neposredni izvršilac atentata, uprkos zajedničkim istragama Britanskih i Bugarskih zvaničnika, uključujući Interpol. Veruje se da je za tehničku podršku atentata odgovoran KGB, uz nekoliko oficira Bugarske tajne policije.

1.7. SLUČAJEVI ZLOUPOTREBE RICINA

Pored slučaja ubistva Georgija Markova dokumentovan je niz drugih slučajeva zloupotrebe ricina.

- Avgust 1981, Virdžinija, SAD

14. Avgusta 1981. dvostruki agent CIA Boris Korčak ustreljen je sitnom kuglicom iz vazdušne puške u bubreg. U kuglici se nalazio ricin. Korčak i CIA bili su uvereni da je ovo delo KGB-a jer je on uspeo da se infiltrirše duboko u njihovu tajnu organizaciju i oštetiti ih za milione dolara. Korčak je preživeo ovaj napad, što se pripisuje činjenici da je pogođen u bubreg, te je njegovo telo tretiralo projektil kao kamen u bubregu.

- April 1993, Aljaska, SAD

U aprilu 1993. Thomas Levi je uhapšen na graničnom prelazu sa Kanadom dok je pokušavao da prokrijumčari 130 g ricina. Tvrdio je da je ricin nabavio kako bi trovao kojote na svojoj farmi pilića.

- Januar 1997, Viskonsin, SAD

U kući Tomasa Lihija otkriven je veći broj toksičnih supstanci, nakon što je izvršen pretres jer je Lihi ustrelio sina u lice. Među hemikalijama je pronađeno 0,67 grama ricina i nikotina pomešanih sa rastvaračem, što bi ovim supstancama omogućilo da prodru kroz kožu i izazovu smrtne posledice. Takođe, pronađene su knjige koje se odnose na proizvodnju hemijskih i bioloških agenasa. Lihi je navodno rekao svojoj sestri da je nameravao da otrovom natopi žilete i pošalje ih svojim neprijateljima kako bi se oni posekli i bili izloženi otrovu.

- April 1997, SAD

Istražitelji su pretresli kuću Džejsma Daltona Bela, inženjera elektrotehnike, i otkrili veći broj hemikalija, uključujući natrijum-cijanid, diizopropil-fluorofosfat i niz korozivnih kiselina. Naknadnom analizom kompjuterskih fajlova otkriveno je da je Bel održavao komunikaciju posredstvom elektronske pošte sa prijateljem Robertom Istom, koji je izrazio želju da dobije ricinus kako bi izdvojili ricin. Bel je prethodno pribavio adrese od blizu 100 službenika FBI-a i drugih državnih agencija. Bio je u procesu produkcije hemijskih i bioloških agenasa kada je uhvaćen.

- Mart 1998, Mičigen, SAD

Tri člana frakcije severnoameričke militantne grupe uhapšena su zbog optužbi o oružanoj zaveri. U njihovim domovima otkriven je arsenal oružja i kasete posebnog formata, koja je sadržala instrukcije kako napraviti bombu i slično terorističko oružje, uključujući i deo o tome kako ekstrahovati ricin iz ricinusa.

- Novembar 1999, Tampa, SAD

Agenti FBI uhapsili su 53-godišnjeg stanovnika Kolorada Džejsma Keneta Glaka, zbog pretnji ubistvom sudskih zvaničnika. On je poslao pismo od 10 stranica na adresu više sudija u kojem je pretio da će ih ubiti biološkim agensom. Pretresom njegove kuće otkriveno je da je posedovao supstance neophodne da napravi ricin, iako sam ricin nije pronađen.

- Avgust 2001, Rusija i Čečenija

Ruska federalna služba bezbednosti saopštila je da je presrela razgovor između dva čečenska komandanta na terenu, u kome su razmatrali korišćenje otrova protiv ruskih trupa. Ruske vlasti su upale u dom jednog od njih i zaplenile dokumente o tome kako koristiti otrovne agense za kontaminaciju robe široke potrošnje, malu hemijsku laboratoriju, oružje i uputstva u kojima se objašnjava kako izolovati ricin iz ricinusa.

- Avgust 2002, Ansar al-Islam

Prema izveštajima Ansar al-Islama, sunitska militantna grupa bila je uključena u testiranje otrova i hemikalija, uključujući ricin. Grupa je navodno na magarcima i pilićima testirala aerosol ricina, mada neki podaci govore i o testiranju na ljudima.

- Januar 2003, Velika Britanija

5. januara 2003. policija je pretresla stan u severnom Londonu i uhapsila šest Alžiraca zbog proizvodnje ricina, kao deo plana napada na londonski metro. Prilikom racije ricin nije pronađen.

- 2003, pisma u SAD.

Paket i pismo u koverti kontaminiranoj ricinom presretnuti su u Grinvilu, Južna Karolina. (15). Takođe, ricin je pronađen u pošti u Beloj kući u Vašingtonu u novembru 2003. Pismo je presretnuto u objektu za poštu u podzemlju Bele kuće i nikad nije stiglo na nameravanu adresu. U pismu je bila praškasta supstanca za koju je dokazano da je zapravo ricin.

- Januar 2006, Ričmond, SAD

U januaru 2006. u kući u predgrađu Ričmonda pronađen je ricin u obliku ricinusove kaše. Osumnjičeni je izolovao toksin s namerom da ubije bivšu suprugu.

- Februar 2008, Las Vegas, SAD

U februaru 2008. Rodžer Fon Bergendorf pronađen je u motelu u Las Vegasu u kritičnom stanju. Nakon 2 nedelje u njegovom prtljagu je pronađeno oružje, anarhističke

knjige i nekoliko bočica ricina. Nakon buđenja iz kome, Bergendorf je optužen za posedovanje biološkog oružja.

- Januar 2009, Sijetl, SAD

Menadžer 11 barova za homoseksualce u području Sijetla je dobio anonimno preteće pismo u kome pošiljalac tvrdi da poseduje 67 g ricina koji će biti raspoređen u 5 identičnih patrona u cilju ubistva osoba homoseksualne orijentacije.

- Jun 2009, Engleska

U junu 2009. izvršen je pretres kuće oca i sina Jana i Nikija Dejvisona i tom prilikom je u zatvorenoj tegli od džema u kuhinjskom ormariću pronađen ricin. Hapšenja oca i sina su usledila posle dugotrajnog obaveštajnog rada protiv ekstremne desničarske aktivnosti.

- Novembar 2011, Džordžija, SAD.

FBI je uhapsio četiri čoveka u Džordžiji jer su nameravali da biološkim oružjem ubiju veći broj ljudi, uključujući političare, javne ličnosti i nedužne civile. Oni su bili pripadnici lokalne militantne grupe i verovali su da moraju da počine ubistva kako bi spasili zemlju. Planirali su da raseju 10 kg ricina po nekoliko velikih gradova, a takođe su razmatrali mogućnost da raspu ricin iz aviona iznad Vašingtona.

- April 2013, Vašington, SAD

16. aprila 2013. koverat koji je bio pozitivan na ricin je presretnut u objektu pošte u Vašingtonu. Koverat je bio upućen kancelariji senatora Rodžera Vikera. Sledećeg dana je koverat poslat predsedniku Baraku Obami i bio je pozitivan na ricin. Još jedno pismo pozitivno na ricin bilo je poslato na adresu sudije u Misisipiju.

- Maj 2013, SAD

U maju 2013. američka glumica Šenon Ričardson pozvala je policiju i optužila svog supruga da je poslao ricin nekolicini političara. Istražitelji su ustanovili da je ricin zapravo

poslala Šenon, s namerom da napakosti suprugu sa kojim je bila u procesu razvoda. Šenon je priznala da je poslala tri pisma, od čega jedno na adresu predsednika Baraka Obame.

- Mart 2014, Pensilvanija, SAD

21. marta 2014. tada 19-godišnji Nikolas Helman uhapšen je jer je poslao rođendansku čestitku koja je sadržala ricin momku sa kojim se viđala njegova bivša devojka.

- Jul 2015, Liverpool

Muhamed Ali iz Liverpula osuđen je zbog pokušaja nabavljanja hemijskog oružja. U januaru 2015. Ali je putem interneta pokušao da kupi 500 mg ricina na crnom tržištu, ali je zapravo bio u kontaktu sa FBI agentom i poslat mu je bezopasni beli prah.

1.8. SLUČAJEVI ZADESNOG TROVANJA RICINOM

Doze ricina unetog prilikom zadesnog i namernog trovanja nisu precizno definisane. One variraju u zavisnosti od većeg broja faktora: veličine, težine i procenta vlage semena; sorte, regiona, starosti i perioda razvoja biljke u vreme uzimanja semena; stepena mastikacije semena, želudačnog sadržaja, starosti osobe, komorbiditeta.^{12,51,52,78,94,96-98} Simptomi trovanja mogu varirati od blagih do vrlo ozbiljnih, uključujući i nastupanje smrtnog ishoda, a prevashodno zavise od broja unetih zrna, odnosno unete količine ricina. Prema literaturnim podacima broj unetih zrna koji je doveo do smrtnog ishoda kod ljudi varira od jednog do preko 30 zrna.⁷

Stilmark je izvršio reviziju slučajeva trovanja ricinom do 1900. godine,⁵⁷ dok su Balint, Rauber i Challoner obradili 700 slučajeva trovanja do 1990. godine.^{12,51,78} Slučajevi akcidentalnog trovanja ricinom najčešći su među decom i uglavnom se događaju usled nepažnje, pri čemu su deca obično privučena neobičnim i atraktivnim izgledom biljke i samog zrna.²¹⁰ Akcidentalno trovanje kod odraslih nastaje iz radoznalosti ili usled slučajne i pogrešne pretpostavke da se radi o nekoj drugoj biljci. Uopšteno, u svim opisanim slučajevima simptomi trovanja bili su vrlo slični, nezavisno od načina unošenja ricina u organizam (oralno, parenteralno ili intramuskularno unošenje). Nakon latentnog perioda od nekoliko časova (3-20 časova) javlja se bol u trbuhu, mučnina, povraćanje, dijareja koja je

ponekad praćena krvarenjem iz debelog creva, bol u mišićima i zglobovima, malaksalost, grčevi, a nešto kasnije dolazi do sloma cirkulacije, dispneje i dehidracije. Biohemijski testovi se karakterišu povećanjem nivoa leukocita, uree i kreatinina, jetrenih enzima (AST, ALT), što upućuje na poremećaj funkcije jetre i bubrega.

Slučajevi trovanja ricinom su najčešći u regionima u kojima se ricinus uobičajeno uzgaja, te je lako dostupan. Prema bolničkim podacima iz Šri Lanke, u periodu 1984-2001. dogodilo se 46 slučajeva zadesnog trovanja ricinusom među decom. Nijedan od opisanih slučajeva nije bio fatalan. Kod svih pacijenata kao simptomi trovanja navedeni su bolovi u stomaku, praćeni povraćanjem i dehidracijom.²¹¹ U Indiji je opisano 57 slučajeva trovanja ricinom u periodu 1962-1965. sa istim simptomima kao u Šri Lanki.²¹²

Podaci ukazuju na očiglednu opasnost od trovanja, posebno kod dece, kada se ricinus gaji kao ukrasna biljka ili se koristi za izradu ukrasnih predmeta. U Sjedinjenim američkim državama opisan je slučaj iz 1980. kada je dečak, igrajući se ogrlicom napravljenom od zrna ricinusa, nenamerno progutao 4 zrna. Dovežen je u bolnicu gde je hitno izvršena gastrolavaža, uz tretman aktivnim ugljem. Dečak je napustio bolnicu nakon 7 časova.⁷⁹

U Vojvodini je 2009. registrovan slučaj trovanja ricinom kod deteta koje je tokom igre unelo nepoznat broj zrna ricinusa. U uzorku urina identifikovan je ricinin, te je tako indirektno potvrđeno trovanje ricinom. Uz primenjenu simptomatsku terapiju dete je nakon nekoliko dana u dobrom opštem stanju otpušteno iz bolnice.

Na Malti je opisan slučaj čoveka starije životne dobi koji je primljen u bolnicu sa perzistentnim povraćanjem i dijarejom nakon što je pojeo 10 zrna, kasnije identifikovanih kao zrna ricinusa. Pacijent je bio dehidriran, tahikardan i hipotenzivan. Nakon odgovarajuće simptomatske terapije potpuno se oporavio nakon 7 dana.²¹³ U Australiji 1995. mlađi muškarac je iz radoznalosti sažvakao 10-15 zrna ricinusa. Primljen je na urgentno odeljenje sa bolom u truhu i stalnim povraćanjem. Nakon tretmana aktivnim ugljem, emeticima i sredstvima za nadoknadu volumena bio je otpušten iz bolnice nakon 3 dana.¹⁹⁴ U Velikoj Britaniji 1992. je čovek, po zanimanju hemičar, ubrizgao sebi vodeni rastvor napravljen od jednog zrna ricinusa. Nije imao suicidalne namere već je to učinio iz radoznalosti. Analizom preostalog ekstrakta utvrđeno je da je ubrizgao oko 150 mg ricina. Kao simptomi i znaci trovanja registrovani su jaka glavobolja i rigiditet poprečno-prugaste

muskulature, oštećenje jetre i povišena telesna temperatura u trajanju od 8 dana. Potpuno se oporavio nakon 10 dana.²⁰⁰

Američka asocijacija centara za kontrolu trovanja objavila je 45 od preko 2.000.000 slučajeva trovanja biljkama u period 1983-2009. među kojima je opisan samo jedan smrtni slučaj trovanja ricinusom.²¹⁴ Podaci Centra za toksikološke informacije u Švajcarskoj uključuju 130 ozbiljnih slučajeva trovanja biljnim otrovima u periodu 1966-1994. Od svih slučajeva 3 slučaja se odnose na trovanje ricinusom i nijedan nije bio fatalan.²¹⁵

Ricinus se od davnina koristi u medicinske svrhe, te su opisani slučajevi neželjenih reakcija prilikom njegove upotrebe. U Južnoj Koreji je opisan slučaj žene koja je pojela 5 zrna ricinusa u cilju lečenja opstipacije. Primljena je u bolnicu u teškom stanju, sa mučninom, povraćanjem, bolovima u stomaku i hipotermijom. Ricin je otkriven u uzorku urina, a pacijentkinja je nakon simptomatske terapije otpuštena iz bolnice nakon 2 dana.²¹⁶

Poznat je slučaj čoveka u Japanu koji je kupio seme ricinusa s namerom da leči reumatske tegobe. Prevideo je da su zrna bila namenjena za spravljanje dermalne suspenzije u obliku masti te je progutao oko 30 zrna. Narednog dana na prijemu u bolnicu imao je dijareju, povraćanje i bol u trbuhu. Lečen je aktivnim ugljem i nadoknadom tečnosti uz inicijalno ispiranje želuca, a nakon 8 dana otpušten je iz bolnice.²¹⁷

U Omanu je čovek pojeo jedno zrno ricinusa kao tradicionalan lek protiv kašlja. Nakon inicijalnog povraćanja primljen je u bolnicu konfuzan i dezorijentisan, usporenog refleksa zenica, midrijatičan i tahikardan. Nakon 2 dana simptomatske terapije njegovo stanje se normalizovalo.²¹⁸

Posebno zanimljiv slučaj intoksikacije ricinom dogodio se 2009. u Sjedinjenim američkim državama. Medicinski radnik koji nije imao licencu pacijentkinji je slučajno, umesto silikona, ubrizgao injekciju od 500 ml ricinusovog ulja radi uvećanja grudi. Vrlo brzo su se pojavili simptomi i znaci trovanja uključujući groznicu, tahikardiju, hemolizu, trombocitopeniju, hepatitis, respiratorni distress i anuriju. Nakon primenjenih intenzivnih mera lečenja pacijentkinja je otpuštena iz bolnice 11 dana kasnije, ali je provela na dijalizi još skoro 2 meseca. I u ovom slučaju ricin je otkriven u uzorku urina.²¹⁹

1.9. SLUČAJEVI NAMERNOG TROVANJA U CILJU SAMOUBISTVA

Do sada je opisano više slučajeva kada je ricinus unet u organizam namerno, u svrhu samoubistva. U najvećem broju slučajeva radi se o unosu ekstrakta zrna ricinusa u organizam, najčešće intravenski ili intramuskularno. Smrtni slučajevi prilikom intoksikacije ricinom uglavnom se vezuju za vreme koje je prethodilo razvoju moderne medicine, u kojem nisu bile razvijene intenzivne mere lečenja urgentnih stanja. Tako je u slučajevima pokušaja samoubistva, kada je ricin unet u vidu injekcije, stepen smrtnosti bio izuzetno visok. Usled visoke toksičnosti parenteralno datog ricina 5 od 7 takvih slučajeva završeno je smrtno. Opisano je nekoliko slučajeva unošenja ricina u organizam, u vidu injekcije, s ciljem da se počini samoubistvo. U Poljskoj je čovek supkutano ubrizgao ekstrakt semena ricinusa i nakon 36 časova je hospitalizovan sa simptomima mučnine, povraćanja, vrtoglavice, bolova i teške slabosti. Stanje se pogoršalo do hemoragijske dijateze i multiorganske disfunkcije i pacijent je preminuo od srčanog zastoja 18 časova kasnije.²²⁰

U drugom poznatom slučaju čovek, koji je bio hemičar po profesiji, sebi je intravenski ubrizgao rastvor acetona i usitnjenog semena ricinusa. Iako je u početku bio bez simptoma trovanja ubrzo se javilo povraćanje, krvave dijareje, hipotenzija i gubitak svesti. Uz sve intenzivne mere lečenja priminuo je nakon 12 časova.²²¹

U Belgiji je čovek sebi intravenski i intramuskularno ubrizgao acetonski ekstrakt semena ricinusa koji je lično pripremio. Nakon 24 časa hospitalizovan je sa simptomima povraćanja, dijareje, mučnine, vrtoglavice, teške dehidracije i preminuo je nakon 9 časova. Ricinin i aceton su registrovani u uzorcima urina, krvi i očne vodice.²²²

Takođe u Belgiji zabeležen je još jedan slučaj trovanja ricinusom, kada je čovek pripremio ekstrakt ricinusa i intramuskularno ga ubrizgao sebi i supruzi. Oboje su hospitalizovani 12 časova kasnije sa simptomima groznice. U lečenju je korišćena vakcina protiv tetanusa, imunoglobulini, sistemski antibiotici i kortikosteroidi uz lokalnu obradu rane, ali uprkos svim primenjenim merama lečenja njihovo stanje se pogoršavalo, razvio se nekrotizirajući fascitis i oboje su preminuli. Ricin je detektovan u špricu kojim je ekstrakt ubrizgan i u urinu.²²³

U literaturi je poznat slučaj čoveka iz Francuske koji je u svrhu samoubistva sažvakao 13 zrna ricinusa, a potom je tu sažvakanu masu ubrizgao sebi u sedalni predeo. Na mestu aplikacije razvila se nekroza i bile su potrebne 3 operacije da bi se uklonilo

celokupno nekrotično tkivo, ali je pacijent preživeo i otpušten je iz bolnice nakon 3 meseca.¹⁹⁸

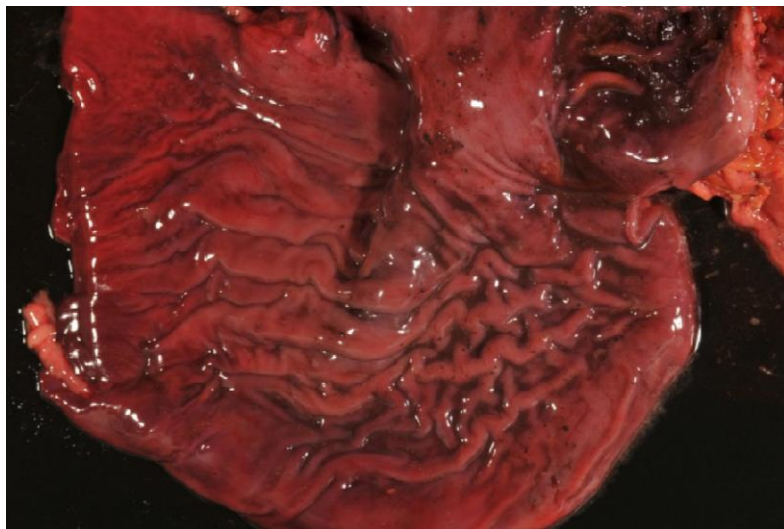
Iz navedenog se može zaključiti da su, u odnosu na ukupan broj slučajeva trovanja biljnim otrovima, slučajevi trovanja ricinom retki. Imajući u vidu savremene mere i protokole lečenja urgentnih stanja mortalitet u slučaju trovanja ricinom je takođe nizak, pod uslovom da se trovanje na vreme prepozna. Takođe se može zaključiti da je ricin toksičniji i prouzrokuje mnogo ozbiljnije simptome ukoliko se unese u vidu parenteralne ili intramuskularne injekcije nego oralnim putem.

1.10. SLUČAJEVI TROVANJA ŽIVOTINJA RICINOM

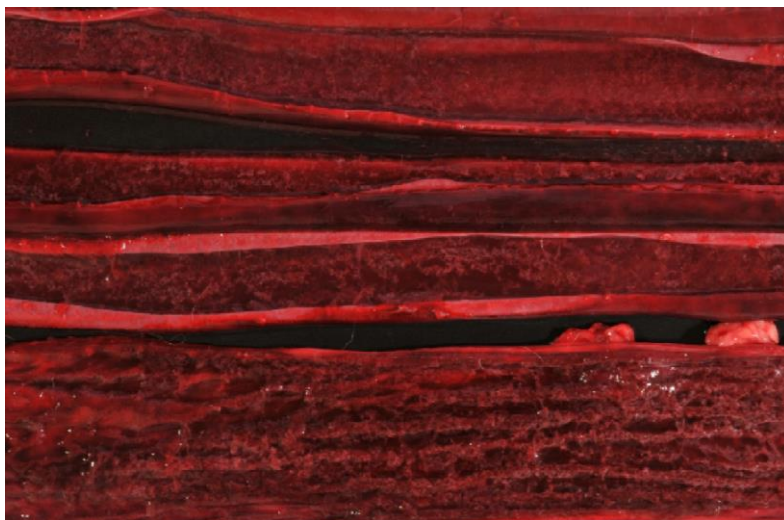
Dokumentovani su slučajevi trovanja ricinom različitih životinjskih vrsta, ali većina tih slučajeva je među domaćim životinjama. Trovanje životinja ricinom javlja se usled konzumiranja celog – neobrađenog zrna ili organskog đubriva napravljenog od ostataka zrna nakon ekstrakcije ulja.

Životinjske vrste različito reaguju na intoksikaciju ricinom. Najosetljiviji su konji, a potom guske, glodari i preživari. Zanimljivo, živina i žabe su najotporniji na delovanje ricina. Životinje pokazuju identične simptome trovanja kao i ljudi: slabost, profuzna dijareja, dehidracija, tahikardija, dispneja i dilatacija zenica. Svi ovi znaci i simptomi pojavljuju se u prvih 6-24 časova od intoksikacije. U biohemijskim analizama dominiraju povećan nivo serumske kreatin kinaze, AST-a i kreatinina. Patološkim ispitivanjima otkriveni su znaci gastroenteritisa, nekroza i krvarenje u srcu i bubrezima.^{7,51,224}

Najviše slučajeva intoksikacije životinja opisano je među psima u Nemačkoj. Okolnosti trovanja u svim slučajevima bile su gotovo identične – psi su jeli organsko đubrivo kojim je zemljište bilo nađubreno. Klinički simptomi trovanja uključivali su povraćanje, krvave prolivaste stolice i bolove u stomaku. Prilikom obdukcije jednog psa nađen je izražen edem i hiperemija sluznice želuca i fibrinozno-hemoragijski enteritis u tankom crevu (slike 19 i 20). Hemijsko-toksikološkom analizom u urinu psa detektovan je ricinin, čime je indirektno dokazana intoksikacija ricinom.^{225,226}



Slika 19. Edematozna i hiperemična sluzokoža želuca psa uginulog usled intoksikacije ricinom



Slika 20. Fibrinozno-hemoragijski enteritis na tankom crevu psa uginulog usled intoksikacije ricinom

Pored slučajeva u Nemačkoj, u literaturi su opisani i slučajevi trovanja pasa u Sjedinjenim američkim državama, Brazilu, Belgiji i Južnoj Koreji. U većini slučajeva dijagnoza trovanja ricinom postavljena je na osnovu kliničkih simptoma ili dokazanog očiglednog konzumiranja zrna ricinusa. U slučaju trovanja u Belgiji, dokazan je ricinin u jetri, bubrezima, želudačnom i crevnom sadržaju psa.²²⁷

1.11. PRIMENA RICINA U TRETMANU MALIGNITETA

Maligna oboljenja su vodeći uzrok smrti u svetu i drugi vodeći uzrok smrti u Sjedinjenim američkim državama, gde je svaki četvrti smrtni slučaj prouzrokovan malignim oboljenjem. Prema skorašnjim podacima kod oko 14 miliona ljudi širom sveta dijagnostikovana je maligna bolest i 8,2 miliona smrti u svetu u 2012. godini je povezano sa ovim bolestima, s tim što se očekuje da taj broj dostigne 13 miliona u naredne dve decenije. Imajući u vidu navedene podatke jasno je da zabrinutost postaje sve veća i globalno gledano stanje je alarmantno.

U tretmanu malignih oboljenja koristi se više terapijskih pristupa, ali hemoterapija je i dalje vodeća opcija, bez obzira na sva ograničenja i nuspojave koje je prate. Uprkos svim pokušajima i naporima vrlo malo napretka u terapiji postignuto je u prethodnih 50 godina, pa su se pojedina istraživanja bazirala na prirodne biljne produkte ili lekove dobijene iz prirodnih izvora. Dokazano je da pojedini biljni toksini imaju snažna citotoksična dejstva što se može iskoristiti u modernoj terapiji.²²⁸⁻²³¹

Ricin se istražuje kao sredstvo u terapiji malignih oboljenja zbog sposobnosti da inaktiviše ribosome i na taj način izazove smrt eukariotske ćelije. Prvi podaci o antikarcinomskim efektima ricina opisani su na sarkomu kod pacova.²³² Ricin je pokazao obećavajuće rezultate kod humanog ksenografta razvijanog na golim miševima i uključen je u fazu I kliničkih istraživanja.²⁰¹ Studije su pokazale obećavajuće rezultate, ali su klinička istraživanja stopirana zbog određenog broja neželjenih efekata.

Kasnije, nakon što su otkriveni struktura i mehanizam delovanja ricina uočeno je da se B lanac nespecifično vezuje za glikolipide i glikoproteine na ćelijskoj površini. Zbog te nespecifičnosti u vezivanju B lanca ricin nekontrolisano dovodi do smrti svih ćelija, čime se limitira njegova potencijalna upotreba u terapiji maligniteta. Kako bi se ovo prevazišlo učinjeno je više pokušaja da se napravi imunotoksin tako što će se enzimski aktivan A lanac vezati direktno za antitumorska antitela. Hormoni i faktori rasta čiji se receptori nalaze na površini tumorskih ćelija su takođe korišćeni kao ciljno mesto vezivanja toksina. Takav imunotoksin, baziran na aktivnosti A lanca ricina, pokazao je visoki stepen selektivnosti, ali lošu efikasnost protiv malignih ćelija. Pokazano je da efikasnost imunotoksina u terapiji maligniteta zavisi od većeg broja faktora, uključujući način unošenja toksina i njegov intracelularni transport, kao i da se veći deo ricina rapidno

razgrađuje u lizozomima čime se znatno smanjuje količina ricina koji dospeva u citosol, gde ispoljava citotoksična svojstva. Otkriveno je i da citotoksični efekat ricina može biti pospešen u prisustvu slobodnog B lanca ili u prisustvu antitela na B lanac konjugovanih na A lanac. Ta bolja efikasnost imunotoksina je postignuta redukovanjem transporta u lizosome i posledičnim povećanjem transporta u Goldžijev aparat, odnosno citosol. Međutim, pored svih dostignuća, uvođenje ricina u terapiju malignih oboljenja je još uvek daleko.²³³⁻²³⁸

Primenu ricina u terapiji malignih oboljenja ograničavaju ozbiljni neželjeni efekti, uzrokovani pre svega nespecifičnim vezivanjem B lanca za različite tipove ćelija. Jedan od najozbiljnijih neželjenih efekata je sindrom povećane propustljivosti krvnih sudova koji nastaje zbog vezivanja toksina za endotelne ćelije kapilara, sa posledičnim tkivnim edemima i multiorganskim zatajivanjem.²³⁹ Pored toga, ricin ima jaka alergijska svojstva i izaziva snažan imunološki odgovor organizma, što takođe značajno ograničava njegovu upotrebu u terapiji maligniteta. Moguće rešenje u prevazilaženju ovog problema je povećanje terapijske efikasnosti toksina, odnosno visoka specifičnost u vezivanju ricina isključivo za tumorske ćelije. Na taj način bi i male doze toksina bile dovoljno efikasne, a izbegnuti neželjeni efekti. To se može postići ukoliko se hemoterapeutski agens dopremi direktno na tumorske ćelije čime bi zdrave ćelije bile „sačuvane“ od dejstva toksina.

Danas se za ciljani prenos toksina direktno na mesto delovanja u organizmu koriste tzv. nanoprenosioci. Dokazano je da oni mogu biti vrlo efikasni, pre svega zbog svoje sposobnosti da lako prolaze kroz biološke i fiziološke barijere u telu, produženo vreme cirkulacije, kontrolisano otpuštaju željenu supstancu, unapređuju bioiskoristljivost lekova i štite od degradacije u lizozomima. U cilju dopremanja ricina direktno na maligne ćelije ispitivani su različiti tipovi nanoprenosioca: lipozomi, nanočestice, ugljenične nanocevi. Ricin je najpre bio inkapsulisan u negativno naelektrisane fosfatidil-serin lipozome i dobijeni su zadovoljavajući rezultati, iako citotoksičnost ricina nije bila na odgovarajućem nivou. Citotoksičnost je povećana upotrebom lizozomotropičnih supstanci kao što su monensin i amonijum-hlorid. U budućnosti se očekuje usavršavanje ovakvog načina transporta ricina i ispoljavanje maksimalnog efekta na konkretne tumorske ćelije.^{240,241}

1.12. DIJAGNOSTIKOVANJE TROVANJA RICINOM

Primarna dijagnoza trovanja ricinusom postavlja se uglavnom na osnovu podataka o okolnostima slučaja i kliničkim simptomima trovanja, pri čemu epidemiološka ispitivanja mogu imati centralno mesto u zaključivanju. Međutim, postavljanje dijagnoze trovanja može biti izuzetno komplikovano jer ricin izaziva nespecifične simptome koji se mogu registrovati i kod mnogih drugih oboljenja, te se dijagnoza trovanja ricinom ne može postaviti sve dok se ricin ne identifikuje u biološkom materijalu (zrna u povraćenom sadržaju, crevima ili fecesu) ili dokaže toksikološko-laboratorijskim pretragama u biološkim uzorcima.

Među različitim metodama, imunoeseji bazirani na antitelima su najstandardnije metode za detekciju i kvantifikaciju ricina u kliničkim uzorcima i uzorcima poreklom iz spoljašnje sredine (hrana i zemlja), a najpoznatiji od njih je ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Ove metode mogu da kvantifikuju ricin sa limitom detekcije od svega nekoliko pg/ml. Naprednija metoda detekcije je imuno-PCR i ona se koristi za detekciju ricina u uzorcima hrane kao i njegovo praćenje nakon eksperimentalnih intoksikacija.^{86,242-245} Nedostatak ELISA metode je što zahteva nekoliko časova da bi se izvela te se na taj način gubi dragoceno vreme do primene mera intenzivne terapije, što je naročito značajno u slučajevima kada se ricin koristi kao potencijalno bioterorističko oružje. Zbog toga je razvijena metoda LFA (*lateral-flow assay*) koja je brža i tehnički lakša za izvođenje, ali je oko 1000 puta manje osetljiva nego standardna ELISA, sa limitom detekcije od 1-50 ng/ml.^{246,247} Savremene tehnologije masene spektrometrije, u kombinaciji sa tečnom hromatografijom, omogućavaju pouzdanu detekciju ricina i njegovu selektivnu diskriminaciju od ricinus komunis aglutinina.²⁴⁸⁻²⁵⁰

Pored svih savremenih metoda, u realnim slučajevima intoksikacije detekcija ricina u kliničkim uzorcima, kao i uzorcima poreklom iz okoline (hrana, zemljište) može biti vrlo komplikovana. U forenzičkim analizama detekciju ricina otežava rapidna apsorpcija u tkiva i transport u ćelije čime se vreme u kojem je moguće detektovati ricin nakon intoksikacije značajno smanjuje. Na osnovu eksperimenata na životinjama zna se da nakon oralne aplikacije ricin prolazi kroz želudac i tanko crevo za 72 časa. Većina unete količina ricina stiže do debelog creva za oko 12 časova i može biti detektovana imunoesejima do 72 časa. Oko polovine aplikovanog ricina se resorbuje i više ne može biti detektovana.¹⁰⁰ Takođe je

pokazano da se ricin može detektovati u fecesu 2-24 časa nakon oralnog unošenja, ali se znatna količina unetog ricina resorbuje u krv životinja odakle vrlo brzo dospeva u tkiva, pri čemu su jetra i slezina organi sa najvećom akumulacijom ricina.^{17,86} Ukupna količina detektovanog ricina je vrlo mala u poređenju sa unetom količinom, sugerišući da se deo unetog ricina destruiše u želucu, deo se izluči neizmenjen fecesom, dok samo mala količina stiže u krvotok i potom u unutrašnje organe.²⁵¹

S obzirom na komplikovanu identifikaciju ricina u biološkim uzorcima, ricinin se može koristiti kao biomarker za intoksikaciju ricinom. Ricinin se lako ekstrahuje iz bioloških uzoraka metodom tečne hromatografije i masene spektrometrije,^{188,190,192,252} a ekperimentalne studije na pacovima pokazale su da se može detektovati u mokraći do 48 časova nakon aplikacije.⁸ Oralna intoksikacija semenom ricinusa kod ljudi i životinja može se uspešno dokazati nakon registrovanja ricinina u uzorcima krvi, mokraće, jetre, bubrega, pluća, mozga i želudačnog sadržaja.^{219,222,253-255}

1.13. TERAPIJA U SLUČAJU TROVANJA RICINUSOM

Ne postoji specifična terapija niti antidoti u slučaju trovanja ricinusom, te su mere simptomatske terapije jedina mogućnost lečenja trovanja u bolničkim uslovima. Primena konkretnih mera terapije zavisi pre svega od načina intoksikacije.

Prilikom oralne intoksikacije suportivna terapija treba da uključuje intravensku nadoknadu tečnosti i elektrolita, uz konstantnu kontrolu funkcije jetre i bubrega. Lavaža želuca, ukoliko ne postoje kontraindikacije za njenu primenu, može biti korisna da se eliminiše toksin iz želuca. Takođe treba razmotriti terapiju aktivnim ugljem.

U slučaju perkutane i parenteralne intoksikacije neophodna je intravenska nadoknada tečnosti i praćenje simptoma koji ukazuju na eventualnu pojavu sindroma povećane propustljivosti krvnih sudova (hipotenzija, otoci i plućni edem). Mere suportivne terapije treba da uključuju i konstantno praćenje funkcije jetre i bubrega, regulaciju koagulopatije i respiratornu podršku ukoliko je potrebno.

U slučaju inhalacije aerosola koji sadrži ricinus, mere suportivne terapije su primarno usmerene na sprečavanje akutnog plućnog edema i respiratornog distres

sindroma. Ove mere uključuju oksigenoterapiju, nadoknadu cirkulišuće tečnosti i elektrolita, antiinflamatornu terapiju i primenu analgetika po potrebi.

Osim simptomatske terapije, ne postoji druga terapija koja može da spreči letalitet u slučaju trovanja ricinom *in vivo*. Dokazano je da samo dve supstance, deksametazon i difluoro-metilornitin, produžavaju vreme preživljavanja kod miševa.^{56,256,257}

Najnovija istraživanja pokazuju dobre rezultate rane primene plazmafereze u terapiji trovanja ricinom, u smislu ubrzane eliminacije toksina i prevencije mogućih oštećenja tkiva.²⁵⁸

1.14. PROFILAKSA TROVANJA

Do sada je izveden veći broj eksperimenata i identifikovano je nekoliko terapijskih molekula u prevenciji trovanja ricinom: antitela, inhibitori malih molekula, aptameri, šećeri itd. ali je samo primena ricinskih antitela dala obećavajuće rezultate.²⁵⁹ Određenu zaštitu od trovanja ricinom moguće je postići ukoliko se antitela primene odmah ili najkasnije do 10 časova nakon intoksikacije, u zavisnosti od puta unošenja ricina u organizam.^{82,86} Dokazano je da intratrahealna primena antitela u inkapsulisanoj formi značajno smanjuje inflamatornu reakciju u plućima nakon udisanja ricinskog aerosola. Savremena istraživanja usmerena su na primenu humanizovanih monoklonalnih i rekombinovanih antitela u cilju neutralizacije toksina.²⁶⁰⁻²⁶²

Danas još uvek ne postoji adekvatna profilaksa trovanja ricinom. Tokom poslednje decenije razvijeno je i testirano nekoliko vakcina, a najpoznatije od njih su RiVaxTM i RVEcTM. Obe vakcina predstavljaju modifikovane, enzimski neaktivne derivate A lanca ricina, ali sa različitom strukturom. Klinička istraživanja na životinjama i ljudima pokazala su da vakcine indukuju stvaranje funkcionalno aktivnih antitela protiv ricina. Međutim, pored svih sprovedenih ispitivanja u zvaničnoj upotrebi se još uvek ne nalazi vakcina kao sredstvo profilakse protiv intoksikacije ricinom.²⁶³⁻²⁶⁵

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi ovog rada su:

- 1) Utvrditi prisustvo ricinina u krvi laboratorijskih pacova, a u odnosu na vremenski interval koji je protekao od oralne aplikacije suspenzije do vremena žrtvovanja.
- 2) Utvrditi distribuciju i koncentraciju ricinina u organima laboratorijskih pacova u različitim vremenima žrtvovanja.
- 3) Utvrditi da li postoji značajna razlika u razvoju patomorfoloških promena na organima laboratorijskih pacova u različitim vremenima žrtvovanja.

3. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće radne hipoteze:

- 1) Očekuje se da će se ricinin detektovati u krvi laboratorijskih pacova nakon aplikacije suspenzije.

- 2) Očekuje se različita koncentracija ricinina u organima laboratorijskih pacova u funkciji vremena.

- 3) Step en razvoja patomorfoloških promena u unutrašnjim organima biće u pozitivnoj korelaciji sa vremenom delovanja ricina i ricinina, odnosno sa vremenom protekl im od oralne aplikacije suspenzije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

U ogledu su korišćeni polno zreli beli laboratorijski pacovi muškog pola, soja Wistar, telesne mase 250-350 grama, odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u kavezima za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, u Zavodu za antirabičnu zaštitu u Novom Sadu. Temperatura vazduha u prostoriji je održavana između 20 i 25°C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12h). Životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun, Srbija). Higijena kaveza je svakodnevno održavana. Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje ogleda je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost sa planom ovog ispitivanja, broj odobrenja III-2011-07.

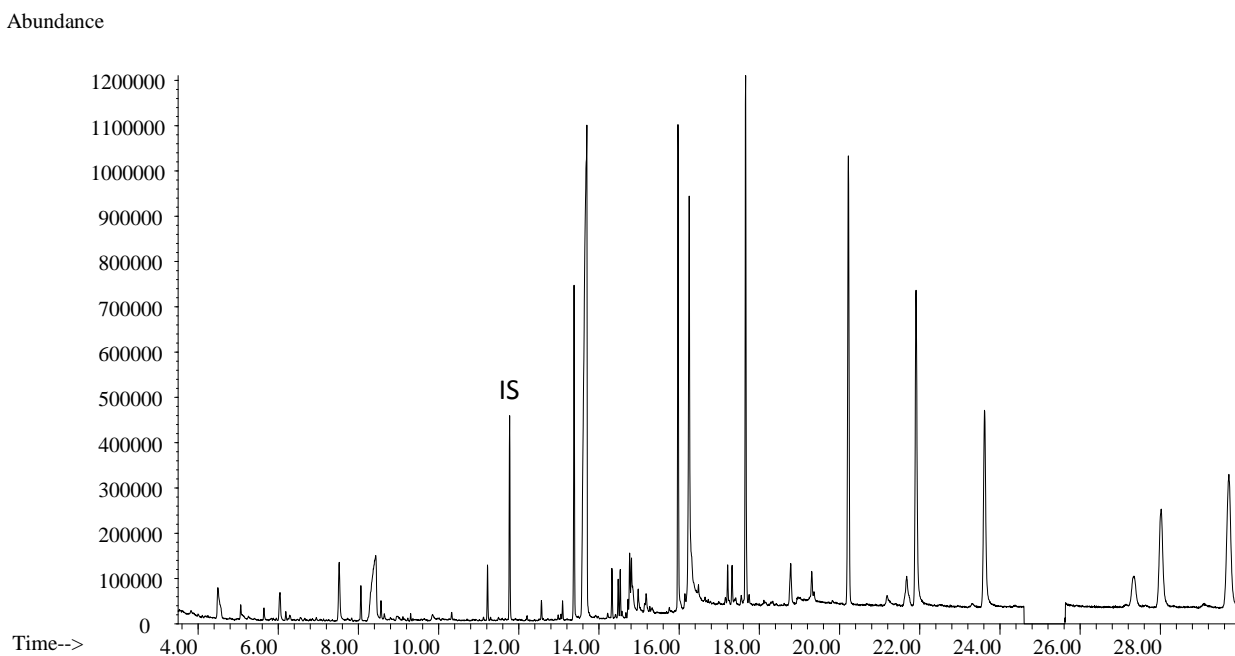
Čuvanje uzoraka, priprema biološkog materijala i GC-MS analiza izvedena je u toksikološkoj laboratoriji, a patohistološke analize izvedene su u laboratoriji za patohistologiju Centra za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku u Novom Sadu.

4.2. Analiza semena biljke *Ricinus communis* L.

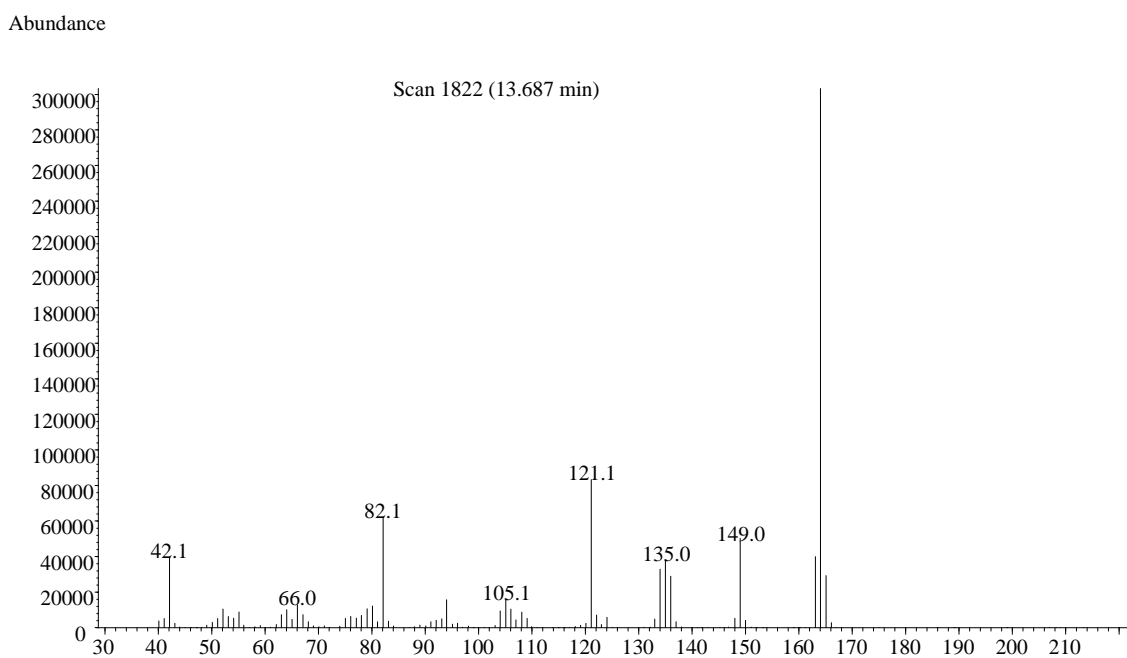
Kvantitativnom GC-MS analizom je utvrđeno da količina ricinina u jezgru semena biljke *Ricinus communis* L. iznosi oko 0,15 %, što je u skladu sa literaturnim podacima (50). Na osnovu toga preračunata doza ricina u semenu iznosi oko 0,9 %, odnosno oko 1,60 mg. S obzirom da LD50 ricina kod laboratorijskih pacova iznosi 30 mg/kg, odlučeno je da se životinje tretiraju suspenzijom tri semena biljke *Ricinus communis* L. u 1ml fiziološkog rastvora, što predstavlja dozu od 19 mg/kg telesne mase ricina, odnosno 3,2 mg/kg telesne mase ricinina.

Gasni TIC hromatogram (total ion chromatogram) semena biljke *Ricinus communis*

L. i maseni spektar ricinina su prikazani na slikama 4.1. i 4.2.



Slika 21. TIC hromatogram semena biljke *Ricinus communis L.*



Slika 22. Maseni spektar ricinina iz semena biljke *Ricinus communis*

4.3. Postupak pripreme semena biljke *Ricinus communis* L.

Za tretiranje eksperimentalnih životinja korišćeno je seme biljke *Ricinus communis* L., ubrano u bašti privatnog poseda na području Bačke, AP Vojvodine.

U cilju utvrđivanja količine ricinina, izvršena je tečno-tečna ekstrakcija semena, na taj način što su 3 semena, nakon skidanja opne, homogenizovana u avanu. Nakon toga dodato je 5 ml metanola (HPLC grade, *Merck - Nemačka*) i vršena ekstrakcija u trajanju 60 minuta na magnetnoj mešalici (*Heidolph, Nemačka*) na 40°C. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 3000 o/min (*Hettich, Nemačka*), odvojen je metanolni ekstrakt, uparen do suva na grejnoj ploči na 80°C (*Stuart, Nemačka*), potom rastvoren u 3 ml metilenhloridnog (HPLC grade, *Merck - Nemačka*) rastvora internog standarda meperidina (*Sigma-Aldrich - Nemačka*), koncentracije 3,486 µg/ml i 1 µl je injektiran za GC-MS analizu.

Za tretiranje eksperimentalne grupe životinja, za svaku pojedinačnu životinju je pripremljena suspenzija tri semena, na taj način što su semenke nakon skidanja opne, homogenizovane u avanu sa 1,5 ml fiziološkog rastvora (0,9 % NaCl, *Hemofarm, Srbija*).

4.4. Eksperimentalni protokol

Životinje su bile podeljene u dve osnovne grupe:

- a) kontrolnu grupu, 5 životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml per os i žrtvovane nakon 48 časova
- b) eksperimentalnu grupu, 25 životinja koje su istovremeno tretirane pripremljenom suspenzijom semena *Ricinus communis* L. u dozi od 19 mg/kg telesne mase ricina, odnosno 3,2 mg/kg telesne mase ricinina (1 ml) per os, nakon čega su žrtvovane u različitim vremenskim periodima: 6, 12, 18, 24 i 48 časova. Za svaki vremenski period korišćeno je po 5 životinja.

Sve životinje su bile podvrgnute merenju telesne mase neposredno pre početka oglada. Oralna aplikacija napravljene suspenzije vršila se pomoću sonde od nerđajućeg čelika, otvora veličine 18 G, za peroralni tretman eksperimentalnih životinja.

Po isteku određenog vremenskog perioda životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana (*Sigma-Aldrich - Nemačka*), u dozi od 5 ml/kg intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane eksangvinacijom (kardiopunkcijom), pri čemu su uzimani sledeći uzorci:

- krv (u epruvete sa antikoagulansom litijum heparinom, BD Vacutainer, *Velika Britanija*),
- moždano tkivo,
- bubrezi,
- jetra,
- slezina
- pluća,
- srce i
- tanko crevo.

Svi uzorci tkiva izmereni su na digitalnoj vagi.

Uzorci krvi, moždanog tkiva, bubrega, jetre i pluća za hemijsko-toksikološku analizu čuvani su na temperaturi od -18 °C (u zamrzivaču) do analize.

Uzorci moždanog tkiva, bubrega, jetre, slezine, pluća, srca i tankog creva za patohistološku analizu su fiksirani i dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, prožeti i ukalupljeni u parafin i sečeni na rotacionom mikrotomu (*Leica, Germany*) na serijske rezove debljine od 5 µm. Uzorci su zatim deparafinisani, bojeni rutinskom hematoksilin-eozin (H&E) metodom i montirani kanada balzomom.

4.4.1. Hemijsko-toksikološka analiza

4.4.1.1. Postupak čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE - Solid Phase Extraction) bioloških uzoraka

Krv

Uzorak krvi (2 ml) kojem je dodat čvrst pufer $K_2CO_3:NaHCO_3=2:3$ (Centrohem, Srbija) i cc NH_4OH (Centrohem, Srbija) do pH 9, razblažen je destilovanom vodom do 3 ml i prenet na SPE kolonu Extrelut-NT3 (Merck – Nemačka). Nakon 20 minuta je vršeno eluiranje sa 15 ml smeše rastvarača metilenhlorid:metanol=9:1 (HPLC grade, Merck - Nemačka). Eluat je uparen do suva na grejnoj ploči na 80°C (Stuart, Nemačka), potom rastvoren u 0,1 ml metilenhloridnog (HPLC grade, Merck - Nemačka) rastvora internog standarda meperidina (Sigma-Aldrich - Nemačka), koncentracije 0,349 µg/ml i 3 µl je injektirano za GC-MS analizu.

Moždano tkivo

Uzorak moždanog tkiva (oko 1,5 g) je homogenizovan u avanu sa kvarcnim peskom (Centrohem, Srbija; 1 g) i natrijum-hloridom (Centrohem, Srbija; 1,5 g). Homogenatu je potom dodato 15 ml destilovane vode, kojoj je prethodno podešen pH 2 sa 2M H_2SO_4 (Centrohem, Srbija) i vršena je ekstrakcija sa 5 ml *n*-heksana (HPLC grade, Merck - Nemačka) radi uklanjanja viših masnih kiselina i holesterola, u trajanju 2 minuta na aparatu Vortex T-Genie 2. Zatim je vršeno centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min (Hettich, Nemačka), organski sloj je odbačen, a vodeni sloj je, nakon dodatka čvrstog pufera $K_2CO_3:NaHCO_3=2:3$ i cc NH_4OH (Centrohem, Srbija) do pH 9 i destilovane vode do 20 ml, prenet na SPE kolonu Extrelut-NT20 (Merck – Nemačka). Po isteku 20 minuta, vršeno je eluiranje sa dva puta po 20 ml smeše rastvarača metilenhlorid:metanol=9:1 (HPLC grade, Merck - Nemačka). Eluat je uparen do suva na grejnoj ploči (Stuart, Nemačka) na 80°C, potom rastvoren u 0,1 ml metilenhloridnog (HPLC grade, Merck - Nemačka) rastvora internog standarda meperidina (Sigma-Aldrich - Nemačka), koncentracije 0,349 µg/ml i 3 µl je injektirano za GC-MS analizu.

Bubrezi, jetra i pluća

Uzorci bubrega (oko 2 g), jetre (oko 12 g) i pluća (oko 2 g) su nakon homogenizacije u avanu, podvrgnuti kiseloj hidrolizi dodatkom 2M H₂SO₄ (Centrohem, Srbija) do pH 2 i zagrevanjem na grejnoj ploči na 80°C (Stuart, Nemačka) u toku 1 sata. Hidrolizovani uzorci su nakon dodatka čvrstog pufera K₂CO₃:NaHCO₃=2:3 i cc NH₄OH (Centrohem, Srbija) do pH 9 i destilovane vode do 20 ml, preneti na SPE kolone Extrelut-NT20 (Merck – Nemačka). Po isteku 20 minuta, vršeno je eluiranje sa dva puta po 20 ml smeše rastvarača metilenhlorid:metanol=9:1 (HPLC grade, Merck - Nemačka). Eluati su upareni do suva na grejnoj ploči (Stuart, Nemačka) na 80°C, potom rastvoreni u 0,1 ml metilenhloridnog (HPLC grade, Merck - Nemačka) rastvora internog standarda meperidina (Sigma-Aldrich - Nemačka), koncentracije 0,349 µg/ml i 3 µl je injektirano za GC-MS analizu.

4.4.1.2. Kvantitativna GC-MS analiza

Gasno hromatografska analiza sa spektrometrijskom detekcijom masa (GC-MS) je urađena na gasnom hromatografu 6890 N (GC) opremljenim masenim detektorom 5973 (MS) i automatskim injektorom 7683 *Agilent Technologies*, u EI (Electron Impact) modu na 70 eV i kapilarnoj koloni DB-5MS (30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 µm; *Agilent Technologies*). Temperatura injektora je iznosila 250°C, a temperatura detektora (interface) 280°C. Hromatografsko razdvajanje jedinjenja je vršeno u splitless modu pri konstantnom protoku helijuma kao gasa nosača od 1 ml/min i sledećem temperaturnom programu za SCAN i SIM (Selected Ion Monitoring) GC-MS analizu: inicijalna temperatura 50 °C je povećana do 130 °C, brzinom 22 °C/min i potom je nakon 1 minuta, brzinom 12 °C/min temperatura povećana do 280 °C i održavana je tokom 12,86 minita.

4.4.1.3. Kvantitativna GC-MS analiza semena *Ricinus communis* L.

Kvantitativna GC-MS analiza semena vršena je u SCAN modu, skeniranjem masa u širokom opsegu (50-550 m/z), a dobijeni maseni spektri jedinjenja su upoređivani sa masenim spektrima komercijalne biblioteke Wiley. Identifikovana jedinjenja se uzimaju u

obzir ukoliko je, prilikom poređenja njihovih masenih spektara sa masenim spektrima komercijalne biblioteke, verovatnoća slaganja veća od 80 %.

Kvantifikacija je vršena na osnovu karakterističnih m/z jona za ricinin 164,121 i 82 i interni standard meperidin 247,172 i 218. Kalibraciona kriva je dobijena snimanjem serije kalibracionih rastvora ricinina (u koje je dodat interni standard meperidin koncentracije 3,486 µg/ml) u opsegu koncentracija 5,0 - 80 µg/ml. Odnos površina pikova ricinina i internog standarda je prikazan kao funkcija koncentracije supstance, primenom metode linearne regresije, a koeficijent korelacije je iznosio $r^2=0,999$.

Kalibracioni rastvori ricinina u metilenhloridu (HPLC grade, *Merck - Nemačka*) su pripremljeni razblaživanjem standardnih rastvora ricinina (*Sigma-Aldrich - Nemačka*; 1 mg) i meperidina (*Sigma-Aldrich - Nemačka*; 1 mg/ml) u metanolu.

4.4.1.4. Kvantitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka

Kvantitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka vršena je u SIM modu, pri čemu su praćeni karakteristični m/z joni za ricinin 164,121 i 82 i interni standard meperidin 247,172 i 218. Kalibraciona kriva je dobijena snimanjem serije kalibracionih rastvora ricinina (u koje je dodat interni standard meperidin koncentracije 0,349 µg/ml) u opsegu koncentracija 0,02 - 0,50 µg/ml. Odnos površina pikova ricinina i internog standarda je prikazan kao funkcija koncentracije supstance, primenom metode linearne regresije, a koeficijent korelacije je iznosio $r^2=0,999$.

Kalibracioni rastvori ricinina u metilenhloridu (HPLC grade, *Merck - Nemačka*) su pripremljeni razblaživanjem standardnih rastvora ricinina (*Sigma-Aldrich - Nemačka*; 1 mg) i meperidina (*Sigma-Aldrich - Nemačka*; 1 mg/ml) u metanolu.

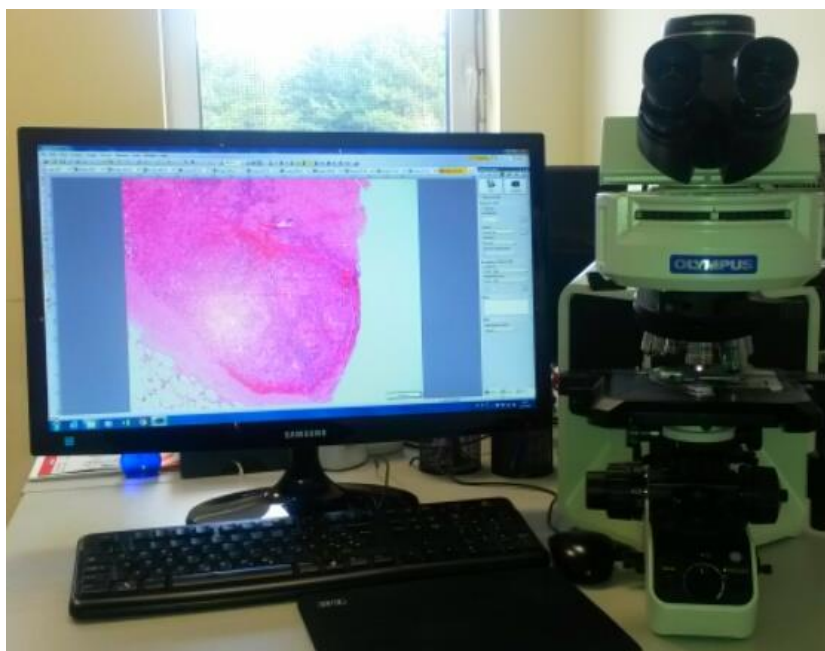
Granica detekcije (LOD - Limit of Detection) je definisana kao količina jedinjenja koja se može detektovati pri odnosu signal/šum=3 i za ricinin je iznosila 0,007 µg/ml.

Granica kvantitacije (LOQ - Limit of Quantitation) je definisana kao minimalna količina jedinjenja koja se može sa sigurnošću i preciznošću kvantifikovati pri odnosu signal/šum=10 i za ricinin je iznosila 0,02 µg/ml.

Stvarni prinos (recovery) je određen dodavanjem poznate količine (spike) ricinina kontrolnim biološkim uzorcima, koji su zatim obrađeni na SPE kolonama i nakon GC-MS analize je vršeno poređenje površine pika ricinina sa površinom pika iste količine ricinina direktno injektirane u GC-MS instrument. Recovery je iznosio 85 - 90 %.

4.4.2. Patohistološka analiza

Svi iseći tkiva su nakon prethodno opisane obrade (strana 46) mikroskopirani pomoću mikroskopa Olympus BX53, povezanog sa računarom (slika 4.3).



Slika 23. Mikroskop Olympus BX53 povezan sa računarom i operativnim programom CellSens Standard i kamerom olympus DP26

5. REZULTATI

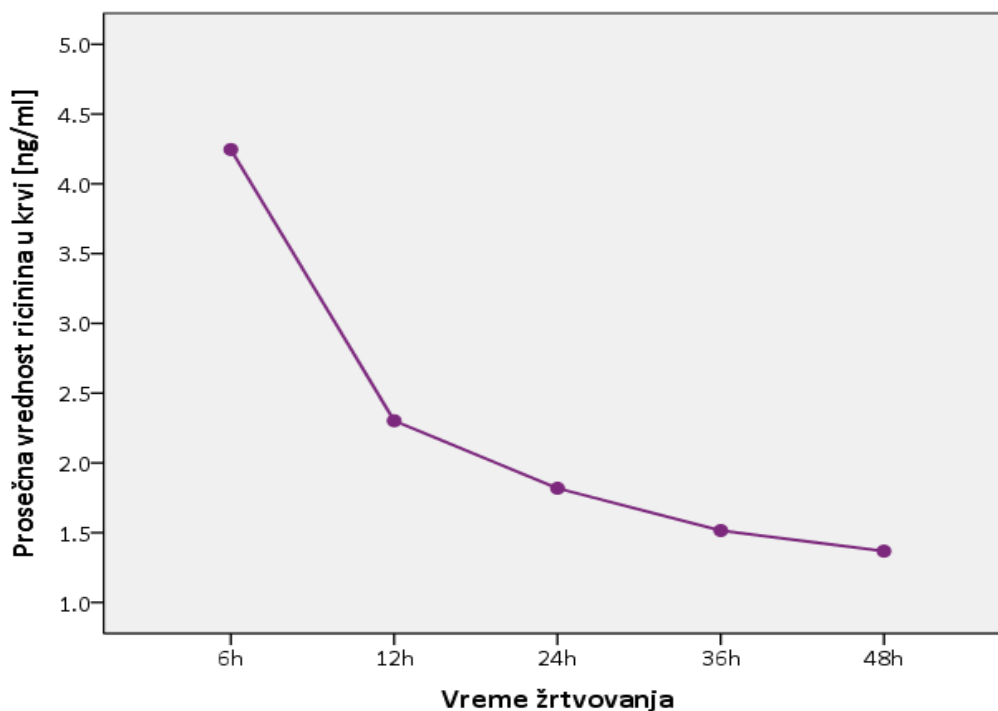
5.1. KONCENTRACIJA RICININA U ORGANIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

5.1.1. KONCENTRACIJA RICININA U KRVI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Tabela 1. Koncentracija ricinina u krvi eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | Mean | Medijana | SD | Min | Max |
|------------------|------|----------|------|------|------|
| 6h | 4.25 | 4.03 | 0.78 | 3.65 | 5.55 |
| 12h | 2.30 | 2.30 | 0.28 | 1.94 | 2.68 |
| 24h | 1.82 | 1.81 | 0.15 | 1.62 | 2.05 |
| 36h | 1.52 | 1.52 | 0.08 | 1.42 | 1.61 |
| 48h | 1.37 | 1.37 | 0.04 | 1.32 | 1.42 |
| Ukupno | 2.32 | 1.83 | 1.15 | 1.32 | 5.55 |

Deskriptivni podaci o koncentraciji ricinina u krvi eksperimentalnih životinja (srednje vrednosti: prosečna vrednost i medijana, mere varijabiliteta: standardna devijacija, opseg vrednosti) su prikazani u tabeli 1, a prosečne koncentracije u odnosu na vreme žrtvovanja su prikazane na grafikonu 1.



Grafikon 1. Kretanje prosečnih vrednosti koncentracije ricinina u krvi [ng/ml] u odnosu na vreme žrtvovanja

Kao što je prikazano na grafikonu 1, najveća prosečna koncentracija ricinina u krvi je utvrđena nakon 6h žrtvovanja (4.25 ± 0.78), a zatim vrednosti značajno opadaju tokom analiziranog vremena, do najniže vrednosti za 48h (1.37 ± 0.04).

Primenom jednosmerne analize varijanse (ANOVA), utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima koncentracije ricinina u krvi eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja ($F = 41.097$, $p < 0.001$). Daljom međusobnom komparacijom (Tukey test; tabela 2) utvrđena je značajno veća prosečna koncentracija za 6h vreme žrtvovanja u odnosu na ostala analizirana vremena: 12h ($p < 0.001$), 24h ($p < 0.001$), 36h ($p < 0.001$) i 48h ($p < 0.001$). Takođe je utvrđena značajna razlika u prosečnim koncentracijama ricinina u krvi za 12h i 48h ($p = 0.019$), sa značajno većim vrednostima za vreme žrtvovanja 12h. Nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji ricinina u krvi u odnosu na ostala vremena žrtvovanja: 12h i 24h, 12h i 36h, 24 i 36h, 24 i 48h, 36h i 48h.

Tabela 2. Multiple komparacije koncentracija ricinina u krvi u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | | Prosečna razlika koncentracije | p |
|-------------------------|-----|---|----------|
| 6h | 12h | 1.944 | <0.001 |
| | 24h | 2.428 | <0.001 |
| | 36h | 2.731 | <0.001 |
| | 48h | 2.879 | <0.001 |
| 12h | 6h | -1.944 | <0.001 |
| | 24h | 0.484 | 0.341 |
| | 36h | 0.787 | 0.058 |
| | 48h | 0.935 | 0.019 |
| 24h | 6h | -2.428 | <0.001 |
| | 12h | -0.484 | 0.341 |
| | 36h | 0.303 | 0.786 |
| | 48h | 0.451 | 0.465 |
| 36h | 6h | -2.731 | <0.001 |
| | 12h | -0.787 | 0.058 |
| | 24h | -0.303 | 0.786 |
| | 48h | 0.148 | 0.984 |
| 48h | 6h | -2.879 | <0.001 |
| | 12h | -0.935 | 0.019 |
| | 24h | -0.451 | 0.465 |
| | 36h | -0.148 | 0.984 |

5.1.1.1. ANALIZA POVEZANOSTI KONCENTRACIJE RICININA U KRVI I VREMENA ŽRTVOVANJA - REGRESIONI MODEL

U cilju određivanja povezanosti i predikcije koncentracije ricinina u krvi u odnosu na vreme žrtvovanja razmatrani su različiti matematički modeli, pri čemu se kao najznačajniji izdvaja kubni regresioni model:

$$y = 7.967 - 4.9x + 1.275x^2 - 0.112x^3 \quad (1)$$

y= koncentracija ricinina u krvi

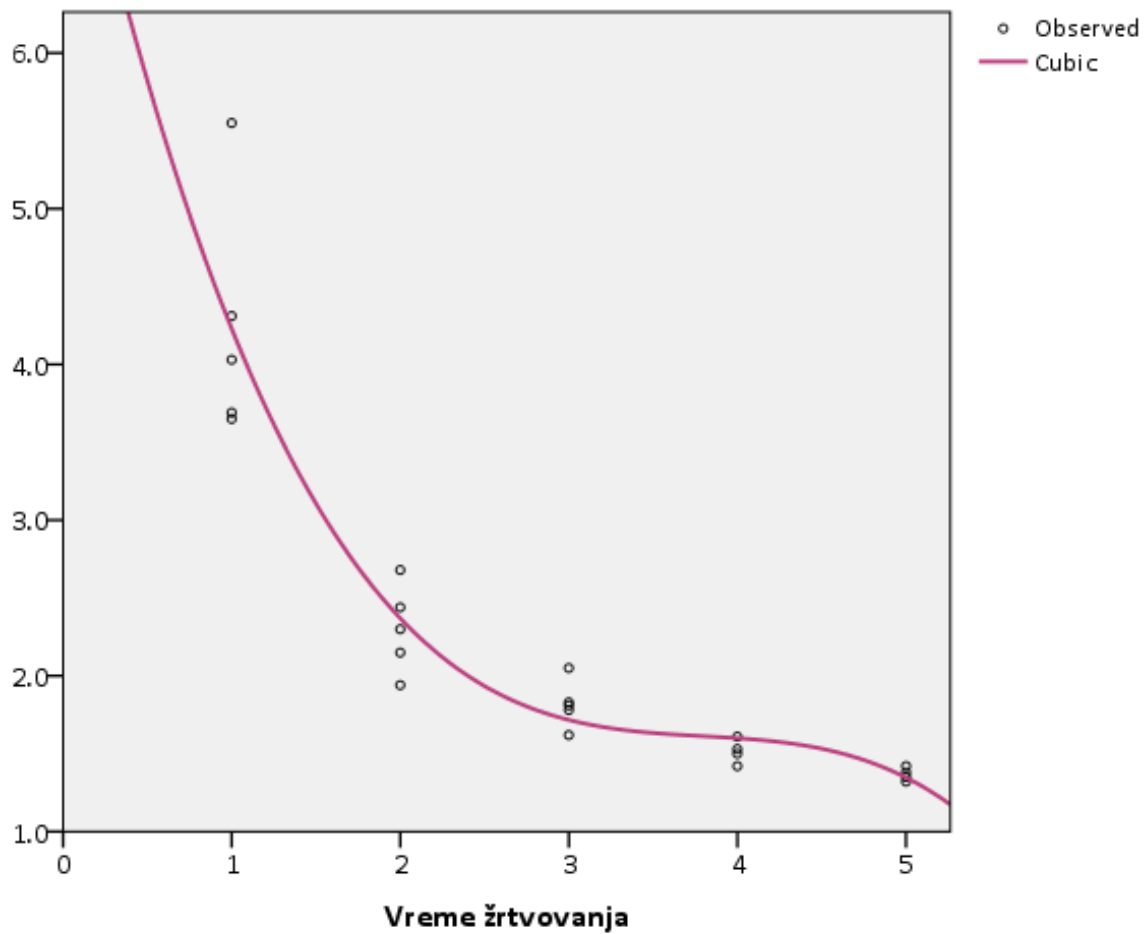
x= vreme žrtvovanja (1= 6h, 2= 12h, 3=24h, 4= 36h, 5=48h)

Koeficijent determinacije $R^2=0.898$, govori u prilog tome da je 89.8% varijabiliteta zavisne varijable (koncentracija ricinina u krvi) objašnjen varijabilitetom nezavisne varijable (vreme žrtvovanja).

Vrednost testa ukazuje da je model dobro prilagođen podacima ($F=55.543$, $p<0.001$). Primenom jednačine modela (1), moguće je izvršiti predikciju koncentracije ricinina u krvi eksperimentalnih životinja na osnovu podataka o vremenu žrtvovanja.

Na grafikonu 2 su prikazane opservirane vrednosti koncentracije ricinina u krvi eksperimentalnih životinja u odnosu na različito vreme žrtvovanja i kriva najbolje prilagođena podacima (kubni model).

Grafikon 2. Koncentracija ricinina u krvi eksperimentalnih životinja u funkciji vremena žrtvovanja

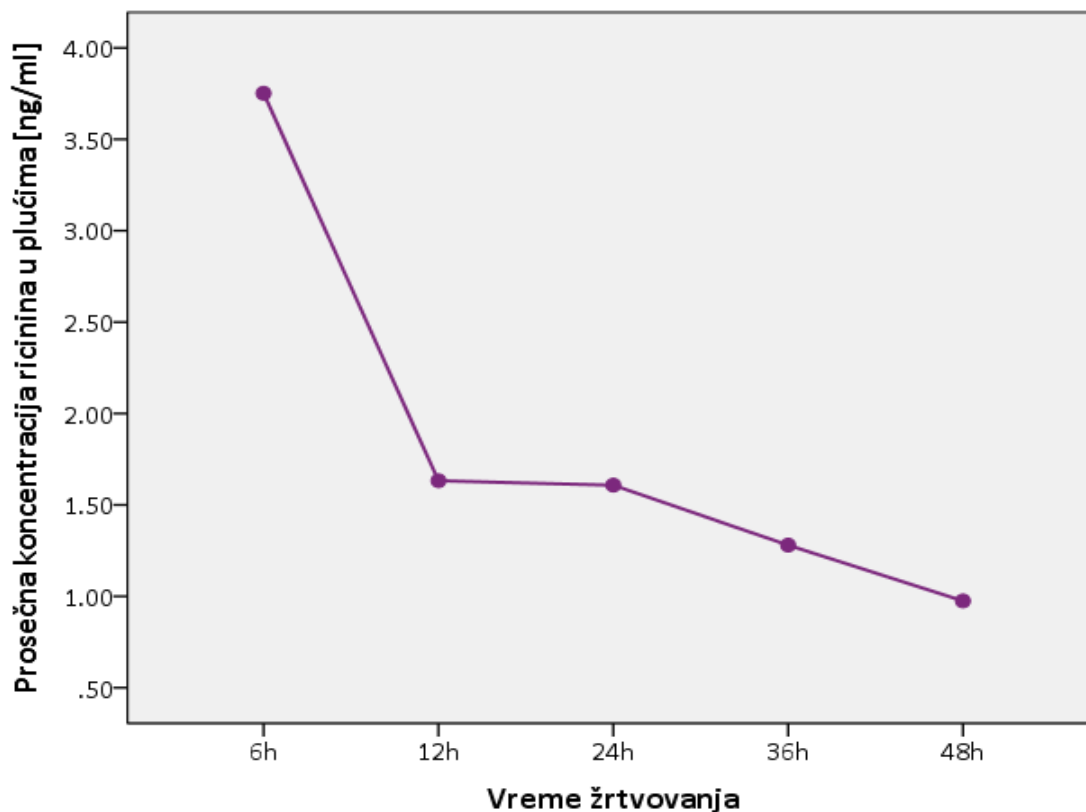


5.1.2. KONCENTRACIJA RICININA U PLUĆIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Tabela 3. Koncentracija ricinina u plućima eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | Mean | Medijana | SD | Min | Max |
|------------------|------|----------|------|------|------|
| 6h | 3.75 | 3.90 | 0.27 | 3.42 | 3.98 |
| 12h | 1.63 | 1.68 | 0.14 | 1.39 | 1.75 |
| 24h | 1.61 | 1.57 | 0.18 | 1.45 | 1.90 |
| 36h | 1.28 | 1.28 | 0.09 | 1.17 | 1.39 |
| 48h | 0.98 | 0.99 | 0.13 | 0.81 | 1.12 |
| Ukupno | 1.91 | 1.57 | 1.03 | 0.81 | 3.98 |

Deskriptivni podaci o koncentraciji ricinina u plućima eksperimentalnih životinja (srednje vrednosti: prosečna vrednost i medijana, mere varijabiliteta: standardna devijacija, opseg vrednosti) su prikazani u tabeli 3, dok su prosečne koncentracije u odnosu na vreme žrtvovanja prikazane na grafikonu 3.



Grafikon 3. Kretanje prosečnih vrednosti koncentracije ricinina u plućima [ng/ml] u odnosu na vreme žrtvovanja

Kao što je prikazano na grafikonu 3, najveća prosečna koncentracija ricinina u plućima je utvrđena nakon 6h žrtvovanja (3.75 ± 0.27), sledi nagli pad za 12h (1.63 ± 0.14), a zatim prosečne vrednosti postepeno opadaju do najniže vrednosti za 48h (0.98 ± 0.13).

Primenom jednosmerne analize varijanse (ANOVA), utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima koncentracije ricinina u plućima eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja ($F = 179,545$, $p < 0.001$). Daljom međusobnom komparacijom (Tukey test) utvrđena je značajno veća prosečna koncentracija za 6h vreme žrtvovanja u odnosu na ostala analizirana vremena: 12h ($p < 0.001$), 24h ($p < 0.001$), 36h ($p < 0.001$) i 48h ($p < 0.001$). Takođe je utvrđena značajno veća koncentracija ricinina u plućima za 12h u odnosu na 48h ($p < 0.001$), kao i za 24h u odnosu na 48h ($p < 0.001$). Nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji ricinina u plućima za 12h i 24h, 12h i 36h, 24h i 36h, 36h i 48h. Podaci su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Multiple komparacije koncentracija ricinina u plućima u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | | Prosečna razlika koncentracije | p |
|-------------------------|-----|---|----------|
| 6h | 12h | 2.120 | <0.001 |
| | 24h | 2.144 | <0.001 |
| | 36h | 2.472 | <0.001 |
| | 48h | 2.777 | <0.001 |
| 12h | 6h | -2.120 | <0.001 |
| | 24h | 0.024 | 0.999 |
| | 36h | 0.352 | 0.059 |
| | 48h | 0.657 | <0.001 |
| 24h | 6h | -2.144 | <0.001 |
| | 12h | -0.024 | 0.999 |
| | 36h | 0.328 | 0.087 |
| | 48h | 0.633 | <0.001 |
| 36h | 6h | -2.472 | <0.001 |
| | 12h | -0.352 | 0.059 |
| | 24h | -0.328 | 0.087 |
| | 48h | 0.305 | 0.156 |
| 48h | 6h | -2.777 | <0.001 |
| | 12h | -0.657 | <0.001 |
| | 24h | -0.633 | <0.001 |
| | 36h | -0.305 | 0.156 |

5.1.2.1. ANALIZA POVEZANOSTI KONCENTRACIJE RICININA U PLUĆIMA I VREMENA ŽRTVOVANJA - REGRESIONI MODEL

U cilju određivanja povezanosti i predikcije koncentracije ricinina u plućima eksperimentalnih životinja u funkciji vremena žrtvovanja razmatrani su različiti matematički modeli, pri čemu se kao najznačajniji izdvaja kubni regresioni model:

$$y = 8.275 - 6.230x + 1.850x^2 - 0.180x^3 \quad (2)$$

y= koncentracija ricinina u plućima

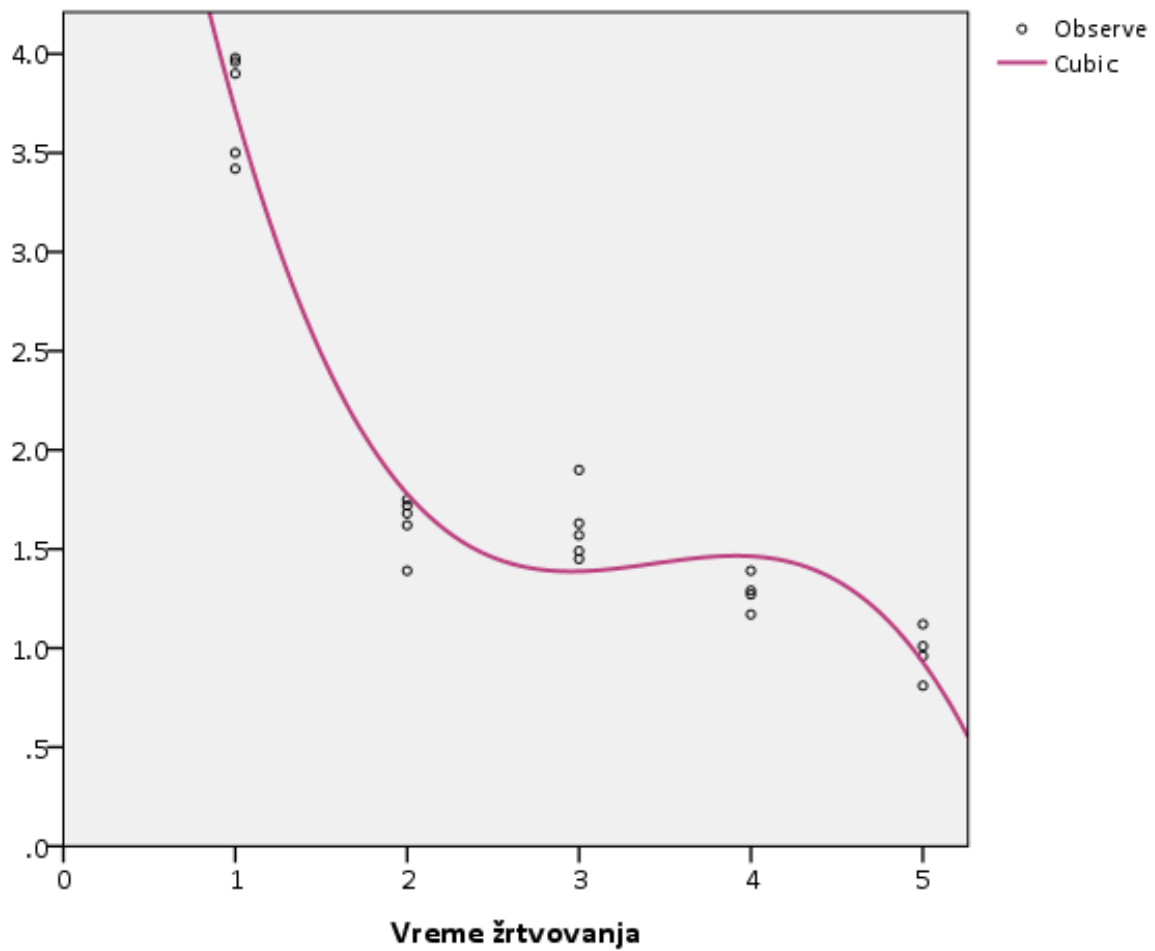
x= vreme žrtvovanja (1= 6h, 2= 12h, 3=24h, 4= 36h, 5=48h)

Vrednost koeficijenta determinacije $R^2=0.954$, ukazuje da je 95.4% varijabiliteta zavisne varijable (koncentracija ricinina u plućima) objašnjeno varijabilitetom nezavisne varijable (vreme žrtvovanja).

Prikazani model (2) je model dobro prilagođen podacima ($F=131.975$, $p<0.001$). Koristeći podatke o vremenu žrtvovanja eksperimentalnih životinja i primenom jednačine ovog modela, možemo izvršiti predikciju koncentracije ricinina u plućima.

Na grafikonu 4 su prikazane opservirane vrednosti koncentracije ricinina u plućima eksperimentalnih životinja u odnosu na različito vreme žrtvovanja i kriva najbolje prilagođena podacima (kubni model).

Grafikon 4. Koncentracija ricinina u plućima eksperimentalnih životinja u funkciji vremena žrtvovanja

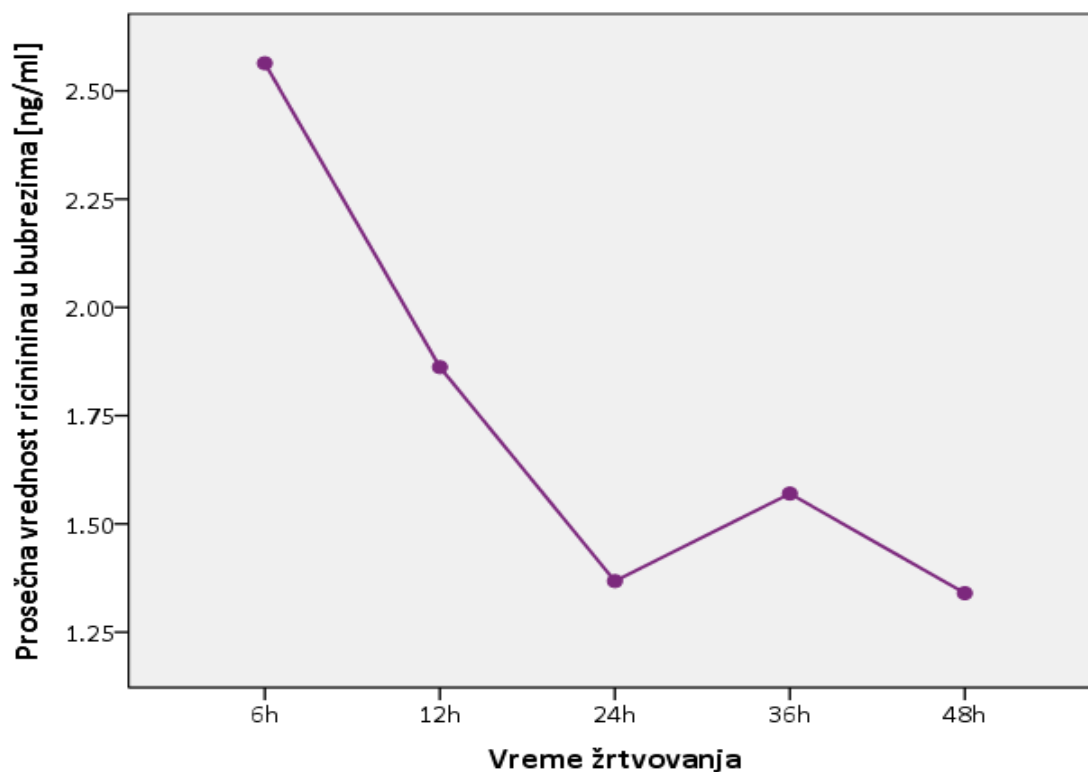


5.1.3. KONCENTRACIJA RICININA U BUBREZIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Tabela 5. Koncentracija ricinina u bubrezima eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | Mean | Medijana | SD | Min | Max |
|------------------|------|----------|-------|------|------|
| 6h | 2.56 | 2.55 | 0.16 | 2.37 | 2.79 |
| 12h | 1.86 | 1.90 | 0.22 | 1.63 | 2.18 |
| 24h | 1.37 | 1.33 | 0.14 | 1.25 | 1.58 |
| 36h | 1.57 | 1.54 | 0.16 | 1.43 | 1.78 |
| 48h | 1.34 | 1.34 | 0.06 | 1.29 | 1.40 |
| Ukupno | 1.77 | 1.59 | 0.049 | 1.25 | 2.79 |

Deskriptivni podaci o koncentraciji ricinina u bubrezima eksperimentalnih životinja (srednje vrednosti: prosečna vrednost i medijana, mere varijabiliteta: standardna devijacija, opseg vrednosti) su prikazani u tabeli 5.



Grafikon 5. Kretanje prosečnih vrednosti koncentracije ricinina [ng/ml]u bubrezima u odnosu na vreme žrtvovanja

Kao što je prikazano na grafikonu 5, najveća prosečna koncentracija je utvrđena nakon 6 h žrtvovanja (2.56 ± 0.16), a zatim vrednosti opadaju do 24h (1.37 ± 0.14). Blagi porast vrednosti postoji za 36h, a zatim opet blagi pad vrednosti za 48h (1.34 ± 0.06).

Primenom ANOVA testa, utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima koncentracije ricinina u bubrezima eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja ($F = 49.243$, $p < 0.001$). Daljom međusobnom komparacijom (Tukey test) utvrđene su značajno veće vrednosti za 6h u odnosu na ostala vremena žrtvovanja: 12h ($p < 0.001$), 24h ($p < 0.001$), 36h ($p < 0.001$) i 48h ($p < 0.001$). Utvrđene su i značajno veće prosečne koncentracije za 12h u odnosu na 24h ($p < 0.001$) i 12h u odnosu na 48h ($p < 0.001$), a nije uočena značajna razlika za sledeća vremena žrtvovanja: 12h i 36h ($p = 0.083$), 24h i 36h ($p = 0.348$), 24h i 48h ($p = 0.999$), odnosno 36h i 48h ($p = 0.278$). Podaci su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Multiple komparacije koncentracija ricinina u bubrezima u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | | Prosečna razlika koncentracije | p |
|-------------------------|-----|---|----------|
| 6h | 12h | 0.702 | <0.001 |
| | 24h | 1.196 | <0.001 |
| | 36h | 0.994 | <0.001 |
| | 48h | 1.224 | <0.001 |
| 12h | 6h | -0.702 | <0.001 |
| | 24h | 0.494 | 0.001 |
| | 36h | 0.292 | 0.083 |
| | 48h | 0.522 | 0.001 |
| 24h | 6h | -1.196 | <0.001 |
| | 12h | -0.494 | 0.001 |
| | 36h | -0.202 | 0.348 |
| | 48h | 0.028 | 0.999 |
| 36h | 6h | -0.994 | <0.001 |
| | 12h | -0.292 | 0.083 |
| | 24h | 0.202 | 0.348 |
| | 48h | 0.230 | 0.278 |
| 48h | 6h | -1.224 | <0.001 |
| | 12h | -0.522 | 0.001 |
| | 24h | -0.028 | 0.999 |
| | 36h | -0.230 | 0.278 |

5.1.3.1. ANALIZA POVEZANOSTI KONCENTRACIJE RICININA U BUBREZIMA I VREMENA ŽRTVOVANJA - REGRESIONI MODEL

U cilju određivanja povezanosti i predikcije koncentracije ricinina u bubrezima u odnosu na vreme žrtvovanja razmatrani su različiti matematički modeli, pri čemu se kao najznačajniji izdvaja kubni regresioni model:

$$y = 4.227 - 2.154x + 0.563x^2 - 0.049x^3 \quad (3)$$

y= koncentracija ricinina u bubrezima

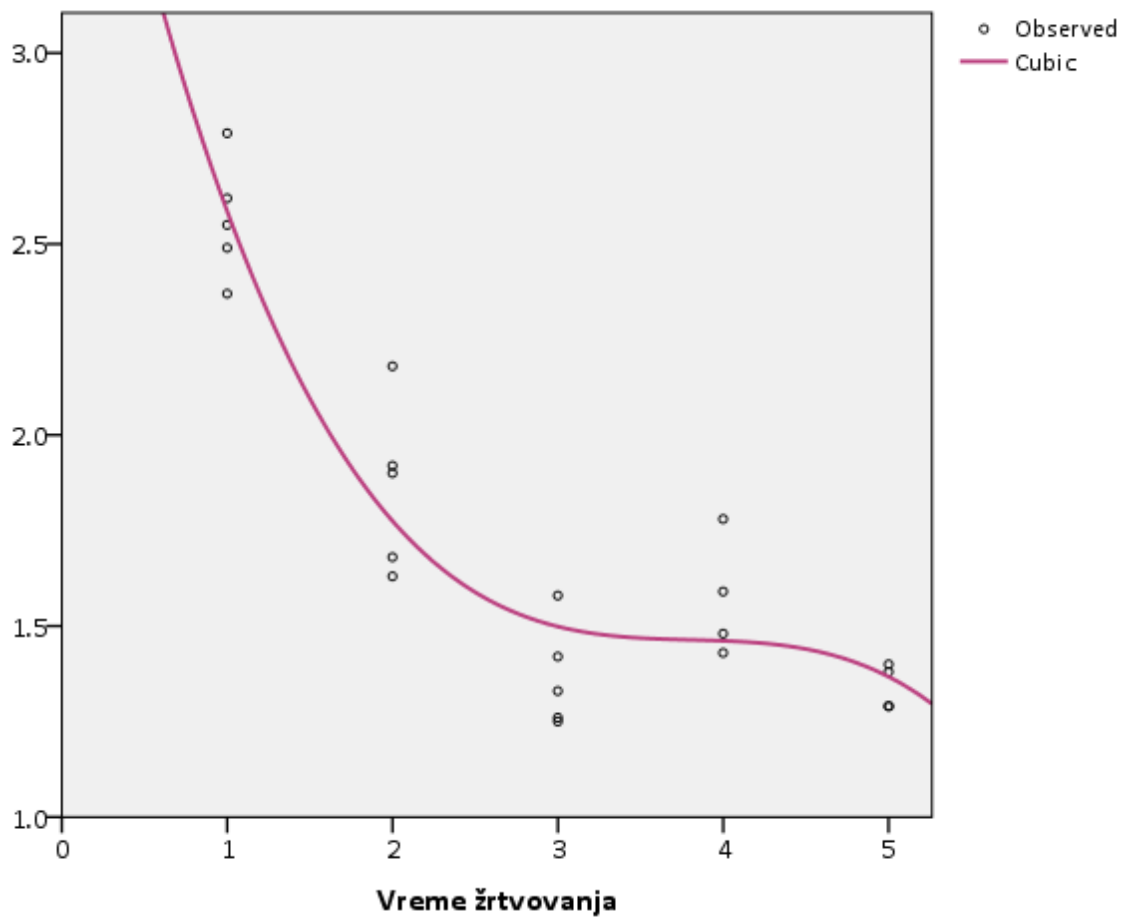
x= vreme žrtvovanja (1= 6h, 2= 12h, 3=24h, 4= 36h, 5=48h)

Koeficijent determinacije $R^2=0.883$, govori u prilog tome da je 88.3% varijabiliteta zavisne varijable (koncentracija ricinina u bubrezima) objašnjen varijabilitetom nezavisne varijable (vreme žrtvovanja).

Regresioni kubni model jedobro prilagođen podacima, što i potvrđuju rezultati testa ($F=48.016$, $p<0.001$). Na osnovu jednačine ovog modela (3), možemo izvršiti predikciju koncentracije ricinina u bubrezima eksperimentalnih životinja na osnovu podataka o vremenu žrtvovanja.

Na grafikonu 6 su prikazane opservirane vrednosti koncentracije ricinina u bubrezima eksperimentalnih životinja u odnosu na različito vreme žrtvovanja i kriva najbolje prilagođena podacima (kubni model).

Grafikon 6. Koncentracija ricinina u bubrezima eksperimentalnih životinja u funkciji vremena žrtvovanja

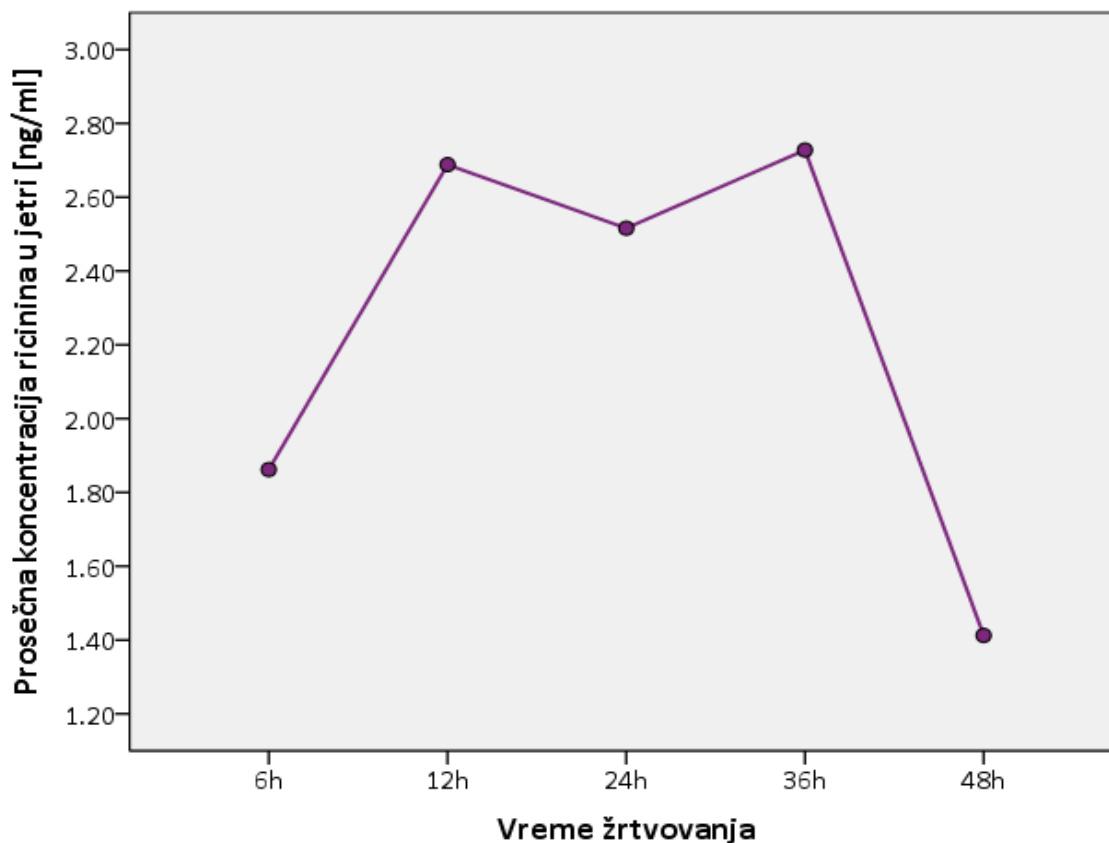


5.1.4. KONCENTRACIJA RICININA U JETRI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Tabela 7. Koncentracija ricinina u jetri eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | Mean | Medijana | SD | Min | Max |
|-------------------------|-------------|-----------------|-----------|------------|------------|
| 6h | 1.86 | 1.99 | 0.28 | 1.37 | 2.05 |
| 12h | 2.69 | 2.74 | 0.35 | 2.35 | 3.18 |
| 24h | 2.52 | 2.58 | 0.14 | 2.33 | 2.65 |
| 36h | 2.73 | 2.69 | 0.12 | 2.64 | 2.90 |
| 48h | 1.41 | 1.42 | 0.06 | 1.35 | 1.47 |
| Ukupno | 2.26 | 2.35 | 0.55 | 1.35 | 3.18 |

Deskriptivni podaci o koncentraciji ricinina u jetri eksperimentalnih životinja (srednje vrednosti: prosečna vrednost i medijana, mere varijabiliteta: standardna devijacija, opseg vrednosti) su prikazani u tabeli 7, a prosečne koncentracije u odnosu na vreme žrtvovanja su prikazane na grafikonu 7.



Grafikon 7. Kretanje prosečnih vrednosti koncentracije ricinina u jetri [ng/ml] u odnosu na vreme žrtvovanja

Kao što je prikazano na grafikonu 7, prosečna koncentracija ricinina u jetri nakon 6h žrtvovanja iznosi 1.86 ± 0.28 , dok je najniža vrednosti dostignuta za 48h (1.41 ± 0.06).

Primenom jednosmerne analize varijanse (ANOVA), utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima koncentracije ricinina u jetri eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja ($F = 27.640$, $p < 0.001$). Daljom međusobnom komparacijom (Tukey test) utvrđena je značajno manje prosečne koncentracije ricinina u jetri za 6h vreme žrtvovanja u odnosu na sledeća vremena: 12h ($p < 0.001$), 24h ($p = 0.002$) i 36h ($p < 0.001$). Takođe su utvrđena značajno veće koncentracije za 12h u odnosu na vreme 48h ($p < 0.001$), 24h u odnosu na 48h ($p < 0.001$) i 36h u odnosu na 48h ($p < 0.001$). Podaci su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Multiple komparacije koncentracija ricinina u jetri u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | | Prosečna razlika koncentracije | p |
|-------------------------|-----|---|----------|
| 6h | 12h | -0.826 | <0.001 |
| | 24h | -0.654 | 0.002 |
| | 36h | -0.866 | <0.001 |
| | 48h | 0.450 | 0.060 |
| 12h | 6h | 0.826 | <0.001 |
| | 24h | 0.172 | 0.757 |
| | 36h | -0.040 | 0.999 |
| | 48h | 1.276 | <0.001 |
| 24h | 6h | 0.654 | 0.002 |
| | 12h | -0.172 | 0.757 |
| | 36h | -0.212 | 0.648 |
| | 48h | 1.104 | <0.001 |
| 36h | 6h | 0.866 | <0.001 |
| | 12h | 0.040 | 0.999 |
| | 24h | 0.212 | 0.648 |
| | 48h | 1.315 | <0.001 |
| 48h | 6h | -0.450 | 0.060 |
| | 12h | -1.276 | <0.001 |
| | 24h | -1.104 | <0.001 |
| | 36h | -1.315 | <0.001 |

5.1.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI KONCENTRACIJE RICININA U JETRI I VREMENA ŽRTVOVANJA - REGRESIONI MODEL

U cilju određivanja povezanosti i predikcije koncentracije ricinina u jetri u odnosu na vreme žrtvovanja razmatrani su različiti matematički modeli, pri čemu se kao najznačajniji izdvaja kubni regresioni model:

$$y = 1.183 + 0.711x + 0.048 x^2 - 0.036x^3 \quad (4)$$

y= koncentracija ricinina u jetri

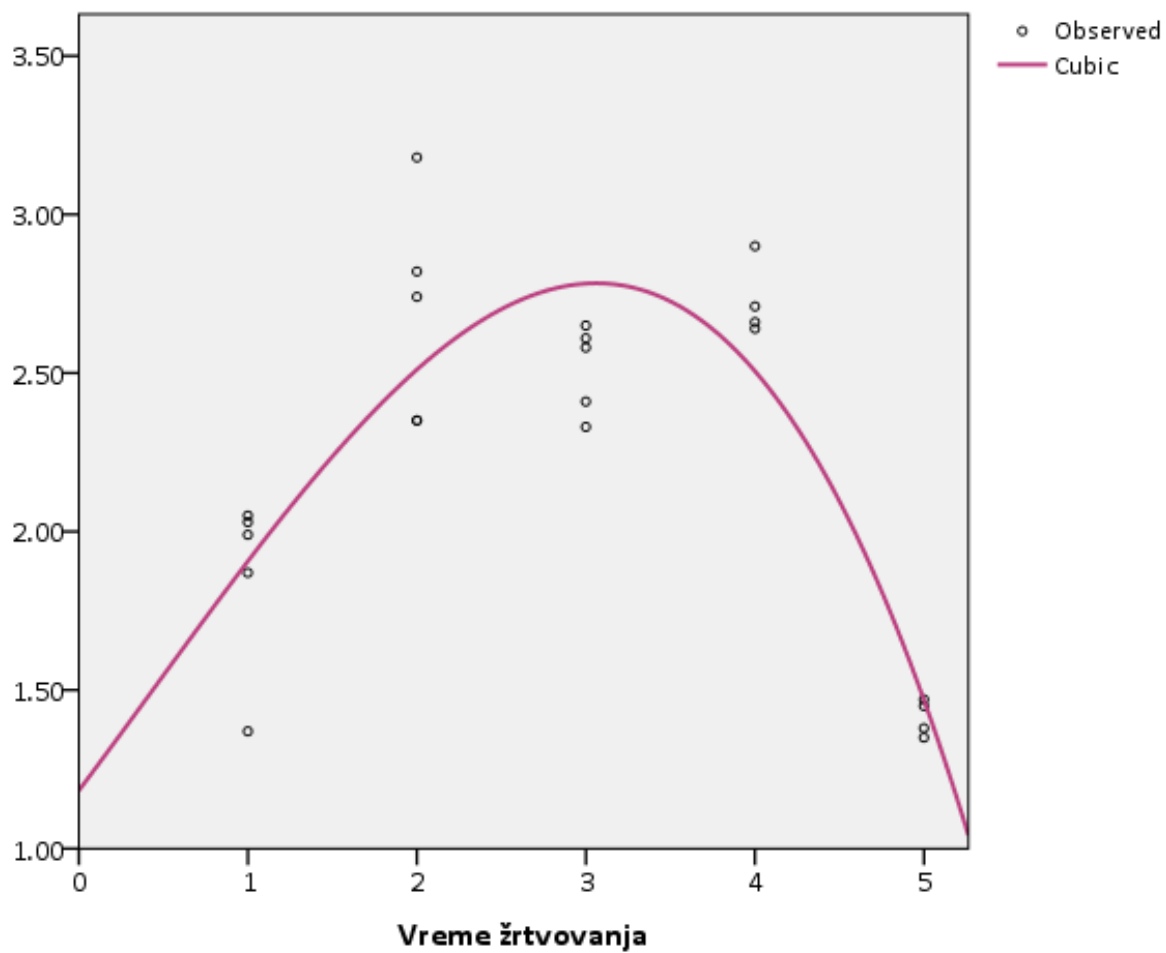
x= vreme žrtvovanja (1= 6h, 2= 12h, 3=24h, 4= 36h, 5=48h)

Vrednost koeficijenta determinacije $R^2=0.751$, ukazuje da je 75.1% varijabiliteta zavisne varijable (koncentracija ricinina u jetri) objašnjeno varijabilitetom nezavisne varijable (vreme žrtvovanja).

Vrednost testa ($F=19.152$, $p<0.001$) ukazuje da je kubni model dobro prilagođen podacima. Primenom jednačine modela (4), možemo izvršiti predikciju koncentracije ricinina u jetri eksperimentalnih životinja na osnovu podataka o vremenu žrtvovanja.

Na grafikonu 8 su prikazane opservirane vrednosti koncentracije ricinina u jetri eksperimentalnih životinja u odnosu na različito vreme žrtvovanja i kriva najbolje prilagođena podacima (kubni model).

Grafikon 8. Koncentracija ricinina u jetri eksperimentalnih životinja u funkciji vremena žrtvovanja

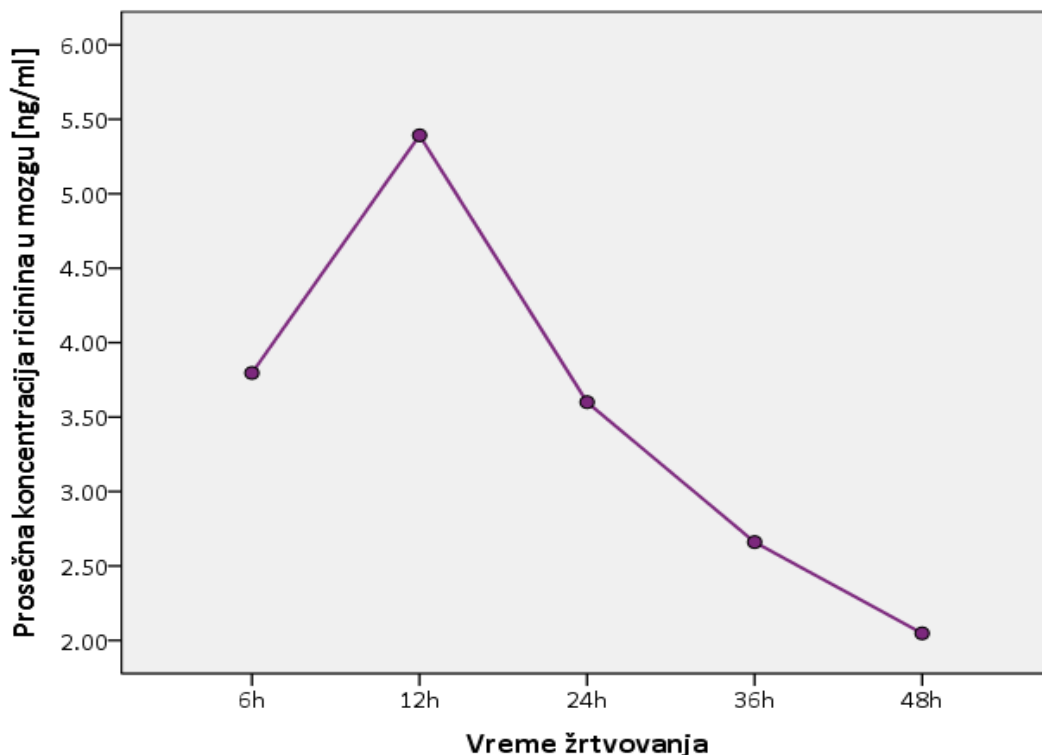


5.1.5. KONCENTRACIJA RICININA U MOZGU EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Tabela 9. Koncentracija ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | Mean | Medijana | SD | Min | Max |
|-------------------------|-------------|-----------------|-----------|------------|------------|
| 6h | 3.80 | 3.85 | 0.44 | 3.12 | 4.23 |
| 12h | 5.39 | 5.64 | 0.66 | 4.35 | 6.05 |
| 24h | 3.60 | 3.52 | 0.23 | 3.32 | 3.93 |
| 36h | 2.66 | 2.61 | 0.23 | 2.44 | 2.98 |
| 48h | 2.05 | 2.06 | 0.14 | 1.88 | 2.19 |
| Ukupno | 3.60 | 3.52 | 1.21 | 1.88 | 6.05 |

Deskriptivni podaci o koncentraciji ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja (srednje vrednosti: prosečna vrednost i medijana, mere varijabiliteta: standardna devijacija, opseg vrednosti) su prikazani u tabeli 9, a prosečne koncentracije u odnosu na vreme žrtvovanja su prikazane na grafikonu 9.



Grafikon 9. Kretanje prosečnih vrednosti koncentracije ricinina u mozgu [ng/ml] u odnosu na vreme žrtvovanja

Kao što je prikazano na grafikonu 9, prosečna koncentracija ricinina u krvi nakon 6h žrtvovanja iznosi $3.80(\pm 0.44)$, a zatim sledi skok vrednosti za 12h (5.39 ± 0.66), a zatim vrednosti opadaju do najniže vrednosti za 48h (2.05 ± 0.14).

Primenom jednosmerne analize varijanse (ANOVA), utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima koncentracije ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja u odnosu na vreme žrtvovanja ($F = 44.980$, $p < 0.001$). Daljom međusobnim poređenjem parova vrednosti (Tukey test) utvrđene su značajno veće vrednosti za 6h u odnosu na 36h ($p = 0.004$), kao i 6h u odnosu na 48h ($p < 0.001$). Utvrđene su značajno veće prosečne koncentracije za 12h u odnosu na ostala analizirana vremena žrtvovanja : 6h ($p < 0.001$), 24h ($p < 0.001$), 36h ($p < 0.001$) i 48h ($p < 0.001$). Takođe su utvrđene značajno veće prosečne koncentracije za 24h u odnosu na 36h ($p = 0.020$), kao i 24h u odnosu na 48h ($p < 0.001$). Nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji ricinina u mozgu za 6h i 24h, odnosno za 36h i 48h, što je i prikazano u tabeli 10.

Tabela 10. Multiple komparacije koncentracija ricinina u mozgu u odnosu na vreme žrtvovanja

| Vreme žrtvovanja | | Prosečna razlika koncentracije | p |
|-------------------------|-----|---|----------|
| 6h | 12h | -1.596 | <0.000 |
| | 24h | 0.196 | 0.937 |
| | 36h | 1.136 | 0.004 |
| | 48h | 1.749 | <0.000 |
| 12h | 6h | 1.596 | <0.000 |
| | 24h | 1.792 | <0.000 |
| | 36h | 2.732 | <0.000 |
| | 48h | 3.345 | <0.000 |
| 24h | 6h | -0.196 | 0.937 |
| | 12h | -1.792 | <0.000 |
| | 36h | 0.940 | 0.020 |
| | 48h | 1.553 | <0.000 |
| 36h | 6h | -1.136 | 0.004 |
| | 12h | -2.732 | <0.000 |
| | 24h | -0.940 | 0.020 |
| | 48h | 0.613 | 0.246 |
| 48h | 6h | -1.749 | <0.000 |
| | 12h | -3.345 | <0.000 |
| | 24h | -1.553 | <0.000 |
| | 36h | -0.613 | 0.246 |

5.1.5.1. ANALIZA POVEZANOSTI KONCENTRACIJE RICININA U MOZGU I VREMENA ŽRTVOVANJA - REGRESIONI MODEL

U cilju određivanja povezanosti i predikcije koncentracije ricinina u mozgu u odnosu na vreme žrtvovanja razmatrani su različiti matematički modeli, pri čemu se kao najznačajniji izdvaja kubni regresioni model:

$$y = -1.770 + 8.452 x - 3.143 x^2 + 0.322 x^3 \quad (5)$$

y= koncentracija ricinina u mozgu

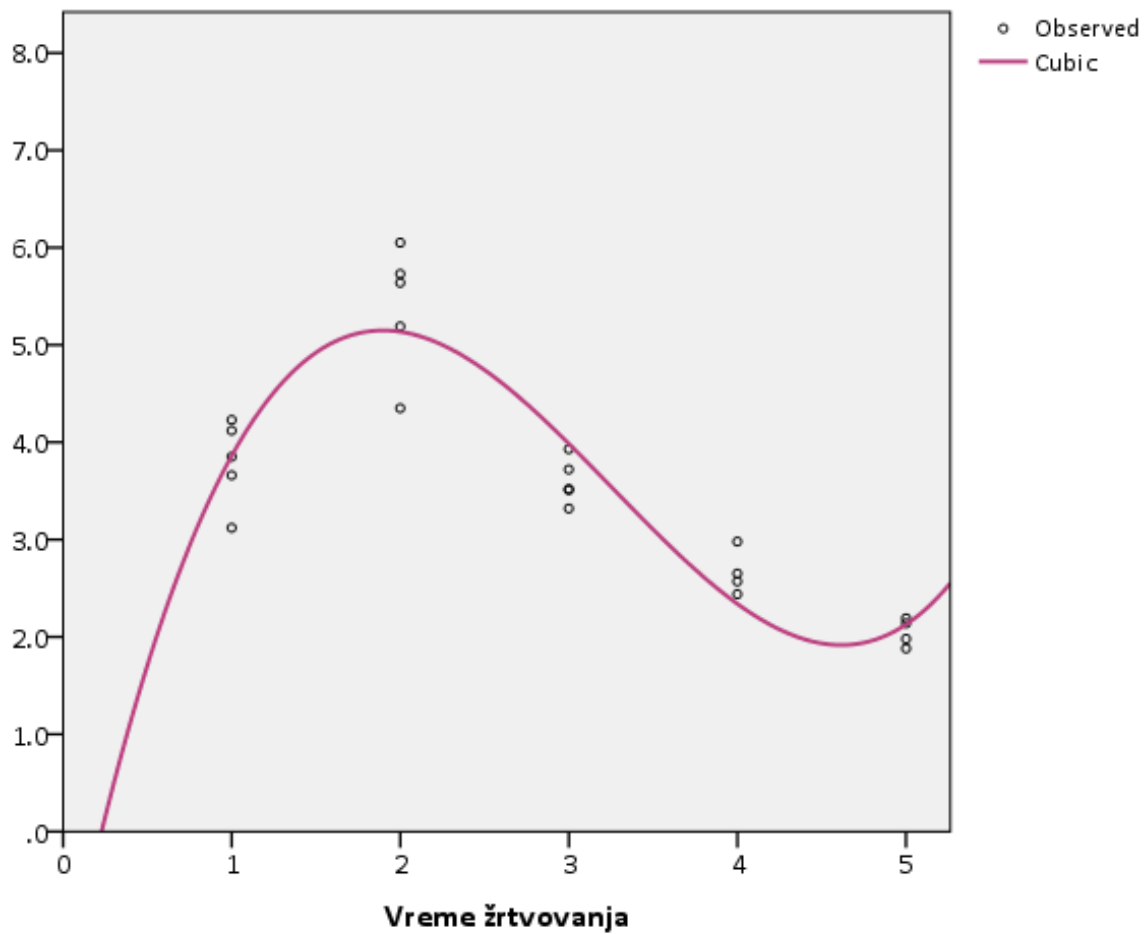
x= vreme žrtvovanja (1= 6h, 2= 12h, 3=24h, 4= 36h, 5=48h)

Koeficijent determinacije $R^2=0.862$, ukazuje da 86.2% varijabiliteta zavisne varijable (koncentracija ricinina u mozgu) objašnjen varijabilitetom nezavisne varijable (vreme žrtvovanja).

Prikazani regresioni model (5) je dobro prilagođen podacima ($F=39.503$, $p<0.001$). Na osnovu jednačine modela (5), možemo izvršiti predikciju koncentracije ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja na osnovu podataka o vremenu žrtvovanja.

Na grafikonu 10 su prikazane opservirane vrednosti koncentracije ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja u odnosu na različito vreme žrtvovanja i kriva najbolje prilagođena podacima (kubni model).

Grafikon 10. Koncentracija ricinina u mozgu eksperimentalnih životinja u funkciji vremena žrtvovanja



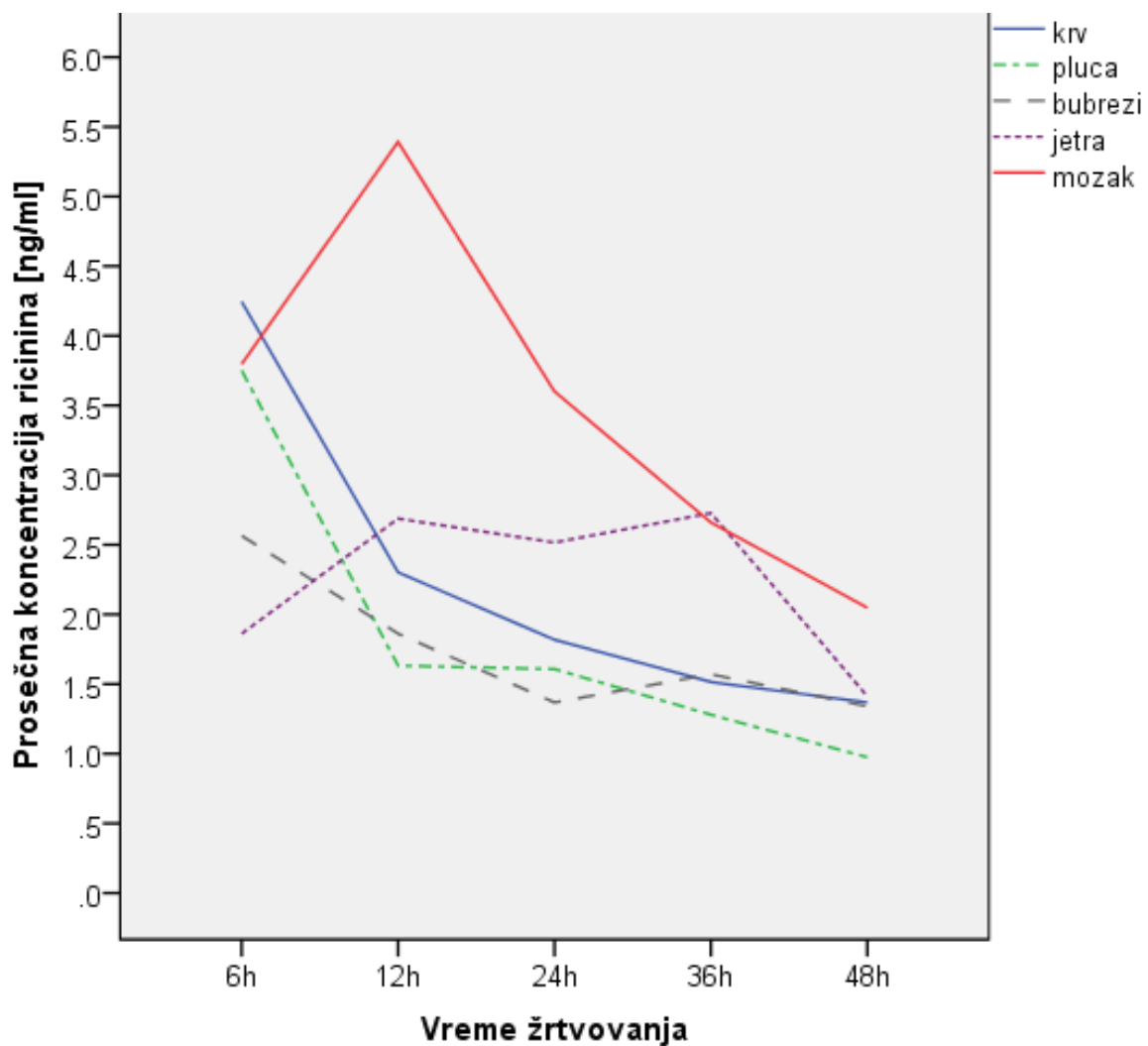
5.1.6. MEĐUSOBNA KORELACIJA KONCENTRACIJA RICININA U ORGANIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Tabela 11. Stepen povezanosti koncentracije ricinina u različitim organima eksperimentalnih životinja

| | | KRV | PLUĆA | BUBREZI | JETRA | MOZAK |
|---------|---|-----|--------|---------|--------|-------|
| KRV | r | 1 | 0.936 | 0.869 | -0.171 | 0.347 |
| | p | | <0.001 | <0.001 | 0.436 | 0.104 |
| PLUĆA | r | | 1 | 0.877 | -0.215 | 0.277 |
| | p | | | <0.001 | 0.324 | 0.200 |
| BUBREZI | r | | | 1 | -0.137 | 0.382 |
| | p | | | | 0.532 | 0.072 |
| JETRA | r | | | | 1 | 0.505 |
| | p | | | | | 0.014 |
| MOZAK | r | | | | | 1 |
| | p | | | | | |

U tabeli 11 prikazan je Pirsonov koeficijent linearne korelacije (r) i nivo značajnosti (p). Analiziranjem koncentracije ricinina u različitim organima eksperimentalnih životinja, utvrđena je visoko značajna pozitivna korelacija između koncentracije u plućima i krvi ($p < 0.001$), bubrezima i krvi ($p < 0.001$) i bubrezima i plućima ($p < 0.001$). Koncentracije ricinina u jetri i mozgu koreliraju samo međusobno ($p = 0.014$), a nije utvrđena značajna korelacija između koncentracije ricinina u jetri i ostalim organima (krv, bubrezi, pluća) odnosno koncentracije ricinina u mozgu i ostalim organima.

Grafikon 11. Uporedni prikaz kretanja prosečnih vrednosti koncentracije ricinina u organima u odnosu na vreme žrtvovanja



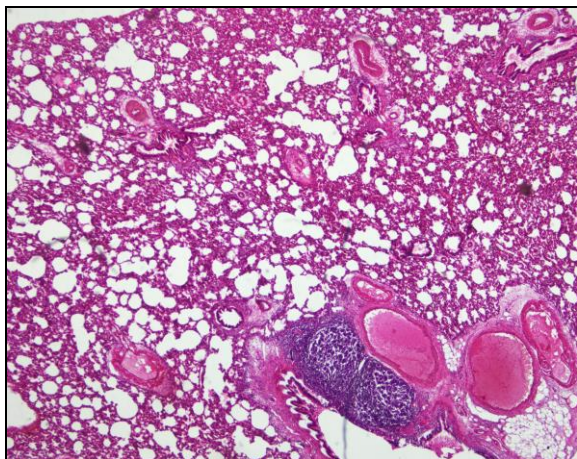
U toku izvođenja eksperimenta uginule su dve laboratorijske životinje. Jedna životinja uginula je između 12 i 24 časa, a druga između 24 i 28 časova. U tabeli su prikazane koncentracije ricinina u organima obe uginule životinje.

Tabela 12.

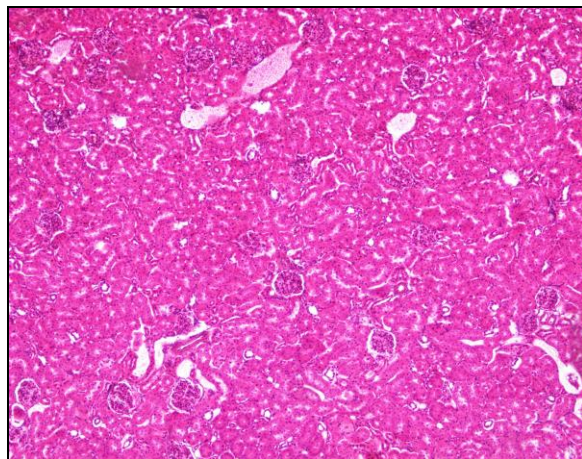
| | KRV | PLUĆA | BUBREZI | JETRA | MOZAK |
|-------------|------|-------|---------|-------|-------|
| Životinja 1 | 8,70 | 5,55 | 1,54 | 2,71 | 4,18 |
| Životinja 2 | 8,71 | 6,66 | 6,10 | 13,03 | 5,91 |

5.2. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA UZORAKA TKIVA

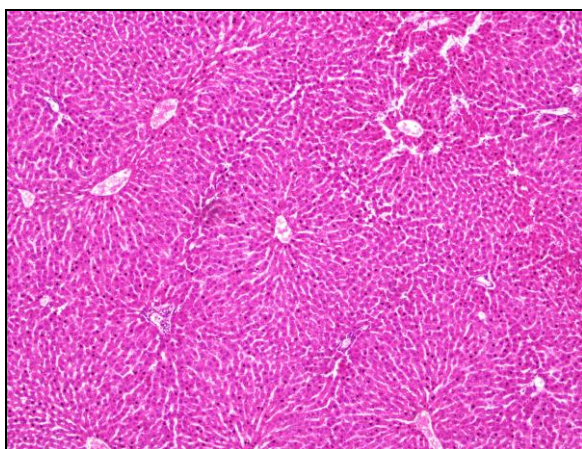
Grupa I



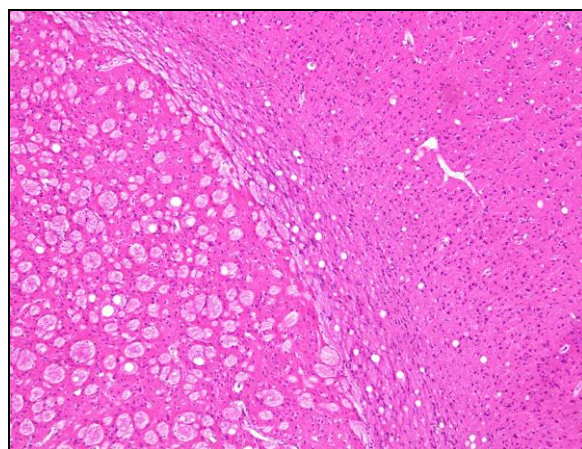
Slika 24. Pluća (HE, 40x)



Slika 25. Bubrež (HE, 100x)

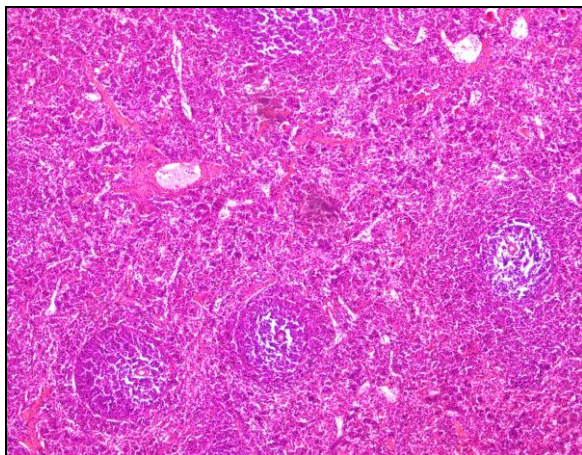


Slika 26. Jetra (HE, 100x)

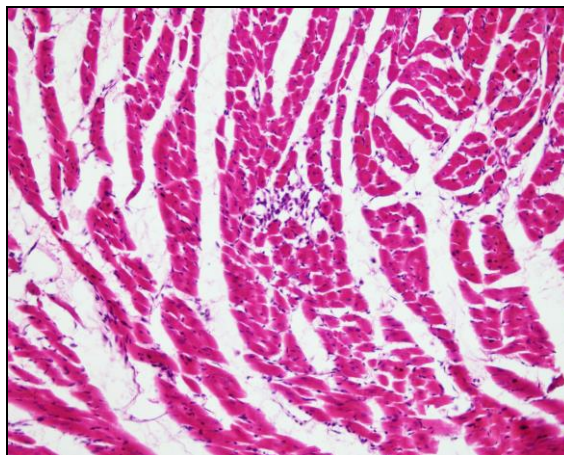


Slika 27. Mozak (HE, 100x)

Grupa I



Slika 28. Slezina (HE, 100x)

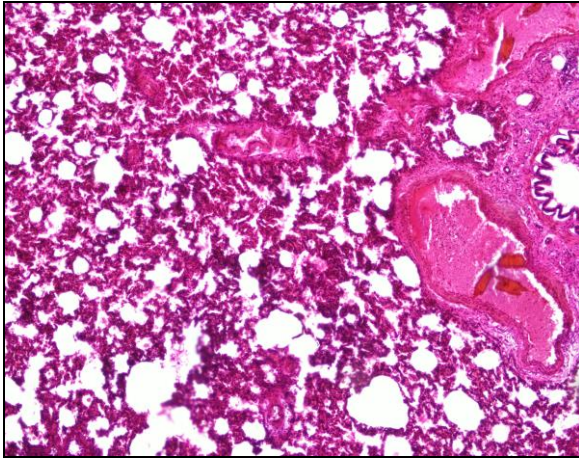


Slika 29. Srce (HE, 200x)

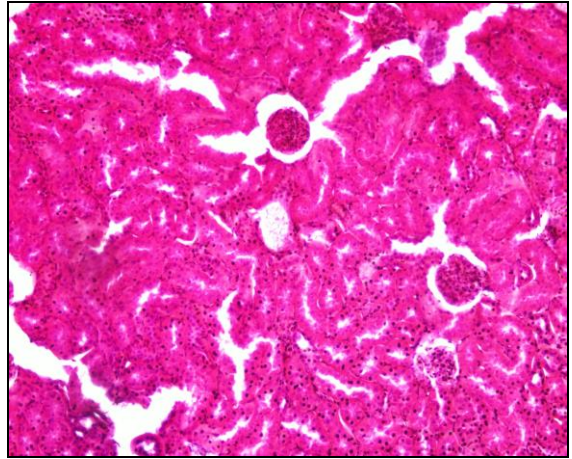


Slika 30. Tanko crevo (HE, 100x)

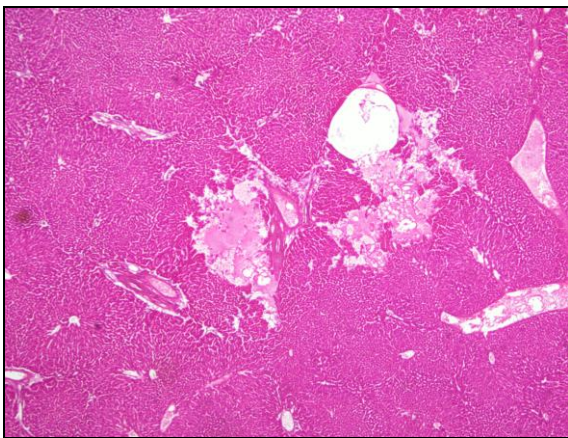
Grupa II



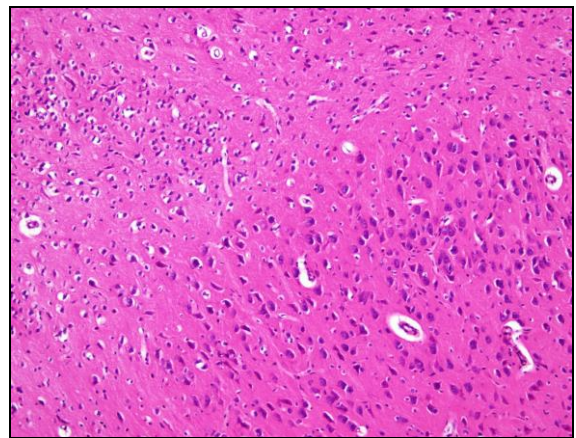
Slika 31. Pluća (HE, 100x)



Slika 32. Bubrež (HE, 200x)

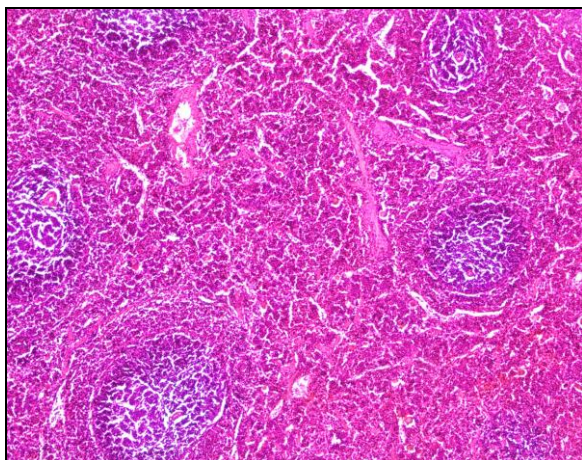


Slika 33. Jetra (HE, 40x)

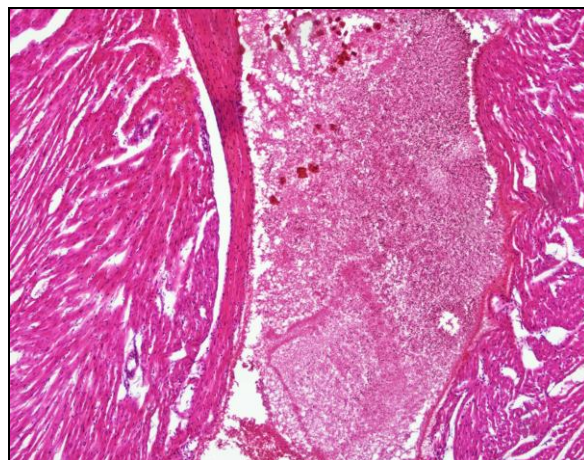


Slika 34. Mozak (HE, 200x)

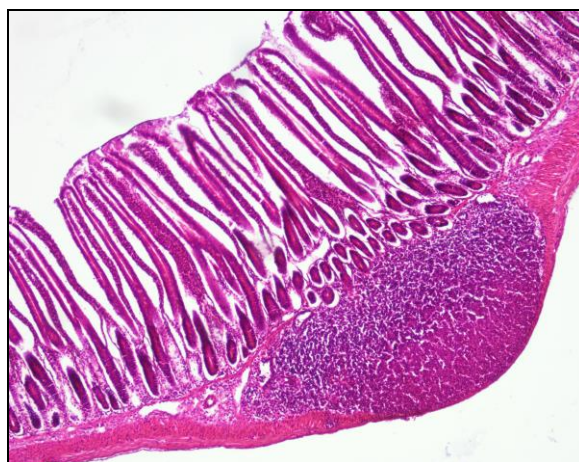
Grupa II



Slika 35. Slezina (HE, 100x)

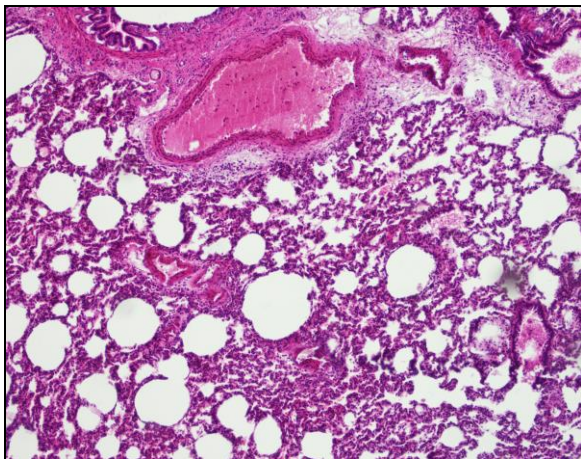


Slika 36. Srce (HE, 100x)

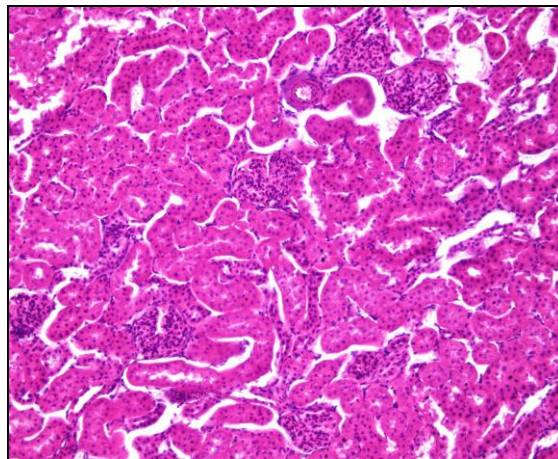


Slika 37. Tanko crevo (HE, 100x)

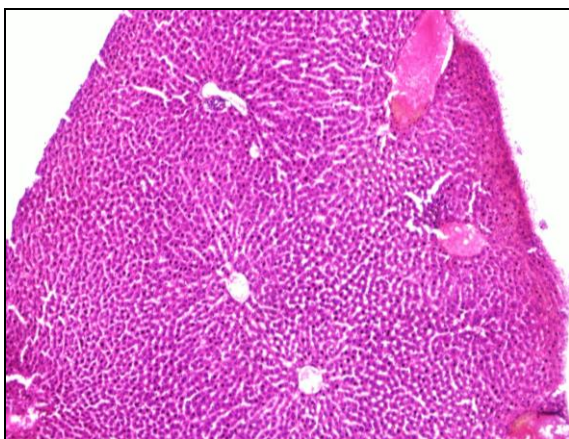
Grupa III



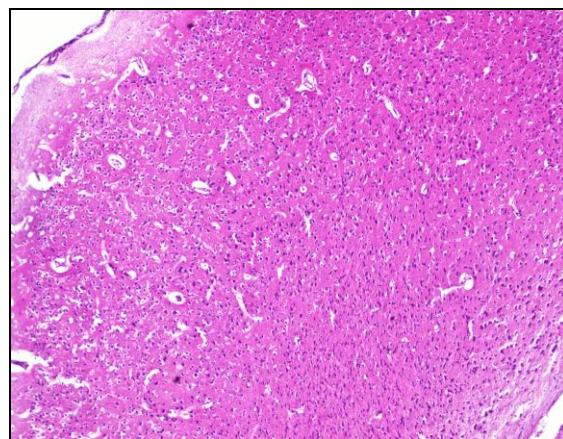
Slika 38. Pluća (HE, 100x)



Slika 39. Bubrež (HE, 200x)

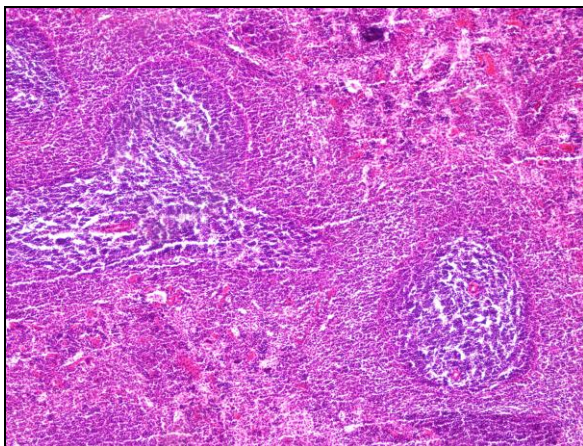


Slika 40. Jetra (HE, 40x)

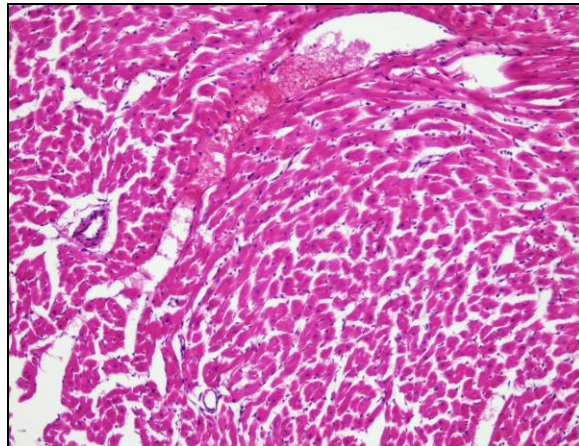


Slika 41. Mozak (HE, 200x)

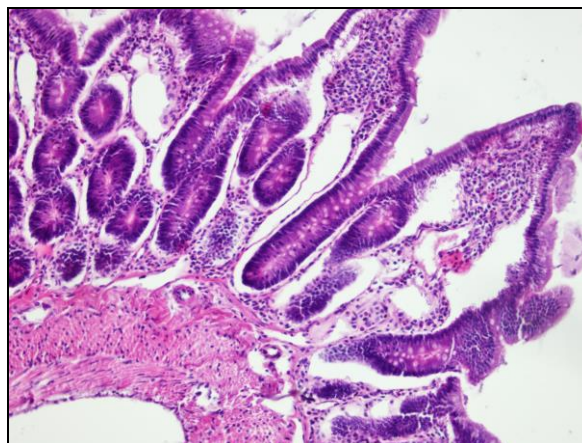
Grupa III



Slika 42. Slezina (HE, 100x)

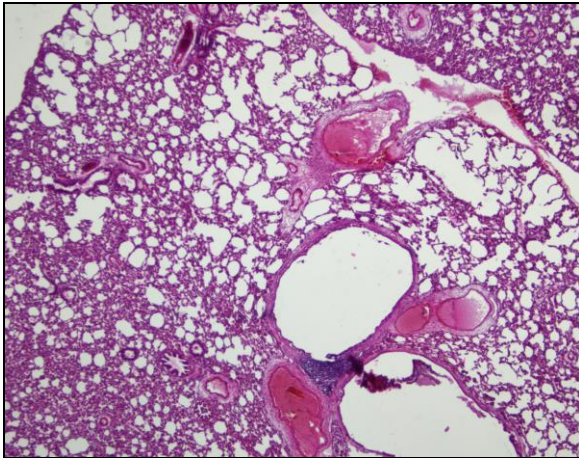


Slika 43. Srce (HE, 200x)

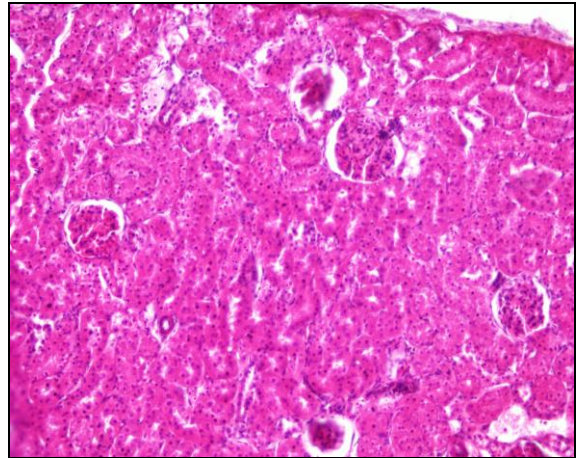


Slika 44. Tanko crevo (HE, 200x)

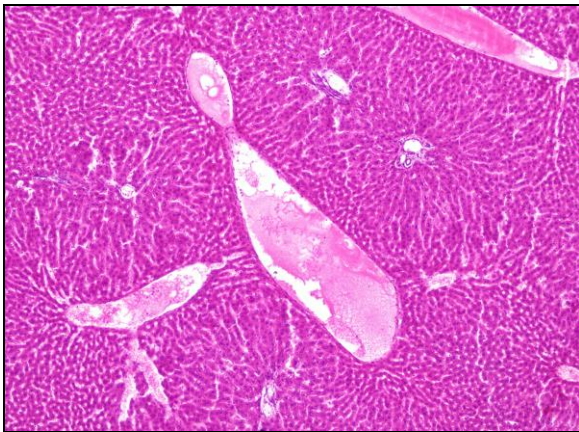
Grupa IV



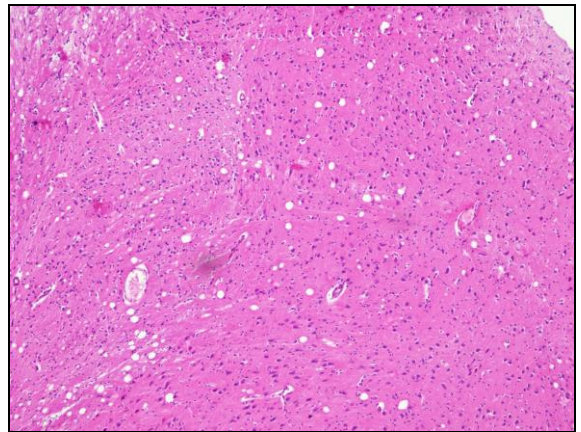
Slika 45. Pluća (HE; 40x)



Slika 46. Bubrež (HE, 200x)

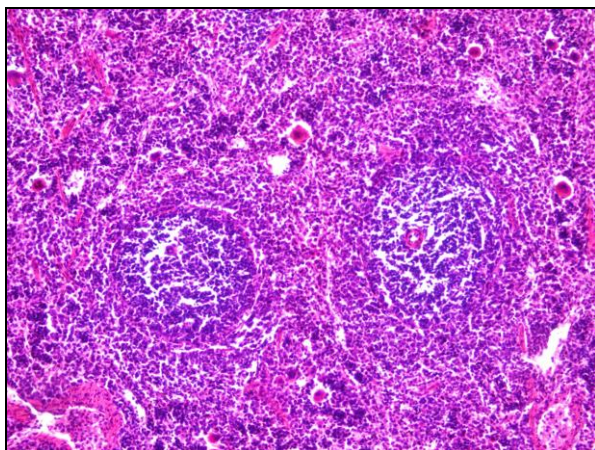


Slika 47. Jetra (HE, 100x)

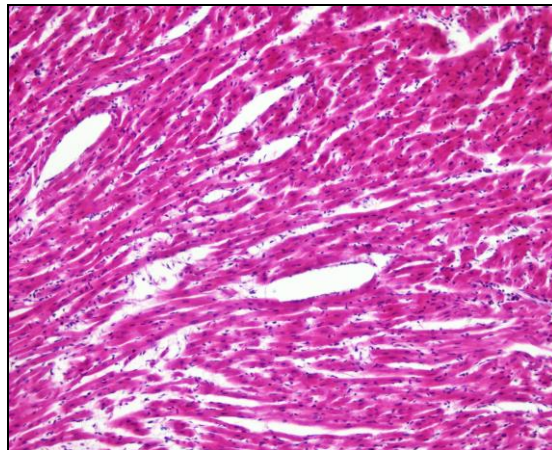


Slika 48. Mozak (HE, 100x)

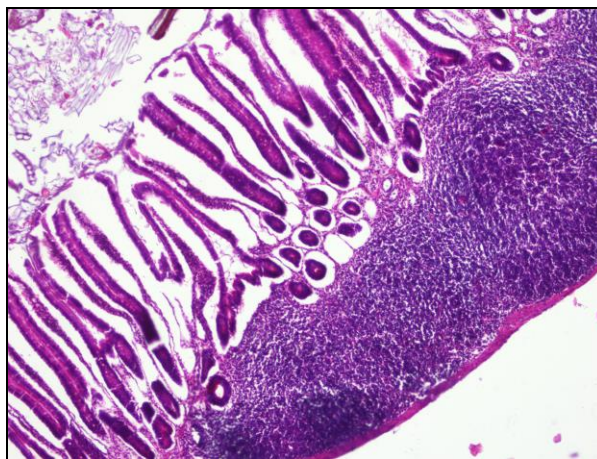
Grupa IV



Slika 49. Slezina (HE, 200x)

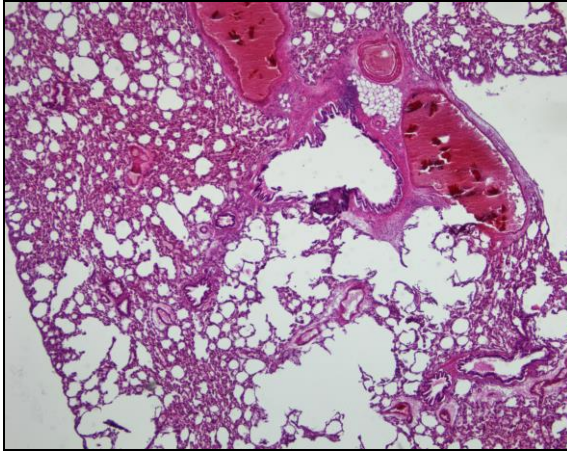


Slika 50. Srce (HE, 200x)

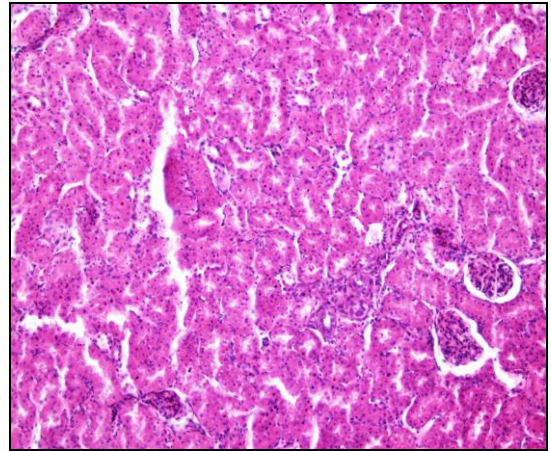


Slika 51. Tanko crevo (HE, 100x)

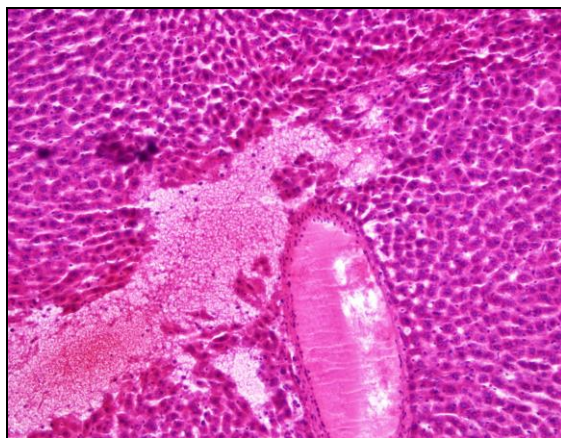
Grupa V



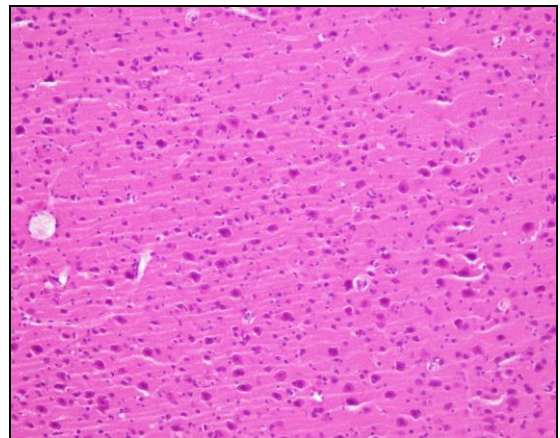
Slika 52. Pluća (HE, 40x)



Slika 53. Bubrež (HE, 200x)

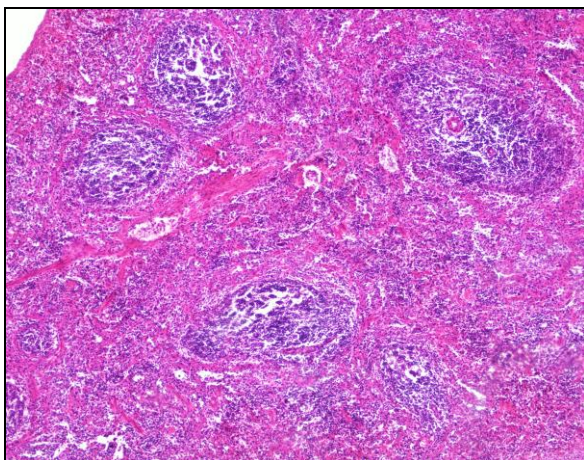


Slika 54. Jetra (HE, 100x)

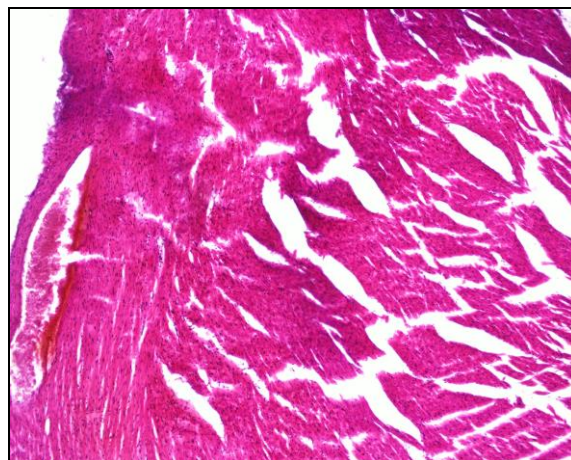


Slika 55. Mozak (HE, 100x)

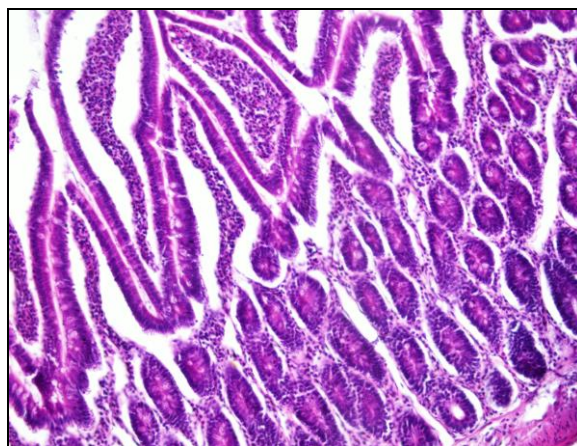
Grupa V



Slika 56. Slezina (HE, 100x)

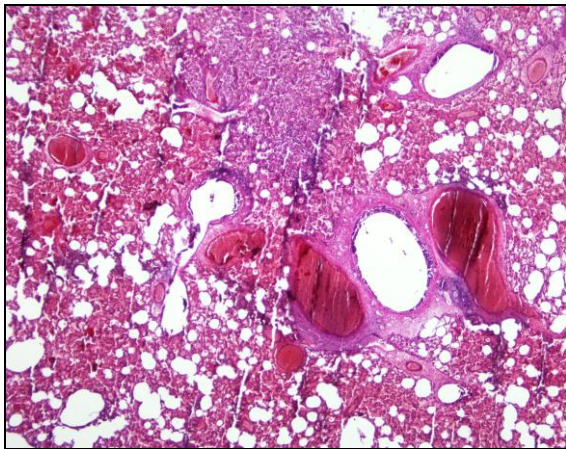


Slika 57. Srce (HE, 100x)

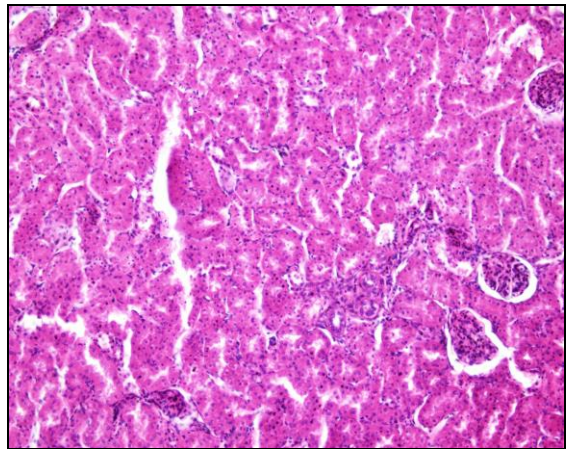


Slika 58. Tanko crevo (HE, 200x)

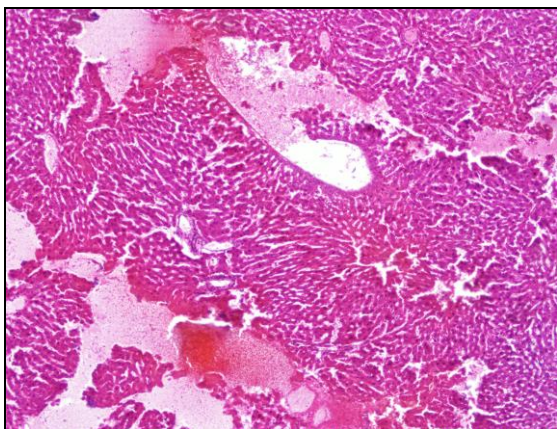
Životinja uginula između 12 i 24 časova od aplikacije suspenzije



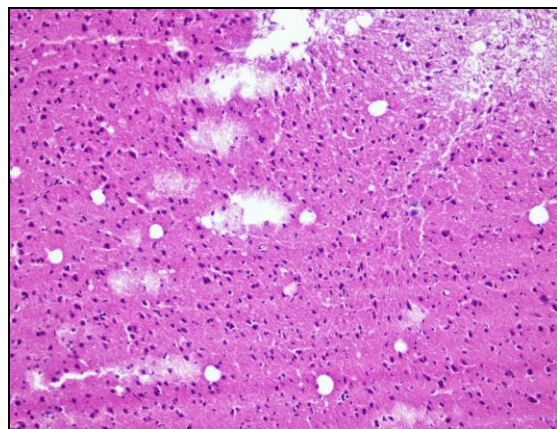
Slika 59. Pluća (HE, 40x)



Slika 60. Bubrež (HE, 200x)

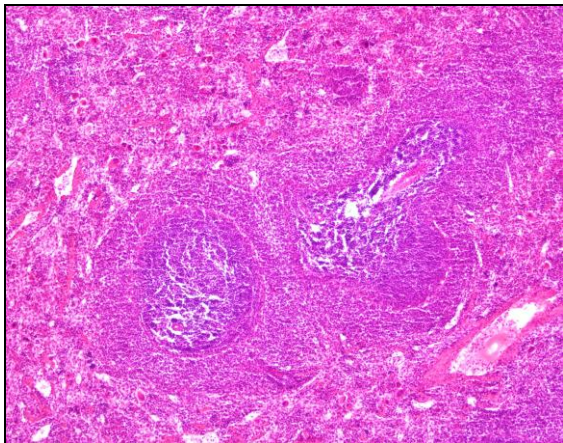


Slika 61. Jetra (HE, 100x)

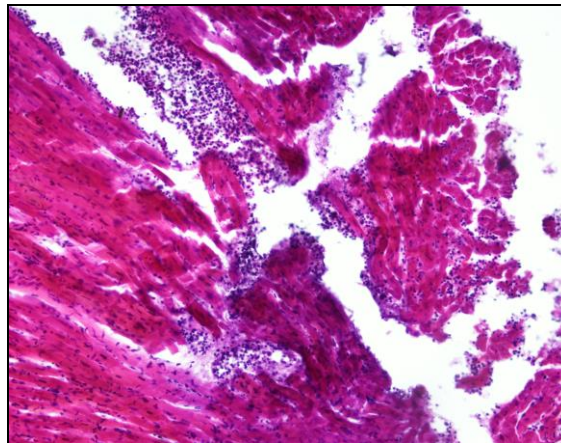


Slika 62. Mozak (HE, 200x)

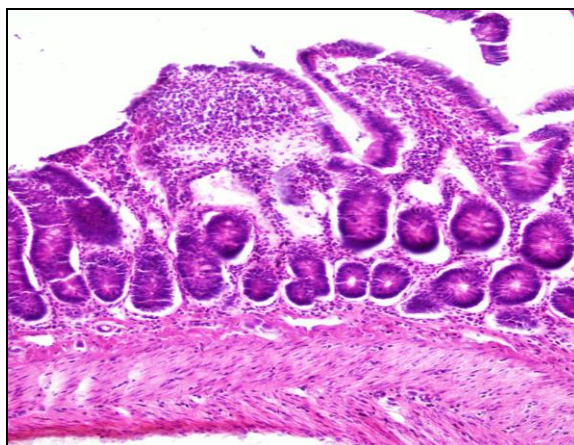
Životinja uginula između 12 i 24 časova od aplikacije suspenzije



Slika 63. Slezina (HE, 100x)

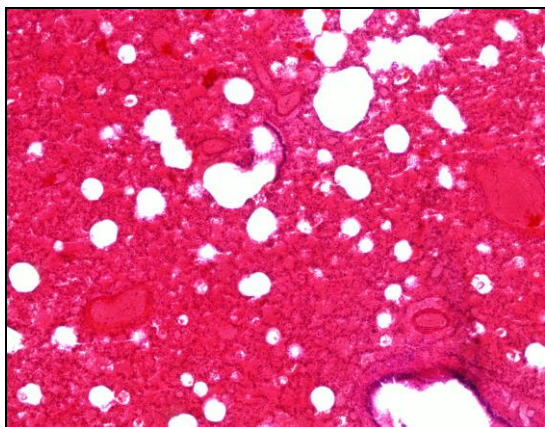


Slika 64. Srce (HE, 200x)

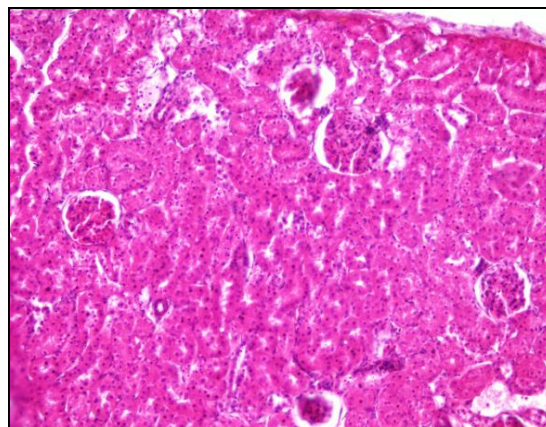


Slika 65. Tanko crevo (HE, 200x)

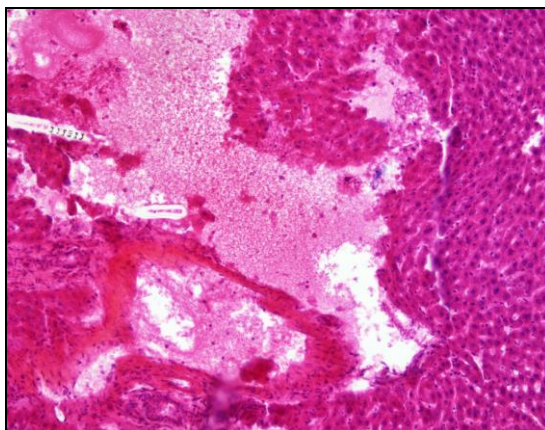
Životinja uginula između 24 i 28 časova od aplikacije suspenzije



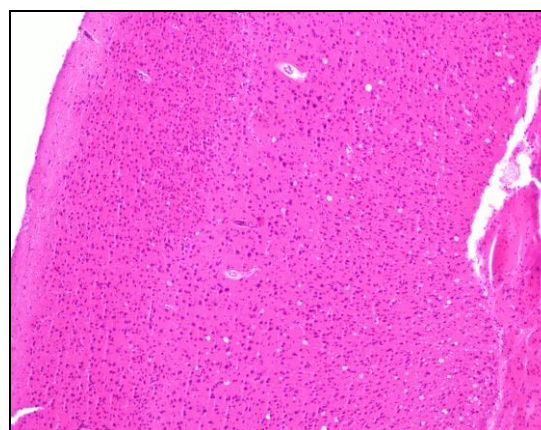
Slika 66. Pluća (HE, 100x)



Slika 67. Bubrež (HE, 200x)

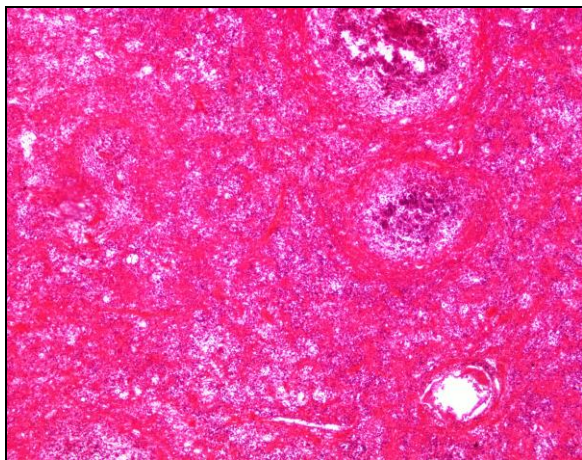


Slika 68. Jetra (HE, 100x)

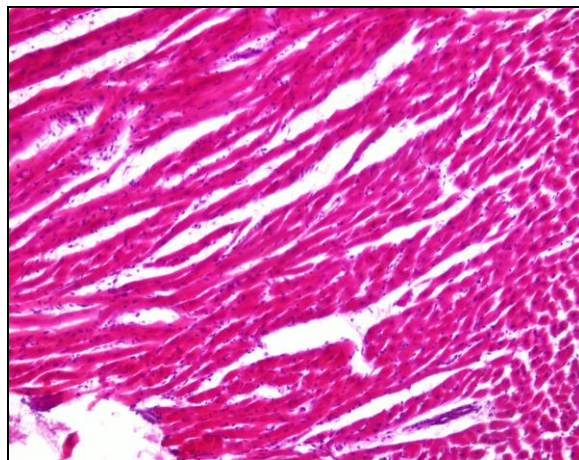


Slika 69. Mozak (HE, 100x)

Životinja uginula između 24 i 28 časova od aplikacije suspenzije



Slika 70. Slezina (HE, 100x)



Slika 71. Srce (HE, 200x)



Slika 72. Tanko crevo (HE, 100x)

5.2.1. PATOHISTOLOŠKI NALAZ NA ORGANIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA U ODNOSU NA VREME ŽRTVOVANJA

I grupa životinja

Pluća: blaga hiperemija (slika 24)

Bubrezi: blaga hiperemija (slika 25)

Jetra: blaga hiperemija (slika 26)

Mozak: blaga hiperemija (slika 27)

Slezina: izražena hiperemija sa proširenim sinusoidima crvene pulpe (slika 28)

Srce: edem intersticijuma i blaga hiperemija (slika 29)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalni inflamatorni infiltrat u lamini propriji (slika 30)

II grupa životinja

Pluća: blaga hiperemija (slika 31)

Bubrezi: blaga hiperemija i fokalna parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija prevashodno proksimalnih tubula (slika 32)

Jetra: blaga hiperemija (slika 33)

Mozak: blaga hiperemija (slika 34)

Slezina: izražena hiperemija sa proširenim sinusoidima crvene pulpe (slika 35)

Srce: edem intersticijuma i blaga hiperemija (slika 36)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalni inflamatorni infiltrat u lamini propriji (slika 37)

III grupa životinja

Pluća: umerena hiperemija, deskvamovane alveolarne ćelije i makrofagi u alveolama, fokalni perivaskularni i peribronhijalni infiltrat limfocita i plazma ćelija (slika 38)

Bubrezi: izraženija hiperemija i difuzna parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija tubula (slika 39)

Jetra: izražena hiperemija sa proširenjem sinusoida i kompresijom hepatocita (slika 40)

Mozak: umerena hiperemija, fokalni pericelularni i perivaskularni edem (slika 41)

Slezina: izražena hiperemija sa proširenim sinusoidima crvene pulpe, povećanim brojem ćelija bele krvne loze i megakariocitima (slika 42)

Srce: edem intersticijuma i izraženija hiperemija (slika 43)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini propriji (slika 44)

IV grupa životinja

Pluća: izražena hiperemija, deskvamovane alveolarne ćelije i makrofagi u alveolama, fokalno gušći perivaskularni i peribronhijalni infiltrat limfocita i plazma ćelija (slika 45)

Bubrezi: izražena hiperemija, difuzna parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija tubula, zadebljanje i fibroza glomerularnih kapilarnih krvnih sudova, u pojedinim tubulima je prisutan eozinofilni proteinski materijal (slika 46)

Jetra: izražena hiperemija sa proširenjem sinusoida i kompresijom hepatocita koji pokazuju degenerativne promene fokalno praćene sa karioreksom, kariolizom i kariopiknozom jedara, fokalno je prisutan mononuklearni inflamatorni infiltrat (slika 47)

Mozak: izražena hiperemija, difuzan pericelularni i perivaskularni edem (slika 48)

Slezina: izražena hiperemija sa proširenim sinusoidima crvene pulpe povećanim brojem ćelija bele krvne loze i megakariocitima, bela pulpa je proliferisala sa fokalno izraženijim germinativnim centrima (slika 49)

Srce: edem intersticijuma i izražena hiperemija, fokalan mononuklearni infiltrat (slika 50)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini propriji, umnoženo limfno tkivo Payerovih ploča (slika 51)

V grupa životinja

Pluća: izražena hiperemija, deskvamovane alveolarne ćelije i makrofagi u alveolama, fokalno gušći perivaskularni i peribronhijalni infiltrat limfocita i plazma ćelija (slika 52)

Bubrezi: izražena hiperemija, difuzna parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija tubula, zadebljanje i fibroza glomerularnih kapilarnih krvnih sudova, u pojedinim tubulima je prisutan eozinofilni proteinski materijal (slika 53)

Jetra: izražena hiperemija sa proširenjem sinusoida i kompresijom hepatocita koji pokazuju degenerativne promene fokalno praćene sa karioreksom, kariolizom i kariopiknozom jedara, fokalno je prisutan mononuklearni inflamatorni infiltrat (slika 54)

Mozak: izražena hiperemija, difuzan pericelularni i perivaskularni edem (slika 55)

Slezina: izražena hiperemija sa proširenim sinusoidima crvene pulpe povećanim brojem ćelija bele krvne loze i megakariocitima, bela pulpa je proliferisala sa fokalno izraženijim germinativnim centrima (slika 56)

Srce: edem intersticijuma i izražena hiperemija, fokalni mononuklearni infiltrat (slika 57)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini propriji (slika 58)

Životinja uginula između 12 i 24 časova od aplikacije suspenzije

Pluća: Izražena nekroza alveolarnih pregrada i intraalveolarna hemoragija (slika 59)

Bubrezi: akutna tubularna nekroza i mononuklearni infiltrat u intersticijumu (slika 60)

Jetra: nekroza hepatocita sa fragmentacijom gredica, krvarenjem i nakupljanjem svetlo eozinofilne tečnosti (slika 61)

Mozak: fokalno su prisutna manja područja encefalomalacije (slika 62)

Slezina: izražena nekroza crvene pulpe (slika 63)

Srce: nekroza kardiomiocita i gust infiltrat prevashodno neutrofilnih granulocita (slika 64)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini propriji, umnoženo limfno tkivo Payerovih ploča (slika 65)

Životinja uginula između 24 i 28 časova od aplikacije suspenzije

Pluća: Izražena nekroza alveolarnih pregrada i intraalveolarna hemoragija (slika 66)

Bubrezi: akutna tubularna nekroza i mononuklearni infiltrat u intersticijumu (slika 67)

Jetra: nekroza hepatocita sa fragmentacijom gredica, krvarenjem i nakupljanjem svetlo eozinofilne tečnosti (slika 68)

Mozak: fokalno su prisutna manja područja encefalomalacije (slika 69)

Slezina: izražena nekroza crvene pulpe (slika 67)

Srce: nekroza kardiomiocita i gust infiltrat prevashodno neutrofilnih granulocita (slika 68)

Tanko crevo: blaga hiperemija i fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini propriji, umnoženo limfno tkivo Payerovih ploča (slika 69)

6. DISKUSIJA

6.1. Analiza promene koncentracije ricinina u organima eksperimentalnih životinja u zavisnosti od vremena proteklog od aplikacije suspenzije

Koncentracija ricinina u krvi

Nakon resorpcije iz digestivnog trakta ricin i ricinin dospevaju u krv, gde je za očekivati da u prvim časovima nakon intoksikacije koncentracije budu najviše. Dokazivanje hemijsko-toksikološkom analizom ricinina u krvi laboratorijskih životinja nakon oralne aplikacije suspenzije ricinusa, u smislu posrednog dokaza intoksikacije ricinom, postavljeno je kao jedan od ciljeva ovog eksperimenta.

Ranija istraživanja pokazala su da se ricin može dokazati u krvi za manje od jednog časa nakon oralnog unosa.^{86,100,251} Rezultati eksperimenta pokazuju da je koncentracija ricinina 6 časova nakon aplikacije suspenzije najviša upravo u krvi, u poređenju sa analiziranom koncentracijom po organima. Prosečna koncentracija ricinina u krvi kod prve grupe životinja iznosila je 4,25 ng/ml (Tabela 1). Nakon toga, u narednih 6 časova, došlo je do naglog pada koncentracije, tako da je prosečna koncentracija ricinina u krvi kod životinja iz druge grupe iznosila 2,30 ng/ml. Dakle, između 6 i 12 časova nakon aplikacije suspenzije ricinusa koncentracija ricinina u krvi životinja se gotovo prepolovila. Analizom Grafikona 1 može se zaključiti da se taj nagli pad koncentracije ricinina u krvi, između 6 i 12 časova nakon intoksikacije, odigrava po kinetici I reda, a kriva opadanja koncentracije ima linearan izgled. To je u skladu sa ranije objavljenim istraživanjima^{50,251,266} kada je pokazano da ubrzo nakon intoksikacije dolazi do naglog pada koncentracije ricina u krvi i da je to najverovatnije posledica rapidnog vezivanja za receptore na ćelijskoj površini i redistribucije po tkivima. Istraživanje Godala i saradnika²⁶⁷ takođe je pokazalo da u prvim časovima nakon intoksikacije smanjivanje koncentracije ricina u krvi prati kinetiku I reda. Isto pokazuju i rezultati faze I kliničkog ispitivanja u kojem je pacijentima sa malignom bolešću aplikovan ricin u određenoj dozi i kod kojih se koncentracije ricina u krvi smanjivala prema kinetici I reda.²⁰¹

Nakon 12 časova od intoksikacije koncentracija ricinina u krvi više ne opada rapidno, prema kinetici I reda, već se beleži blagi pad koncentracije, a kriva ima

eksponencijalan izgled. U trećoj grupi životinja, žrtvovanih 24 časa od aplikacije suspenzije, prosečna vrednost koncentracije ricinina u krvi iznosila je 1,82 ng/ml, u četvrtoj grupi (36 časova nakon aplikacije suspenzije) 1,52 ng/ml, a u petoj grupi (48 časova nakon aplikacije suspenzije) 1,37 ng/ml. Utvrđeno je da razlike u koncentraciji ricinina u navedenim grupama nisu statistički značajne.

Od velikog praktičnog značaja je činjenica da se, nakon intoksikacije, mogu očekivati približno slične koncentracije ricina u krvi kod ljudi i laboratorijskih miševa. Na taj način se, zasnovano na eksperimentima izvedenim na životinjama, mogu predvideti toksični efekti ricina kod ljudi.

Imajući u vidu kretanje koncentracije ricinina u krvi laboratorijskih životinja nakon oralne intoksikacije ricinusom može se zaključiti da je uzorak krvi za analizu i dokazivanje trovanja najbolje uzeti što je pre moguće, u prvih nekoliko časova nakon intoksikacije, kada su koncentracije toksina u krvi najviše i pouzdano se može izvršiti njegovo dokazivanje. Dokazivanje ricinina u krvi je lako izvodljivo metodom GC/MS i predstavlja siguran znak intoksikacije ricinom.

Koncentracija ricinina u plućima

Promena koncentracije ricinina u plućima ima sličnu dinamiku kao promena koncentracije u krvi, s tim što prosečne koncentracije u plućima, u svim uzorcima, imaju nešto niže vrednosti (Grafikon 11). Takođe, zanimljivo je da su koncentracije ricinina u plućima i mozgu 6 časova nakon intoksikacije gotovo identične. To bi se moglo objasniti činjenicom da su ricin i ricinin hidrosolubilni, lako prolaze kroz krvno-moždanu i respiratornu barijeru i podležu brzom redistribuciji iz krvi u mozak i pluća.

Prosečna koncentracija ricinina u plućima kod životinja iz prve grupe iznosila je 3,75 ng/ml (Tabela 3). Nakon toga beleži se nagli pad koncentracije u sledećih 6 časova, tako da je prosečna koncentracija kod životinja iz druge grupe iznosila 1,63 ng/ml, što predstavlja smanjenje za oko 60 %. Pri tome se, kao i kod krvi, koncentracija smanjivala prema kinetici I reda. Nakon toga koncentracija ricinina se u narednih 12 časova održavala na gotovo istom nivou, kod životinja iz treće grupe (24 časa nakon intoksikacije) prosečna koncentracija je iznosila 1,61 ng/ml. Između 24 i 48 časova od intoksikacije koncentracija

ricinina u plućima se konstantno smanjivala, te je prosečna koncentracija kod životinja iz četvrte grupe iznosila 1,28 ng/ml, a kod životinja iz pete grupe 0,98 ng/ml (Grafikon 3).

Navedeni rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima. Neophodno je napomenuti da u literaturi postoje oskudni podaci o toksokinetici ricina i ricinina nakon oralne ingestije, većina istraživanja je bazirana na intravenskoj ili inhalatornoj aplikaciji toksina. Rezultati Doblера i saradnika²⁶⁸ i Bensonа i saradnika²⁶⁹ pokazuju da nakon inhalacije aerosola ricina kod miševa koncentracije rapidno opadaju u prvih 6 časova, a potom se beleži konstantni blagi pad koncentracije sve do 30 časova nakon intoksikacije. Do sličnih rezultata došli su Ramzden i saradnici, Fodstad i saradnici, Godal i saradnici koji su životinjama aplikovali ricin intravenski ili intraparijetalno.^{77,266,267} Išiguro i saradnici su oralno aplikovali ricin laboratorijskim pacovima u dozi od 10 mg/kg i utvrdili da ricin ne može da se detektuje u plućima između 6 i 72 časa nakon intoksikacije.

Rezultati istraživanja ukazuju da zbog naglog pada koncentracije ricinina u plućima (kao indirektnog markera trovanja ricinom), dokazivanje trovanja u smrtnim slučajevima može biti znatno otežano. Kao što je već navedeno, smrt usled trovanja ricinom nastupa najčešće između 36 i 72 časa od intoksikacije, kada su koncentracije ricinina u plućnom tkivu niske i eventualno se mogu javiti poteškoće u njegovom dokazivanju. Ipak, svakako se preporučuje rutinsko uzimanje uzorka plućnog tkiva za hemijsko-toksikološke analize jer upotreba aerosola ricina danas predstavlja najverovatniji put trovanja u slučaju moguće upotreba ricina kao hemijskog oružja.

Koncentracija ricinina u bubrezima

U izvršenom eksperimentu najviša koncentracija ricinina u bubrezima registrovana je kod životinja iz prve grupe, koje su žrtvovane 6 časova nakon aplikacije doze. Prosečna koncentracija ricinina kod ovih životinja iznosila je 2,56 ng/m (Tabela 5).

U narednih 18 časova koncentracija ricinina je progresivno opadala. U drugoj grupi životinja, žrtvovanih 12 časova nakon aplikacije, prosečna koncentracija je iznosila 1,86 ng/ml, a u trećoj grupi životinja 1,37 ng/ml. Između 24 i 36 časova zabeležen je blagi porast koncentracije ricinina u bubrezima, sa prosečnom vrednošću od 1,57 ng/ml. Nakon ovog kratkotrajnog porasta koncentracije ricinina kod životinja žrtvovanih 36 časova nakon aplikacije doze, usledio je blagi pad koncentracije kod životinja u petoj grupi, žrtvovanih 48

časova nakon aplikacije doze. U ovoj grupi prosečna koncentracija je iznosila 1,34 ng/ml, što je u nivou prosečne koncentracije koje su imale životinje iz treće grupe (Grafikon 5).

Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim podacima. Opisan je slučaj pacijenta koji je u suicidalne svrhe oralno i parenteralno uneo suspenziju zrna ricinusa i kod kojeg je koncentracija ricinina u urinu imala sličnu progresiju kao u našem istraživanju. Tada je najviša koncentracija u urinu zabeležena 12 časova nakon intoksikacije, kada je uzet prvi uzorak za analizu (u našem eksperimentu to je 6 časova nakon intoksikacije). I u ovom slučaju koncentracija ricinina je naglo opadala do 29 časova nakon intoksikacije, a zatim je u vremenu od 29 do 41 časa zabelen blagi porast.⁵⁰ U našem eksperimentu koncentracija ricinina nije merena u urinu nego u bubrežnom tkivu, ali je imala sličnu progresiju i takođe je, nakon inicijalnog naglog pada, zabeležen blagi porast koncentracije od 24 do 36 časova nakon intoksikacije.

U drugom publikovanom slučaju pacijent je pokušao samoubistvo ingestijom 6 zrna ricinusa. Uzorci urina uzeti su 14, 27, 37, 62 i 86 časova nakon ingestije. Najviša koncentracija ricinina zabeležena je u uzorku uzetom 27 časova nakon ingestije, a potom je usledio nagli pad koncentracije koji je registrovan u uzorcima od 37, 62 i 86 časova.¹⁹²

U eksperimentu izvedenom na laboratorijskim pacovima određene koncentracije ricinina su aplikovane intramuskularno, a potom je izmerena ukupna koncentracija ricinina u uzorcima urina uzetim 24 i 48 časova nakon intoksikacije.¹⁸⁸ Navedeno istraživanje pokazuje da koncentracija ricina progresivno opada tokom vremena, od 24 do 48 časova.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da se zaključak o trovanju ricinom može pouzdano izvesti dokazivanjem ricinina u bubrežnom tkivu i urinu ukoliko se radi o smrtnim slučajevima trovanja, odnosno u uzorku urina u kod hospitalizovanih pacijenata. Kod ovih pacijenata uzorak urina bi trebalo uzeti što je moguće ranije, jer je, bez obzira na put unošenja ricina u organizam, najviša koncentracija ricinina u bubrezima registrovana 6 časova nakon intoksikacije. Ricinin se sigurno može dokazati u bubrežnom tkivu i urinu do 48 časova nakon intoksikacije, imajući u vidu da se nakon inicijalnog naglog pada u prva 24 časa koncentracija ricinina održava na približno istom nivou između 24 i 48 časova.

Dokazivanje ricinina u urinu pacijenata predstavlja siguran znak trovanja ricinom i u tom slučaju neophodna je hitna primena simptomatske terapije.

Koncentracija ricinina u jetri

Nakon resorpcije u krv ricin se distribuira u tkiva i unutrašnje organe. Istraživanja u kojima je radioaktivno obeležen ricin aplikovan laboratorijskim životinjama pokazala su da se najveći procenat unete doze, nakon redistribucije iz krvi, može registrovati u jetri i slezini.^{77,266,267} Navedena istraživanja pokazuju da potom dolazi do naglog pada koncentracije ricina u jetri u kratkom vremenskom periodu. Rezultati istraživanja Godala i saradnika pokazuju da se 6 časova nakon intoksikacije oko 10 % unete doze ricina može registrovati u jetri, ukazujući na vrlo brzu eliminaciju.²⁶⁷ Slične rezultate su objavili Ramzden i saradnici i Fodstad i saradnici, ukazujući na visoku akumulaciju, ali i brzu eliminaciju iz jetre.^{77,266} Kuk i saradnici su tretirali laboratorijske pacove suspenzijom ricinusa i, kao i prethodno navedeni autori, zaključili da se najveći procenat unete doze može registrovati u jetri.²⁵¹ Razlog ovako visoke koncentracije toksina u jetri mogla bi biti činjenica da Kupferove ćelije jetre poseduju nekoliko tipova receptora kojima apsorbuju ricin iz krvi.

Rezultati izvršenog eksperimenta su u suprotnosti sa navedenim istraživanjima. U prvoj grupi životinja (6 časova nakon aplikacije suspenzije) prosečna koncentracija ricinina iznosila je 1,86 ng/ml, a u drugoj grupi životinja (12 časova nakon aplikacije suspenzije) 2,69 ng/ml (Tabela 7). Rezultati pokazuju da se koncentracija ricinina, a samim tim i ricina, u jetri konstantno povećava u prvih 12 časova nakon intoksikacije, kada dostiže plato. U naredna 24 časa koncentracija ostaje na približno istom nivou. Zabeležen je blagi pad koncentracije u trećoj grupi (24 časa nakon aplikacije suspenzije) u odnosu na drugu grupu (2,52 ng/ml), dok je u četvrtoj grupi (36 časova nakon aplikacije suspenzije) koncentracija gotovo identična kao u drugoj i iznosila je 2,73 ng/ml. Nakon toga sledi nagli pad koncentracije, čija je prosečna vrednost u jetri kod pete grupe životinja (48 časova nakon aplikacije suspenzije) iznosila 1,41 ng/ml.

Navedeni rezultati ukazuju da se uporedo sa snižavanjem u krvi koncentracija ricina povećava u jetri, odražavajući redistribuciju iz krvi u jetreno tkivo. Za razliku od ostalih analiziranih tkiva, kada koncentracija ricina nakon dostizanja platoa beleži nagli pad, u jetri koncentracija nakon dostizanja platoa ostaje konstantna u određenom periodu (Grafikon 7). Ovo se može objasniti akumulacijom toksina u jetri koja se najverovatnije događa preko portalnog krvotoka, i njegovim naknadnim metabolizmom. Rezultati izvršenog

eksperimenta su u skladu sa istraživanjem Išigura i saradnika¹⁰⁰ koji su takođe utvrdili da se koncentracija ricina u jetri povećava počevši od 6. časa nakon oralne intoksikacije, dostiže maksimalnu vrednost nakon 48 časova, a potom počinje da se snižava.

Na osnovu navedenog može se zaključiti da je prilikom obdukcije, u slučajevima kada se sumnja da je smrtni ishod nastupio usled intoksikacije ricinom, neophodno uzeti uzorak tkiva jetre za hemijsko-toksikološku analizu. Nakon trovanja ricinom smrt najčešće nastupa između 36 i 72 od unosa toksina, a rezultati eksperimenta pokazuju da je zbog akumulacije toksina u jetri moguće njegovo dokazivanje barem 48 časova nakon intoksikacije, detektovanjem ricinina. Pri tome su koncentracije ricina u jetri u dužem vremenskom periodu više nego u drugim tkivima, te je i njegovo dokazivanje znatno lakše i pouzdanije.

Za razliku od plućnog tkiva, koncentracija ricinina u tkivu mozga, jetre i bubrega u dužem vremenu nakon intoksikacije zadržava više vrednosti, te je njegovo dokazivanje u ovim organima znatno jednostavnije.

Koncentracija ricinina u mozgu

U poređenju sa drugim tkivima, kretanje koncentracije ricinina u mozgu pokazuje određene osobenosti. Kod prve grupe životinja prosečna koncentracija ricinina u mozgu je bila visoka (3,80 ng/ml) i gotovo identična kao u plućima (Tabela 9). Za razliku od krvi, pluća i bubrega, gde se koncentracija naglo snižavala nakon 6 časova od intoksikacije, koncentracija ricinina u mozgu je rasla između 6 i 12 časova od intoksikacije i kod druge grupe životinja iznosila je 5,39 ng/ml. Po tome je kretanje koncentracije ricinina u mozgu slično kao kod jetre, gde je takođe zabeležen rast koncentracije između 6 i 12 časova od intoksikacije. Ujedno, vrednost od 5,39 ng/ml predstavlja najvišu prosečnu koncentraciju ricinina zabeleženu u ovom eksperimentu. Međutim, za razliku od jetre, gde se koncentracija zadržavala na približno istom nivou tokom više časova, u mozgu nakon 12 časova od intoksikacije dolazi do naglog pada koncentracije, tako da je prosečna koncentracija u kod životinja iz treće grupe iznosila 3,60 ng/ml. Taj pad koncentracije se nastavio dalje, prosečna koncentracija ricinina u mozgu kod životinja iz četvrte grupe iznosila je 2,66 ng/ml, a kod životinja iz četvrte grupe 2,05 ng/ml (Grafikon 9). Zanimljivo

je da je upravo u mozgu zabeležena najviša prosečna vrednost koncentracije ricinina u vremenu od 48 časova nakon intoksikacije (navedenih 2,05 ng/ml).

U literaturi ne postoje podaci o distribuciji ricina ili ricinina u mozgu nakon.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da je prilikom obdukcije, u slučajevima sumnje na trovanje ricinom, neophodno uzimanje uzorka tkiva mozga za hemijsko-toksikološku analizu. Ricinin se, kao biomarker trovanja ricinom, zadržava u visokoj koncentraciji u tkivu mozga više časova nakon intoksikacije, te je dokazivanje trovanja pouzdanije u odnosu na druga analizirana tkiva.

U toku izvođenja eksperimenta uginule su dve životinje. Jedna životinja uginula je između 12 i 24 časa, a druga između 24 i 28 časova. Kod obe životinje nađene su značajno veće koncentracije ricinina u svim analiziranim organima u odnosu na ostale eksperimentalne životinje (Tabela 12). Kod prve životinje najveća koncentracija ricinina zabeležena je u krvi i plućima. Kod druge životinje koncentracije ricinina su izuzetno visoke u svim analiziranim organima, s tim što se posebno ističe koncentracija u jetri. Ovako visoke koncentracije ricinina u krvi i organima laboratorijskih pacova mogle bi se, nakon isključivanja drugih mogućih uzroka, objasniti razvojem idiosinkratične reakcije. Idiosinkratična reakcija je potpuno nepredvidiva i neočekivana, specifična za organizam i, za razliku od alergijske reakcije, može se javiti prilikom prvog kontakta sa određenom supstancom. Životinje uključene u eksperiment potiču iz istog okota, bile su približno iste mase i čuvane su pod istim uslovima, sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Imajući u vidu navedeno, izuzev razvoja idiosinkratične reakcije ne postoji drugo prihvatljivo objašnjenje kojim bi se mogle tumačiti koncentracije ricinina u krvi i unutrašnjim organima uginulih životinja.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da je u slučaju sumnje na trovanje ricinom od pacijenata neophodno uzeti biološke uzorke za hemijsko-toksikološku analizu. U tim slučajevima najveći problem svakako je postavljanje dijagnoze trovanja, jer su slučajevi intoksikacije retki. Pored toga, simptomi trovanja su nespecifični, vrlo slični gripu ili nekoj drugoj virusnoj infekciji, tako da se prilikom inicijalnog pregleda najčešće ne posumnja na intoksikaciju, osim ukoliko se ne dobije pouzdan podatak o unosu ricinusa u

organizam. Problem je posebno izražen kod male dece sa kojom se teško uspostavlja kontakt i kod koje su okolnosti trovanja najčešće nepoznate.

U slučaju sumnje na trovanje ricinom kod bolničkih pacijenata rutinski je potrebno uzeti uzorke krvi i mokraće za analizu. Uzorke bi, ukoliko je to moguće, trebalo uzeti odmah nakon postavljanja sumnje na intoksikaciju. Koncentracija ricinina u krvi i urinu je, i pored naglod snižavanja, najviša u prvih 12 časova nakon intoksikacije, te je njegovo dokazivanje u navedenim biološkim uzorcima u ovom vremenu znatno lakše i pouzdanije. Dobijeni rezultati pokazuju da je ricinin moguće dokazati u uzorcima krvi i urina i 48 časova nakon intoksikacije, ali su koncentracije u tom vremenu znatno niže, pa je samim ti i njegovo dokazivanje komplikovanije.

U slučajevima smrtnog trovanja obdukcijom je potrebno ustanoviti uzrok smrti, odnosno dokazati ricin kao toksični agens. Treba imati na umu da su u svakodnevnom sudskomedicinskom radu okolnosti nastupanja smrtnog ishoda često nepoznate, te je potreban multidisciplinarni pristup kako bi se ustanovio definitivni uzrok smrti. U dijagnozi nastupanja smrtnog ishoda usled trovanja ricinom ovakav pristup je posebno važan, jer su trovanja vrlo retka, a makroskopski i mikroskopski nalaz nespecifični. Rezultati istraživanja ukazuju da je prilikom obdukcije neophodno uzeti uzorke krvi, urina, pluća, bubrega, jetre i mozga jer se ricinin, kao posredni marker intoksikacije ricinom, može pouzdano registrovati u ovim organima. Smrtni ishod kod trovanja ricinom najčešće nastupa više časova nakon unosa toksina (najčešće između 36 i 72 časa), tako da se, imajući u vidu rezultate dobijene u eksperimentu, može zaključiti da se ricinin prilikom obdukcije sigurno može dokazati pre svega u tkivu jetre i mozga. U ovim organima registrovane su visoke koncentracije ricinina više časova nakon intoksikacije (između 24 i 48 časova) (grafikon 11) što, u poređenju sa drugim tkivima, dijagnozu trovanja ricinom čini lakšom i pouzdanijom.

6.2. Analiza progresije patohistoloških promena na organima eksperimentalnih životinja u zavisnosti od vremena proteklog od aplikacije suspenzije

Pluća

Patohistološke promene u plućnom parenhimu su izraženije u skladu sa vremenom proteklom od aplikacije suspenzije. U I i II grupi promene su diskretne, prisutna je blaga hiperemija, dok je u ostalim grupama hiperemija izraženija, fokalno je u alveolama prisutna edemska tečnost, kao i deskvamovane alveolarne ćelije i makrofagi. Perivaskularno i peribronhijalno prisutan je fokalno gušći infiltrat limfocita i plazma ćelija. U sitnim krvnim sudovima fokalno su prisutni fibrinski trombi. Izražena nekroza alveolarnih pregrada i intraalveolarna hemoragija registrovani su kod uginulih životinja.

Bubrezi

U I i II grupi promene u bubrežnom parenhimu su diskretne i nesigifikantne. Kod životinja iz drugih grupa prisutna je blaga do izražena hiperemija, parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija prevashodno proksimalnih tubula, zadebljanje i fibroza glomerularnih kapilarnih krvnih sudova, a u pojedinim tubulima je prisutan eozinofilni proteinski materijal. Kod uginulih životinja najizraženiji nalaz je akutna tubularna nekroza i mononuklearni infiltrat u intersticijumu.

Jetra

Diskretne patohistološke promene prisutne su u I i II grupi u vidu blage hiperemije. U drugim grupama hiperemija je izraženija, sa proširenjem sinusoida i kompresijom hepatocita. Hepatociti pokazuju fokalne degenerativne promene praćene karioreksom, kariolizom i kariopiknozom jedara. Fokalno je prisutan mononuklearni inflamatorni infiltrat. Nekroza hepatocita sa fragmentacijom gredica, krvarenjem i nakupljanjem svetlo eozinofilne tečnosti registrovana je kod uginulih životinja.

Mozak

Patohistološke promene u mozgu su slabo izražene i obuhvataju pericelularni i perivaskularni edem i hiperemiju. U I i II grupi su slabo uočljive, dok su u ostalim grupama

izraženije, pre svega edem. Kod uginulih životinja fokalno su prisutna manja područja encefalomalacije.

Slezina

U svim ispitivanim slučajevima parenhim slezine je izraženije hiperemičan, sa proširenim sinusoidima crvene pulpe, povećanim brojem ćelija bele krvne loze i megakariocitima. Bela pulpa je proliferisala sa fokalno izraženijim germinativnim centrima. U slučajevima sa najvišom koncentracijom ricinina prisutna je izražena nekroza crvene pulpe.

Srce

Patohistološke promene u srcu su slabije izražene u svim grupama. Uočljiv je edem intersticijuma i hiperemija, kao i fokalni mononuklearni infiltrat. U slučajevima koji su egzistirali prisutna je nekroza kardiomiocita i gust infiltrat prevashodno neutrofilnih granulocita.

Tanko crevo

Patohistološke promene u tankom crevu nisu izražene, prisutan je fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini proprijii i nešto umnoženo limfno tkivo Payerovih ploča.

Registrovane patohistološke promene na organima eksperimentalnih životinja odgovaraju promenama opisanim u prethodno objavljenim istraživanjima, u kojima je ricin aplikovan na različite načine.²⁶⁸⁻²⁷¹

Analiza pokazuje da su patohistološke promene kod životinja iz prve dve grupe diskretne, dok su kod životinja iz ostalih grupa bolje izražene i uočljivije. Time je potvrđena hipoteza da patohistološke promene progrediraju tokom vremena proteklog od aplikacije suspenzije, odnosno da su u pozitivnoj korelaciji sa proteklim vremenom.

Na osnovu registrovanih promena ne može se opredeliti egzaktan uzrok smrti prilikom intoksikacije ricinom. Kako je objavljeno u istraživanju Flore i saradnika (rad 25) mehanizam nastupanja smrtnog ishoda mogao bi se objasniti povećanom vaskularnom propustljivošću, što za posledicu ima nastanak hipovelemijskog šoka.

U ovoj disertaciji eksperimentalne životinje (laboratorijski pacovi) tretirane su suspenzijom semena ricinusa što predstavlja inovaciju u odnosu na ranija istraživanja, u kojima su životinje tretirane čistim supstancama, ricinom ili ricininom. Rezultati dobijeni primenom odgovarajućih toksikoloških i histopatoloških analiza trebalo bi da omoguće bolju procenu uzroka smrti usled trovanja semenom ricinusa, da pruže dodatne podatke o distribuciji ricina i ricinina i histopatološkim promenama tkiva, a samim tim da omoguće odabir reprezentativnih uzoraka za analizu u slučajevima sumnje na intoksikaciju ricinusom.

6. ZAKLJUČCI

U odnosu na hipoteze i ciljeve istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Ricinin se pouzdano može detektovati u krvi i organima laboratorijskih pacova (pluća, bubrezi, jetra, mozak) 6, 12, 24, 36, i 48 časova nakon oralne aplikacije suspenzije zrna ricinusa.
2. Koncentracija ricinina u krvi najviša je kod životinja žrtvovanih 6 časova nakon oralne aplikacije suspenzije zrna ricinusa.
3. Koncentracija ricinina u krvi i organima laboratorijskih pacova menja se u skladu sa vremenom proteklim od oralne aplikacije suspenzije zrna ricinusa.
4. Stepen razvoja patomorfoloških promena na analiziranim organima laboratorijskih pacova je u pozitivnoj korelaciji sa vremenom proteklim od oralne aplikacije suspenzije zrna ricinusa.
5. U slučaju sumnje na trovanje ricinom kod bolničkih pacijenata rutinski je neophodno uzeti uzorke krvi i mokraće za analizu jer se ricinin, kao indirektni marker intoksikacije ricinom, pouzdano i lako može dokazati u ovim biološkim uzorcima.
6. Prilikom obdukcije u slučajevima nastupanja smrtnog ishoda usled trovanja ricinom neophodno je uzeti uzorke krvi, urina, pluća, bubrega, jetre i mozga jer se ricinin pouzdano može registrovati u ovim organima.

8. LITERATURA

1. Poli M, Roy C, Huebner K, Franz D, Jaax N. Ricin. In: Dembek Z. Medical aspects of biological warfare. Washington: Walter Reed Army Medical Center; 2007. p. 323-35.
2. Salihu B, Gana AK, Apuyor B. Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.): Botany, Ecology and Uses. *Inter J Sci Resear.* 2014;3:1333-41.
3. Gana AK, Yusuf AF, Apuyor B. Castor Oil Plant and its Potential in Transformation and Industrialization of Under Developing Nations in the World. *Adv J Agric Resear.* 2013;1(005):72-9.
4. Weiss EA. Oilseed crops. London: Longman Group Ltd; 1983.
5. Patocka J. Abrin and Ricin—Two dangerous poisonous proteins. *ASA Newslett.* 2001:20–5.
6. Steenkamp PA. Chemical Analysis of Medicinal and Poisonous Plants of Forensic Importance in South Africa. Ph.D. Thesis. 2005.
7. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA.* 2005;294 (18):2342–51.
8. Salihu BZ, Gana AK, Amosun A, Shaahu A, Agboire SA, Apuyor BO, Oliseh, A. Morphological Characterization of Castor (*Ricinus communis* L.) Accessions. *Proc Agric Soc Nig.* 2013:308-16.
9. Salihu BZ, Gana AK, Agboire SA, Isong AE, Shaahu A. Genetic Divergence, Principal Components and Clustering Analyses of Some Agronomic Characteristics of Eleven Castor (*Ricinus communis* L.) Accessions. *Inter J Sci Resear.* 2013;2:129–32.
10. Report of castor germplasm collections and stakeholder identification. Castor Breeding, National Cereal Research Institute. Nigeria: 2014.
11. Barbieri L, Battelli M, Stirpe F. Ribosomes-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1154:237–82.
12. Rauber A, Heard J. Castor bean toxicity re-examined: a new perspective. *Vet Hum Toxicol.* 1985;27:498–502.
13. Knight B. Ricin—a potent homicidal poison. *Br Med J.* 1979;3:350–1.
14. Scarpa A, Guerci A. Various uses of the castor oil plant (*Ricinus communis* L.). *J Ethnopharmacol.* 1982;5(2):117-37.

15. Skure A, Dhaduk H, Mehta D. Castor bean (*Ricinus communis* L.): Morphological Genetic Diversity. Saarbrücken: Lambert academic publishing; 2012.
16. Ferraz AC, Angelucci ME, Da Costa ML, Batista IR, De Oliveira BH, Da Cunha C. Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999;63(3):367-75.
17. Balali-Mood M, Moshiri M, Etemad L. Bio Warfare and Terrorism: Toxins and Other Mid-spectrum Agents. In: Wexler P, Greim H, Moser V, Wiegand TJ, Lafarga JVT, Peyster A, et al. *Encyclopedia of Toxicology.* 3rd Edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 503-8.
18. Statistics Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: Italy; 2002.
19. Mutlu H, Meier MAR. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *Eur J Lipid Sci.* 2010;112:10–30.
20. Gandhi VM, Chrian KM, Mulky MJ. Destoxification of castor seed meal by interaction with sal seed meal. *J Am Oil Chem Soc.* 1994;71:827–31.
21. Ogunniyi DS. Castor Oil: A vital industrial raw material. *Bioresour Technol.* 2006;97(9):1086-91.
22. Ranal M, Dhamijal H, Prashar1 B, Sharma S. *Ricinus communis* L. – A Review. *Intern J PharmTech Research.* 2012;4(4):1706-11.
23. Worbs S, Kohler K, Pauly D, Avondet MA, Schaer M, Dorner MB. *Ricinus communis* Intoxications in Human and Veterinary Medicine-A Summary of Real Cases. *Toxins (Basel).* 2011;3(10):1332-72.
24. Behl CR, Pande MB, Pande DP, Radadia MS. Nutritive value of matured wilted castor (*Ricinus communis* Linn.) leaves for crossbred sheep. *J Anim Sci.* 1986;56:473-4.
25. Robb JG, Laben RC, Walker HG Jr, Herring V. Castor meal in dairy rations. *J Dairy Sci.* 1974; 57:443–50.
26. Gowda NKS, Pal DT, Bellur SR, Bharadwaj U, Sridhar M, Satyanarayana ML, Prasad CS, Ramachandra KS, Sampath KT. Evaluation of castor (*Ricinus communis*) seed cake in the total mixed ration for sheep. *J Sci Food Agric.* 2009;89:216–20.

27. Balogun JK, Auta J, Abdullahi SA, Agboola OE. Potentials of castor seed meal (*Ricinus communis* L.) as feed ingredient for *Oreochromis niloticus*. In Proceedings of the 19th Annual Conference Fisheries Society Nigeria. 2004 Nov 29-Dec 3; Ilorin, Nigeria. Ilorin: Fisheries society of Nigeria; 2005: p. 838–43.
28. Diniz LL, Valadares Filho SC, de Oliveira AS, Pina DS, de Lima da Silva N, Benedeti PB, Baião GF, Campos JMS, Valadares RFD. Castor bean meal for cattle finishing: 1–nutritional parameters. *Livestock Sci.* 2011;135:153–67.
29. Vilhjalmsdottir L, Fisher H. Castor bean meal as a protein source for chickens: Detoxification and determination of limiting amino acids. *J Nutr.* 1971;101:1185–92.
30. Ani AO. Effects of graded levels of dehulled and cooked castor oil bean (*Ricinus communis* L.) meal and supplementary L-lysine on performance of broiler finishers. *J Tropic Agric Food Environ Exten.* 2007;6:89–97.
31. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, di Domenico A, Fernández-Cruz ML, Fürst P, Fink-Gremmels J, Galli CL. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed. *EFSA J.* 2008;726:1–38.
32. Barnes DJ, Baldwin BS, Braasch DA. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. *Ind Crops Prod.* 2009;29:509–15.
33. Gupta AP, Antil RS, Narwal RP. Utilization of deoiled castor cake for crop production. *Arch Agron Soil Sci.* 2004;50:389–95.
34. Lima RLS, Severino LS, Sampaio LR, Sofiatti V, Gomes JA, Beltrão NEM. Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Ind Crops Prod.* 2011;33:364–8.
35. Shokeen P, Anand P, Murali YK, Tandon V. Antidiabetic activity of 50% ethanolic extract of *Ricinus communis* and its purified fractions. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:3458–66.
36. Panghal M, Kaushal V, Yadav JP. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2011;10:21.

37. Sharma S, Vasudevan P, Madan M. Insecticidal Value of Castor (*Ricinus communis*) Against Termites. *Int Biod.* 1990;27:249-54
38. Singh PP, Ambika Chauhan SMS. Activity guided isolation of antioxidants from the leaves of *Ricinus communis* L. *Food Chem.* 2009;114(3):1069–72.
39. Okwuasaba FK, Osunkwo UA, Ekwenchi MM, Ekpenyong KI, Onwukeme KE, Olayinka AO, Uguru MO, Das SC. Anticonceptive and estrogenic effects of a seed extract of *Ricinus communis* var. minor. *J Ethnopharmacol.* 1991;34:141-5.
40. Ilavarasan R, Mallika M, Venkataraman S. Anti-inflammatory and free radical scavenging activity of *Ricinus communis* root extract. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:478–80.
41. Almeida RN, Navarro DS, Barbosa- Filho JM. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine.* 2001;8(4):310–22.
42. Lin JY, Liu SY. Studies on the antitumour lectins isolated from the seeds of *Ricinus communis* (castor bean). *Toxicon.* 1986;24(8):757-65.
43. Lord MJ, Jolliffe NA, Marsden CJ, Pateman CS, Smith DC, Spooner RA, Watson PD, Roberts LM. Ricin. Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol Rev.* 2003;22(1):53-64.
44. Beloti MM, Hiraki KR, Barros VM, Rosa AL. Effect of the chemical composition of *Ricinus communis* polyurethane on rat bone marrow cell attachment, proliferation and differentiation. *J Biomed Mater Res A.* 2003;64(1):171-6.
45. Abdulla Al-Mamun M, Akter Z, Josim Uddin MD, Ferdous KM.KB, Hoque KMF, Ferdousi Z, Abu Reza M. Characterization and evaluation of antibacterial and antiproliferative activities of crude protein extracts isolated from the seed of *Ricinus communis* in Bangladesh. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:211.
46. Sadraeian M, Rasoul-Amini S, Mansoorkhani MJ, Mohkam M, Ghoshoon MB, Ghasemi Y. Induction of Antitumor Immunity Against Cervical Cancer by Protein HPV-16 E7 in Fusion With Ricin B Chain in Tumor-Bearing Mice. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23:809-14.
47. Sabo T, Kronman C, Mazor O. Ricin-Holotoxin-Based Vaccines: Induction of Potent Ricin-Neutralizing Antibodies. *Methods Mol Biol.* 2016;1403:683-94.

48. Griffiths GD, Phillips GJ, Holley J. Inhalation toxicology of ricin preparations: animal models, prophylactic and therapeutic approaches to protection. *Inhal Toxicol.* 2007;19:873–87.
49. Roy CJ, Hale M, Hartings JM, Pitt L, Duniho S. 2003. Impact of inhalation exposure modality and particle size on the respiratory deposition of ricin in BALB/c mice. *Inhal Toxicol.* 2003;15:619–38.
50. Røen BT, Opstad AM, Haavind A, Tønsager J. Serial ricinine levels in serum and urine after ricin intoxication. *J Anal Toxicol.* 2013;37(5):313-17.
51. Balint GA. Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. *Toxicol.* 1974;2:77-102.
52. Bradberry SM, Dickers KJ, Rice P, Griffiths GD, Vale JA. Ricin poisoning. *Toxicol Rev.* 2003;22(1): 65-70.
53. Musshoff F, Madea B. Ricin poisoning and forensic toxicology. *Drug Test Anal.* 2009;1(4):184-91.
54. Cope AC, Dee J, Cannan RK, et al. Chemical warfare agents and related chemical problems Part I: Summary Technical Report of Division 9. Washington, DC:National Defense Research Committee. 1945; 179-203.
55. Burrows WD, Renner SE. Biological warfare agents as threats to potable water. 33. Fodstad Ø, Kvalheim G, Godal A, et al. Phase I study of the plant protein ricin. *Environ Health Perspect.* 1999;107: 975-84.
56. Moshiri M, Etemad L, Balali-Mood M. The Biowarfare Agent Ricin. In: Gopalakrishnakone P, Balali-Mood M, Singh BR, Llewellyn L, editors. *Biological Toxins and Bioterrorism.* Dordrecht: Springer; 2014; p. 43-59.
57. Stillmark H. Ueber ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen [thesis]. Tartu, Estonia: University of Dorpat; 1888.
58. Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon.* 2004;44:361–70.
59. Olsnes S, Pihl A. Ricin – a potent inhibitor of protein synthesis. *FEBS Lett.* 1972;20:327–9.
60. Smart JK. History of chemical and biological warfare: an American perspective. In: Zajtcuk R, ed. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Part I:*

- Warfare, Weaponry, and the Casualty. Washington, DC: Department of the Army, Office of the Surgeon General, Borden Institute; 1997. p. 9–86.
61. Franz DR, Jaax NK. Ricin Toxin. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, editors. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington, DC: TMM Publications; 1997. p. 631–42.
 62. Zilinskas RA. Iraq's biological weapons. The past as future? *JAMA*. 1997;278(5):418-24.
 63. Kirby R. Ricin toxin: A military history. *CML Army chem rev*. 2004;PB 3–04:38–40.
 64. Shea DA, Gottron F. Ricin: Technical Background and Potential Role in Terrorism. Congressional Research Service;2013:1-5.
 65. Binder P, Franz D, Monteleone-Neto R, Spertzel R, Zilinskas RA. The Kay report to congress on the activities of the Iraq Survey Group: former bioweapons inspectors comment. *Biosecur Bioterror*. 2003;1(4):239-46.
 66. Schieltz DM, McGrath SC, McWilliams LG, Rees J, Bowen MD, Kools JJ, Dauphin LA, Gomez-Saladin E, Newton BN, Stang HL et al. Analysis of active ricin and castor bean proteins in a ricin preparation, castor bean extract, and surface swabs from a public health investigation. *Forensic Sci Int*. 2011;209:70–9.
 67. Moran, G.J. Threats in bioterrorism. II: CDC category B and C agents. *Emerg Med Clin North Am*. 2002;20:311–30.
 68. Zhou XX, Ji F, Zhao JL, Cheng LF, Xu CF. Anti-cancer activity of anti-p185Her-2 ricin A chain immunotoxin on gastric cancer cells. *J Gastroen Hepatol*. 2010;25(7):1266–75.
 69. Spitler LE, del Rio M, Khentigan A, Wedel NI, Brophy NA, Miller LL, Harkonen WS, Rosendorf LL, Lee HM, Mischak RP. Therapy of patients with malignant melanoma using a monoclonal antimelanoma antibody-ricin A chain immunotoxin. *Cancer res*. 1987;47(6):1717-23.
 70. Frankel AE, Woo JH, Neville DM. Principles of Cancer Biotherapy. 5th ed. Dodrecht: Springer; 2009.
 71. Schindler J, Gajavelli S, Ravandi F, Shen Y, Parekh S, Braunchweig I, Barta S, Ghetie V, Vitetta E, Verma A. A phase I study of a combination of anti-CD19 and

- anti-CD22 immunotoxins (Combotox) in adult patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Brit J Haematol*. 2011;154(4):471-6.
72. Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol*. 2005;23(9):1137-46.
73. Vitetta ES, Thorpe PE, Uhr JW. Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles? *Immunol Today*. 1993;14(6):252-9.
74. Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: A side effect of immunotherapy. *Immunopharmacol*. 1997;37:117-32.
75. Furman RR, Grossbard ML, Johnson JL, Pecora AL, Cassileth PA, Jung SH, Peterson BA, Nadler LM, Freedman A, Bayer RL, Bartlett NL, Hurd DD, Cheson BD; Cancer Leukemia Group B; Eastern Cooperative Oncology Group. A phase III study of anti-B4-blocked ricin as adjuvant therapy post-autologous bone marrow transplant: CALGB 9254. *Leukemia Lymphoma*. 2011;52(4):587-96.
76. Zhan J, Zhou P. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicol*. 2003;186:119-23.
77. Fodstad O, Olsnes S, Pihl A. Toxicity, distribution and elimination of the cancerostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. *Brit J Canc*. 1976;34:418-25.
78. Challoner KR, McCarron MM. Castor bean intoxication: review of reported cases. *Ann Emerg Med*. 1990;19:1177-83.
79. Kinamore PA, Jaeger RW, de Castro FJ. Abrus and ricinus ingestion: management of three cases. *Clin Toxicol*. 1980;17:401-5.
80. Koch LA, Caplan J. Castor bean poisoning. *AJDC*. 1942;64:485-6.
81. Olsnes S, Saltvedt E, Pihl A. Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *J Biol Chem*. 1974;249:803-10.
82. Foxwell BM, Detre SI, Donovan TA, Thorpe PE. The use of anti-ricin antibodies to protect mice intoxicated with ricin. *Toxicol*. 1985;34:79-88.
83. Olsnes S, Pappenheimer AM, Meren R. Lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*: II. Hybrid toxins and their interaction with chain-specific antibodies. *J Immunol*. 1974;113:842-7.

84. Olsnes S, Refsnes K, Pihl A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature*. 1974;249:627–31.
85. Fodstad O, Johannessen JV, Schjerven L, Pihl A. Toxicity of abrin and ricin in mice and dogs. *J Toxicol Environ Health*. 1979;5:1073–84.
86. He X, McMahon S, Henderson TD, Griffey SM, Cheng LW. Ricin toxicokinetics and its sensitive detection in mouse sera or feces using immuno-PCR. *PLoS One*. 2010;5(9):e12858.
87. Jang HY, Kim JH. Isolation and biochemical properties of ricin from *Ricinus communis*. *Kor Biochem J*. 1993;26:98–104.
88. Wannemacher RW, Anderson JB. Inhalation Ricin: aerosol procedures, animal toxicology and therapy. In: Salem H, Katz SA, editors. *Inhalation Toxicology*. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 973–82.
89. Derenzini M, Bonetti E, Marionozzi V, Stirpe F. Toxic effects of ricin: Studies on the pathogenesis of liver lesions. *Virchows Archiv B*. 1976;20:15–28.
90. Griffiths GD, Rice P, Allenby AC, Bailey SC, Upshall DG. Inhalation toxicology and histopathology of ricin and abrin toxins. *Inhal Toxicol*. 1995;7:269–88.
91. Ishiguro M, Mitarai M, Harada H, Sekine I, Nishimori I, Kikutani M. Biochemical studies on oral toxicity of ricin. I. Ricin administered orally can impair sugar absorption by rat small intestine. *Chem Pharm Bull*. 1983;31:3222–7.
92. Garber EAE. Toxicity and detection of ricin and abrin in beverages. *J Food Protec*. 2008;71:1875–83.
93. Wedin GP, Neal JS, Everson GW, et al. Castor bean poisoning. *Am J Emerg Med*. 1986;4:259-61.
94. Kopferschmitt J, Flesch F, Lugnier A. Acute voluntary intoxication by ricin. *Human Toxicol*. 1983;2:239-42.
95. Palatnick W, Tenenbein M. Hepatotoxicity from castor bean ingestion in a child. *J Toxicol. Clin Toxicol*. 2000;38:67-9.
96. Brugsch HG. Toxic hazards: the castor bean. *N Engl J Med*. 1960;262:1039-40.
97. Waller GR, Tang MS, Scott MR, Goldberg FJ, Mayes JS, Auda H. Metabolism of ricinine in the castor plant. *Plant Physiol*. 1965;40:803-7.

98. Klaim GJ, Jaeger JJ. Castor Seed Poisoning in Humans: A Review. Letterman Army Institute of Research; 1990.
99. Flora AD, Teel LD, Smith MA, Sinclair JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Ricin crosses polarized human intestinal cells and intestines of ricin-gavaged mice without evident damage and then disseminates to mouse kidneys. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69706.
100. Ishiguro M, Tanabe S, Matori Y, Sakakibara R. Biochemical studies on oral toxicity of ricin. IV. A fate of orally administered ricin in rats. *J Pharmacobiodyn*. 1992;15:147–56.
101. Moshiri M, Hamid F, Etemad L. Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. *Reports Biochem Mol Biol*. 2016;4(2):60–5.
102. Bradberry S. Ricin and abrin. *Medicine*. 2012; 40(2):80-1.
103. Pincus SH, Smallshaw JE, Song K, Berry J, Vitetta ES. Passive and active vaccination strategies to prevent ricin poisoning. *Toxins*. 2011; 3(9):1163-84.
104. Balali-Mood M, Moshiri M. Problems of Clinical Diagnosis and Management of a Deliberate Biological Born Disease. *J Bioterror Biodef*. 2015;6:e113.
105. Słomińska-Wojewódzka M, Sandvig K. Ricin and Ricin-Containing Immunotoxins: Insights into Intracellular Transport and Mechanism of action in Vitro. *Antibodies*. 2013;2:236-69.
106. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*. 1987;262:5908–12.
107. Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem*. 1987;262:8128–30.
108. Lappi DA, Kapmeyer W, Beglau JM, Kaplan NO. The disulfide bond connecting the chains of ricin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:1096–100.
109. Ishiguro M, Tomi M, Funatsu G, Funatsu M. Isolation and chemical properties of a ricin variant from castor bean. *Toxicon*. 1976;14:157-65.

110. Youle R, Huang A. Protein bodies from the endosperm of castor beans: subfractionation, protein components, lectins, and changes during germination. *Plant Physiol.* 1976;58:703–9.
111. Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry.* 1973;12(16):3121-6.
112. Weston SA, Tucker AD, Thatcher DR, Derbyshire DJ, Pauptit RA. X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 1994;244(4):410-22.
113. Rutenber E, Katzin BJ, Ernst S, Collins EJ, Mlsna D, Ready MP, Robertus JD. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins.* 1991;10(3):240-50.
114. Rudolph MJ, Vance DJ, Cassidy MS, Rong Y, Mantis NJ. Structural analysis of single domain antibodies bound to a second neutralizing hot spot on ricin toxin's enzymatic subunit. *J Biol Chem.* 2017;292(3):872-83.
115. Wales R, Richardson PT, Roberts LM, Woodland HR, Lord JM. Mutational analysis of the galactose binding ability of recombinant ricin B chain. *J Biol Chem.* 1991;266(29):19172-9.
116. Rutenber E, Ready M, Robertus JD. Structure and evolution of ricin B chain. *Nature.* 1987;326(6113):624–6.
117. Baenziger JU, Fiete D. Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J Biol Chem.* 1979;254:9795–9.
118. Sandvig K, van Deurs B. Endocytosis and intracellular transport of ricin: Recent discoveries. *FEBS Lett.* 1999;452:67–70.
119. Morino H, Sakakibara R, Ishiguro M. The binding of ricin to its receptor is not required for the expression of its toxicity. *Biol Pharm Bull.* 1995;18:1770-2.
120. Day PJ, Pinheiro TJ, Roberts LM, Lord JM. Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry.* 2002;41:2836-43.
121. Sandvig K, Olsnes S. Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin, and diphtheria toxin into cells, I: requirement for calcium. *J Biol Chem.* 1982;257:7495-503.

122. Sandvig K, Olsnes S. Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin, and diphtheria toxin into cells, II: effect of pH, metabolic inhibitors, and ionophores and evidence for toxin penetration from endocytotic vesicles. *J Biol Chem.* 1982;257:7504-13.
123. Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J.* 2000;19:5943-50.
124. Sphyris N, Lord JM, Walles R, Roberts LM. Mutational analysis of the ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of ricinus communis agglutinin b-chain. *J Biol Chem.* 1995;270:20292-7.
125. Greenwood JS, Helm M, Gietl C. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during Ricinus seed development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2238-43.
126. Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C. A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta.* 1998;206:466-75.
127. Schmid M, Simpson D, Gietl C. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14159-64.
128. Frigerio L, Vitale A, Lord JM, Ceriotti A, Roberts LM. Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J Biol Chem.* 1998;273:14194-9.
129. Lord JM. Precursors of ricin and Ricinus communis agglutinin. Glycosylation and processing during synthesis and intracellular transport. *Eur J Biochem.* 1985;146:411-6.
130. Roberts LM, Lamb FI, Pappin DJ, Lord JM. The primary sequence of Ricinus communis agglutinin. Comparison with ricin. *J Biol Chem.* 1985;260:15682-6.
131. Richardson PT, Westby M, Roberts LM, Gould JH, Colman A, Lord JM. Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA. *FEBS Lett.* 1989;255:15-20.
132. Wright HT, Robertus JD. The intersubunit disulfide bridge of ricin is essential for cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys.* 1987;256:280-4.

133. Harley SM, Beevers H. Ricin inhibition of in vitro protein synthesis by plant ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:5935–8.
134. Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *Eur J Biochem*. 1997;246:133–41.
135. van Deus B, Petersem OW, Sudan S, Olsnes S, Sandvig K. Receptor-mediated endocytosis of ricin-colloidal gold conjugate in Vero cells: Intracellular routing to vacuolar and tubulovesicular portions of the endosomal system. *Exp Cell Res*. 1985;159:287–304.
136. Sandvig K, Torgersen ML, Engedal N, Skotland T, Iversen TG. Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett*. 2010;84:2626–34.
137. Sandvig K, Pust S, Skotland T, van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23:413–20.
138. Llorente A, Rapak A, Schmid SL, van Deurs B, Sandvig K. Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 1998;140(3):553-63.
139. Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol*. 1994;127(4):915-34.
140. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol*. 1994;127(5):1199-215.
141. Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J Gen Vir*. 1998;79(Pt 6):1469-77.
142. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell*. 1999;10:961–74.
143. Blum JS, Fiani ML, Stahl PD. Proteolytic cleavage of ricin A chain in endosomal vesicles. *J Biol Chem*. 1991;266:22091–5.

144. Brech A, Kjekken R, Synnes M, Berg T, Roos N, Prydz K. Endocytosed ricin and asialoorosomucoid follow different intracellular pathways in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1373:195–208.
145. Sandvig K, van Deurs B. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Bi*.2002;18:1–14.
146. van Deurs B, Tonnessen TI, Petersen OW, Sandvig K, Olsnes S. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. *J Cell Biol*. 1986;102:37–47.
147. van Deurs B, Sandvig K, Petersen OW, Olsnes S, Simons K, Griffiths G. Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J Cell Biol*. 1998;106:253–67.
148. Riederer MA, Soldati T, Shapiro AD, Lin J, Pfeffer SR. Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol*. 1994;125(3):573-82.
149. Lauvrak SU, Llorente A, Iversen TG, Sandvig K. Selective regulation of the Rab9-independent transport of ricin to the Golgi apparatus by calcium. *J Cell Sci*. 2002;115:3449–56.
150. Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH, van Deurs B. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1992;358(6386):510-12.
151. Sandvig K, Garred O, van Helvoort A, van Meer G, van Deurs B. Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell*. 1996;7(9):1391-404.
152. Sandvig K, Garred O, van Deurs B. Thapsigargin-induced transport of cholera toxin to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12339-43.
153. Spooner RA, Lord JM. Ricin trafficking in cells. *Toxins (Basel)*. 2015;7(1):49-65.
154. Sandvig K, Prydz K, Hansen SH, van Deurs B. Ricin transport in brefeldin A-treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. *J Cell Biol*.1991;115:971– 81.

155. Wesche J, Rapak A, Olsnes S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem.* 1999;274:34443–9.
156. Tartakoff AM. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell.*1983;32:1026–8.
157. Wesche J, Elliott JL, Falnes PO, Olsnes S, Collier RJ. Characterization of membrane translocation by anthrax protective antigen. *Biochemistry.* 1998;37:15737–46.
158. Audus KL, Raub TJ. *Biological barriers to protein delivery.* New York: Plenum; 2012.
159. van Deurs B, Petersen OW, Olsnes S, Sandvig K. Delivery of internalised ricin and ricin conjugate to the Golgi complex. *J Biol Chem.* 1987;102:37-47.
160. Day PJ, Owens SR, Wesche J, Olsnes S, Roberts LM, Lord JM. An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem.* 2001;276:7202–8.
161. Spooner RA, Watson PD, Marsden CJ, Smith DC, Moore KAH, Cook JP, Lord JM, Roberts LM. Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2004;383:285–93.
162. Bellisola G, Fracasso G, Ippoliti R, Menestrina G, Rosén A, Soldà S, et al. Reductive activation of ricin and ricin A-chain immunotoxins by protein disulfide isomerase and thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1721–31.
163. Deeks ED, Cook JP, Day PJ, Smith DC, Roberts LM, Lord JM. The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry.* 2002;4:3405–13.
164. Di Cola A, Frigerio L, Lord JM, Ceriotti A, Roberts LM. Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:14726–31.
165. Li S, Spooner RA, Allen SCH, Guise CP, Ladds G, Schnoder T, Schmitt MJ, Lord JM, Roberts LM. Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain

- have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2010;21:2543–54.
166. Sokołowska I, Wälchli S, Węgrzyn G, Sandvig K, Słomińska-Wojewódzka M. A single point mutation in ricin A-chain increases toxin degradation and inhibits EDEM1-dependent ER retrotranslocation. *Biochem J*. 2011;436:371–85.
 167. Spooner RA, Hart PJ, Cook JP, Pietroni P, Rogon C, Höhfeld J, Roberts LM, Lord JM. Cytosolic chaperones influence the fate of a toxin dislocated from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:17408–13.
 168. Chiou JC, Li XP, Remacha M, Ballesta JPG, Tumer NE. The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2008;70:1441–52.
 169. Lord MJ, Jolliffe NA, Marsden CJ, Pateman CSC, Smith DC, Spooner RA, Watson PD, Roberts LM. Ricin: Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol Rev*. 2003;22:53–64.
 170. Dai J, Zhao L, Yang H, Guo H, Fan K, Wang H, Qian W, Zhang D, Li B, Wang H, et al. Identification of a novel functional domain of ricin responsible for its potent toxicity. *J Biol Chem*. 2011;286:12166–71.
 171. Jetzt AE, Cheng JS, Tumer NE, Cohick WS. Ricin A-chain requires c-Jun N-terminal kinase to induce apoptosis in nontransformed epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:2503–10.
 172. Horrix C, Raviv Z, Flescher E, Voss C, Berger M. Plant ribosome-inactivating proteins type II induce the unfolded protein response in human cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:1269–81.
 173. Halling KC, Halling AC, Murray EE, Ladin BF, Houston LL, Weaver RF. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Res*. 1985;13:8019–33.
 174. Tregear JW, Roberts LM. The lectin gene family of *Ricinus communis*: Cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes. *Plant Mol Biol*. 1992;8:515–25.
 175. Sweeney EC, Tonevitsky AG, Temiakov DE, Agapov II, Saward S, Palmer RA. Preliminary crystallographic characterization of ricin agglutinin. *Proteins*. 1997;28:586–9.

176. Baenziger JU, Fiete D. Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J Biol Chem.* 1979;254:9795–9.
177. Lin TTS, Li SSL. Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. *Eur J Biochem.* 1980;105:453–9.
178. Saltvedt E. Structure and toxicity of pure ricinus agglutinin. *Biochim Biophys Acta.* 1976;45:536–48.
179. Lord JM, Harley SM. *Ricinus communis* agglutinin B chain contains a fucosylated oligosaccharide side chain not present on ricin B chain. *FEBS Lett.* 1985;189:72–6.
180. Stern D, Pauly D, Zydek M, Müller C, Avondet MA, Worbs S, et al. Simultaneous differentiation and quantification of ricin and agglutinin by an antibody-sandwich surface plasmon resonance sensor. *Biosens Bioelectron.* 2016;78:111-7.
181. Parker DT, Parker AC, Ramachandran CK. Joint Technical Data Source Book. Vol 6. Part 3. US Dugway Proving Ground, Utah: Joint Contact Point Directorate. 1996;1-38.
182. Hegde R, Podder SK. Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin. *Eur J Biochem.* 1992;204:155-64.
183. Corwin AH. Toxic constituents of the castor bean. *J Med Pharm Chem.* 1961;4:483-90.
184. Tuson RV. XXII.-note on an alkaloid contained in the seeds of the *Ricinus communis*, or castor-oil plant. *J Chem Soc.* 1864;17:195–7.
185. Späth E, Koller G. Die Konstitution des Ricinins. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* 1923;56:880–7.
186. Soriano-García M, Jiménez ME, Reyes Vaca R, Toscano RA. Structure of ricinine. *Acta Crystallogr C.* 1989;45:957–9.
187. Waller GR, Skursky L. Translocation and metabolism of ricinine in the castor bean plant, *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.* 1972;50:622–6.
188. Johnson RC, Lemire SW, Woolfitt AR, Ospina M, Preston KP, Olson CT, Barr JR. Quantification of ricinine in rat and human urine: a biomarker for ricin exposure. *J Anal Toxicol.* 2005;29(3):149-55.
189. Bogdashevskaya OV. Physiological conditions for biosynthesis of ricinine. *Doklady Akademii Nauk SSSR.* 1954;99:853-4.

190. Peng J, Cai S, Wang L, Zhao N, Zhang TJ, Chen ZX, Meng FH. A metabonomic analysis of serum from rats treated with ricinine using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *PLoS One*. 2014;9(3):e90416.
191. Cazal Cde M, Batalhão JR, Domingues Vde C, Bueno OC, Filho ER, Forim MR, et al. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. *J Chromatogr A*. 2009;1216(19):4290-4.
192. Hamelin EI, Johnson RC, Osterloh JD, Howard DJ, Thomas JD. Evaluation of ricinine, a ricin biomarker, from a non-lethal castor bean ingestion. *J Anal Toxicol*. 2012;36(9): 660-2.
193. Doan LG. Ricin: mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. A review. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2004;42(part 2):201-8.
194. Aplin PJ, Eliseo T. Ingestion of castor oil plant seeds. *Med J Aust*. 1997;167:260-1.
195. Malizia E, Sarcinelli L, Andreucci G. Ricinus poisoning: a familiar epidemy. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1977;41:351-61.
196. Zenilman ME, Fiani M, Stahl P, Brunt E, Flye MW. Use of ricin A-chain to selectively deplete Kupffer cells. *J Surg Res*. 1988;45:82-9.
197. Levin Y, Sherer Y, Bibi H. Rare *Jatropha multifida* intoxication in two children. *J Emerg Med*. 2000;19:173-5.
198. Passeron T, Mantoux F, Lacour JP, Roger PM, Fosse T, Iannelli A, Ortonne JP. Infectious and toxic cellulitis due to suicide attempt by subcutaneous injection of ricin. *Br J Dermatol*. 2004;150(1):154.
199. Targosz D, Winnik L, Szkolnicka B. Suicidal poisoning with castor bean (*Ricinus communis*) extract injected subcutaneously: case report [abstract]. *Clin Toxicol*. 2002;40:398.
200. Fine DR, Shepherd HA, Griffiths GD. Sub-lethal poisoning by self-injection with ricin. *Med Sci Law*. 1992;32:70-2.
201. Fodstad Ø, Kvalheim G, Godal A, Lotsberg J, Aamdal S, Høst H, Pihl A. Phase I study of the plant protein ricin. *Cancer Res*. 1984;44: 862-5.
202. Engert A, Diehl V, Schnell R, Radszuhn A, Hatwig MT, Drillich S, et al. A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89:403-10.

203. Baluna R, Sausville EA, Stone MJ, Stetler-Stevenson MA, Uhr JW, Vitetta ES. Decreases in levels of serum fibronectin predict the severity of vascular leak syndrome in patients treated with ricin A chain-containing immunotoxins. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1705-12.
204. Alipour M, Kresimir Pucaj K, Smith M, Suntres Z. Toxicity of ricin toxin A chain in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36(2):224–30.
205. Pincus SH, Eng L, Cooke CL, Maddaloni M. Identification of hypoglycemia in mice as a surrogate marker of ricin toxicosis. *Comp Med.* 2002;52(6):530-3.
206. Topping MD, Henderson RTS, Luczynska CM, Woodmass A. Castor bean allergy among workers in the felt industry. *Allergy.* 1982;37:603-8.
207. Assaad A. Principal Investigator, Aerobiology and Product Evaluation Department, Toxinology Division, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, Md. Personal communication, December 1994.
208. Wilhelmsen CL, Pitt ML. Lesions of acute inhaled lethal ricin intoxication in rhesus monkeys. *Vet Pathol.* 1996;33:296–302.
209. Crompton R, Gall D. Georgi Markov: death in a pellet. *Med Leg J.* 1980;48:51-62.
210. Reed R.P. Castor oil seed poisoning: A concern for children. *Med J Aust.* 1998;168:423–4.
211. Lucas G.N. Plant poisoning in Sri Lankan children: A hospital based prospective study. *Sri Lanka J Child Health.* 2006;35:111–24.
212. Ingle V, Kale V, Talwalkar Y. Accidental poisoning in children with particular reference to castor beans. *Indian J Pediatr.* 1966;33:237–40.
213. Despott E, Cachia MJ. A case of accidental ricin poisoning. *Malta Med J.* 2004;16:39–41.
214. Krenzelok EP, Mrvos R. Friends and foes in the plant world: A profile of plant ingestions and fatalities. *Clin Toxicol (Phila).* 2011;49:142–9.
215. Jaspersen-Schib R, Theus L, Guirguis-Oeschger M, Gossweiler B, Meier-Abt PJ. Wichtige Pflanzenvergiftungen in der Schweiz 1966–1994: Eine Fallanalyse aus dem schweizerischen toxikologischen Informationszentrum (STIZ). *Schweiz Med Wochenschr.* 1996;126:1085–98.

216. Lim H, Kim HJ, Cho YS. A case of ricin poisoning following ingestion of Korean castor bean. *Emerg Med J.* 2009;26:301–2.
217. Nishiyama T, Oka H, Miyoshi M, Aibiki M, Maekawa S, Shirakawa Y. Case of accidental ingestion of castor beans: Acute intoxication by ricin. *Chudoku Kenkyu.* 2005;18:149–50.
218. Al-Tamimi F.A, Hegazi AE. A case of castor bean poisoning. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2008;8:83–7.
219. Smith SW, Graber NM, Johnson RC, Barr JR, Hoffman RS, Nelson LS. Multisystem organ failure after large volume injection of castor oil. *Ann Plast Surg.* 2009;62:12–4.
220. Targosz D, Winnik L, Szkolnicka B. Suicidal poisoning with castor bean (*Ricinus communis*) extract injected subcutaneously-Case report. *Clin Toxicol.* 2002;40:398.
221. Watson WA, Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Rodgers GC Jr, Youniss J, Reid N, Rouse WG, Rembert RS, Borys D. 2003 annual report of the American Association of Poison Control Centers toxic exposure surveillance system. *Am J Emerg Med.* 2004;22:335–404.
222. Coopman V, De Leeuw M, Cordonnier J, Jacobs W. Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.). *Forensic Sci Int.* 2009;89:13–20.
223. De Paepe P, Gijsenbergh F, Martens F, Piette M, Buylaert W. Two fatal cases following ricin injection. *Brit J Clin Pharmacol.* 2005;59:125–6.
224. Aslani MR, Maleki M, Mohri M, Sharifi K, Najjar-Nezhad V, Afshari E. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. *Toxicon.* 2007;49:400–6.
225. Ebbecke M, Hünefeld D, Schaper A, Desl H. Increasing frequency of serious or fatal poisonings in dogs caused by organic fertilizers during the summer of 2001 in Germany. *Clin Toxicol.* 2002;40:346–7.
226. Neika D. Vergiftung mit Rizinussamen bei einem Hund - Fallbericht. *Kleintiermed.* 2010;11:343–6.
227. Roels S, Coopman V, Vanhaelen P, Cordonnier J. Lethal ricin intoxication in two adult dogs: Toxicologic and histopathologic findings. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:466–8.

228. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncology*. 2015;1:505–27.
229. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA-Cancer J Clin*. 2015;65:5–29.
230. Stewart BW. Wild CPE: World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France; 2014.
231. Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *Sci World J*. 2014;2014:721402.
232. Mosinger M. Necrosing or clastic effects of ricin on different organs and on experimental sarcomas. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*. 1951;145:412–5.
233. Singh M, Griffin T, Salimi A, Micetich RG, Atwal H. Potentiation of ricin A immunotoxin by monoclonal antibody targeted monensin containing small unilamellar vesicles. *Cancer Lett*. 1994;84:15–21.
234. Smaglo BG, Aldeghaither D, Weiner LM. The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;1:637–48.
235. Neville DM Jr, Youle RJ. Monoclonal antibody-ricin or ricin A chain hybrids: kinetic analysis of cell killing for tumor therapy. *Immunol Rev*. 1982;62:75–91.
236. van Horssen PJ, van Oosterhout YV, de Witte T, Preijers FW. Cytotoxic potency of CD22-ricin A depends on intracellular routing rather than on the number of internalized molecules. *Scand J Immunol*. 1995;41:563–9.
237. Antignani A, Fitzgerald D. Immunotoxins: the role of the toxin. *Toxins (Basel)*. 2013;5:1486–502.
238. Raso V, Lawrence J. Carboxylic ionophores enhance the cytotoxic potency of ligand and antibody delivered ricin A chain. *J Exp Med*. 1984;160:1234–40.
239. Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3957–62.
240. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target*. 2016;24(3):179-91.

241. Bharadwaj S, Rathore SS, Ghosh PC. Enhancement of the cytotoxicity of liposomal ricin by the carboxylic ionophore monensin and the lysosomotropic amine NH₄Cl in Chinese hamster ovary cells. *Int J Toxicol*. 2006;25:349–59.
242. Koja N, Shibata T, Mochida K. Enzyme-linked immunoassay of ricin. *Toxicon*. 1980;18:611–8.
243. Men J, Lang L, Wang C, Wu J, Zhao Y, Jia PY, Wei W, Wang Y. Detection of residual toxin in tissues of ricin-poisoned mice by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation. *Anal Biochem*. 2010;401:211–6.
244. Pauly D, Kirchner S, Störmann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, Zbinden R, Avondet MA, Dorner MB, Dorner BG. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst*. 2009;134:2028–39.
245. He X, McMahon S, McKeon TA, Brandon DL. Development of a novel immuno-PCR assay for detection of ricin in ground beef, liquid chicken egg and milk. *J Food Protect*. 2010;73:695–700.
246. Thullier P, Griffiths G. Broad recognition of ricin toxins prepared from a range of *Ricinus* cultivars using immunochromatographic tests. *Clin Toxicology (Phila)*. 2009;47:643–50.
247. Weber M, Schulz H. Immunological detection of ricin and castor seeds in beverages, food and consumer products. *Toxichem Krimtech*. 2011;78:276–7.
248. Despeyroux D, Walker N, Pearce M, Fisher M, McDonnell M, Bailey SC, et al. Characterization of ricin heterogeneity by electrospray mass spectrometry, capillary electrophoresis, and resonant mirror. *Anal Biochem*. 2000;279:23–36.
249. Sehgal P, Kumar O, Kameswararao M, Ravindran J, Khan M, Sharma S, et al. Differential toxicity profile of ricin isoforms correlates with their glycosylation levels. *Toxicology*. 2011;282:56–67.
250. Brinkworth CS, Pigott EJ, Bourne DJ. Detection of intact ricin in crude and purified extracts from castor beans using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81:1529–35.

251. Cook DL, David J, Griffiths GD. Retrospective identification of ricin in animal tissues following administration by pulmonary and oral routes. *Toxicology*. 2006;223:61–70.
252. Darby SM, Miller ML, Allen RO. Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts. *J Forensic Sci*. 2001;46:1033–42.
253. Chan AP, Crabtree J, Zhao Q, Lorenzi H, Orvis J, Puiu D, et al. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nat Biotechnol*. 2010;28:951–6.
254. Mouser P, Filigenzi MS, Puschner B, Johnson V, Miller MA, Hooser SB. Fatal ricin toxicosis in a puppy confirmed by liquid chromatography/mass spectrometry when using ricinine as a marker. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19:216–20.
255. Roels S, Coopman V, Vanhaelen P, Cordonnier J. Lethal ricin intoxication in two adult dogs: Toxicologic and histopathologic findings. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22:466–8.
256. Thompson WL, Scovill JP, Pace JG. Drugs that show protective effects from ricin toxicity in in-vitro protein synthesis assays. *Natural Toxins*. 1995;3:369–77.
257. Muldoon DF, Stohs SJ. Modulation of ricin toxicity in mice by biologically active substances. *J Appl Toxicology*. 1994;14:81–6.
258. Wang CF, Nie XJ, Chen GM, Yu ZH1, Li Z1, Sun ZW, et al. Early plasma exchange for treating ricin toxicity in children after castor bean ingestion. *J Clin apheresis*. 2015;30(3):141-6.
259. Pruet JM, Jasheway KR, Manzano LA, Bai Y, Anslyn EV, Robertus JD. 7-substituted pterins provide a new direction for ricin A chain inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2011;46:3608–15.
260. Griffiths GD, Phillips GJ, Bailey SC. Comparison of the quality of protection elicited by toxoid and peptide liposomal vaccine formulations against ricin as assessed by markers of inflammation. *Vaccine*. 1999;17:2562-8.
261. Pelat T, Hust M, Hale M, Lefranc MP, Dubel S, Thullier P. Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol*. 2009;9:60–72.

262. Herrera C, Tremblay JM, Shoemaker CB, Mantis NJ. Mechanisms of Ricin Toxin Neutralization Revealed through Engineered Homodimeric and Heterodimeric Camelid Antibodies. *J Biol Chem*. 2015;290(46):27880-9.
263. Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S, Schindler J, Vitetta ES. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine*. 2005;23:4775–84.
264. Roy CJ, Brey RN, Mantis NJ, Mapes K, Pop IV, Pop LM, et al. Thermostable ricin vaccine protects rhesus macaques against aerosolized ricin: Epitope-specific neutralizing antibodies correlate with protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(12):3782-7.
265. Brey RN, Mantis NJ, Pincus SH, Vitetta ES, Smith LA, Roy CJ. Recent advances in the development of vaccines against ricin. *Hum Vacc Immunother*. 2016;12(5):1196-201.
266. Ramsden CS, Drayson MT, Bell EB. The toxicity, distribution and excretion of ricin holotoxin in rats. *Toxicology*. 1989;55(1-2):161-71.
267. Godal A, Fodstad O, Ingebrigtsen K, Pihl A. Pharmacological studies of ricin in mice and humans. *Cancer Chemoth Pharm*. 1984;13(3):157-63.
268. Jeffrey A, Doebler J, Wiltshireb N, Mayerb T, Estepc J, Moellera R, Trauba R, Broomfieldd C, Calamaio C, Thompsone W, Louise Pitt M. The distribution of [125I] ricin in mice following aerosol inhalation exposure. *Toxicology*. 1995;98:137-49.
269. Benson JM, Gomez AP, Wolf ML, Tibbetts BM, March TH. The acute toxicity, tissue distribution, and histopathology of inhaled ricin in Sprague Dawley rats and BALB/c mice. *Inhal toxicol*. 2011;23(5):247-56.
270. Kumar O, Sugendran K, Pant SC, Vijayaraghavan R. Effect of ricin on some biochemical, haematological and histopathological variables in mice. *Def Sci J*. 2004;54(4):493-502.
271. Dong N, Li Z, Li Q, Wu J, Jia P, Wang Y, et al. Absorption, distribution and pathological injury in mice due to ricin poisoning via the alimentary pathway. *J Toxicol Pathol*. 2014;27(1):73-80.