

*Originalni članci/
Original articles*

PROGRESIJA PATOHISTOLOŠKIH
PROMENA NA ORGANIMA
LABORATORIJSKIH PACOVA NAKON
ORALNE APLIKACIJE SUSPENZIJE
SEMENA RICINUSA (*RICINUS COMMUNIS*)

PROGRESSION OF PATOHISTOLOGICAL
CHANGES ON LABORATORY RATS
ORGANS AFTER ORAL APPLICATION OF
RICINUS SEEDS SUSPENSION (*RICINUS
COMMUNIS*)

Correspondence to:

dr **Radosav Radosavkić**

Katedra za sudsku medicinu, Medicinski
fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Hajduk Veljkova 3,
21 000 Novi Sad
e-mail: radosav.radosavkic@mf.uns.ac.rs

Radosav Radosavkić¹, Dušan Vapa¹,
Isidora Radosavkić², Aleksandra Ilić³,
Golub Samardžija⁴, Miljen Maletin¹

¹ Katedra za sudsku medicinu, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski
fakultet

² Centar za laboratorijsku medicinu, Klinički centar Vojvodine

³ Centar za patologiju, Klinički centar Vojvodine

⁴ Katedra za patologiju, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

Ključne reči

ricinus, ricin, laboratorijske životinje,
mikroskopske promene,
trovanje biljkama.

Key words

ricinus, ricin, laboratory animals,
microscopic changes, plant intoxica-
tion.

Sažetak

Uvod: Ricin je prirodni protein, toksin koji spada među najpristupačnije i najsmrtonosnije otrove. Nalazi se u biljci Ricinus (*Ricinus communis*), 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. Osnovni cilj ovog istraživanja je da se patohistološkom analizom utvrdi progresija razvoja patomorfoloških promena na organima laboratorijskih pacova u različitim vremenima žrtvovanja. **Materijal i metode:** Laboratorijski pacovi su istovremeno oralno tretirani suspenzijom koja je sadržala subletalnu koncentraciju ricina. Nakon žrtvovanja u precizno definisanim vremenskim intervalima, uzeti su uzorci tkiva unutrašnjih organa radi daljih analiza. Izvršena je patohistološka analiza uzoraka u cilju utvrđivanja promena izazvanim delovanjem ricina u odnosu na vreme proteklo od aplikacije suspenzije. **Rezultati:** Na histološkim preparatima životinja iz prve i druge eksperimentalne grupe patohistološke promene su diskretne. Kod životinja iz ostalih grupa promene su izraženije i jasno uočljive, a posebne su intenzivne kod životinja uginulih tokom izvođenja eksperimenta. **Zaključak:** Patohistološke promene na organima laboratorijskih pacova progrediraju tokom vremena proteklog od aplikacije suspenzije semena ricinusa, odnosno u pozitivnoj su korelaciji sa proteklom vremenom.

UVOD

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. To je

žbunasta biljka, visoka najčešće 1-4 m, na kojoj su najupečatljiviji krupni, zelenkasti listovi i koristi se uglavnom u dekorativne svrhe ^(1,2).

Ricinus je najpoznatiji kao izvor ricinusovog ulja koje se dobija hladnim ceđenjem zrelog i oljuštenog semena. Seme

ricinusa sadrži oko 40% ricinusovog ulja (3). Ricinusovo ulje se najviše koristi kao laksativno sredstvo 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 (4).

U ricinusu se nalaze tri aktivna jedinjenja: ricin, ricinin i ricinus komunis aglutinin. Ricinin i ricinus komunis aglutinin imaju slabo toksično dejstvo, tako da toksična svojstva ricinusa zapravo potiču od ricina.

Ricin spada među najsmrtonosnije poznate prirodne toksine i prema riziku za ljudsko zdravlje svrstan je u B kategoriju hemijskog oružja (5-8). To je proteinski otrov. Nalazi se u semenu ricinusa i čini 1-5% ukupne težine semena. Pripada grupi toksina koji dovode do inaktivacije ribozoma što kao posledicu ima ćelijsku smrt koja može da nastupi za manje od jednog minuta nakon intoksikacije. (9,10,11) Izgrađen je od dva lanca (A i B podjedinica) povezanih disulfidnom vezom. A lanac je enzimski aktivan i ima molekulsku težinu od (32 kDa) dok B lanac ima molekulsku težinu od 34 kDa i služi za vezivanje za terminalne galaktozne ostatke (rezidue) na ćelijskoj površini (12-15).

Delovanje ricina je vremenski i koncentracijski zavisno. Prvi simptomi javljaju se 4-6 časova nakon intoksikacije, ali vreme pojave simptoma može biti odloženo i do 10 časova (15,16). Ricin je oko 1000 puta manje toksičan kada se unese oralno u odnosu na intravenski put unošenja, odnosno inhalaciju. Ukoliko se seme proguta celo, bez žvakanja, rizik od intoksikacije je vrlo mali jer seme ima čvrst omotač, poput školjke, te prolazi neoštećeno kroz digestivni trakt. Sažvakano i nedovoljno zrelo seme ricinusa je neuporedivo toksičnije nego nesažvakano i zrelo seme. (17,18) Srednja letalna doza kod miševa je 30 mg/kg, a kod pacova 20-30 mg/kg. Kod ljudi nakon oralnog unošenja ricina srednja letalna doza je 1-20 mg/kg (19-21).

Simptomi trovanja i patološke promene na organima u slučajevima intoksikacije ricinom zavise, pre svega, od puta unošenja ricina u organizam. Oralna ingestija je najčešći put unošenja toksina u organizam, ali je ricin tada najmanje toksičan u odnosu na inhalaciju i intravensko unošenje. (22) U slučajevima oralne intoksikacije semenom ricinusa dominiraju simptomi od strane gastrointestinalnog trakta. 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. Smrt nastupa usled razvoja nepovratne faze hipovolemijškog šoka (23,24).

MATERIJAL I METODE

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 (proizvođač Veterinarski institut Zemun, Srbija).

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 (25). Na osnovu toga preračunata doza ricina u semenu iznosi oko 0,9%, odnosno oko 1,60 mg. S obzirom na to 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.

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).

Eksperimentalni protokol

Životinje su bile podeljene u dve osnovne grupe:

kontrolnu grupu, 5 životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml per os i žrtvovane nakon 48 časova 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 (E-I), 12 (E-II), 24 (E-III), 36 (E-IV) i 48 časova (E-V). 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

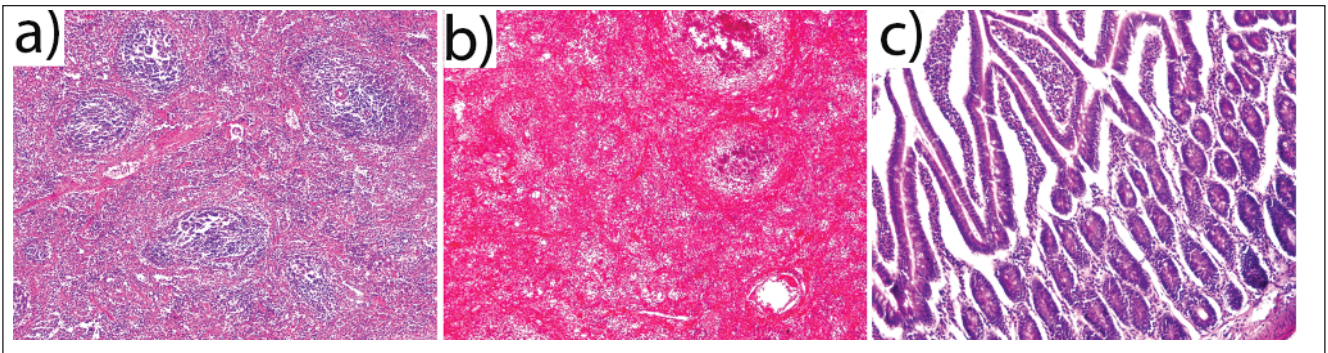
gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane eksangvinacijom (kardiopunkcijom). Uzorci moždanog tkiva, bubrega, jetre, slezine, pluća, srca i tankog creva za patohistološku analizu su fiksirani i dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, prožeti i ukapljeni u 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.

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 nakon aplikacije suspenzije semena ricinusa.

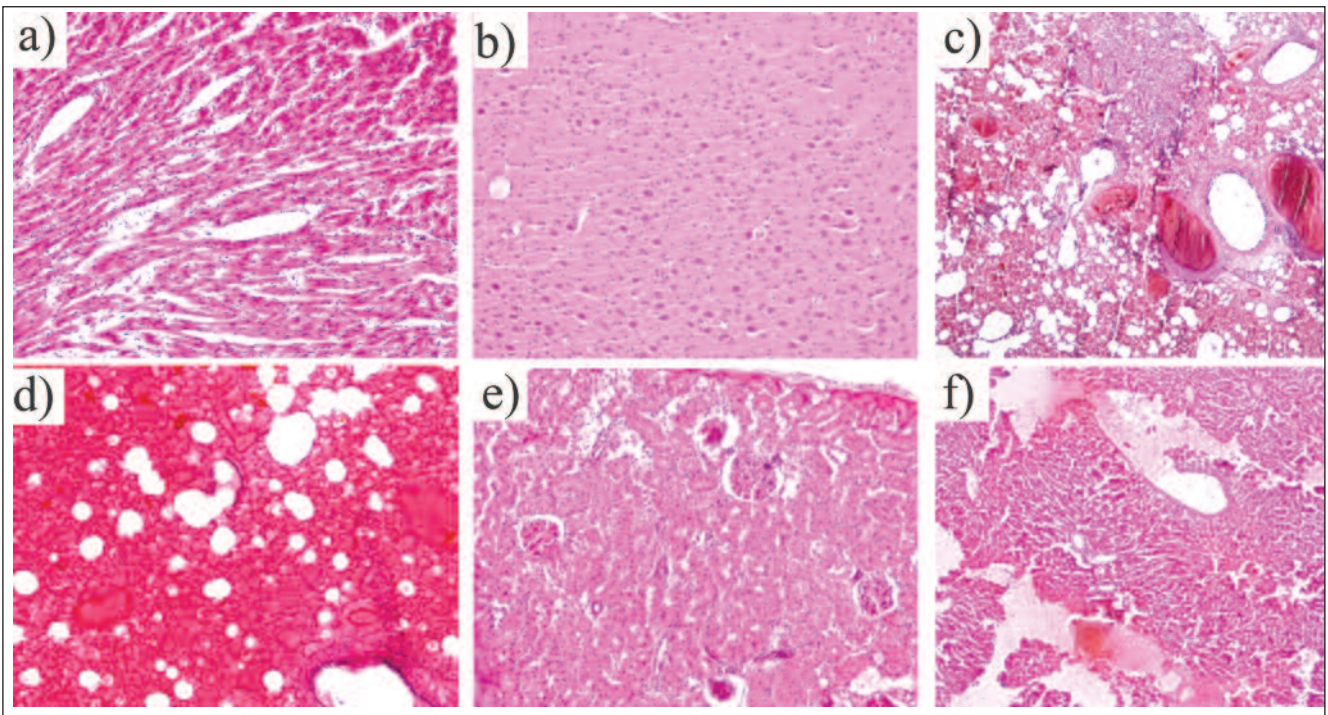
REZULTATI

Na histološkim preparatima životinja iz prve i druge eksperimentalne grupe (grupe E-I i E-II) patohistološke promene su diskretne. Naime, na preparatima analiziranih organa (pluća, bubrega, jetre, mozga) uočava se blaga hiperemija, dok se u crvenoj pulpi slezine nalaze prošireni sinusoidi sa izraženom hiperemijom tkiva. Na tankom crevu uočava se blaga hiperemija sa fokalnim inflamatornim infiltratom u lamini propriji.

Promene na organima životinja žrtvovanih 24 h (E-III) nakon tretmana su nešto jačeg intenziteta. Na plućima se uočava umerena hiperemija, deskvamovane alveolarne ćelije i makrofagi u alveolama, fokalni perivaskularni i peribronhijalni infiltrat limfocita, kao i prisustvo plazma ćelija.



Slika 1. Patohistološke promene na organima pacova nakon aplikacije semena ricinusa: a) Slezina: izražena hiperemija sa proširenim sinusoidima crvene pulpe, HE, 100x; b) Izražena nekroza crvene pulpe slezine, HE, 100x; c) Blaga hiperemija i fokalno gušći inflamatorni infiltrat u lamini propriji tankog creva, HE, 200x;



Slika 2. Patohistološke promene na organima životinja uginulih u toku izvođenja eksperimenta: a) Nekroza kardiomiocita i gust infiltrat prevashodno neutrofilnih granulocita, HE, 200x; b) Izražena hiperemija, difuzan pericelularni i perivaskularni edem na preparatima moždanog parenhima, HE, 100x; c) Pluća: izražena hiperemija pra'ena fokalno gušći perivaskularni i peribronhijalni infiltrat limfocita i plazma ćelija, HE, 400x; d) Izražena nekroza alveolarnih pregrada i intraalveolarna hemoragija, HE, 100x; e) Bubrež: izražena hiperemija, difuzna parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija tubula, zadebljanje i fibroza glomerularnih kapilarnih krvnih sudova, HE, 200x; f) U parenhimu jetre uočava se izražena hiperemija sa proširenjem sinusoida i kompresijom hepatocita, fokalno je prisutan mononuklearni inflamatorni infiltrat, HE, 100x;

Patohistološka slika bubrega je u vidu izražene hiperemije i difuzne parenhimatozne degeneracije epitelnih ćelija tubula, a na jetri se takođe uočava izražena hiperemija sa proširenjem sinusoida i posledičnom kompresijom hepatocita. Slezina se karakteriše proširenim sinusoidima crvene pulpe, kao i povećanim brojem ćelija bele krvne loze i megakariocitima. U parenhimu velikog mozga prisutna je umerena hiperemija, fokalni pericelularni i perivaskularni edem. Srčani mišić je hiperemičan sa intersticijalnim edemom, dok su promene na preparatima tankog creva i dalje diskretne i u vidu blage hiperemije i fokalno gušćeg inflamatornog infiltrata u lamini propriji.

Kod životinja koje su žrtvovane nakon 36 h, odnosno 48 h (E-IV i E-V grupa) na plućnom parenhimu je prisutna izražena hiperemija, deskvamovane alveolarne ćelije i makrofagi u alveolama, fokalno gušći perivaskularni i peribronhijalni infiltrat limfocita i plazma ćelije. Na preparatima bubrega jasno se uočava izražena hiperemija, difuzna parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija tubula, zadebljanje i fibroza glomerularnih kapilarnih krvnih sudova, u pojedinim tubulima je prisutan eozinofilni proteinski materijal. Promene na jetri su u vidu izražene hiperemije sa proširenim sinusoidima i kompresijom hepatocita koji pokazuju degenerativne promene praćene karioreksom, kariolizom i kariopiknozom jedara, fokalno je prisutan mononuklearni inflamatorni infiltrat. Pored izražene hiperemije na slezini se nalaze prošireni sinusoidi crvene pulpe sa povećanim brojem ćelija bele krvne loze i megakariocitima, a bela pulpa je proliferisala sa fokalno izraženijim germinativnim centrima (slika 1a i 1b). U moždanom parenhimu je hiperemija jače

izražena i prisutan je difuzan pericelularni i perivaskularni edem, dok se u srcu uočava edem intersticijuma sa fokalnim mononuklearnim infiltratima. Promene na tankom crevu karakterišu se blagom hiperemijom, sa fokalno gušćim inflamatornim infiltratom u lamini propriji i umnoženim limfnim tkivom Payerovih ploča (slika 1c).

U slučajevima koji su egzistirali promene su znatno jačeg intenziteta. Na preparatima srca prisutna je nekroza kardiomiocita i gust infiltrat prevashodno neutrofilnih granulocita (Slika 2a). U moždanom parenhimu fokalno su prisutna manja područja encefalomalacije (Slika 2b), dok je na plućima uočena izražena nekroza alveolarnih pregrada i intraalveolarna hemoragija (Slika 2c i 2d). Bubrezi su se karakterisali akutnom tubularnom nekrozom i mononuklearnim infiltratom u intersticijumu (Slika 2e). Na jetri uginulih životinja prisutna je nekroza hepatocita sa fragmentacijom gredica, krvarenjem i nakupljanjem svetle, eozinofilne tečnosti (Slika 2f).

ZAKLJUČAK

Registrovane patohistološke promene na organima eksperimentalnih životinja odgovaraju promenama opisanim u prethodno objavljenim istraživanjima, u kojima je ricin aplikovan na različite načine. Analiza pokazuje da su patohistološke promene kod životinja iz prve dve grupe diskretne, dok su kod životinja iz ostalih grupa bolje izražene i uočljivije. Na osnovu iznetog može se zaključiti da patohistološke promene progrediraju tokom vremena proteklog od aplikacije suspenzije, odnosno da su u pozitivnoj korelaciji sa proteklom vremenom.

Abstract

Introduction: 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 (*Ricinus communis*), 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. The main aim of this research is to use pathohistological analysis 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. **Material and methods:** Experimental rats were simultaneously orally tested by the solution which contained sublethal concentration of ricin. After sacrificing, the samples of inner organs tissue were taken in specifically defined intervals of time and used for further analysis. Pathohistological analysis of the samples of inner organ tissues was made with the purpose of establishing the changes caused by the effects of ricin in relation to time which passed from the application of the solution. **Results:** On histological preparations of animals from the first and second experimental groups, pathohistological changes are discrete. In animals from other groups changes are more pronounced and clearly visible and are particularly intense in animals which died during the experiment. **Conclusion:** Pathohistological changes on the organs of laboratory rats progress over the time that has passed since the application of the suspension of the seed of castor bean.

REFERENCE

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. Salihi B, Gana AK, Apuyor B. Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.): Botany, Ecology and Uses. *Inter J Sci Resear*. 2014;3:1333-41.
3. 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.
4. Ranal M, Dhamijal H, Prashar I B, Sharma S. *Ricinus communis* L. – A Review. *Intern J PharmTech Resear*. 2012;4(4):1706-11.
5. Sabo T, Kronman C, Mazor O. Ricin-Holotoxin-Based Vaccines: Induction of Potent Ricin-Neutralizing Antibodies. *Methods Mol Biol*. 2016;1403:683-94.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Skure A, Dhaduk H, Mehta D. Castor bean (*Ricinus communis* L.): Morphological Genetic Diversity. Saarbrücken: Lambert academic publishing; 2012.
10. Balint GA. Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. *Toxicol*. 1974;2:77-102.
11. Bradberry SM, Dickers KJ, Rice P, Griffiths GD, Vale JA. Ricin poisoning. *Toxicol Rev*. 2003;22(1): 65-70.
12. Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*. 2004;44:361-70.
13. Balali-Mood M, Moshiri M. Problems of Clinical Diagnosis and Management of a Deliberate Biological Born Disease. *J Bioterror Biodef*. 2015;6:e113.
14. Ishiguro M, Tomi M, Funatsu G, Funatsu M. Isolation and chemical properties of a ricin variant from castor bean. *Toxicon*. 1976;14:157-65.
15. Zhan J, Zhou P. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicol*. 2003;186:119-23.
16. Rauber A, Heard J. Castor bean toxicity re-examined: a new perspective. *Vet Hum Toxicol*. 1985;27:498-502.
17. Bradberry S. Ricin and abrin. *Medicine*. 2012; 40(2):80-1.
18. 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.
19. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA*. 2005;294 (18):2342-51.
20. Garber EAE. Toxicity and detection of ricin and abrin in beverages. *J Food Protec*. 2008;71:1875-83.
21. Palatnick W, Tenenbein M. Hepatotoxicity from castor bean ingestion in a child. *J Toxicol. Clin Toxicol*. 2000;38:67-9.
22. 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.
23. Aplin PJ, Eliseo T. Ingestion of castor oil plant seeds. *Med J Aust*. 1997;167:260-1.
24. 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.
25. 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.
26. Jeffrey A, Doeblner J, Wiltshire N, Mayerb T, Estepe J, Moellera R, Trauba R, Broomfield C, Calamaio C, Thompson W, Louise Pitt M. The distribution of [¹²⁵I] ricin in mice following aerosol inhalation exposure. *Toxicology*. 1995;98:137-49.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Roels S, Coopman V, Vanhaelen P, Cordonnier J. Lethal ricin intoxication in two adult dogs: toxicologic and histopathologic findings. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22:466-468.
31. Hassan I, Al-Awadi A, Salman I, Jasim N. Histological study of the effect of aqueous extraction of the castor seeds on the internal organs in male white mice. *Bas J Vet Res*. 2016;14:54-65.
32. 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.