(مقالهٔ مروری)

سم ریسین: مکانیسم سمیت، روش‌های تشخیص، درمان و ایمنی زائی علیه آن

داود صادقی[۱]، فیروز ابراهیمی[۲*]، مهدی زین الدین[۳]، سید امیر حسینی[۴]، زهره هدایت منش[۵]

۱-دکترای گروه نانوبیوتکنولوژی.
۲-استادیار گروه بیوشیمی.
۳-دانشیار گروه بیوشیمی.
۴-دانشجو دکتری نانوبیوتکنولوژی.
۵-کارشناس ارشد فیزیولوژی.

۱و۲و۴-مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.
۳-پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
۵-دانشگاه آزاد اسلامی واحد آبادان، آبادان، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
فیروز ابراهیمی؛ مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۰۸۶۰۹۳۴۰
Email:
davudsadeghi64@yahoo.com

چکیده

سم ریسین یک گلیکوپروتئین هترودایمر دارای اتصال دی سولفید متشکل از زنجیره سمی A و زنجیره B متصل به سلول می باشد که بواسطه غیرفعال‌کردن برگشت‌ناپذیر ریبوزوم‌های یوکاریوتی از طویل شدن زنجیره پلی‌پپتیدی جلوگیری می‌کند و در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود. این سم از دانه‌های گیاه کرچک استخراج می شود و ۵-۱درصد از وزن دانه خشک را شامل می‌شود. ریسین یکی از عوامل نگران کننده در دفاع بیولوژیک می باشد بعلت اینکه به آسانی توسط گروه‌ها و اشخاص با تکنیک-هایی با تخصص کم و بودجه پایین قابل تهیه است و منبع آن بصورت علف هرز و یا محصول کشت شده در همه کشورها وجود دارد. با توجه به اینکه ریسین به راحتی در بدن انتشار می‌یابد توسط CDC (مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری های آمریکا) به عنوان یک تهدید زیستی کلاس B طبقه‌بندی شده است. تحقیقات مختلفی برای تشخیص، درمان و ساخت یک واکسن مناسب بر علیه این عامل صورت پذیرفته است. جهت تشخیص مسمومیت ریسین در نمونه‌های بالینی، از روش‌های ایمونولوژیکی برای غربالگری و از تلفیق روش‌های کروماتوگرافی و طیف سنجی جرمی برای تائید مسمومیت استفاده می‌شود. در حال حاضر هیچ درمان ویژه ای برای مسمومیت با ریسین در دسترس نمی‌باشد اما دو واکسن که شباهت زیادی با زیر واحد A سم دارند، شامل RiVax و RVEc، در حال توسعه هستند. هدف از این مطالعه معرفی سم ریسین، روش‌های تشخیص، درمان و کاندیدهای جدید واکسنی آن می‌باشد.

کلید واژگان: سم ریسین، روش تشخیص، درمان، توسعه واکسن.

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۸/۱۷ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲ اعلام قبولی: ۱۳۹۵/۱۱/۲۶

مقدمه

بسیاری از موجودات زنده پروتئین‌های سمی قوی ای را تولید می‌کنند که این پروتئین‌ها در سلول‌های دیگر عمل می‌کنند، که گاهی اوقات هم با اثرات کشنده همراه می‌باشند. این پروتئین‌ها به افزایش شانس بقا یا تکثیر و تولیدمثل ارگانیسم کمک می‌کنند. بعضی از آن‌ها کارکردی دقیق و خاصی را دارا می‌باشند که سموم پروتئینی تولید شده توسط گیاهان از جمله این سموم می باشند. برای مثال ریسین، ویسکومین، ولکنسین و پروتئین‌های شبیه آن‌ها به نحوی تکامل یافته‌اند که بصورت انتخابی ریبوزوم‌های درون سلول‌های موجودات حساس را هدف قرار دهند، در نتیجه اختلال کشنده‌ای را در سنتز پروتئین ایجاد می‌کنند. این سموم قادرند با استفاده از مسیرهای انتقال داخل سلولی از سطح سلول به بسترهای مرتبط با خود در سیتوزول انتقال یابند. پروتئین‌های سمی گیاهی، متعلق به گروه فیتوتوکسین‌ها می‌باشند که با غیرفعال کردن ریبوزوم‌های سلولی سنتز پروتئین سلول‌های یوکاریوتی را مهار می‌کنند. سموم این گروه، گلیکوپروتئین‌هایی با وزن مولکولی حدود ۶۰ کیلودالتون می‌باشند که از دو زیرواحد تشکیل شده‌اند که این دو زیرواحد به وسیله یک باند دی‌سولفیدی به هم مرتبط می‌شوند. به این سموم پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم یا RIP (Ribosome Inactivation Protein) می‌گویند. سموم گیاهی RIP ممکن است به عنوان یک سم قابل دسترس برای کاربردهای جنگی استفاده شوند زیرا منابع گیاهی آن‌ها به آسانی کشت می‌شود و آماده سازی سم خالص آن پیچیده نمی‌باشد. تهیه سموم گیاهی برای کشورها یا تروریست‌هایی که پول زیادی برای تهیه سلاح‌های هسته‌ای و دیگر ابزارهای کشتار جمعی با تکنولوژی بالا ندارند قابل استفاده و در دسترس می‌باشد. از ویژگی‌های این سموم می‌توان به ارزان بودن، آسانی ساخت و سادگی پنهان کردن اشاره کرد. حتی مقدار کمی از این سموم گیاهی اگر به طور موثر استفاده شود می‌تواند آسیب‌های گسترده‌ای را ایجاد کند که باعث رسیدن آسیب به بسیاری از افراد می‌شود. بیشتر تحقیقات انجام شده و اطلاعات بدست آمده بر روی پروتئین‌های سمی گیاهی حاصل مطالعات انجام شده بر روی ریسین می‌باشد. علت اهمیت ریسین در بین RIPها تولید انبوه آن در کشورهای مختلف جهت تهیه روغن کرچک بوده که در این بین کنجاله آن که جزء مواد باقی مانده از فرایند جداسازی روغن است حاوی سم ریسین می‌باشد. هدف از این مطالعه معرفی سم ریسین، مکانیسم سمیت، روش‌های تشخیص، درمان و کاندیدهای جدید واکسنی ریسین می‌باشد(۳-۱).

گیاه کرچک:

گیاه کرچک (*Ricinus communis*) که در زبان انگلیسی castor-oil plant نامیده می‌شود یک گیاه علفی است که بنا به محل رویش، طول دوره رشد آن متفاوت است به صورتی که در مناطق سردسیری، گیاه یکساله بوده ولی در مناطق گرمسیر به صورت چندساله در آمده و ممکن است از لحاظ حجمی فضای بسیاری را اشغال کند و به صورت درخت یا درختچه در آید. این گیاه یک یا چندساله (در مناطق سردسیر بصورت یکساله است) که متعلق به خانواده فرفیون (Eupharbiaceae) می‌باشد دارای ساقه ای با ارتفاع ۲ متر است ولی در آب و هوای گرم و مساعد با ظاهر درختچه مانند به ارتفاع ۴ تا ۶ متر و حتی ۱۰ متر و گاهی بیشتر ممکن است رشد نماید (تصویر۱).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که کرچک بومی آفریقای شمالی و به احتمال زیاد کشور اتیوپی می‌باشد(۴). کرچک تقریباً در همه نوع خاک به جز خاک های سنگین رسی رشد کرده و محصول می دهد. میوه آن پوشیده از خار و محتوی سه دانه کرچک دار است(۵).

از دانه‌های کرچک در تولید روغن کرچک استفاده می شود. روغن کرچک در تولید رنگ‌ها، لاک و روغن موتورهای جت، اتومبیل و ماشین آلات صنعتی کاربرد دارد. یکی دیگر از کاربردهای روغن کرچک مسهل کردن

است(۶). سم ریسین در پالپ‌های دانه کرچک پیرو جداسازی روغن از دانه‌ها موجود است. اگر عصاره‌گیری در شرایط دمایی انجام شود هیچ ریسینی در روغن باقی نمی‌ماند و ریسین در طول جداسازی غیرفعال می‌شود(۷). اگرچه ریسین در سرتاسر گیاه پراکنده است لیکن دانه‌های کرچک هستند که حاوی مقادیر قابل توجهی از این سم می‌باشند. در صورت خوردن دانه‌های کرچک سمیت ریسین تنها در صورت خیساندن و یا جویدن دانه‌ها ایجاد می‌شود(۸).

دانه گیاه کرچک به جز ریسین دارای یک لکتین گلیکوپروتئین دیگر بنام Ricinus communis agglutinin (RCA) می‌باشد که بر خلاف ریسین بطور مستقیم سمیت ندارد اما دارای میل ترکیبی برای سلول‌های قرمز خون می‌باشد که منجر به لخته شدن خون و متعاقب آن همولیز می‌شود. RCA بطور قابل توجهی از روده جذب نمی‌شود و تنها پس از تزریق داخل وریدی باعث همولیز قابل توجهی می‌شود (۹).

سم ریسین:

سم ریسین (RT) یک سم بیولوژیک است که در دانه‌های گیاه کرچک (*Ricinus communis*) موجود می‌باشد. ۵-۱ درصد از وزن کل دانه خشک کرچک حاوی سم ریسین می‌باشد(۱۰). گیاه کرچک در سراسر جهان در هوای معتدل و گرمسیری رشد می‌کند و از آن به عنوان یک گیاه زینتی و در تجارت برای تولید روغن کرچک استفاده می‌شود، همچنین بصورت علف هرز نیز در مناطق مختلف رشد می‌کند. روغن کرچک در درجه حرارت بالا استخراج می‌شود و از آن به عنوان یک ماده مسهل کننده استفاده می‌کنند. پس از استخراج روغن، سم را می‌توان از خمیر باقی مانده بوسیله ترسیب با هیدروکسید سدیم یا بوسیله کروماتوگرافی خالص کرد و در مجموع با ۲ مرحله جداسازی با بازده شیمیایی ۹۵ درصد سم خالص تولید می‌شود. با این حال، حتی سم ریسین خام بسیار سمی است، همچنین دانه‌های آسیاب شده به عنوان یک سلاح بالقوه زیستی محسوب می شود(۱۱).

سم خالص، یک پودر سفید رنگ می باشد و قابل انحلال در آب و در محدوده pH وسیع پایدار است، کاملاً در دمای کمتر از ۶۰ درجه سانتیگراد پایداراست و در محلول آبی برای ۱ ساعت در دمای ۸۰°C غیر فعال می شود و نیاز به دما و زمان طولانی‌تری برای غیرفعال کردن فرم خام و یا پودری سم می‌باشد. حتی هنگامی که سم جوشانده می‌شود دوز بالای سم ریسین می‌تواند کشنده باشد(۱۳-۱۲).

در اصل سم ریسین یک گلیکوپروتئین لکتین تشکیل شده از دو زنجیره A و B می‌باشد که توسط یک باند دی سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند و دارای وزن مولکولی ۶۵-۶۰ kDa می‌باشد(۱۳). زنجیره B یک لکتین و دارای وزن مولکولی ۳۴kDa می‌باشد و به گالاکتوزگلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای بیان شده بر روی سطح سلول متصل می‌شود که ورود ریسین به سیتوزول را تسهیل می‌کند(۱۴). زنجیره A دارای وزن مولکولی ۳۲kDa می‌باشد و از سنتز پروتئین به واسطه غیرفعال کردن برگشت ناپذیر ریبوزوم‌های یوکاریوتی به واسطه حذف یک باقیمانده آدنین از حلقه ۲۸s RNA ریبوزومی موجود در زیر واحد ۶۰s جلوگیری می‌کند. این فرآیند مانع از طویل شدن زنجیره پلی‌پپتیدی و در نتیجه توقف ساخت پروتئین در سلول و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود(۱۵). نتیجه سمیت جلوگیری از بیان پروتئین است، اما مکانسیم‌های دیگر از جمله مسیر آپوپتوز، آسیب مستقیم به غشاء سلولی، تغییر ساختار و عملکرد و فرآیندهای غشایی و آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی نیز صورت می‌گیرد(۱۶).

پراکندگی دانه‌های کرچک، سهولت استخراج و پایداری شیمیایی، ریسین را به ماده‌ای جذاب و ارزان قیمت برای افراد با علم پایین و یا سازمان‌های تروریستی برای تولید مقادیر زیاد این سم تبدیل کرده است و

احتمال اینکه در برخی از نقاط طی یک اقدام تروریستی مورد استفاده قرار گیرد وجود دارد(۱۰).

روش انتشار ریسین و علائم بالینی بر اساس نوع در معرض قرار گرفتن انسان تعیین می‌شود. ریسین را می‌توان بصورت عصاره خام، کریستال‌های خالص و یا اشکال پودری آماده و یا محلول در مایعات تهیه کرد. انتشار عمومی می‌تواند از طریق ذرات معلق، از طریق آب و غذا و یا تزریق مستقیم وریدی انجام پذیرد(۱۷).

سمیت سلولی ریسین:

ریسین یک مولکول بیوشیمیایی ساده می‌باشد، که باید در بخش‌های خاصی در سلول برای اعمال سمیت شکسته شود(۱۸). پردازش ریسین به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و مسیرهای انتقال منحصر به فرد در سلول، به ویژه انتقال معکوس آن مشخص شده است. چندین مقاله مروری در توصیف پردازش درون سلولی ریسین وجود دارد(۱۹). زنجیره B از طریق گیرنده‌های لکتین خود به سلول‌ها متصل می‌شوند. از آنجا که بسیاری از گلیکوپروتئین‌ها وگلیکولیپیدهای سطح سلول دارای باقیمانده‌های گالاکتوزیل انتهایی می‌باشند، تقریباً ریسین بی قاعده به تمام انواع سلول ها متصل می‌شود. از آنجا که هر یک از مونومرهای ریسین می‌تواند به دو باقی مانده گالاکتوز متصل شود، ریسین همچنین می‌تواند با برخی از مولکول‌های سطح سلول کراس لینک داشته باشد(۲۰). به طور معمول از محلول‌های ۰/۱ مولار لاکتوز و یا گالاکتوز جهت جلوگیری از سمیت سلولی ریسین در شرایط آزمایشگاهی استفاده می کنند. شیر شامل یک غلظت مشابهی از لاکتوز می‌باشد و در نتیجه از شیرهای بر پایه مسدود کننده TM BLOTTO جهت جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی گلیکوپروتئین‌ها به ریسین در آزمایش‌های ایمنولوژی استفاده می‌شود. البته هنوز اینکه آیا خوردن یک لیوان شیر می‌تواند بعنوان پادزهر ریسین استفاده شود هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین ممکن است که پلی ساکاریدهای میکروبی در بخش‌های مخاطی به ریسین متصل شوند و مانع از اتصال آن به سلول‌های انسان شوند که این می‌تواند برای کاهش سمیت ریسین مصرف شده به صورت خوراکی استفاده شود(۱۹).

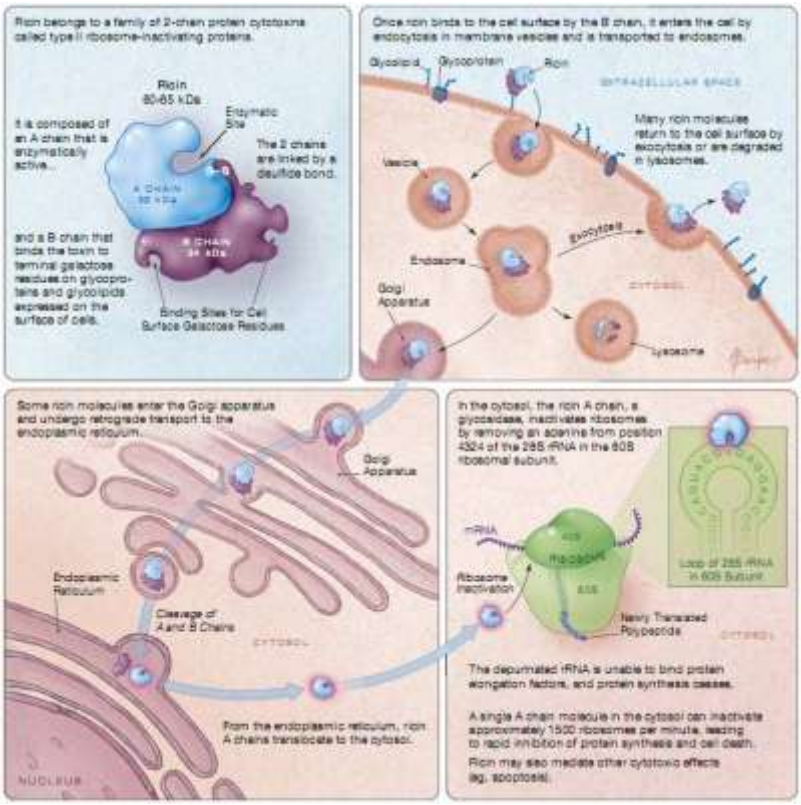
ریسین پس از ورود به بدن موجود زنده، از سطح سلول به واسطه یک مکانیسم متغیر از کلاترین وابسته و مستقل و داینامین وابسته و مستقل وارد سلول می‌شود. به وسیله تداخل با مولکول‌های سطح سلول و سیگنالینگ به واسطه کینازهای سطح سلول، ریسین می‌تواند تنظیمات را در درون سلول برای خودش افزایش دهد. چرا که ریسین می‌تواند به تعدادی از ساختارهای حاوی گلایکان سطح سلول، به علاوه گلیکوپروتئین‌های سرم و بافت متصل و باعث محدوده‌ی بالایی از مکانیسم‌های ادراکی شامل فاگوسیتوز و پینوسیتوز شود. مکانیسم‌های ورودی ریسین به سلول‌های مختلف و همچنین به سلول‌های یکسان متفاوت می باشد که در جایگاه های درون سلولی مختلفی صورت می پذیرد. بیشتر مسیرهای اصلی برون سلولی ریسین شامل نقل و انتقال به واسطه بخش‌های اندوزومی و سه مرحله می‌باشد. اولین مرحله شامل اگزوسیتوز و دفع سلولی می‌باشد که به طور مشابهی باعث ایجاد تاول می‌شود. ایجاد تاول می‌تواند حاصل تلاش سلول برای بیرون انداختن سم باشد که این می‌تواند پتانسیل ریسین را برای انتقال به سلول‌های دیگر را نشان دهد. دومین مسیری که ریسین می‌تواند طی کند این است که توسط لیزوزوم‌های سلول میزبان تخریب می‌شود و در سومین مسیر، ریسین در شبکه اندوپلاسمی احیاء شده و عملکرد سمیت خود را در سلول اعمال می‌کند(۱۹).

جهت ورود ریسین دسته یکسانی از ارگان‌ها که در ترشح پروتئین‌ها دخیل هستند درگیر می‌شوند، اما در جهت معکوسِ مسیر پروتئین‌های ترشحی مورد استفاده قرار می‌گیرند که از اندوزوم‌ها به واسطه دستگاه گلژی به درون شبکه اندوپلاسمی منتقل می‌شوند. در ابتدا گمان می‌شد که این مسیر تنزل بطور منحصر بفردی مربوط به سم ریسین می‌باشد اما بعدها مشخص شد که این مسیر

یک ویژگی تنظیمی از عبور و مرور برون سلولی می-باشد(۲۱). داروهایی که بطور اختصاصی از این مسیر جلوگیری می‌کنند اثر دارویی ضد ریسین را هم در سلول و هم در حیوانات از خود نشان می دهند(۱۸).

اولین سمی که به شبکه اندوپلاسمی می‌رسد باید به واسطه غشاء شبکه اندوپلاسمی به درون سیتوزول منتقل شود تا بتواند سمیت خود را اعمال کند. درون شبکه اندوپلاسمی ریسین احیاء می‌شود و زنجیره A از زنجیره B جدا می‌شود. زنجیره A سپس از تاخوردگی خارج می‌شود و از غشاء شبکه اندوپلاسمی عبور می‌کند و وارد سیتوزول می شود. زنجیره A باید از مسیرهای تخریبی وابسته به شبکه اندوپلاسمی اجتناب کند، تا زمانیکه در جریان پروتئینی ترانس‌لوکون‌ها که بخشی از مسیر تخریب هستند بکار برود. اینکار به واسطه استفاده از چاپرون‌هایی مانند Hsc70 و Hsp90 انجام می‌شود، بعلاوه یک تغییر ساختار وابسته به دما در زنجیره A انجام می‌شود و باعث کاهش ساختارهای مارپیچ آلفا هلیکس و الحاق پایانه کربوکسیل به غشاء لیپیدی دو لایه شبکه اندوپلاسمی می‌شود(۲۳-۲۲). در یکی از این جایگاه‌های فعالیت، زنجیره A بعنوان یک N-گلیکوزیداز فعالیت می‌کند که RNA ریبوزومی را به وسیله حذف آدنین ۴۳۲۴ در لوپ RTA/sarcin در 28srRNA غیرفعال می‌کند. این آنزیم در هر دقیقه ۱۵۰۰ ریبوزوم را غیر فعال می‌کند. فعالیت کاتالتیکی در بخش متحرک ساختار RNA اعمال می‌شود. مشخص شده است که دمین مارپیچی زنجیره A یک نقش کلیدی را در حذف آدنین بازی می‌کنند که عملکرد این دمین می‌تواند به وسیله یک هجوم آنتی بادی حد واسط متوقف شود (تصویر۲). ارزیابی شده است که به ازای عملکرد هر مولکول ریسین که به جایگاه فعالیت می‌رسد، ۱۰۰۰۰ مولکول دیگر به وسیله اگزوسیتوز یا تفکیک در بخش-های غیرمرتبط عملکردی در سلول حذف می‌شوند. نتیجه مرگ سلولی بعلت جلوگیری از سنتز پروتئین و اصولاً بوسیله آپوپتوزیس صورت می‌گیرد(۲۴).

تصویر۱: تصویر گیاه کرچک و دانه گیاه کرچک در حال خارج شدن از پوسته اولیه



تصویر۲: مکانیسم سمیت ریسین

کاربردهای دارویی سم ریسین:

ترکیب سمی موجود در گیاه کرچک ماده‌ای بنام ریسین است. اگرچه ریسین بسیار سمی است، ولی دارای کاربردهای درمانی متنوعی است و به عنوان ابزاری در مطالعه خصوصیات سطح سلول و نیز آزمایشات دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. ریسین برای استفاده‌های درمانی در شیمی درمانی سرطان، در پیوند مغز استخوان و در تحقیقات سلولی مورد استفاده قرار گرفته است. شواهد تجربی نشان می‌دهد که سلول‌های بدخیم نسبت به سم ریسین حساس‌تر هستند به علت اینکه آن‌ها کربوهیدرات‌های بیشتری شامل سطوح لکتین اتصالی به سایت‌ها را بیان می‌کنند. سلول‌های غیربدخیم این حالت را ندارند. آنتی‌بادی الحاق شده به ریسین سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار داده است و به‌عنوان یک عامل مورد بررسی قرار گرفته است(۲۶،۱۰–۲۵).

ریسین و زنجیره A سمی آن (RTA) بصورت درمانی با لیگاندهای بازویی که هدف سلول‌های بیماری‌زا هستند استفاده می‌شود. در اغلب موارد این لیگاندها آنتی-بادی‌های مونوکلونال (MAbs) متصل شونده به سلول هستند. این ترکیب لیگاند–سم یا ایمونوتوکسین آن، نتایج آزمایش‌های بالینی موفقی را نشان داده‌اند. در این تحقیقات که در زمینه درمان سرطان از ریسین متصل به آنتی بادی مونوکلونال و پلی‌کلونال استفاده می‌گردد، مشکلاتی نیز در کاربرد ریسین – ایمونوتوکسین وجود دارد و آن بیماری نشت عروقی (vascular leak syndrome) است که در آن مایعات از سیستم‌های گردش خون و لنفاتیک نشت می‌کنند و باعث کاهش میزان آلبومین (hypoalbuminuria)، افزایش وزن و ورم ریوی (pulmonary oedema) می‌شود. همچنین ریسین ایمونوتوکسین به طور موفقیت آمیز در تخریب سلول‌های لنفوسیتی T در مغز استخوان طی فرایند پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار گرفته است و بنابراین احتمال پس زدن مغز استخوان پیوندی توسط گیرنده را کاهش می‌دهد (بیماری میزبان علیه پیوند). با افزایش

یافتن اطلاعات در مورد حرکت ریسین در اطراف سلول و هدف گیری اجزای سلولی ویژه، کاربرد ریسین-ایمونوتوکسین در درمان سرطان در آینده بسیار مورد توجه خواهد بود. علاوه بر این، عصب شناسان از ریسین جهت از بین بردن سلول‌های عصبی به صورت انتخابی استفاده می‌کنند و آسیب به سلول‌های عصبی خاصی را القاء نمایند. این کار به محققان اجازه می‌دهد تا جزئیات بسیاری از بیماری‌هایی که در آن‌ها سلول‌های عصبی از بین می‌روند و مسیر تکامل سلول‌های عصبی را مشخص نمایند(۲۷).

در سال‌های اخیر با بکارگیری تکنیک‌های پیشرفته ایمینودرمانی، ریسین مجدداً مورد توجه در درمان پزشکی قرارگرفته است و ریسین طبیعی و یا زنجیرهٔ A آن به آنتی بادی‌های مونوکلونال ضد سلول‌های سرطانی، کونژوگه و در تحقیقات مورد استفاده می‌باشد(۲).

کاربردهای نظامی سم ریسین بعنوان یک سلاح بیوتروریسم:

ریسین یکی از عوامل نگران کننده در دفاع بیولوژیک می‌باشد به‌علت اینکه به آسانی توسط گروه‌ها و اشخاص با تکنیک هایی با تخصص کم و بودجه پایین قابل تهیه است و منبع آن بصورت علف هرز و یا محصول کشت شده در همه کشورها وجود دارد. افزایش آگاهی و نگرانی در مورد ریسین بعنوان یک سلاح تروریستی نیاز به بررسی جامعی از سم را ضروری می-کند. مراکز کنترل و پیشگیری بیماری (CDC) ریسین را به عنوان سری عامل B (دومین اولویت) رده بندی کرده-اند، به‌علت اینکه ریسین به راحتی انتشار می‌یابد و نتیجه آن مرگ و میر کم اما عوارض متوسط به بالا می‌باشد و نیاز به ارتقاء خاص تشخیص CDC و ظرفیت نظارت بیماری دارد. چنین عواملی به طور معمول رخ نمی دهد بنابراین افزایش آگاهی جامعه و مراقبت های بهداشتی و زیرساخت‌های بهداشت عمومی قوی برای تشخیص و واکنش لازم مورد نیاز است(۲۸).

ریسین خام از دانه‌های کرچک پودر شده که سمی هستند، تولید می‌شود و با ۲ مرحله جداسازی با بازده شیمیایی ۹۵ درصد سم خالص تولید می شود. سم از نظر شیمیایی پایدار است و می‌تواند برای دوره‌های طولانی مدت با کاهش کمی در فعالیت در محیط غیر سرد ذخیره شود. تقریبا تمام گزارش‌ها از مسمومیت ریسین با توجه به مصرف دانه‌های کرچک بوده اند اما با توجه به اینکه آن‌ها رشد فراوانی در سراسر جهان دارند و به راحتی در دسترس هستند در طی چندین دهه گذشته، اطلاعات مختلفی از تهیه ریسین برای استفاده‌های غیر اخلاقی وجود دارد و آخرین اطلاعات مربوط به ترور با ریسین می‌باشد. خطر ریسین بخوبی مشخص نیست و این به علت این است که میزان تلفات آن نامشخص است و ما نباید اختلال و وحشتی که می‌تواند نتیجه یک حمله بیولوژیکی به‌وسیله یک ماده تک باشد را دست کم بگیریم حتی اگر این ماده باعث مسمومیت تعداد کمی از افراد بشود و تصمیمات عمومی باید شدت اضطراب و تشویش را کاهش دهد و بعنوان یک بازدارنده عمل کند(۱۱).

حفاظت از اثرات کشنده ریسین برای جمعیت‌های نظامی و غیرنظامی متفاوت خواهد بود. برای جمعیت‌های غیرنظامی احتمال زیادی وجود دارد که یک حمله به صورت همگانی صورت گیرد که باعث مسمومیت تعداد محدودی از اشخاص شود. در این مورد درمان پس از در معرض قرار گرفتن بسیار اختصاصی است. بعلاوه درمان-های اختصاصی توسعه داده شده است که بطور مؤثری در استراتژی‌های پس از در معرض قرار گرفتن جهت سازماندهی حوادث با اولین اعلام خطر، تایید سریع یک حمله بواسطه آزمایش‌های اختصاصی، فراهم کردن داروهای درمانی اختصاصی و تجویز آن‌ها همه در یک محدوده زمانی کمتر از ۲۴ ساعت مورد نیاز است. علائم مسمومیت ریسین برای ساعت‌ها مشخص نمی‌شود و تشخیص آن از خیلی از عفونت‌های عمومی دیگر مشکل می‌باشد. یک عامل که بطور قوی خطر در معرض قرار

گرفتن به‌وسیله یک جمعیت بزرگ را کاهش می‌دهد، انتقال ریسین بصورت غیر یکنواخت در مقادیر کشنده می‌باشد. در معرض ذرات معلق ریسین قرار گرفتن ایجاد علائم مهمی می‌کند. انتقال سم بصورت محلول یا پودر آسیاب شده نیاز به ذرات کمتر از ۳ میکرون دارد، ذرات بزرگتر به سرعت ته نشین می‌شوند و نمی‌تواند به سیستم ریوی بطور عمقی نفوذ کند. با این وجود ذرات کمتر ۱ میکرون که می‌توانند بصورت ذرات معلق مورد استفاده قرار بگیرند می‌تواند بوسیله اشخاص آموزش دیده که برای گروه دشمن کاری می‌کنند تولید شود(۲۹).

مقدار مورد نیاز برای سمیت ذرات معلق ریسین (۱۰ µg/kg) در مقایسه با سم بوتولینیوم (۱۰۰ ng/kg) بالا می‌باشد. با وجود اینکه ریسین ۱۰۰ برابر کمتر از سم بوتولینوم سمی است اما حتی کمترین میزان آن در جمعیت غیر نظامی می تواند منجر به وحشت و اخلال اقتصادی شود، که از اهداف اصلی تروریسم می باشد. با توجه به سابقه ی حوادث مربوط به ریسین، احتمال اینکه در برخی از نقاط طی یک اقدام تروریستی مورد استفاده قرار گیرد وجود دارد. برای واحدهای نظامی احتمال در معرض قرار گرفتن برای کل گروه وجود دارد و پراکندگی و پخش در میدان جنگ یا قرارگاه نظامی بطور بالایی وابسته به شرایط آب و هوایی و تکنیک‌های تخصصی دارد. با این وجود اگر نظامی‌ها با دشمن مواجه شوند و تصور شود که ریسین در زرادخانه‌های دشمن وجود دارد، باید کارهای پیشگیری کننده قبل از در معرض قرار گرفتن که می‌تواند شامل موانع فیزیکی، مواد جلوگیری کننده از ترکیب اکسیژن با مواد شیمیایی و ایمن سازی می‌باشد باید طرح ریزی شود. در کل ریسین باید در هرحادثه‌ای که در آن پودر سفید رنگ وجود دارد درنظرگرفته شود. سندرم بالینی ناشی از مسمومیت ریسین وابسته به مسیر در معرض قرار گرفتن است. در حال حاضر اقدامات مختلفی برای جلوگیری از مسمومیت ریسین در حال توسعه هستند و از آن‌ها در جمعیت نظامی یا غیرنظامی در معرض خطر استفاده خواهد شد (۳۱-۳۰).

تاریخچه مختصری از استفاده ریسین و تهدیدات حاضر:

اطلاعات مختلفی از تهیه سم ریسین جهت استفاده-های غیراخلاقی وجود دارد و آخرین اطلاعات مربوط به ترور با سم ریسین می‌باشد در اینجا به تاریخچه مختصری از استفاده ریسین و تهدیدات حاضر در مورد ریسین اشاره می‌کنیم:

- سمیت دانه های کرچک از زمان‌های باستان در آفریقا، مصر، روم و یونان شناخته شده بود(۳).
- این توکسین اولین بار توسط دانشمندی بنام استیلمارک در سال ۱۸۸۸ میلادی گزارش شد(۳).
- وزارت جنگ آمریکا ریسین را ابتدا در سال ۱۹۱۸ بعنوان جنگ افزار شیمیایی در نظر گرفت(۳۲).
- در اواخر جنگ جهانی اول نتیجه کار مشترک آمریکا و انگلیس تولید W bomb درجنگ جهانی دوم شد. این سلاح مورد آزمایش قرارگرفت ولی هرگز در جنگ واقعی استفاده نشد(۳۳).
- هرچند هیچ آزمایشگاهی تایید نکرد، از سم ریسین بعنوان عامل اتیولوژیک در سال ۱۹۷۸ جهت ترور روزنامه نگار بلغاری بنام جرجی مارکو در بریتانیا استفاده کردند(۳).
- در اواخر دهه ۱۹۸۰ در عراق ذرات خالص و قابل استنشاق ریسین تولید و در حیوانات آزمایشگاهی و آتش توپخانه در محدوده ی آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت(۳۲).
- از سال ۱۹۹۱-۱۹۹۷ سه مورد استفاده از سم ریسین بعنوان عامل تروریسم زیستی در آمریکا گزارش شده است(۳۲).
- در سال ۱۹۹۵ گمرگ کانادا یک کانتینر حاوی سم ریسین را پس از دستگیری یک قاچاقچی اسلحه کشف کردند(۳۲).

➢ در سال ۲۰۰۴ ریسین در یک محل دسته بندی نامه ها در کارولینای شمالی، در یک اتاق نامه ها که مربوط به دفتر سناتور بیل فست بود، پیدا شد که در داخل نامه ای خطاب به کاخ سفیدکشف شد(۳۲).

➢ در سال ۲۰۱۱ وجود انبارهای ریسین در سراسر جهان که توسط القاعده تولید بمب های ریسین می کند توسط نیویورک تایمز گزارش شده است(۲۴).

➢ همچنین ریسین در طول این سال‌ها در دست افراد وابسته به گروه‌های ضد دولتی و در کشورهای مختلف در دست افرادیکه احتمالاً مرتبط با سازمان های تروریستی بودند، کشف شد(۲۴). در جدول ۱ به خلاصه ای از مسمومیت های عمدی و تصادفی و تعداد مرگ و میر افراد مسموم اشاره شده است(۳).

نحوه سنتز ریسین در گیاه کرچک:

چندین ایزوفرم از ریسین وجود دارد از قبیل ریسین D و ریسین E که این سموم بوسیله یک خانواده چند ژنی کوچک در ژنوم این گیاه که تقریباً هشت عضو دارد، تولید می‌شود و برخی از این‌ها غیرفعال هستند. ریسین در بافت اندوسپرم درطول تشکیل دانه روغن کرچک تولید می‌شود و در اندام پروتئینی سلول‌های اندوسپرم همراه با آلبومین‌ها و پروتئین‌های کریستالوئید ذخیره می‌شود(۵). در داخل این اندام ریسین تا حدود ۵ درصد کل پروتئین‌های آن ذخیره می‌شود و در مراحل اولیه بعد از رشد تولید مثلی گیاه از بین می‌رود. ریسین درگیاه به شکل یک پلی پپتید منفرد سنتز می‌شود و سپس به دو زنجیره A و B برش داده می‌شود. زنجیره کامل قبل از برش خوردن به گالاکتوز متصل می‌شود ولی قادر به جداکردن پورین از ۲۸S rRNA نمی‌باشد. ریسین از یک mRNA که شامل زنجیرهٔ A و B است سنتز می‌شود. این قسمت شامل ۵۷۶ اسیدآمینه است که ۳۵ اسید آمینه اول سکانس سیگنال برای هدایت به شبکه رتیکولوم آندوپلاسمیک (ER) است. ۲۶۷ اسیدآمینه بعدی زنجیره A ریسین را تشکیل می‌دهند که از طریق ۱۲ اسیدآمینه متصل کننده به زنجیره B با ۲۶۲ اسیدآمینه متصل می‌شود (تصویر۳). ریسین درطول ترجمه به شبکه اندوپلاسمی هدایت شده و در آنجا سیگنال پپتید آن جدا می‌شود. پپتید باقیمانده کلیگوزیله شده و ۵ باند دی سولفیدی درآن شکل می‌گیرد(۳۴). چهار باند دی-سولفیدی در داخل توالی زنجیره B ایجاد می‌شود و یک باند نیز انتهای کربوکسیل از زنجیره A را به انتهای آمین از زنجیره B متصل می‌کند. ریسین شکل گرفته سپس از طریق دستگاه گلژی به‌داخل واکوئل‌های ذخیره سازی پروتئین منتقل می‌شوند. در داخل این گویچه‌ها پپتید انتهای آمین و ۱۲ اسیدآمینه متصل کننده دو زنجیره از طریق آنزیمی برش داده می‌شوند و هترودایمر ریسین با دو زنجیره A و B که از طریق باند دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند، آزاد می‌گردد(۳۵).

راه های انتشار ریسین:

روش انتشار ریسین بر اساس نوع در معرض قرار گرفتن انسان تعیین می‌شود. ریسین را می‌توان بصورت عصاره خام، کریستال‌های خالص و یا اشکال پودری آماده و یا محلول در مایعات تهیه کرد. انتشار عمومی می-تواند از طریق ذرات معلق، از طریق آب و غذا و یا تزریق مستقیم وریدی و همچنین از مسیر چشم و پوست انجام پذیرد. میزان پراکندگی ریسین در محدوده‌های ذرات کمتر از میکرون در محیط‌های نظامی مورد آزمایش قرار گرفته است، هر چند اطلاعات کمی در این زمینه وجود دارد. ریسین ماندگاری کمی در محیط دارد، اما ذرات در اندازه‌های میکرون می‌توانند برای چندین ساعت بصورت سالم در هوا باقی بمانند. ذرات کمتر از ۱۰μm جهت استنشاق ذرات معلق بکار رفته است، با کاهش اندازه ذرات تا حدود ۱μm قدرت افزایش می‌یابد. مسمومیت ریسین مسری نیست و انتقال فرد به فرد رخ نمی دهد (۳۶).

اثرات بالینی مسمومیت با ریسین در حیوانات و انسان:

مسمومیت خوراکی سم ریسین:

تا کنون هیچ گزارشی از مسمومیت ریسین خالص به واسطه خوردن گزارش نشده است. همه گزارشات بالینی به مسمومیت با خوردن دانه کرچک اشاره می‌کنند، متوسط دوز کشنده (LD50) از مسیر خوراکی در موش ۳۰ mg/kg می باشد، یا تقریبا هزار برابر بیشتراز میزانی است که باعث مسمومیت به وسیله مسیرهای تزریقی یا استنشاقی می شود. در گزارشات در رابطه با خوردن دانه کرچک توسط انسان، دوز کشنده خوراکی در انسان بین ۱-۲۰ mg/kg از وزن بدن تخمین زده شده است (تقریبا ۸ دانه کرچک)، اما دوز ریسین تخمین زده شده برای تعداد دانه ها بدلیل تنوع در اندازه، وزن و درصد رطوبت دانه‌ها، فصل و سن گیاه و همچنین میزان جویدن متفاوت می‌باشد. تعداد دانه‌های مصرفی گزارش شده در مستندات علائم بالینی (خفیف تا کشنده) محدوده‌ای از ۱/۵ تا ۳۰ دانه می‌باشد. کمترین تعداد دانه‌ها در ارتباط با مرگ برابر ۲ عدد می‌باشد. در مطالعات حیوانی، ریسین خورده شده در عرض ۲ ساعت بوسیله غدد لنفاوی و رگ‌های خونی جذب می‌شود و عمدتاً در کبد و طحال تجمع می‌یابد و تقریباً ۴۵-۲۰ درصد از آن بدون هیچ تغییری توسط مدفوع دفع می‌شود. شروع علائم در عرض ۶ -۴ ساعت پس از خوردن ریسین رخ می‌دهد اما تا ۱۰ ساعت هم طول می‌کشد. علائم اولیه پس از خوردن غیر اختصاصی می‌باشد و می‌تواند شامل درد شکمی، اسهال، استفراغ و سوزش سردل باشد. ضایعات آبکی می‌تواند منجر به عدم تعادل الکترولیتی بدن، از دست دادن آب، افت فشار خون و نقص در گردش خون شود. همچنین ناهنجاری‌ها ممکن است منجربه افزایش میزان ترانس آمینازها و کراتینین کیناز، نارسایی کلیوی و کم خونی شود(۲۴،۳۲).

مسمومیت تزریقی سم ریسین:

اطلاعات کمی از اثرات تزریقی ریسین بر روی انسان وجود دارد. LD50 در موش در مسیر تزریقی حدود۱۰-۵ µg/kg است. حداقل دوز کشنده در موش بین ۲-۰/۷ µg/kg و در سگ ۱/۷۵-۱ µg/kg می‌باشد. در جوندگان پس از تزریق، بخش اعظمی از ریسین در طول ۲۴ ساعت اول توسط ادرار و کمتر از ۲ درصد توسط مدفوع دفع می‌شود. شروع علائم و نشانه‌های غیر اختصاصی پس از تزریق ریسین می‌تواند شامل تب، سر درد، سرگیجه، تهوع، بی اشتهایی، افت فشار خون، درد شکم باشد و حتی با دوزهای بالاتر نیز می‌تواند در حدود ۱۰ تا ۱۲ ساعت به تاخیر بیافتد. همچنین آسیب بافتی نیز در محل تزریق رخ می‌دهد. ناهنجاری‌های آزمایشگاهی شامل ترانس آمینازهای کبدی، آمیلاز و کراتینین کیناز و نارسایی کلیوی می‌باشد. میزان نارسایی کلینیکی می‌تواند تا نارسایی در چندین ارگان نیز پیشرفت کند. یافته‌های پس از مرگ که در مطالعات و تحقیقات حیوانی یکسان است، شامل خونریزی مرکزی در روده‌ها، مغز، قلب و پرده جنب می‌باشد. همچنین در گره‌های لنفاوی، کلیه‌ها و روده‌ها نیز ممکن است نکروز، خونریزی و تورم ایجاد شود(۲۴،۳۲).

مسمومیت استنشاقی سم ریسین:

رسوب در ریه و مرگ پس از استنشاق ریسین، بطور ویژه‌ای به اندازه ذرات وابسته می‌باشد. ذرات کمتر از ۳ میکرون می‌توانند به بخش‌های عمیق‌تری نفوذ کرده و در نتیجه باعث مرگ و میر بالاتری شوند. ذراتی که به طور فزاینده‌ای قطر آن‌ها افزایش می‌یابد، به طور معمول در مسیرهای هوایی باقی مانده و توسط سیستم مخاطی جاروب شده و پس از آن بلعیده می‌شوند.LD50 در مسیر استنشاقی در موش برای اندازه ذرات کمتر از ۵ میکرومتری در حدود ۵-۳ µg/kg می‌باشد. میمون‌هایی که در معرض ۴۲-۲۱ µg/kg ریسین استنشاقی با قطر ذرات ۲-۱ میکرومتری قرار گرفتند پس از ۲۴-۲۰ ساعت دچار تنگی نفس پیشرفته شدند و ۳ میمون طی ۳۶، ۴۰، ۴۸ ساعت بعد از استنشاق ریسین مردند. بررسی‌های پس از مرگ شامل تورم ریوی پراکنده با چندین ناحیه نکروز و التهاب در بدن بود. در کل آسیب‌ها در مسیرهای هوایی دیستال و آلوئول‌ها شدیدتر بود. نتایج حاصل از سمیت جلوگیری از سنتز پروتئین، آزادسازی واسطه‌های سایتوکان و آسیب مستقیم به غشاء اپی تلیالی بود. پس از

استنشاق ریسین هدف اولیه سمیت، پنوموسیت‌های نوع I و II می‌باشد. هیچ جذب سیستیمیک مهمی پس از در معرض استنشاق قرار گرفتن انجام نمی‌شود و مسمومیت در درجه اول به دستگاه تنفسی در مطالعات حیوانی محدود می‌شود و به احتمال زیاد نارسایی تنفسی پس از استنشاق ریسین توسط انسان می‌تواند منجر به مرگ شود. فقط یک گزارش ضعیف از مسمومیت استنشاقی در انسان وجود داردکه در دهه ۱۹۴۰، ۸ نفر که به مدت ۸-۴ ساعت در معرض احتمالی استنشاق مواد حاوی ریسین قرار گرفته بودند دچار تب، حالت تهوع، سرفه، تنگی نفس، تنگی قفسه سینه و درد مفاصل شدند. بر اساس این گزارش و مطالعات حیوانی، بیماران ممکن است علائم تنفسی را ۶-۴ ساعت بعد از در معرض قرار گرفتن نشان دهند، اما شروع علائم جدی ۲۴ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن ایجاد می‌شود. استنشاق ذرات معلق ریسین همچنین ممکن است باعث واکنش آلرژیک شود که منجر به التهاب راه‌های هوایی، ورم غشاء مخاطی بینی و سوزش چشم می‌شود. همچنین اطلاعاتی در رابطه با واکنش آلرژیک در افرادی که در نزدیکی گیاه کرچک، کار یا زندگی می کنند نیز وجود دارد(۲۴،۳۲). جدول ۲ میزان LD50 سم ریسین برای موش های آزمایشگاهی را از مسیرهای مختلف نشان می دهد.

مسمومیت از طریق جذب پوست یا چشم:

در مطالعات پوستی/چشمی مشخص شده است که کهیر، به‌واسطه IgE و واکنش آلرژیک پس از دست زدن به دانه گیاه کرچک و یا گرد و غبار یا تفاله دانه کرچک می‌تواند ایجاد شود. همچنین سوزش چشم و ایجاد غشاءهای التهابی پس از قرار گرفتن در معرض غلظت-های خیلی کم از ریسین در حیوانات آزمایشگاهی گزارش شده است(۳۲).

تشخیص آزمایشگاهی مسمومیت ریسین:

تشخیص در نمونه های زیستی:

در مطالعات حیوانی، ریسین در بخش‌هایی از نمونه‌های بافتی، سواب‌های بینی و مایعات به‌وسیله روش‌های ایمونولوژیکی شناسایی شده است و امروزه تشخیص سم به روش الیزا به عنوان روشی دقیق و مطمئن مورد نظر است. روش‌های پایه‌ای ایمونولوژیکی بکار رفته در نمونه‌های مایعات انسان و حیوان، پتانسیل اندازه‌گیری غلظت‌های کمتر از ۰/۱ ng/ml را داشته است(۳۷). با این وجود چنین کاربردهایی بصورت کلینیکی معتبر نمی‌باشد و غلظت‌ها پس از در معرض سم قرار گرفتن نامعلوم است. همچنین روش MALDI-Matrix-Assisted Laser Desorption-) MS Ionization Mass Spectrometry) که بر پایه کروماتوگرافی گازی- جرم سنجی جرمی می باشد بعنوان یک روش نوید بخش برای شناسایی حضور سم در نمونه های زیستی و غیر زیستی شناخته شده است. همچنین بکارگیری آزمون های عملکردی مانند روش های زیست سنجی (Bioassay) حیوانات آزمایشگاهی و یا استفاده از روش های سمیت سلولی به صورت in vitro وجود دارد که با توجه به توانایی ریسین در غیرفعال کردن ریبوزوم ها، یکی از روش ها جهت تمایز بین اشکال فعال و غیرفعال مولکول، مجاورت سم با ریبوزوم ها در محیط in vitro و عاری از سلول می باشد. در حال حاضر هیچ آزمایش تجاری قابل دسترسی برای ریسین در نمونه‌های زیستی وجود ندارد. همچنین آزمایش ادرار برای تشخیص آلکالوئید ریسینین دارای یک پتانسیل تشخیص جهت در معرض ریسین قرار گرفتن است. به-علت اینکه ریسین و ریسینین از منبع گیاهی یکسانی خالص سازی می شوند، ریسینین می‌تواند به عنوان شاخص جایگزینی جهت اثبات حضور ریسین باشد. تشخیص ریسینین ۴۸ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن می‌تواند صورت پذیرد(۳،۳۸).

تشخیص در نمونه‌های محیطی:

پاسخ آزمایشگاهی، آزمایشگاه‌های شبکه‌ای توسط انجام تست PCR و آزمون‌های time-resolved

immunofluorescence برای تشخیص ریسین در محیط بکار می رود. آزمایش‌های زیستی بر پایه سلول بعضی مواقع جهت تایید فعالیت کشندگی سم ریسین در نمونه‌های محیطی بکار می‌رود. همچنین روش‌های ایمنی سنجی که سنجش دستی (Hand-Held-Assay)، یا smart tickets نامیده می‌شوند نیز وجود دارند که در اختیار ارتش آمریکا قرار گرفته‌اند. همراه با تست اولیه، آزمایش تاییدی مورد نیاز است. کیت‌های آزمایشی دیگر در وزارت امنیت داخلی آمریکا در حال توسعه و توزیع تجاری محدود است(۳۲). در جدول ۳ مجموع روش های تشخیصی برای تشخیص سم ریسین در نمونه های زیستی و محیطی با میزان LOD (limit of detection) یا محدوده تشخیص آورده شده است.

جدول۱: خلاصه ای از مسمومیت های عمدی و تصادفی و تعداد مرگ و میر افراد مسموم [۳]

نمونه های انسانی	نمونه های تصادفی(مجموع/کشته شده)	نمونه های عمدی(مجموع/کشته شده)
خوراکی	۸۷۵/۱۳	۵/۰
تزریقی	۱/۰	۶/۵
مجموع	۸۷۶/۱۳ (۱/۵ درصد)	۱۱/۵ (۴۵/۵ درصد)

تصویر ۳: ساختمان شماتیک mRNA کدکننده Preproricin: حاوی سیگنال پپتید، دو زنجیره A، B و پپتید متصل کننده

جدول۲: میزان LD50 ریسین درموش آزمایشگاهی

مسیر تجویز	دوز LD_{50}	زمان مرگ
تزریق داخل رگی	۵-۱۰ µg/kg	۹۰ ساعت
تزریق داخل صفاقی	۲۲ µg/kg	۱۰۰ ساعت
تزریق زیرجلدی	۲۴ µg/kg	۱۰۰ ساعت
تجویز خوراکی	۲۰-۳۰ mg/kg	۸۵ ساعت
تجویز استنشاقی	۳- ۵ µg/kg	۶۰ ساعت

جدول۳: روش های تشخیص ریسین در نمونه های زیستی و محیطی (۳۹)

مدت زمان	LOD	محیط نمونه	روش غنی سازی ریسین	روش تشخیص ریسین
۱۰ ساعت	۱۰–۱۰۰ fmol	بافر و مایع بدن	انتی بادی تثبیت شده بر روی میله های سیلیکونی	Sandwich-type ELISA
۲۴–۳ ساعت	۰/۱ – ۰/۵ ng/ml	بافر و مایع بدن	آنتی بادی متصل شده به صفحات میکرومتری	Colorimetric and chemiluminescence ELISA
۲۰ دقیقه	۰/۱ –۱ ng/ml	بافر و آب رودخانه	آنتی بادی متصل شده به فیبر نوری	Fiber optic-based biosensor
۱۰ دقیقه	۰/۱–۵۰ ng/ml	بافر	آنتی بادی متصل شده به غشاء نیتروسلولز	Colloidal immunochromatographic assay
۹۰ دقیقه	۰/۵–۱ ng/ml	بافر و شیر	آنتی بادی متصل شده به IncaSlide	Inca bioanalytical microarray platform
۲,۵ ساعت	۰/۰۱–۰/۰۳ ng/ml	بافر و شیر	آنتی بادی متصل شده به گوی های میکرومتری xMAP	xMAP microspheres immunoassay
گزارش نشده	۲۵ ng/ml	بافر و شربت	آپتامر متصل شده به ذرات مغناطیسی	DNA aptamer and Raman scattering technique
۱۵ دقیقه	۰/۱ ng/ml	بافر و نمونه های حیطی	آنتی بادی متصل شده به چیپ SPR	SPR
۱۰ دقیقه	۲۰۰ ng/ml	بافر	آنتی بادی متصل شده به چیپ SPR	Hand-held SPR
۷,۵ دقیقه	۳۰ ng/ml	بافر	بتا گالاکتوزیداز پوشش داده شده با نانوذرات طلا در چیپ SPR	Localized SPR
۵ دقیقه	۱۰ pg/ml	بافر	گلیکان های متصل شده به چیپ SPR	SPR
۶–۲ دقیقه	۰/۷ ng/ml	بافر	sdAb متصل شده به چیپ SPR	SPR
گزارش نشده	۱ ng/ml	بافر	sdAb متصل شده به پلیت های ۹۶ تایی	sdAb-QD fluoroimmunoassay
۱۵ دقیقه	۳۰۰ pM	بافر	sdAb متصل شده به تشدید کننده های microring array	Microring resonator array
۳ ساعت	۲–۴ ng/ml	بافر و سرم	نانوپارتیکل های مغناطیسی اکسید آهن- گالاکتوز	Lectin pull-down
۲۰ دقیقه	۸۰ng/ml	بافر	چیپ لاکتوز	Sandwich-type glyco immunoassay
گزارش نشده	۰/۱–۰/۰۱ ng/ml	گوشت گاو، شیر، تخم مرغ	آنتی بادی متصل شده به صفحات میکروتیتراسیون	Immuno-PCR
۵ ساعت	۸ng/ml	محلول پروتئینی	لاکتوز تثبیت شده به ستون های چرخشی یک یارچه	Nano LC–MS
۶ ساعت	۵۰ng/ml	بافر و شیر	آنتی بادی متصل شده به ذرات مغناطیسی	Immunocapture and MALDI-TOF/MS

درمان:

توصیه‌های دفع آلودگی قبل از درمان، بیمارانی که در معرض ریسین قرار گرفته‌اند:

توصیه‌هایی برای دفع آلودگی براساس خواص فیزیکی و شیمیایی ریسین، روش‌های جلوگیری از در معرض قرار گرفتن و روش‌هایی براساس رویکرد بالینی و عمومی بهداشتی وجود دارد. خواص فیزیکی و شیمیایی ریسین نشان می‌دهد که پس از ضدعفونی کاملاً دفع می‌شود و بیماران و کارکنان بهداشت در معرض خطر ثانویه ریسین نیستند(۳۲).

مدیریت درمانی:

شناسایی ریسین در بیمار مسموم شده به‌علت شباهت با بیماری‌هایی که بطور معمول رخ می‌دهد کار را مشکل می‌کند. تشخیص متکی بر ظن پزشک با توجه به یک تهدید ریسین و یا شیوع بیماری‌های گوارشی یا تنفسی شدید می‌باشد. جهت کنترل یک تهدید موثق با سوء ظن به مسمومیت ریسین، همه بیمارانی که دارای علائم مسمومیت می‌باشند باید در بیمارستان بستری شوند. دوره بالینی پس از بلع و استنشاق بطور معمول بیش از ۴ تا ۳۶ ساعت پیشرفت می‌کند و باید فردی که احتمال مسمومیت با سم ریسین را دارد در یک واحد مراقبت‌های ویژه تحت کنترل باشد. بیمارانی که پس از ۱۲ ساعت از مصرف خوراکی و یا استنشاق ریسین بدون علامت باقی بمانند، بعید است که مسموم شده باشند و با اقدامات احتیاطی مناسب می‌توان آن‌ها را ترخیص نمود(۴۰). شواهد تجربی نشان می‌دهد که احتمال تاخیر علائم تنفسی ۲۰ تا ۲۴ ساعت پس از استنشاق ریسین وجود دارد، بنابراین باید تمامی بیماران مرخص شده آموزش داده شوند که در صورت بروز علائم باید به بخش اورژانس مراجعه کنند. تشخیص و درمان افرادی که در معرض ریسین قرار دارند می‌تواند با توجه به سن، عوامل اساسی و بیماری‌های پیش زمینه متفاوت باشد (۸).

درمان بیماران:

هیچ پروتکل درمانی خاصی برای مواجه شدن با ریسین وجود ندارد و درمان تا حد زیادی با توجه به نشانه‌های بیماری و کمکی می‌باشد. در صورتی که خوردن در یک ساعت یا کمتر رخ داده باشد شستشوی معده می‌تواند انجام شود. برای جلوگیری از جذب سیستمیک مواد سمی ناشناخته، یک دوز واحد از ذغال فعال برای بیمارانی که استفراغ نمی‌کنند در نظر گرفته می شود. حتی اگر میزان جذب ریسین توسط ذغال مشخص نباشد باز هم اینکار انجام می‌شود. اما هنگامی که بیمار شروع به استفراغ می‌کند احتمال رفع آلودگی معده مبهم می‌باشد(۴۱).

ریسین قابل دیالیز نمی‌باشد و هیچ پادزهر تجاری درحال حاضر در دسترس ندارد. اهداف عمده درمان برای بیمارانی که بصورت خوراکی با ریسین مسموم شده‌اند بهبود خون‌رسانی به‌واسطه مایعات احیاء کننده، درمان وازوپرسورها و تجدید الکترولیت‌ها می‌باشد و درمان عمدتاً بصورت کمکی انجام می‌گیرد و مایعات داخل وریدی و افزایش دهنده فشار خون (به‌عنوان مثال دوپامین) بعلت کاهش فشار خون بکار می‌رود. همچنین بیمارانی که در معرض استنشاقی ریسین قرار گرفته‌اند نیز کنترل می‌شوند و برای هر شواهدی از میوگلوبینوریا و نارسایی کلیه تحت درمان قرار می‌گیرند. درمان عمومی شامل استفاده از اکسیژن، گشاد کننده برونش‌ها، لوله گذاری و مکمل نهایی بازدم با فشار مثبت می‌باشد. در ارتباط با تماس چشمی نیز شستشوی موضعی آب و یا نرمال سالین به مدت ۱۵ دقیقه توصیه می شود. درمان حمایتی انعقادی، ریوی، کبدی، کلیوی و قلبی–عروقی نیز باید صورت پذیرد(۳،۳۲).

ایمنی در برابر مسمومیت ریسین:

مطالعات حیوانی نشان می‌دهد که امکان حفاظت در برابر مسمومیت خوراکی، استنشاقی و تزریقی ریسین از

طریق ایمن‌سازی غیرفعال (آنتی‌بادی‌های ویژه ریسین) و یا ایمن‌سازی فعال توسط واکسن وجود دارد. ایمن‌سازی غیرفعال می‌تواند موجب حفاظت در برابر مسمومیت ریسین شود اگر پیش از در معرض قرار گرفتن تجویز شود، با این حال مزایای ایمن سازی پس از در معرض ریسین قرار گرفتن هنوز مشخص نشده است. چندین مطالعه حیوانی، ایمن‌سازی فعال را بررسی کرده است که نشان دهنده این بوده است که سطوح مناسبی از آنتی-بادی‌های محافظ خنثی‌کننده ریسین تولید خواهند شد. جهت تولید واکسنی علیه ریسین تحقیقات زیادی صورت پذیرفته است که می‌توان به واکسن‌هایی شامل سم ریسین غیرفعال شده توسط فرمالین، زنجیره A دِگلیکوزیله، میکروذرات و لیپوزوم‌های حاوی توکسوئید ریسین و زنجیره A ریسین و یا واکسن‌های زیر واحدی نوترکیب به‌عنوان واکسن علیه مسمومیت ریسین اشاره کرد(۵۶-۴۲).

ایمنی زایی توسط توکسوئید و زنجیره A دگلیکوزیله شده ریسین:

در تحقیقات انجام شده جهت تولید یک واکسن علیه مسمومیت ریسین، محققان ابتدا از سم غیرفعال شده توسط فرمالین (توکسوئید) و زنجیره A دِگلیکوزیله به-عنوان واکسن جهت ایمنی زایی فعال استفاده کردند که حفاظت کامل علیه ذرات معلق ریسین را در حیوانات از خود نشان داد. البته با توجه به نگرانی‌هایی که برای سمیت، سم غیرفعال شده توسط فرمالین و پتانسیل اثرات جانبی زنجیره A دِگلیکوزیله شده ریسین وجود دارد، محققان تحقیقات خود را برای ساخت واکسن‌های ایمن-تر جهت استفاده در انسان گسترش دادند(۴۲).

ایمنی زایی توسط میکروپارتیکل‌های حامل توکسوئید و زنجیره A دگلیکوزیله شده:

کِندا و همکارانش نشان دادند که میکروپارتیکل‌های Poly(Lactide-co-glycolide) که از مسیر دهانی تجویز شدند توانایی تسهیل حفاظت علیه ذرات معلق کشنده سم ریسین را در مدل‌های موشی دارند. همچنین علاوه بر حفاظت ۱۰۰ درصد ایجاد شده، برنامه ایمن-سازی با هفت دوز ۵۰gμ از سم ریسین غیرفعال شده با فرمالین مقایسه شد. اثر نیمی از این دوز و کوتاه شدن برنامه ایمن سازی به نصف، میزان زنده ماندن را به ۵۰ درصد رسانید. در حالیکه حفاظت ایجاد شده مدرکی دال بر پتانسیل سیستم انتقال است، سیستم انتقال واکسن بصورت دهانی بطور مهمی وابسته به میزان دوز و برنامه و فواصل تجویز می‌باشد. همچنین میکروسفرهای (l-Poly(lactide حاوی توکسوئید ریسین برای انتقال درون بینی سم ریسین بکار رفته است که نشان داد که پیرو ایمن سازی با دو دوز از میکروسفرهای حاوی سم، ۱۰۰ درصد موش‌ها علیه سم کشنده ریسین به‌مدت یکسال حفاظت شدند. در صورتی که دو دوز توکسوئید ریسین محلول منتقل شده از طریق بینی هیچ حفاظتی را ایجاد نکرده است. در تحقیقات گزارش شده الحاق سم ریسین درون میکروسفرهای (Lactide-co-Poly(glycolide بطور بارزی شامل تیتر بالاتر آنتی بادی در مقایسه با آنتی ژن محلول بصورت مجزا بود که باعث تسهیل در برنامه ایمن سازی و افزایش سرعت ایجاد حفاظت می‌شد(۴۵-۴۳).

ایمنی زایی توسط لیپوزوم‌های حامل توکسوئید و زنجیره A دگلیکوزیله شده:

بکاربردن یک فرمولاسیون لیپوزومی برای لیپوزوم حاوی توکسوئید ریسین مشخص کرد که لیپوزوم حاوی توکسوئید ریسین در مقایسه با لیپوزوم حاوی زنجیره A سم میزان IgA اختصاصی ریسین بیشتری را در ریه تولید کرد. کار آن‌ها با ارزش بود به‌علت اینکه لیپوزوم‌ها را به زنجیره A سم ریسین متصل کردند که بر خلاف سم، زنجیره A به آسانی در لیپوزوم گنجانیده نمی‌شد. بطور جالب توجهی لیپوزوم‌های حاوی زنجیره A بطور قوی برای مسیر درون نایی در مقایسه با زنجیره A تنها تقویت شد. بر طبق مقالات و تحقیقات مشابه توکسوئید ریسین لیپوزومی یک کاندیدای واکسن خوب و بهینه شده برای انتقال ریوی بوسیله استنشاق می‌باشد. این بر

پایه مشاهداتی بود که توکسوئید ریسین لیپوزومی یک کیفیت بهتری را برای حفاظت با یک کاهش تاثیر لوکوسیت‌های پلی مرفونوکئار و تورم ریوی کم (و احتمال کاهش آسیب ریوی) را در مقایسه با فرمولاسیون لیپوزوم / زنجیره A را ایجاد می‌کرد(۴۷-۴۶).

ایمنی زایی توسط واکسن‌های زیر واحدی نوترکیب ریسین:

در یک تحقیق با اضافه کردن یک زنجیره شامل ۲۵ باقیمانده آمینواسیدی در داخل زنجیره A ریسین یک واکسن ضد سم ریسین تولید شد که بطور قابل توجهی (در حدود ۳۰۰ برابر) سمیت در آن کاهش یافته بود (۴۸). در مطالعه دیگر یک مشتق عملکردی (کاهش در فعالیت سم با ۳ برابر کوچک شدن اندازه سم) از زنجیره سم ریسین برای حضور در یک اپی توپ حفاظتی ویژه بکار رفت. این مشتق بطور ۱۰۰ درصد به‌عنوان واکسن علیه ذرات معلق کشنده ریسین در حیوانات محافظت ایجاد کرد(۴۹). در تلاش برای تولید یک واکسن غیرسمی و یک پروتئین بی‌خطر قابل قبول، زیر واحدهای زنجیره A نوترکیب موتانت به‌وسیله Small shaw و همکارانش بررسی شدند. دو تا از ۳ موتانت حفاظت موش‌ها علیه ریسین را از خود نشان دادند و که بر طبق گفته نویسنده فاقد سمیت بود که در نهایت یک واکسن پروتئینی نوترکیب بنام RiVax معرفی شد که یک پروتئین دارای دو جهش در دو جایگاه اعمال سمیت زنجیره A می‌باشد که در آن تیروزین ۸۰ به آلانین و والین ۷۶ به متیونین تغییر پیدا کرده بود و جایگاه‌های سمیت ریبوزومی زنجیره A و همچنین موتیفی که باعث ایجاد سندرم نفوذ رگی می‌شود غیر فعال شده است. مطالعات مختلفی در رابطه با ایمنی RiVax و در ارتباط با پایداری و میزان ایمونوژنیسیتی و مسیرهای ارسال آن به بدن صورت پذیرفته است. همچنین آزمایش‌های بالینی این واکسن پروتئینی بر روی موش، خرگوش، میمون و انسان نیز صورت گرفته است که نتایج خوبی را در ایجاد ایمنی علیه ریسین نشان داده است و منجر به امیدهایی برای استفاده از این واکسن پروتئینی علیه مسمومیت سم ریسین در انسان شده است(۵۳-۵۰).همچنین کریستالوگرافی اشعه ایکس نشان داده است که ساختار RiVax با آنچه در RTA می‌باشد، تقریباً یکسان است، که این نشان می دهد که جهش‌های نقطه‌ای یک اثر حداقل در ساختار سوم پروتئین آن داشته است (۵۴).

RVEc نیز پروتئین نوترکیب دیگر می‌باشد که مشتق کوتاه شده‌ای از RTA است که فاقد منطقه انتهای کربوکسیل آبگریز (باقی مانده‌های۲۶۷-۱۹۹) و یک حلقه آبگریز کوچک در انتهای آمین (باقی مانده ۴۳-۳۴) می‌باشد و در نتیجه یک مولکول با افزایش حلالیت و پایداری حرارتی است. RVEc شامل موتاسیون‌هایی که مستقیماً جایگاه‌های فعال را غیرفعال می‌کنند، نمی شود اما در مدل‌های آزمایشگاهی مشخص شده است که حذف این دو بخش منجر به غیرفعال شدن فعالیت آنزیمی مولکول و همچنین کاهش و یا حذف توانایی مولکول برای نشت عروقی می‌شود(۵۵). هر دو واکسن در مطالعات حیوانی، تولید پیشرفته و آزمایش‌های بالینی فاز یک تحت بررسی هستند. هر دو واکسن RiVax و RVEc در موش بسیار ایمونوژنیک می‌باشند و منجر به برانگیختن ایمنی حفاظتی در برابر قرار گرفتن در معرض ریسین از طریق استنشاق، گاواژ و یا تزریق می‌شوند (۳۱،۵۵).

با وجود تفاوت‌های ساختاری بین این دو واکسن زیرواحدی، مقایسه سر به سر آن‌ها نشان داده است که RiVax و RVEc زمانی که به آلهیدروژل جذب می‌شوند و یا همراه با ادجوانت LT-II تجویز می‌شوند، دارای ظرفیت‌های یکسانی برای القاء آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و برای محافظت از در موش‌ها هستند(۵۷-۵۶).

هیچ مقایسه سر به سری از این دو واکسن هنوز در پریمات‌ها انجام نشده است هر چند که مشخص شده است که تجویز عضلانی RiVax جذب شده در

ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، میمون رزوس را در برابر استنشاق آئروسل ریسین محافظت می‌کند(۵۴).

همچنین RiVax تجویز شده توسط تزریق عضلانی از موش‌ها در برابر قرار گرفتن در معرض استنشاق ریسین محافظت می‌کند، که این نشان دهنده این است که IgA ترشحی اختصاصی ریسین می‌تواند از سلول‌های اپیتلیوم حفاظت کند ولی مطالعات در موش واکسینه نشان می‌دهد که ممکن است شدت دوز بالای ریسین کاهش یابد، اما آسیب بلند مدت به سطوح مخاطی از بین نمی‌رود(۵۲). از این رو واکسیناسیون عضلانی همراه با تجویز مخاطی ممکن است حفاظت بهتری را ارائه دهد. همچنین ممکن است که دوزهای رژیمی درمانی بهتری با استفاده از مسیر عضلانی بکار برود که نتیجه آن حفاظت بهتر از سطوح مخاطی با افزایش کل سطح آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده باشد. همچنین RiVax تقریباً با RTA طبیعی برابر است، اما در مقایسه با RVEc، در محلول‌های آبی به سرعت آنفولد و دناتوره می شود(۵۹-۵۸). بی ثباتی ذاتی RTA و تمایل به آنفولد، دناتوره یا اگریگیت شدن نشان می دهد که تکنیک های ایجاد ثبات در ساختار RiVax برای موفقیت‌های آینده آن به عنوان واکسن بسیار مهم است. تلاش‌های اخیر در تکنولوژی پایدارسازی مولکولی شرایط زنجیره سرد را بهبود داده است و به‌طور بالقوه می‌تواند اثر بخشی را با نگهداری بهبود یافته ساختار طبیعی افزایش دهد. همچنین تثبیت RiVax بر روی ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم در تلاشی برای افزایش پایداری در ساختار و جلوگیری از آنفولد شدن و دناتوراسیونی که در محلول رخ می‌دهد، انجام شده است (۵۳).

این روش تثبیت شامل لیوفیلیزه کردن ادجوانت آلومینیوم متصل به آنتی ژن RiVax در حضور ترهالوز می‌باشد، که یک واکسنی تولید می‌شود که به راحتی با آب هیدراته و آماده مصرف می‌شود(۶۰).

از آنجایی که این فرمول RiVax پس از ماه‌ها انکوباسیون در ۴۰ درجه سانتی‌گراد در موش موثر بوده است، حدس زده می‌شود که آنتی‌ژن‌های متصل به ادجوانت بی ثبات نمی‌باشند و هر آنفولدشدنی از آنتی‌ژن که قرار بود رخ دهد در طول فرایند فاز آبی رخ داده است. به احتمال زیاد اثر بخشی این پروتئین به این علت می‌باشد که به طور کامل یا بخشی از اپی‌توپ‌های مسئول القاء ایمنی حفاظتی واکسن حفظ شد(۵۳). در مورد RVEc به نظر می‌رسد، اتصال به سطح ادجوانت آلومینیوم پایداری مولکول را بالا می‌برد(۵۹). با این حال، تا کنون هیچ مقایسه بیوفیزیکی مستقیمی بین پروتئین‌های تثبیت شده از RiVax و RVEc هنوز انجام نشده است.

استفاده از واکسن‌های مشتق شده از RTA در نمونه‌های انسان:

از منظر بی‌خطر بودن و ایمنی زایی RiVax، در فاز یک انسانی مطالعات اندکی انجام شده است. در یکی از گروه های انسانی RiVax بدون ادجوانت و در گروه دیگر همراه با ادجوانت آلومینیوم هیدروکسید فرموله شده است(۳۰،۶۱).

در هر دو آزمایش، سه دوز مختلف ۱۰۰-۱ میکروگرم استفاده شد. در تمام داوطلبان واکسینه شده در روزهای ۰، ۶، و ۲۶ هفته به جز آن‌هایی که کمترین دوز آنتی‌ژن به آن‌ها تجویز شده بود، آنتی‌بادی ترشح شد. پاسخ آنتی‌بادی ضد ریسین وابسته به میزان دوز تجویزی بود و در داوطلبان دریافت کننده واکسن همراه با ادجوانت آلومینیوم بیشتر و طولانی مدت‌تر بود. با این حال ترشح آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در داوطلبان دو هفته پس از سومین واکسیناسیون توسعه یافت و در طول یک سال پس از اولین واکسیناسیون آنتی‌بادی خنثی‌کننده با سینتیک آهسته‌ای نسبت به مجموع آنتی‌بادی‌ها کاهش یافت(۶۲).

مرکز USAMRIID نیز یک مطالعه فاز ۱ بالینی در انسان را که توسط RVEc همراه با ادجوانت

آلومینیوم بکار رفته بود را انجام داد که در آن نشان داده شد که این واکسن پروتئینی در دوزهای ۲۰ میکروگرم و ۵۰ میکروگرم که در در روزهای ۰، ۲۸ و ۵۶ تجویز شده بود، بی‌خطر و ایمونوژنیک می‌باشد. دو هفته پس از واکسیناسیون سوم، در همه داوطلبان آنتی‌بادی تولید شد، اما تنها ۵۰ درصد از آنتی بادی‌های خنثی‌کننده با تیتر بیش از ۱:۵۰ توسعه یافت. چهار نفر در گروه دوز ۵۰ میکروگرم، یک دوز دیگر را ۲۰ ماه پس از واکسیناسیون اول دریافت کردند. این دوز دریافتی بی‌خطر و قابل تحمل بود و هر چهار نفر یک پاسخ آنامنستیک قوی (robust anamnestic response) را ارائه دادند و تیتر بالایی از خنثی‌سازی (بیش از ۱:۱۰۰۰) را تا ۶ ماه پس از آخرین بوستر ارائه دادند. پس از آن آنتی‌بادی‌های افراد واکسینه شده بصورت واکسیناسیون غیرفعال به موش‌ها منتقل شد و این موش‌ها با دوز کشنده ریسین به چالش کشیده شدند که منجر به حافظت حیوانات از مرگ شد(۶۲).

با وجود این نتایج امیدوار کننده، چندین مانع مهم وجود دارد که از اخذ مجوز FDA برای واکسن ریسین جلوگیری می‌کند. عوامل کلیدی در این میان نیاز به مدل-های حیوانی مناسب مشابه به انسان می‌باشد که علیه آلودگی ریسین به خوبی حفاظت شوند، کیفیت بهتر و مطلوب‌تر مواد مرتبط با حفاظت و شناسایی ادجوانت‌های افزودنی مناسب‌تر از نمک آلومینیوم می‌باشد که بتواند شدت تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ریسین در بدن را بالا ببرد(۶۲).

نتیجه‌گیری

گروه وسیعی از سموم گیاهی و باکتریایی همانند ریسین دارای ترکیبات پروتئینی زنجیره A و B می‌باشند مانند دیفتری، بوتولینیوم و سیاه زخم که تحقیقات مختلفی بر روی این سموم صورت پذیرفته است (۶۵-۶۳). ریسین جزو گروهی از توکسین‌های دو زنجیره است که دارای فعالیت پروتئینی غیر فعال کردن ریبوزوم توسط زنجیره A (RIP-II) می‌باشد و در گروه سم‌هایی مانند شیگاتوکسین، آبرین، مودسین، ولکن سین، ویسکومین طبقه بندی می‌شود (۶۶). ریسین از قوی ترین و کشنده ترین سم های ممکن در طبیعت می‌باشد. سهولت در تهیه گیاه کرچک و خالص سازی ریسین (با توجه به اینکه روش تهیه آسانتری نسبت به بسیاری سموم از جمله سم سیاه زخم و بوتولینیوم دارد) این سم را به یک سلاح بیولوژیکی جذاب تبدیل کرده است. تهدیدات اخیر در انتشار ریسین بعنوان یک سلاح تروریستی برجسته نیاز به این دارد که پزشکان و کارمندان بخش بهداشت عمومی اطلاعات بیشتری در رابطه با در معرض قرار گرفتن ریسین داشته باشند. سم ریسین توانایی اتصال به سطح تمامی سلول‌های جانداران را دارا می باشد و مسمومیت ریسین می تواند از طریق خوردن، استنشاق یا تزریق رخ دهد و منجر به اسهال، استفراغ، بیماری تنفسی و یا آسیب به کلیه ها و کبد بشود که البته علائم بالینی ریسین با توجه به مسیرهای در معرض ریسین قرار گرفتن متفاوت می باشد.

در کنترل یک تهدید معتبر، پزشکان باید مسمومیت ریسین در بیماران دارای بیماری دستگاه گوارش و دستگاه تنفسی را در نظر بگیرند، بخصوص اگر علائم بتدریج پیشرفت کرده و عملکرد اندام با اختلال مواجه شد. به منظور سهولت در تشخیص زود هنگام و کاهش عوارض و مرگ و میر کمتر، سازمان‌های کنترل سموم و بهداشت عمومی باید با بیماری هایی که بعلت در معرض ریسین قرار گرفتن ایجاد شده و با شیوع مسمومیت مشابه است، مطلع باشند. در حال حاضر هیچ پادزهر و یا درمان خاصی برای مسمومیت ریسین در دسترس نمی باشد و درمان‌های کمکی با مراقبت‌های ویژه برای کاهش عوارض و مرگ و میر مورد نیاز است. کارکنان مراقبت های بهداشتی و مقامات بهداشت عمومی باید بیماری های دستگاه گوارش و تنفسی را در جهت تنظیم تهدیدات موثق در نظر بگیرند. همچنین جهت تشخیص سم ریسین در نمونه‌های زیستی و غیر زیستی باید از تلفیق چند روش برای تائید نهایی استفاده شود. در کل

بهترین راه جلوگیری از مسمومیت ناشی از سم ریسین پیشگیری با استفاده از واکسن های مناسب علیه سمیت ریسین می باشد که تحقیقات مختلفی برای تولید یک واکسن مناسب انجام شده است که بهترین واکسن‌های آزمایش شده شامل واکسن‌های پروتئینی REVc و RiVax می‌باشد که هنوز به صورت گسترده مورد استفاده قرار نگرفته است و باید بررسی های بیشتری بر روی بی‌خطر بودن، ایمنی‌زایی و خصوصیات آنتی‌بادی-های آنها انجام شود که با استفاده از دوزهای متفاوت و احتمالاً استفاده از ادجوانت‌های جایگزین و سیستم‌های تحویل نوین خواهد بود و تحقیقات بر روی شدت پاسخ زودتر و قوی‌تر آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده تمرکز خواهد یافت که در این میان می‌توان از سیستم‌های تحویلی نوین به صورت نانوذرات جهت افزایش کارایی این واکسن‌ها علیه سم ریسین استفاده کرد.

منابع

1-Larsson S.L., M.S. Sloma, O. Nygard O. Conformational changes in the structure of domains II and V of 28S rRNA in ribosomes treated with the translational inhibitrs ricin or alpha-sarcin. Biochem. Biophys. Acta . 2002. 1577: 53-62.

2-Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. Toxicon. 2004;44:361-370.

3-Worbs S, Köhler K, Pauly D, Avondet M.A, Schaer M, Dorner M.B, et al. *Ricinus communis* Intoxications in Human and Veterinary Medicine—A Summary of Real Cases. Toxins 2011; 3(10), 1332-1372.

4-Krieger R (Editor). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, (3rd Edition). Vol 1. 2010. p119–229.

5-Aplin P.J, Eliseo .T .Ingestion of castor oil plant seeds. Med. J. Aust.1997. 167 (5): 260–1.

6-Brugsch HG. Toxic hazards: the castor bean. N Engl J Med. 1960; 262:1039-1040.

7-Burrows WD, Renner SE. Biological warfare agents as threats to potable water. Environ Health Perspect. 1999; 107:975-984.

8-Challoner KR, McCarron MM. Castor bean intoxication: review of reported cases. Ann Emerg Med. 1990; 19:1177-1183.

9-Hegde R, Podder SK. Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin. Eur J Biochem. 1992; 204:155-164.

10-Bradberry SM, Dickers KJ, Rice P, Griffiths GD, Vale JA. Ricin poisoning. Toxicol Rev. 2003;22:65-70.

11-Schep L.J, Temple W.A, Butt G.A, Beasley M.D. Ricin as a weapon of mass terror—separating fact from fiction. Environ. Int. 2009, 35, 1267–1271.

12-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.

13-Balint GA. Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. Toxicology. 1974;2:77-102.

14-Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. Toxicon. 2004;44:361-370.

15-Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. EMBO J. 2000;19:5943-5950.

16-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;41:2836-2843.

17-Eitzen E, Palvin J, Cieslak T. et al. Medical Management of Biological Casualties Handbook. eds 3rd ed. Fort Detrick, Frederick, Md: US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases. 1998;101-106.

18-Stechmann B, Bai S.K, Gobbo E, Lopez R, Merer G, Pinchard S, et al. Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge. Cell. 2010; 141, 231–242.

19-Sandvig K, Torgersen M.L, Engedal N, Skotland T, Iversen T.G. Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. FEBS Lett. 2010; 584, 2626–2634.

20-Thomas, R.J. Receptor mimicry as novel therapeutic treatment for biothreat agents. Bioeng. Bugs 2010; 1, 17–30.

21-Tsai B, Ye Y, Rapoport T.A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002; 3, 246–255.

22-Mayerhofer P, Cook J, Wahlman J, Pinheiro T, Moore K, Lord J, et al. Ricin a-chain insertion into ER membranes is triggered by a temperature increase to 37 °C. J. Biol. Chem. 2009; 284, 10232–10242.

23-Spooner R, Hart P, Cook J, Pietroni P, Rogon C, Höhfeld J, et al. Cytosolic chaperones influence the fate of a toxin dislocated from the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105, 17408-17413.

24-Pincus SH, Smallshaw JE, Song K, BerryJ, Vitetta ES. Passive and active vaccination strategies to prevent ricin poisoning. Toxins. 2011; 3, 1163-1184.
25-Bies C, Lehr C.M, Woodley J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56:425-435.
26-Godal A, Fodstad O. Ingebrigtsen K. Pihl A. Pharmacological studies of ricin in mice and humans. Cancer Chemother Pharmacol. 1984; 13:157-163.
27-Weiss EA. Castor, Sesame and Safflower. Barnes & Noble, New York. 1971.
28-Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup Biological and Chemical Terrorism: strategic plan for preparedness and response. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2000;49:1-14.
29-Roy C.J, Hale M, Hartings J.M, Pitt L, Duniho S. Impact of inhalation exposure modality and particle size on the respiratory deposition of ricin in balb/c mice. Inhal. Toxicol. 2003; 15, 619–638.
30-Vitetta E.S, Smallshaw J.E, Coleman E, Jafri H, Foster C, Munford R, et al. pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006; 103, 2268–2273.
31-Marconescu P.S, Smallshaw J.E, Pop L.M, Ruback S.L, Vitetta E.S. Intradermal administration of Rivax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. Vaccine 2010; 28, 5315–5322.
32-Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning: A comprehensive review. J. Am. Med. Assoc. 2005; 294, 2342-2351.
33-Croddy EA, Wirtz JJ, Larsen JA (Editors). Weapons of Mass Destruction: An Encyclopedia of Worldwide Policy, Technology, and History. 2004. Vol 1. p240.
34-Weston SA, Tucker AD, Thatcher DR, Derbyshire DJ, Pauptit RA. X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 A resolution. J. Mol. Biol. 1994. 244 (4): 410–22.
35-Dlsnes S, and Kozlov JV. Ricin Toxicon. 2001; 39: 1723-1728.
36-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.
37-Griffiths GD, Newman HV, Gee DJ. Immunocytochemical detection of ricin, II: further studies using the immunoperoxidase method. Histochem J. 1986;18:189-195.
38-Johnson RC, Lemire SW, Woolfitt AR. et al. Quantification of ricinine in rat and human urine: a biomarker for ricin exposure. J Anal Toxicol. 2005;29:149-155.
39-Bozza WP, TollesonWH, Rivera Rosado LA, Zhang B. Ricin detection: Tracking active toxin. Biotechnology Advances. 2015; 33:117–123
40-Franz DR, Jahrling PB, McClain DJ, et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. Clin Lab Med. 2001; 21:435-473.
41-Chyka PA, Seger D. Position statement: single-dose activated charcoal: American Academy of Clinical Toxicology; European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists. J Toxicol Clin Toxicol. 1997; 35:721-741.
42-Bramwell VW, Eyles JE, Alpar HO. Particulate delivery systems for biodefense subunit vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews. 2005; 57: 1247– 1265.
43-Kende M, Yan C, Hewetson J, Frick MA, Rill WL, Tammariello R. Oral immunization of mice with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres against aerosol challenge. Vaccine. 2002; 20: 1681–1691.
44-Yan C, Rill WL, Malli R, Hewetson J, Naseem H, Tammariello R, et al. Intranasal stimulation of longlasting immunity against aerosol ricin challenge with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres. Vaccine. 1996; 14:1031–1038.
45-Yan C, Rill WL, Malli R, Hewetson J, Tammariello R, Kende M. Dependence of ricin toxoid vaccine efficacy on thestructure of poly(lactide-co-glycolide) microparticle carriers.Vaccine. 1995; 13:645–651.
46-Griffiths GD, Bailey SC, Hambrook JL, Keyte MP. Local and systemic responses against ricin toxin promoted by mtoxoid or peptide vaccines alone or in liposomal formulations. Vaccine. 1998; 16:530– 535.
47-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– 2568.
48-Marsden GJ, Knight S, Smith DC, Day PJ, Roberts LM, Phillips GJ, et al. Insertional mutagenesis of ricin a chain: a novel route to an anti-ricin vaccine. Vaccine. 2004; 22: 2800–2805.
49-Olson MA, Carra JH, Roxas-Duncan V, Wannemacher RW, Smith LA, Millard CB. Finding a new vaccine in the ricin protein fold. Protein Eng. Des., Sel. 2004; 17:391– 397.
50-Smallshaw JE, Firan A, Fulmer JR, Ruback SL, Ghetie V, Vitetta ES. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. Vaccine. 2002: 20:3422–3427.
51-Smallshaw J.E, Richardson J.A, Pincus S, Schindler J, Vitetta E. S. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. Vaccine; 2005; 23: 4775-4784.

52-Smallshaw J.E, Richardson J.A, Vitetta E.S. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. Vaccine. 2007; 25: 7459-7469.
53-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. 2015; 24; 112(12): 3782-3787.
54-Legler PM, Brey RN, Smallshaw JE, Vitetta ES, Millard CB. Structure of RiVax: a recombinant ricin vaccine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011; 67:826-30.
55-Porter A, Phillips G, Smith L, Erwin-Cohen R, Tammariello R, Hale M, et al. Evaluation of a ricin vaccine candidate (RVEc) for human toxicity using an in vitro vascular leak assay. Toxicon. 2011; 58:68-75.
56-O'Hara JM, Brey RN, Mantis NJ. Comparative efficacy of two leading candidate ricin toxin a subunit vaccines in mice. Clin Vaccine Immunol. 2013; 20:789-94.
57-Vance DJ, Greene CJ, Rong Y, Mandell LM, Connell TD, Mantis NJ. Comparative Adjuvant Effects of Type II Heat-Labile Enterotoxins in Combination with Two Different Candidate Ricin Toxin Vaccine Antigens. Clin Vaccine Immunol. 2015; 22(12):1285-93.
58-Peek LJ, Brey RN, Middaugh CR. A rapid, three-step process for the preformulation of a recombinant ricin toxin A-chain vaccine. J Pharm Sci. 2007; 96:44-60.
59-Carra JH, Wannemacher RW, Tammariello RF, Lindsey CY, Dinterman RE, Schokman RD, et al. Improved formulation of a recombinant ricin A-chain vaccine increases its stability and effective antigenicity. Vaccine. 2007; 25:4149-58.
60-Hassett KJ, Cousins MC, Rabia LA, Chadwick CM, O'Hara JM, Nandi P, et al. Stabilization of a recombinant ricin toxin A subunit vaccine through lyophilization. Eur J Pharm Biopharm. 2013; 85:279-86.
61-Vitetta ES, Smallshaw JE, Schindler J. Pilot Phase IB Clinical Trial of an Alhydrogel- Adsorbed Recombinant Ricin Vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19:1697-9.
62-Brey RN, Mantis NJ, Pincus SH, Vitetta ES, Smith LA, Roy CJ. Recent Advances in the Development of Vaccines against Ricin. Human Vaccines & Immunotherapeutics; 2016; 12, 1196–1201.
63-Najarasl M, Hashemzadeh MS, Honari H, Mousavy SJ, Ebrahimi F, Pourhakkak H. Production of Recombinant Construct by Cloning of Protective Antigen Domain 4 Gene and Fusion of it with Lethal Factor Domain 1 Gene of Bacillus anthracis in E.coli. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2015, 23(7), 18-27.
64-Bagheripour MJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Nazarian Sh, Arefpour MA, Rashidiani J. Preparation of Chitosan Based Botulinum Neurotoxin E Recombinant Nanovaccine and Evaluation of its Immunogenicity as Oral & Intradermal Route in Mice. J RafsanjanUniv Med Sci 2016, 14(11): 923-38.
65-Rezaeiani S, Ebrahimi F, Honari H, Hajizade A, Barati B. Cloning and Expression of Clostridium Botulinum Type B Binding Domain E. Coli. URMIA MED J. 2014: 25(6): 502-510.
66-Olad GhR, Tavalhee M, Mohammad-Hassan Z, Ebrahimi F, Salimian J, Nazarean Sh, et al. Shigella dysentery stxA mutant (R170L-A231D-G234E) gene design and optimization of recombinant protein expression and purification. J Sharekord Univ Med Sci. 2011; 13(5): 93-102.

Ricin Toxin; Mechanisms of Toxicity, Diagnosis Methods, Treatment and Immunization Against it

Davoud Sadeghi[1], Firouz Ebrahimi[1*], Mehdi Zeinoddini[2], Seyed Amir Hosseini[1], Zohreh Hedayat Manesh[3]

1-Ph.D of Nanobitechnology.
2-Ph.D of Biochemistry.
3-Ph.D of Biochemistry.
4-Ph.D Student of Nanobitechnology.
5-Master of Physiology.

1,2,4-Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
3-Department of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
5-Islamic Azad University of Abadan, Abadan, Iran.

**Corresponding author:*
Firouz Ebrahimi; Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
Tel:+989108609340
Email: dvudsadeghi64@yahoo.com

Abstract

Ricin toxin is a disulfide-linked heterodimeric glycoprotein consisting of the toxic A chain and the cell-binding B chain that acts through the irreversible inactivation of eukaryotic ribosomes and inhibition of the polypeptide chain elongation, which finally leads to cell death. The toxin is extracted from castor plant beans (*Ricinus communis*) and it consists of 1–5% of the beans' dry weight. Ricin is of concern in the area of biodefense because it is readily available to individuals or groups with little technical expertise or funding and its source is ubiquitous in the weed and in the cultivated crop in many countries. Since ricin can easily be distribute in the body, it has been classified by the CDC (US center for Disease Control and Prevention) as a class B biothreat. There has been much investigation on the diagnosis, treatment and production of a potent vaccine against this agent. For diagnosis of ricin poisoning in clinical cases, immunological techniques have been used for screening of samples and combination of high tech chromatographic and mass spectrometric methods could be used for poisoning confirmative analysis. There is currently no specific treatment available for poisoning with ricin but two closely related RTA-based subunit vaccines, contain RiVax and RVEc, are now under development. The aim of this study is presentation of ricin toxin, diagnosis methods, treatment and new vaccine candidates against it.

Keywords: Ricin toxin, Diagnosis, Treatment, Vaccine development.

►*Please cite this paper as:*
Sadeghi D, Ebrahimi F, Zeinoddini M, Hosseini SA, Hedayat Manesh Z. Ricin Toxin; Mechanisms of Toxicity, Diagnosis Methods, Treatment and Immunization Against it. Jundishapur Sci Med J 2017;16(1):103-124.

Received: Aug 6, 2016 **Revised: Mar 11, 2017** **Accepted: Mar 13, 2017**