

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИЦИНА В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Н.Ю. Роговская, А.Ю. Горбунов,
Я.А. Дубровский,
Н.С. Хлебникова, В.Н. Бабаков

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии
и экологии человека» ФМБА России,
188663, Ленинградская область,
г.п. Кузьмоловский, Российская
Федерация

В работе предложена система биотестирования токсичности рицина в объектах окружающей среды с помощью технологии мониторинга клеточного индекса в реальном времени. Определена концентрация полумаксимального ингибирования (IC50) рицина ~ 6,7 нг/мл для клеток гепатомы человека линии НераRG. Добавление антител к А- и В-субъединицам рицина в среду клеток НераRG приводит к цитопротекторному и антиапоптотическому эффекту на фоне цитотоксического действия рицина. Антитела к рицину нейтрализуют активацию киназы JNK (фосфорилированной по Thr183/Tyr185) и предотвращают накопление активных форм каспазы 8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы 9 (гидролизованной по Asp315), индуцированные рицином в клетках НераRG. Исследованные антитела также предотвращают снижение внутриклеточных уровней активных форм киназы Akt 1 (фосфорилированной по Ser473) и транскрипционного фактора p53 (фосфорилированного по Ser46), вызванные рицином. Система биотестирования с использованием антител к рицину может рассматриваться как специфичный метод идентификации токсина в объектах окружающей среды.

Ключевые слова: рицин, биотестирование, маркеры апоптоза.

Цит: Н.Ю. Роговская, А.Ю. Горбунов, Я.А. Дубровский, Н.С. Хлебникова, В.Н. Бабаков. Определение рицина в объектах окружающей среды с помощью биотестирования. Токсикологический вестник. 2020; 5:43-49

Введение. Рибосом-инактивирующие белки растений принадлежат к числу наиболее токсичных соединений. К таким белкам относится большое семейство лектинов [1,2], включая такие токсины как рицин, абрин, модецин и ряд других. Рицин входит в список соединений, контролируемых Конвенцией о запрещении химического оружия. Быстрое определение токсичных свойств рицина в объектах окружающей среды возможно с помощью биотестирования с использованием различных хорошо пролиферирующих клеточных линий [3,4].

Лектины способны высокоспецифично связывать терминальные β-галактозные поверхностные полисахаридные рецепторы с высокой аффинностью (k_a в диапазоне 10^7 - 10^8 М⁻¹с⁻¹) [5].

Рицин, абрин и модецин состоят из двух субъединиц со сходной структурой и активностью. Интактные белки имеют молекулярную массу в диапазоне 63-65 кДа и включают две субъединицы. Субъединицы связаны дисульфидной связью, которая ответственна за проявление токсических свойств. А-субъединица (эффектомер) обладает рибосом-инактивирующими свойствами, В-субъединица (гаптомер) содержит сайт связывания с углеводами. Интактный токсин проявляет свои токсические свойства в клетках, но не обладает рибосом-инактивирующей активностью на рибосомах в бесклеточных системах. Восстановление дисульфидной связи приводит к противоположному эффекту – диссоциированные субъединицы обладают рибосом-инактивирующей активностью.

Роговская Надежда Юрьевна (Rogovskaya Nadezhda Yur'evna), научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, niigrech@rhorphe.ru;

Горбунов Александр Юрьевич (Gorbunov Aleksandr Yur'evich), научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, niigrech@rhorphe.ru;

Дубровский Ярослав Александрович (Dubrovskii Yaroslav Aleksandrovich), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, niigrech@rhorphe.ru;

Хлебникова Наталья Семёновна (Khlebnikova Natalia Semenovna), кандидат химических наук, начальник международного отдела ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, niigrech@rhorphe.ru;

Бабаков Владимир Николаевич (Babakov Vladimir Nikolaevich), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, babakov@rhorphe.ru

щей активностью в бесклеточных системах, но не обладают цитотоксическими свойствами. Причиной таких свойств являются особенности димера токсина. Молекула токсина связывается через сахарид-распознающий сайт В-субъединицы с β -галактозилсодержащими гликопротеидами или гликолипидными компонентами клеточной мембраны, находящихся на поверхности клеток. После связывания димера из двух субъединиц с клеткой, А-субъединица проникает внутрь клетки путем эндоцитоза. Оказавшись внутри клетки, А-субъединица связывается и ферментативно инактивирует 28S субъединицу рибосомы, в результате чего нарушается биосинтез белка, что и приводит к гибели клетки. Так как А-субъединица работает как фермент, даже одной молекулы токсина на клетку достаточно, чтобы серьезно нарушить биосинтез белка [5].

Таким образом, дополнительно к прямому определению токсина в объектах окружающей среды с помощью иммунохимических или химических методов [6,7] необходимо оценивать его токсические свойства. При наличии токсичности и подозрений о присутствии рицина требуется применение специфичного скринингового метода для дифференциации рицина от других потенциально вероятных рибосом-инактивирующих белков.

Основной целью настоящей работы являлась разработка скрининговой тест-системы на основе биотестирования для специфичной идентификации рицина в образцах объектов окружающей среды. В работе использовали клетки гепатомы человека линии НераRG. Оценку жизнеспособности клеток при инкубации с серией разведений рицина проводили с помощью системы импедансометрии; кроме того, определяли внутриклеточные маркеры апоптоза. Определение специфической токсичности рицина проводили в присутствии антител к А- и В-субъединицам токсина.

Материалы и методы исследования. Клетки линии НераRG (Gibco) культивировали во флаконах в среде Вильямса Е с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, средовых добавок инсулина и гидрокортизона, антибиотиков стрептомицина-пенициллина при 37 °С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂.

Для определения интегральной цитотоксичности с помощью оборудования xCelligence RTCA, 10 тыс. клеток вносили в лунку специализированного планшета, позволяющего определять клеточный индекс в режиме реального времени, и культивировали в полной среде Вильямса. На следующий день после пассажа клеткам добавляли серию разведения (в диапазоне концентраций 1 нг/мл – 1 мкг/мл) очищенного рицина и рицина с одновременным добавлением анти-

тел в соотношении 100 мкл среды Вильямса и 100 мкл разведенного в растворе Хенкса токсина на лунку планшета. В работе использовали следующие антитела производства Abcam (Великобритания): АТ1 – кат. № ab#27170 к В-субъединице; АТ2 – кат. № ab#48415 к В-субъединице; АТ3 – кат. № ab#27169 к А-субъединице. Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 дней после добавления токсина. Очищенный рицин был предоставлен Организацией по запрещению химического оружия (ОЗХО) в качестве стандарта в рамках тренировочного теста по анализу биотоксинов. В рамках теста ОЗХО были предоставлены жидкие и сухие образцы, содержащие рицин и абрин в различных концентрациях. Для определения наличия рицина в образце делали серию разведений раствором Хенкса исходного образца до 10%, 1%, 0,1%. Из сухих образцов предварительно делали экстракт раствором Хенкса в соотношении 1:10.

Для получения данных по определению активированных молекулярных маркеров апоптоза, клетки культивировали в 24-луночных планшетах, промывали на следующий день после пассажа, добавляли среду, содержащую очищенный рицин или рицин с антителами и инкубировали 24 ч и 48 ч. Определение активированных фосфорилированных или протеолитически фрагментированных белков – маркеров апоптоза проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода по технологии Luminex xMAP. Использовали набор реактивов для определения ранних маркеров апоптоза (7-Plex MILLIPLEX MAP Early Apoptosis Magnetic Bead Kit, Кат. № 48-669MAG Merck/Millipore, США), который позволяет определять активированные фосфорилированные формы следующих белков: Akt1 (Ser473), p53 (Ser46), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), JNK (Thr183/Tyr185), а также активных форм каспазы 8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы 9 (гидролизованной по Asp315). Клеточные лизаты получали по методике, опубликованной ранее [8]. Данные, полученные в ходе экспериментальных исследований, были обработаны в программе Bio-Plex Data Pro Plus. Оценку различий средних значений проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты и обсуждение. При добавлении в среду пролиферирующих клеток в диапазоне конечных концентраций от 1 до 500 нг/мл рицин вызывает гибель клеток дозозависимым образом (рис. 1А). Использование технологии мониторинга клеточного индекса в реальном времени позволяет оценить временные интервалы начала гибели клеток. Для высоких концентраций рицина (50-500 нг/мл) гибель клеток начинается через 6-12 ч, для низких (менее 10 нг/мл) – через 24-48 ч. Зависимость логарифма концентрации от нор-

мализованного клеточного индекса описывается сигмоидой с IC_{50} 6,7 нг/мл (рис. 1Б).

Время начала гибели клеточной популяции и форма кривой клеточного индекса коррелируют с концентрацией токсина, поэтому при наличии стандартной серии разведений рицина и серии разведений токсичного образца можно оценить концентрацию токсина. В качестве примера приведена цитотоксичность 0,1 % жидкого образца, содержащего рицин, в сравнении со стандартами рицина с концентрациями в 50 и 100 нг/мл (рис. 2А). Определение рицина проводилось в жидких образцах в рамках первого тренировочного теста ОЗХО 2017 года по анализу биотоксинов. Цитотоксичность образца находилась между известными концентрациями и соответствовала концентрации, определенной с помо-

щью идентификации протеотипических пептидов методом ВЭЖХ-МСМС [9].

Добавление антител к А- и В-субъединицам рицина в среду совместно с токсином приводит к меньшей гибели клеток относительно рицина. Рабочие конечные концентрации, нейтрализующие токсическое действие 10 нг/мл рицина, для антител были определены для АТ1 – 1 мкг/мл, для АТ2 – 10 мкг/мл, для АТ3 – 10 мкг/мл. В качестве примера приведены графики зависимости нормализованного клеточного индекса от времени инкубации клеток с рицином (10 нг/мл) и смеси рицин (10 нг/мл) и АТ1 (1 мкг/мл) (рис 2Б). Антитела АТ1 проявляли заметный цитопротекторный эффект. Сходные цитопротекторные профили имели и другие изученные антитела АТ2 и АТ3.

Цитопротекторное влияние оказывают как антитела к В-субъединице, вероятно препятствуя проникновению токсина внутрь клетки, так и антитела к ферментативной А-субъединице. Меньшая цитотоксичность рицина в присутствии антител к нему может рассматриваться как важный элемент специфичной идентификации токсина. Используемые антитела к рицину не влияли на цитотоксичность абрина (данные не представлены).

Рицин и абрин вызывают гибель клеток по апоптотическому пути [10]. Абрин индуцирует повышение экспрессии белка FADD, а также активирует каспазу-8 и каспазу-3, заметное повышение активных форм каспаз отмечено через 24 ч и их накопление усиливается к 48 ч в клетках линии Jurkat [11]. Печень является основным органом захвата рицина *in vivo* и проявления его цитотоксичности [12,13]. Рицин времязависимым образом повышает уровень активных форм каспазы-9 и каспазы-3, а также значительно повышает фрагментацию ДНК в клетках печени крыс [14].

Цитопротекторное влияние антител к А и В субъединицам рицина также оценивали по влиянию на внутриклеточные маркеры апоптоза через 24 ч и 48 ч.

Уровень активной формы киназы Akt1, обеспечивающей выживание клеток, резко падает в лизатах клеток через 48 ч действия рицина. Добавление антител АТ1 и АТ3 одновременно с рицином в культуральную среду возвращает активность этой киназы в клетках к контрольному уровню. Добавление антител АТ2 через 24 ч снижает уровень фосфорилированной киназы Akt1 относительно рицина, но через 48 ч уровень статистически значимо был выше.

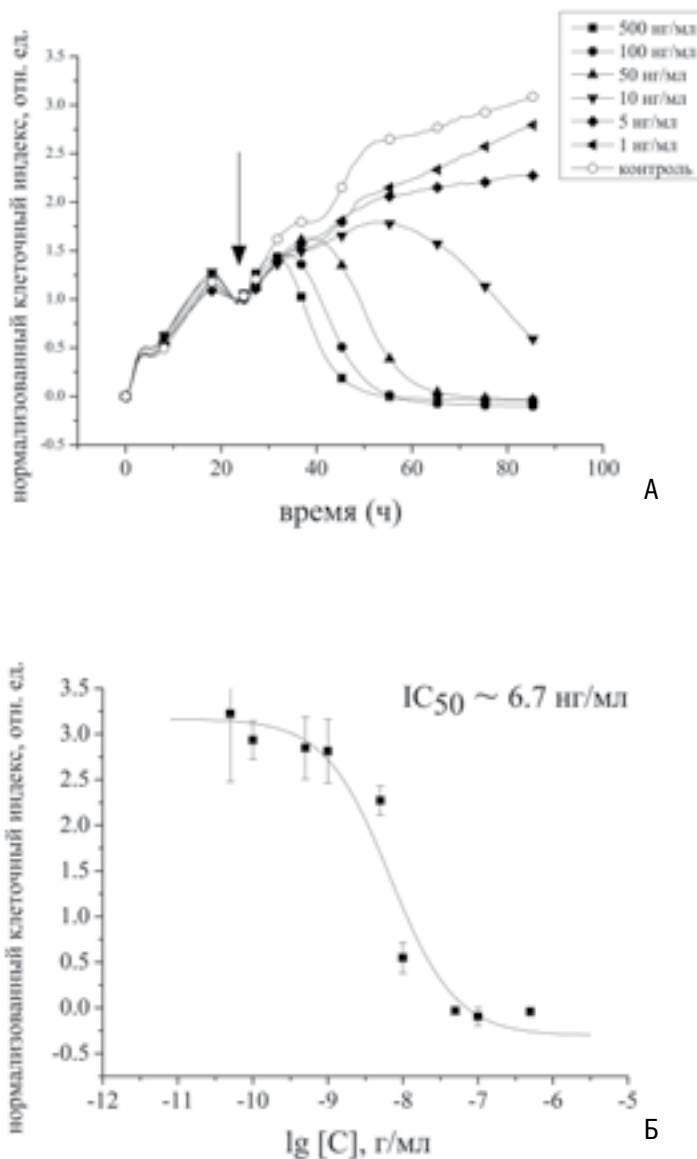


Рис. 1. Графики зависимости нормализованного клеточного индекса от времени инкубации с рицином (А) и от логарифма концентрации рицина (Б) в клетках НераRG. На графике 1А отмечено время добавления токсина

Стрессактивируемая киназа JNK через 24 ч сильно активируется рицином, но через 48 ч интенсивность флуоресценции активной формы киназы JNK падает практически на порядок на фоне токсического действия рицина. Активность этой киназы при добавлении АТ1 и АТ3 практически не отличается от контрольного уровня. Добавление АТ2 приводит к повышенному уровню активности киназы JNK через 24 и 48 ч относительно контроля.

Рицин приводит к резкому снижению активности транскрипционного фактора р53 уже через

24 ч. Добавка антител в различной степени восстанавливает уровень фосфорилированной формы белка р53 к контрольному уровню, что также может интерпретироваться как молекулярный сигнал к выживанию клетки (рис. 3).

Рицин приводит к снижению уровня фосфорилированной формы белка BAD относительно контроля, через 48 ч разница более чем двукратная. Антитела через 48 ч повышают уровень фосфо-BAD относительно рицина к контрольному уровню.

Рицин активирует ключевые ферменты, инициирующие апоптоз, каспазу-8 и каспазу-9 через 24 ч, через 48 ч уровень активных форм этих каспаз снижается. Добавление антител в инкубационную среду препятствует активации каспаз, вызванной воздействием рицина через 24 ч, а через 48 ч их уровень соответствует контрольному (рис. 4).

Таким образом, исследованные антитела к А- и В-субъединицам рицина предотвращают развитие апоптоза, индуцированного рицином. Добавление антител снижает процент погибших клеток относительно токсина, что может быть количественно измерено с помощью импедансометрии или, например, проточной цитофлуориметрии. При наличии стандарта рицина с помощью импедансометрии можно оценить ориентировочную концентрацию токсина в объектах окружающей среды. Снижение цитотоксичности рицина в присутствии антител к нему может рассматриваться как специфический признак его наличия в объектах окружающей среды и позволяет в течение нескольких дней идентифицировать активный токсин с помощью биотестирования, дополнительно к химическому или иммунохимическому его определению. Предложенные подходы позволили успешно идентифицировать образцы, содержащие рицин, в рамках тестов ОЗХО по анализу биотоксинов.

Заключение. На основе клеточной линии НераRG гепатомы человека и мониторинга клеточного индекса в реальном времени предложена тест-система по идентификации рибосом-инактивирующих белковых токсинов (на примере рицина) в объектах окружающей среды. Добавление антител к токсинам в культуральную среду одновременно с токсином приводит к цитопротекторному и антиапоптотическому эффекту на фоне токсического действия токсина. Система биотестирования с использованием антител к токсину может рассматриваться как специфичный метод идентификации токсина в объектах окружающей среды.

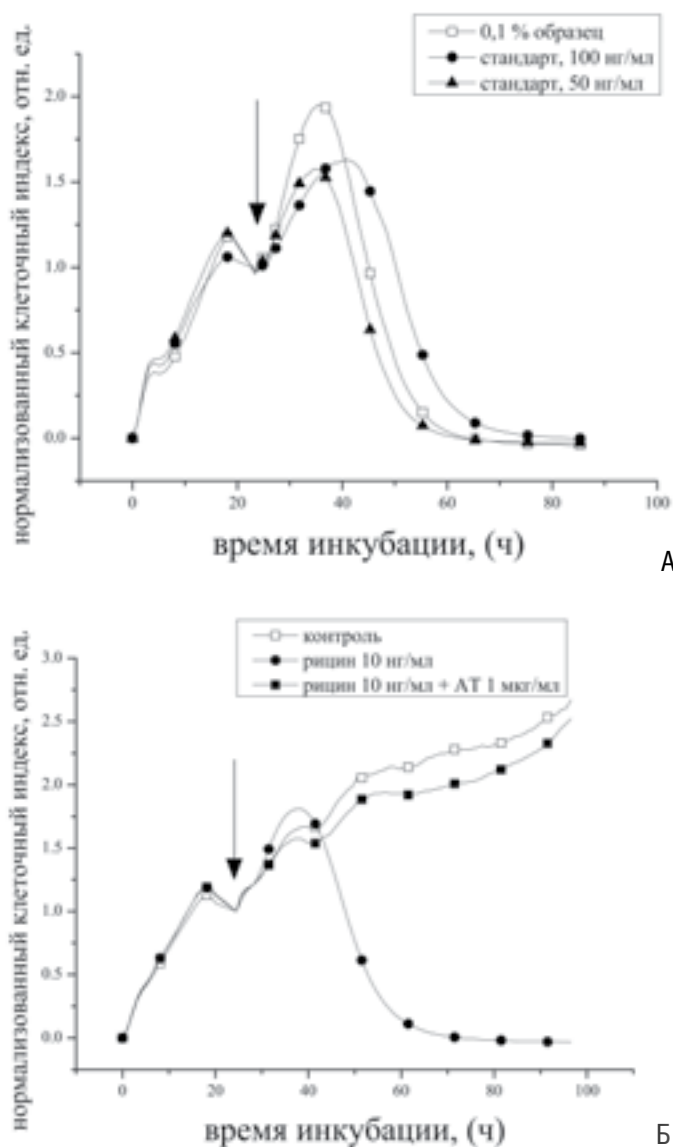
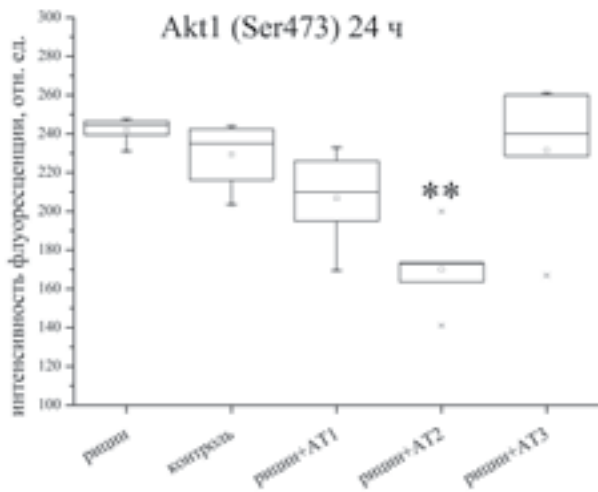
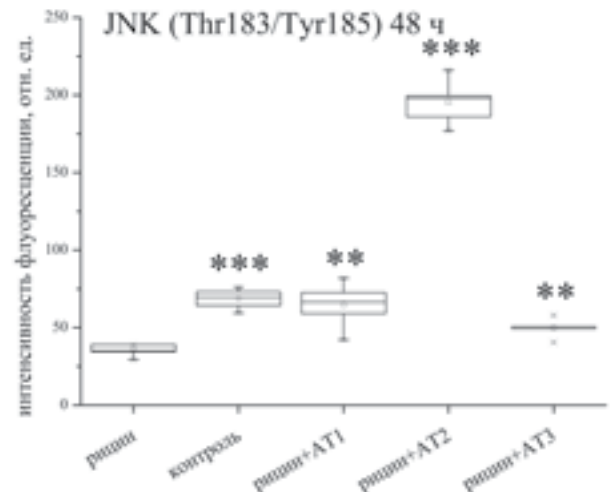


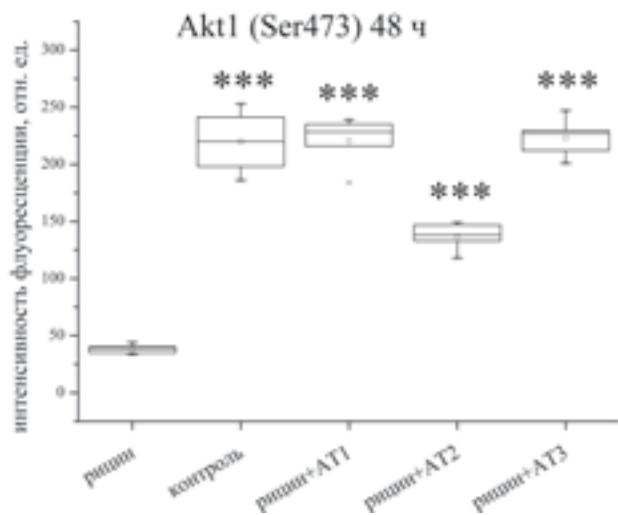
Рис. 2. Графики зависимости нормализованного клеточного индекса от времени инкубации с 0,1% раствором образца, содержащего рицин, и стандартами рицина 50 и 100 нг/мл (А); и от времени инкубации с раствором рицина 10 нг/мл и смесью рицина 10 нг/мл с антителами АТ1 (1 мкг/мл) (Б) в клетках НераRG. На графиках отмечено время добавления токсина



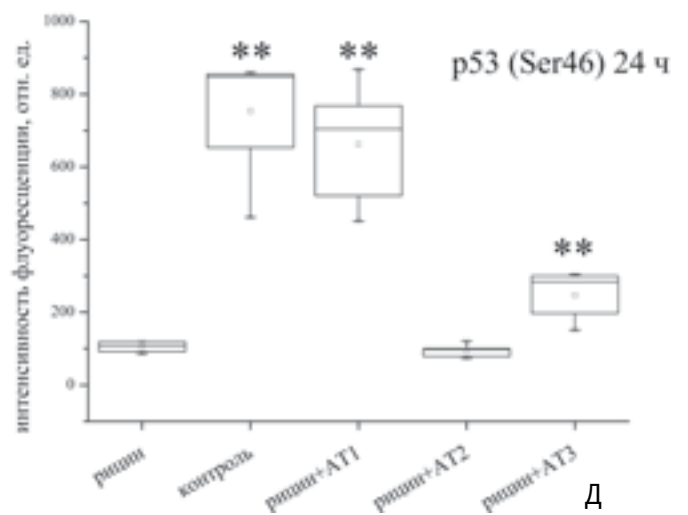
А



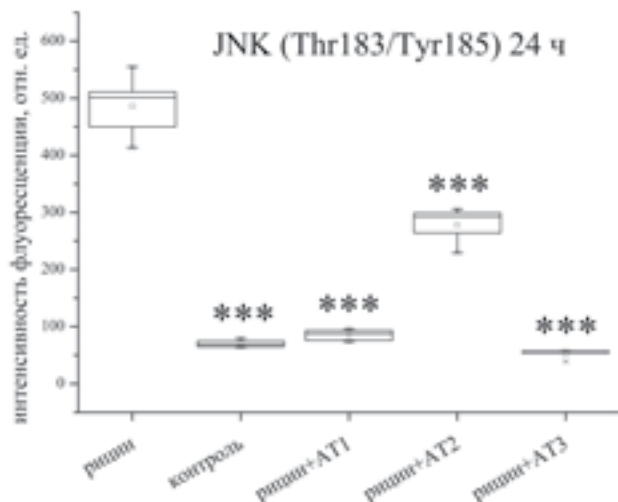
Г



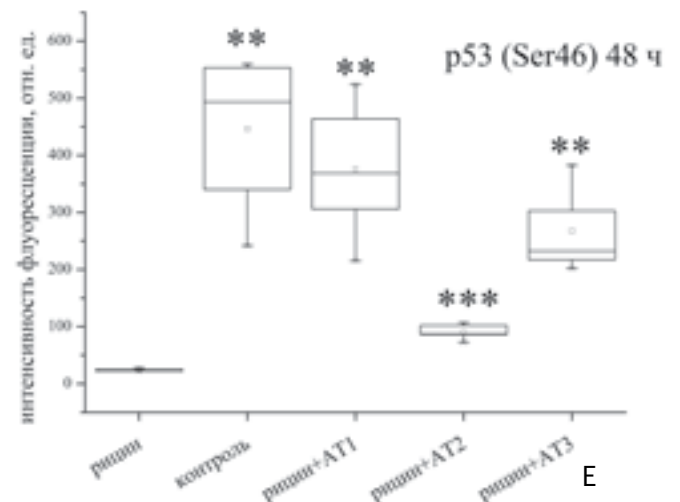
Б



Д

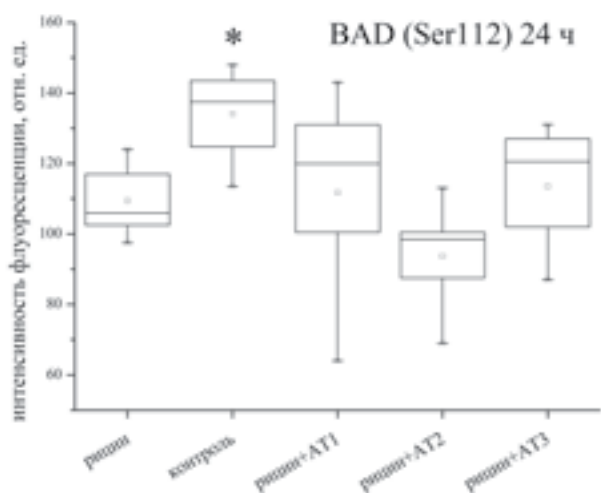


В

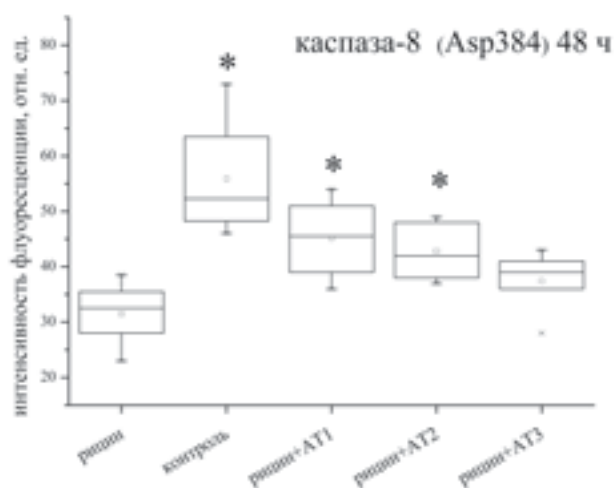


Е

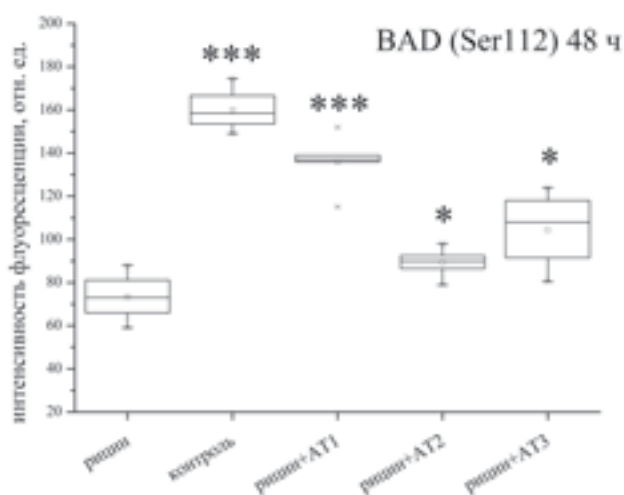
Рис. 3. Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, медиана, среднее, границы 1-3 кватрилей) фосфорилированных белков Akt1 (Ser473), JNK (Thr183/Tyr185) и белка p53 (Ser46) в лизатах клеток НераRG через 24 ч и 48 ч после добавления рицина (10 нг/мл), смеси рицин и AT1 (1 мкг/мл), смеси рицин и AT2 (10 мкг/мл) и смеси рицин и AT3 (10 мкг/мл). Критический уровень значимости (ANOVA) * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.



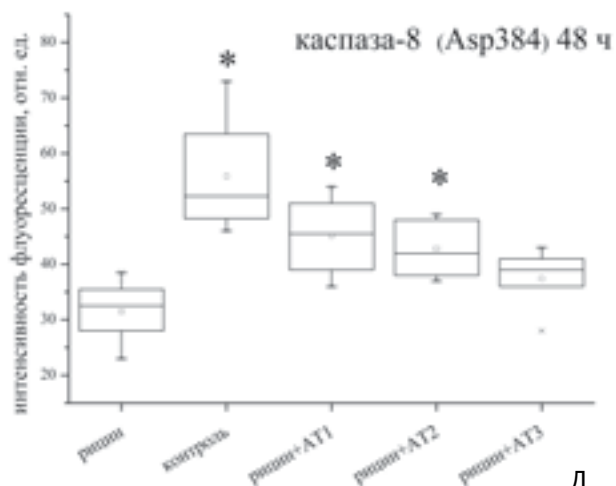
А



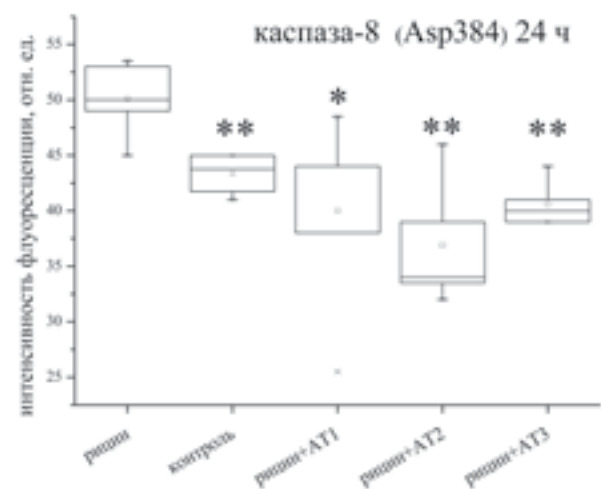
Г



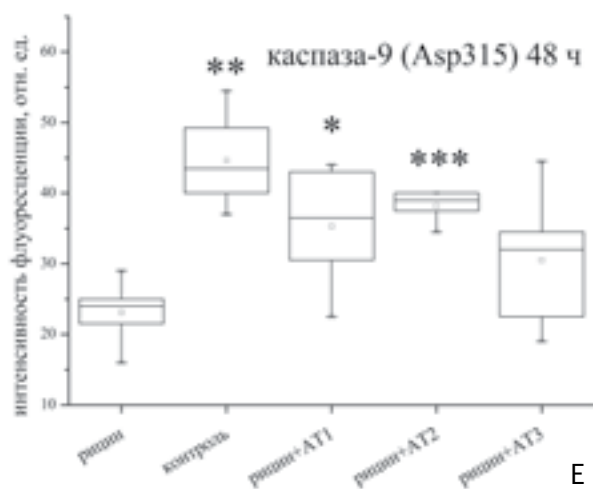
Б



Д



В



Е

Рис. 4. Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, медиана, среднее, границы 1-3 квартилей) фосфорилированного белка BAD (Ser112), каспазы-8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы-9 (гидролизованной по Asp315) в лизатах клеток НераRG через 24 ч и 48 ч после добавления ризина (10 нг/мл), смеси ризин и АТ1 (1 мкг/мл), смеси ризин и АТ2 (10 мкг/мл) и смеси ризин и АТ3 (10 мкг/мл). Критический уровень значимости (ANOVA) * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Ю.В., Сударкина О.Ю., Курманова А.Г. Рибосом-инактивирующие лектины растений Молекулярная биология. 2006; 40(4): 711-23.
2. Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, Battelli MG, Polito L. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. *Molecules*. 2016; 21(12). pii: E1627.
3. Bozza W.P., Tolleson W.H., Rivera Rosado L.A., Zhang B. Ricin detection: tracking active toxin. *Biotechnol Adv*. 2015; 33(1):117-123.
4. Синегубова Е.О., Дубровина И.А., Мясников В.А. Комплексный подход к оценке цитотоксичности рибосом-инактивирующих белков на клеточной модели *in vitro*. Медицина экстремальных ситуаций 2019; 21(S1): 53-62.
5. 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.
6. Дубровский Я.А., Подольская Е.П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS. Научное приборостроение. 2010; 20(4): 21-35.
7. Браун А.В., Таранченко В.Ф., Тихомиров Л.А., Гречухин А.П., Рыбальченко И.В. Обнаружение рицина в растительных экстрактах и почве с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Журнал аналитической химии. 2018; 73(8): 622-631.
8. Бабаков В.Н., Роговская Н.Ю., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П., Дулов С.А., Радиллов А.С. Влияние агонистов арилгидрокарбонного рецептора и липополисахарида на маркеры генотоксического действия бенз(а)пирена Токсикологический вестник 2019; (3):19-25.
9. Дубровский Я.А., Горбунов А.Ю., Роговская Н.Ю., Мурашко Е.А., Бельтюков П.П., Бабаков В.Н. Протеомный подход по определению биотоксинов в объектах окружающей среды. В сб.: Меди-ко-биологические аспекты химической безопасности. Под общей редакцией А.С. Радилова, В.Р. Рембовского. 2018. С. 25-26.
10. Griffiths G.D., Leek M.D., Gee D.J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J Pathol*. 1987;151(3):221-9.
11. Saxena N., Yadav P., Kumar O. The Fas/ Fas ligand apoptotic pathway is involved in abrin-induced apoptosis. *Toxicol Sci*. 2013;135(1):103-18.
12. Fodstad O., Olsnes S., Pihl A. Toxicity, distribution and elimination of the cancer ostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. *Br J Cancer*. 1976;34(4):418-25.
13. Ramsden C.S., Drayson M.T., Bell E.B. The toxicity, distribution and excretion of ricin holotoxin in rats. *Toxicology*. 1989;55(1-2):161-71.
14. Authier F., Djavaheri-Mergny M., Lorin S., Frénoy J.P., Desbuquois B. Fate and action of ricin in rat liver *in vivo*: translocation of endocytosed ricin into cytosol and induction of intrinsic apoptosis by ricin B-chain. *Cell Microbiol*. 2016;18(12):1800-1814

REFERENCES:

1. Kozlov J.V., Sudarkina O.J., Kurmanova A.G. Ribosome-inactivating lectins of plants. *Molecular Biology*. 2006; 40(4): 635-646 (in Russian).
2. Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, Battelli MG, Polito L. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. *Molecules*. 2016; 21(12). pii: E1627.
3. Bozza W.P., Tolleson W.H., Rivera Rosado L.A., Zhang B. Ricin detection: tracking active toxin. *Biotechnol Adv*. 2015; 33(1):117-123.
4. Sinégubova E.O., Dubrovina I.A., Myasnikov V.A. Complex approach to the estimation of cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins on the cell model *in vitro*. *Medicine of extreme situations*. 2019; 21(S1): 53-62 (in Russian).
5. 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.
6. Dubrovsky Ya.A., Podolskaya E.P. Peptide toxins identification by MALDI-MS method. *Nauchnoe Priborostroenie (Scientific Instrumentation)* 2010; 20(4): 21-35 (in Russian).
7. Braun A.V., Tikhomirov L.A., Grechukhin A.P., Rybalkchenko I.V., Taranchenko V.F. Detection of ricin in plant extracts and soil using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Anal. Chem*. 2018; 73(8):786-795 (in Russian).
8. Babakov V.N., Rogovskaya N.Yu., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. Effect of arylhydrocarbon receptor agonists and lipopolysaccharide on benzo(a)pyrene genotoxicity markers. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2019; (3):19-25 (in Russian).
9. Dubrovskii Ya.A., Gorbunov A.Yu., Rogovskaya N.Yu., Murashko E.A., Belyukov P.P., Babakov V.N. Proteomic approach of biotoxin detection in environmental samples. In: *Proc. Med. Biol. Aspects of Chem. Safety*. St. Petersburg. 2018: 25-26 (in Russian).
10. Griffiths G.D., Leek M.D., Gee D.J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J Pathol*. 1987; 151(3):221-9.
11. Saxena N., Yadav P., Kumar O. The Fas/ Fas ligand apoptotic pathway is involved in abrin-induced apoptosis. *Toxicol Sci*. 2013;135(1):103-18.
12. Fodstad O., Olsnes S., Pihl A. Toxicity, distribution and elimination of the cancer ostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. *Br J Cancer*. 1976;34(4):418-25.
13. Ramsden C.S., Drayson M.T., Bell E.B. The toxicity, distribution and excretion of ricin holotoxin in rats. *Toxicology*. 1989;55(1-2):161-71.
14. Authier F., Djavaheri-Mergny M., Lorin S., Frénoy J.P., Desbuquois B. Fate and action of ricin in rat liver *in vivo*: translocation of endocytosed ricin into cytosol and induction of intrinsic apoptosis by ricin B-chain. *Cell Microbiol*. 2016;18(12):1800-1814.

N.Yu. Rogovskaya, A.Yu. Gorbunov, Ya.A. Dubrovskii, N.S. Khlebnikova, V.N. Babakov

DETERMINATION OF RICIN IN ENVIRONMENTAL SAMPLES USING BIOASSAY

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, Leningrad region, Russian Federation

A bioassay of ricin toxicity in environmental samples using real-time cell index monitoring is proposed. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of ricin was estimated at 6,7 ng/ml for human hepatoma HepaRG cells proliferation. The antibodies to A- and B-subunits in HepaRG cell media lead to cytoprotective and antiapoptotic effects against the cytotoxicity of ricin. The antibodies neutralised activation of JNK kinase (phosphorylated at Thr183/Tyr185) and prevented accumulation of the active forms of caspase 8 (hydrolysed to Asp384) and caspase 9 (hydrolysed to Asp315) induced by ricin in HepaRG cells. The tested antibodies also prevented a decrease in the intracellular levels of the active forms of Akt 1 kinase (phosphorylated at Ser473) and transcription factor p53 (phosphorylated at Ser46) caused by ricin. The bioassay with antibodies can be considered as a specific method for identifying the toxin in environmental samples.

Keywords: ricin, bioassay, apoptosis markers.

Quote: N.Yu. Rogovskaya, A.Yu. Gorbunov, Ya.A. Dubrovskii, N.S. Khlebnikova, V.N. Babakov. Determination of ricin in environmental samples using bioassay. *Toxicological Review*. 2020; 5:43-49

Переработанный материал поступил в редакцию 17.02.2020 г.