

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ РИЦИНА

¹Чепур С.В., ²Аль-Шехадат Р.И., ¹Гоголевский А.С., ¹Пугач В.А.,

¹Мясников В.А., ²Анисенкова Е.В., ¹Левчук Е.В., ¹Тюнин М.А.

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский
испытательный институт военной медицины»
Министерства обороны Российской Федерации,
195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4,
телефон: 8 (812) 775-02-41, e-mail: gniiivm_7@mil.ru

²ООО «Иннова плюс»,
198099, г. Санкт-Петербург, ул. Калинина, д. 13,
телефон: 8 (812) 988-89-99, e-mail: info@innovaplus.ru

Резюме. На примере рицина охарактеризованы особенности токсичности рибосом-инактивирующих белков, сопряженные с их прямой пространственно ориентированной РНК-N-гликозидазной активностью, определяющей депуринизацию сарцин-рициновой петли и блокирование гидролиза гуанозинтрифосфата с последующим нарушением трансляции в синтезе белка. Эндоцитоз рицина и его транспорт через комплекс Гольджи определяет значимые конформации молекулы токсина, необходимые для ее выхода в активной форме в цитозоль и связывания с рибосомальными структурами. Полное или частичное ингибирование рицином функции рибосом активирует каскад провоспалительных реакций посредством индукции сигнальных путей транскрипционного фактора NF-κB и митоген-активируемых протеинкиназ. Воздействие рицина на Толл-подобные рецепторы опосредует продукцию цитокинов, стимулируя воспалительные реакции. Прослежено, что цитотоксическое действие рицина сопряжено также с индукцией митохондрий-опосредованного апоптоза. Благодаря цитотоксическому действию рицин может быть использован для разработки новых лекарственных препаратов для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний. Вместе с тем, в качестве кандидатных средств, ограничивающих его токсическое действие, рассматривают блокаторы ретроградного транспорта, средства, блокирующие транспорт рицина в клетке, противовоспалительные препараты различной природы и ряд антибактериальных средств.

Ключевые слова: рицин, рибосомы, сарцин-рициновая петля, апоптоз, индукция воспаления

MOLECULAR ASPECTS OF CYTOTOXICITY OF RICIN

¹Chepur S.V., ²Al-Shekhadat R.I., ¹Gogolevsky A.S., ¹Pugach V.A.,

¹Myasnikov V.A., ²Anisenkova E.V., ¹Levchuk E.V., ¹Tyunin M.A.

¹*State scientific-research test Institute of military medicine*

of Defense Ministry of the Russian Federation

4, Lesoparkovaja street, St. Petersburg, 195043

tel.: 8 (812) 775-02-41, e-mail: gniiivm_7@mil.ru

²*LLC «Innova plus»*

13, Kalinina street, St. Petersburg, 198099

tel.: 8 (812) 988-89-99, e-mail: info@innovaplus.ru

Abstract. On the ricin as an example by features of toxicity ribosome-inactivating proteins associated with their direct spatial oriented RNA-N-glycosidase activity that defines depurination sarcin-ricin loop and blocking the hydrolysis of GTP with consequent impairment of translation in protein synthesis is characterized. Endocytosis of ricin and its transport through the Golgi complex determines the significant conformations of the toxin molecule necessary for its release in active form into the cytosol and binding to ribosomal structures. Complete or partial inhibition of ribosome function by ricin activates a cascade of proinflammatory reactions by inducing transcription factor NF- κ B and mitogen-activated protein kinases signal pathways. The effect of ricin on Toll-like receptors mediates the production of cytokines, stimulating inflammatory responses. It was observed that the cytotoxic effect of ricin is also associated with the induction of mitochondria-mediated apoptosis. Due to its cytotoxic action, ricin can be used to develop new drugs for the treatment of cancer and autoimmune diseases. At the same time, retrograde transport blockers, substances which blocking intracellular ricin transport, anti-inflammatory drugs of various nature, and a number of antibacterial agents are considered as candidate agents that limit its toxic effect.

Keywords: ricin, ribosomes, sarcin-ricin loop, apoptosis, induction of inflammation

ВВЕДЕНИЕ

Рицин – бинарный токсин, получаемый из жмыха семян касторовых бобов *Ricinus communis* (Клещевина обыкновенная), принадлежит к группе растительных рибосом-инактивирующих белков (РИБ) типа 2, в которую наряду с ним входят абрин, вискумин, модецин и волкензин. Среди растительных РИБ рицин и абрин признаны самыми

опасными, поскольку их токсичность на лабораторных животных в 10–40 раз выше, чем у близких по строению токсальбуминов [1, 2].

Интерес к свойствам РИБ возник в начале 19 в., когда научное сообщество обратило внимание на токсичность растительных ядов, выделенных из семян *Ricinus communis L.* и *Abrus precatorius L.* В конце 19 в. идентифицированные яды были частично очищены в Дерптском университете, а затем названы рицином и абрином. Следующий этап изучения РИБ включал новаторские исследования будущего лауреата Нобелевской премии Пауля Эрлиха в Институте инфекционных болезней Берлина. Ученый открыл защитный эффект предварительного кормления лабораторных грызунов небольшими порциями рицина и абрина. Животные демонстрировали специфичность иммунитета и сохраняли чувствительность к другим токсинам. Научный прорыв в изучении цитотоксических свойств РИБ был совершен в 1970 г., когда в исследованиях *in vitro* был показан противоопухолевый потенциал рицина и абрина [3].

В настоящее время, в сравнении с другими РИБ, рицин по-прежнему привлекает внимание ученых, поскольку этот распространенный в природе токсин проявляет как прямую, так и опосредованную цитотоксичность, молекулярные основы реализации которой представляют особый интерес как с точки зрения разработки средств профилактики и лечения рициновых отравлений, так и для создания перспективных фармакологических препаратов на основе этого токсина. В связи с этим цель настоящего обзора состояла в анализе данных о механизмах прямого и непрямого (опосредованного) цитотоксического действия рицина.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РИЦИНА

Первые сведения о двухцепочечной структуре рицина относят к началу 1970-х гг., когда было показано, что токсин состоит из двух субъединиц (А и Б цепь, РТА и РТБ, соответственно), соединенных дисульфидной связью [4]. В тот же период была определена первичная аминокислотная последовательность обеих цепей токсина [5]. Далее, уже в 1987 г., Эндо и его коллеги из Медицинского колледжа Яманаси описали механизм ферментативной активности рицина. Токсин был идентифицирован как рРНК N-гликозидаза [ЕС 3.2.2.22], которая способна удалять остаток аденина (A4324 в 28 S РНК крысы) из высококонсервативной петли рибосомальной РНК, участвующей в связывании факторов элонгации трансляции. Эта же петля также служит мишенью для α -сарцина, другого риботоксина из *Aspergillus giganteus* с рРНК эндонуклеазной активностью [ЕС 3.1.27.10] [6], отсюда и следует её название – сарцин-рициновая петля (СРП) 28S рРНК.

Позже были получены подробные данные, демонстрирующие, что РТА представляет собой глобулярный белок, состоящий из 267 аминокислотных остатков, формирующих три домена и образующих активный сайт молекулы. РТБ состоит из 262 аминокислотных остатков, формирующих два гомологичных домена, каждый из которых содержит лактозо-связывающий сайт и несколько гомологичных аминокислотных областей, предположительно сформированных в результате дупликации генов [7]. Каждый из двух глобулярных доменов РТБ (1 и 2) состоит из трех гомологичных субдоменов (α , β , γ), которые, вероятно, возникли в результате дупликации генов из первичного углевод-распознающего домена (CRD) [8, 9]. Однако в современном эволюционном структурном варианте белка только внешние субдомены 1 α и 2 γ сохраняют функциональную активность по распознаванию углеводов [9]. Субдомен 1 α (остатки 17–59) специфичен к галактозе (Gal) и служит CRD с «низкой аффинностью», в то время как субдомен 2 γ (остатки 228–262) связывается с Gal и N-ацетил-D-галактозамином (GalNac), выступая в качестве «высокоаффинного» CRD [10, 11].

РТА (около 32 кДа) обладает N-гликозидазной каталитической активностью. Она расщепляет гликозидную связь при остатке аденина в позиции 4324 28 S рРНК, расположенного в консервативной последовательности 5'-AGUACGAGAGGA-3' (СРП), обеспечивающей связывание факторов элонгации, вследствие чего синтез белка на рибосоме полностью и необратимо блокируется [12]. Анализ трехмерной структуры рицина позволил идентифицировать ключевые аминокислотные остатки, играющие важную роль в реализации ферментативной активности токсина. В частности, было обнаружено, что Tyr80, Tyr123, Glu177, Arg180 и Trp211 образуют сайт связывания для аденина [1, 8].

РТБ (около 34 кДа) распознает сложные типы углеводных рецепторов, присутствующих на поверхности эукариотических клеток. Эти рецепторы содержат либо концевые N-ацетилгалактозаминовые остатки, либо β -1,4-галактозо-связанные остатки, которые присутствуют в значительном количестве на поверхности большинства типов клеток, что определяет их высокую чувствительность к рицину [13]. Кроме того, токсин также может взаимодействовать с рецепторами маннозного типа на поверхности макрофагов [14] или эндотелиальных клеток печени крыс [15]. Это связано с тем, что РТА и РТБ являются гликопротеинами, которые содержат богатые маннозой олигосахариды. Однако большинство типов клеток не экспрессируют маннозные рецепторы и, следовательно, риксин в таких клетках может интернализироваться исключительно посредством галактозильных остатков.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РИЦИНА

Рицин обладает как прямым, так и непрямым (опосредованным) цитотоксическим действием. Прямое действие предусматривает интернализацию токсина внутрь клетки с последующим угнетением синтеза белка на рибосомах. В течение 4 ч количество рицина в клетке достигает 17 000 молекул и остаётся на этом уровне достаточно длительное время. Риботоксическая активность (РТА) обеспечивает инактивацию более 1500 рибосом в минуту [6]. Непрямое повреждающее действие рицина связано с активацией провоспалительных путей и апоптозом клеток.

Уровни летальных доз рицина зависят от вида животного, степени очистки рицина, а также условий его хранения. Действие рицина наиболее значимо у млекопитающих - токсин поражает человека, овец, лошадей, крупный рогатый скот, свиней и лабораторных грызунов. В то же время, утки и куры оказываются более стойкими к его воздействию. В многочисленных экспериментальных моделях показано, что патологические эффекты и последующие клинические признаки интоксикации рицином зависят от пути его поступления и, следовательно, от распределения токсина в тканях организма [1]. После внутривенного или внутримышечного введения рицина преимущественные поражения регистрируют в селезенке, печени и почках, в то время как дыхательная система остается не вовлеченной в патологический процесс. Пероральный прием токсина вызывает сильное поражение желудочно-кишечного тракта, которое проявляется, главным образом, в геморрагическом энтерите. При кратном введении рицина в сублетальных дозах прослеживали выраженную кахексию. Ингаляционное воздействие, как правило, ограничено нарушением функции дыхательной системы [16]. Токсичность рицина для животных изучена на широком спектре биообъектов (рисунок 1).

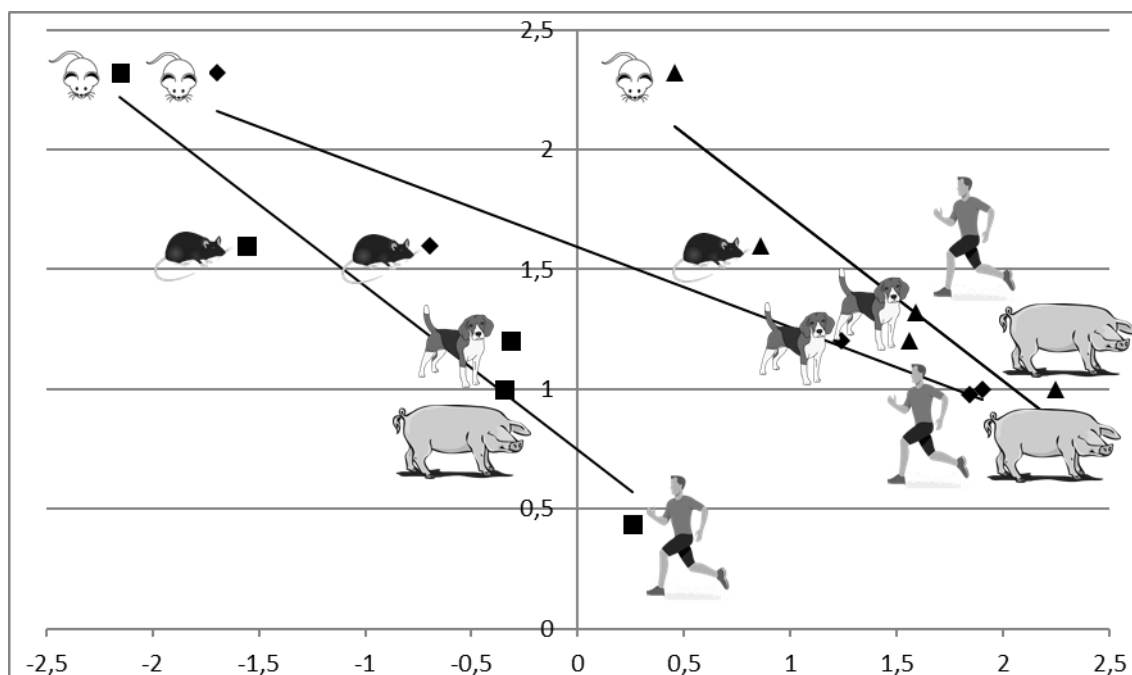


Рисунок 1 – Прогнозирование среднелетальных доз (по вертикали) рицина (мкг/кг) для человека при внутривенном введении по видовому ряду в зависимости от логарифмов (по горизонтали) массы тела (ромбы), поверхности тела (квадраты) и соотношения масса / поверхность (треугольники).

Прогнозная среднелетальная доза для человека составляет 0,43-1,32 мкг/кг

Примечание: при расчетах использованы данные проведенных исследований [17, 18]

Наиболее доступными для экспериментов остаются грызуны. Средняя смертельная доза (LD₅₀) рицина при пероральном введении составляет от 20 до 30 мг/кг для крыс и от 15 до 35 мг/кг для мышей [19, 20]. При внутривенном, ингаляционном и внутрибрюшинном введении токсичность приблизительно в 1000 раз выше, по сравнению с пероральным введением рицина, и значения LD₅₀ для мышей составляют 2–10 мкг/кг, 3–5 мкг/кг и 22 мкг/кг, соответственно [21]. Более низкая токсичность рицина при пероральном введении обусловлена разрушением белка в желудочно-кишечном тракте [22]. Танатогенез при смертельном отравлении рицином протекает около 10 ч даже при аппликации токсина в очень высоких дозах [23]. Средняя смертельная доза для человека при вдыхании токсина составляет 3–5 мкг/кг, а при пероральном введении – 20 мг/кг [24].

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ РИЦИНА

После связывания с рецепторами клеточной поверхности риксин транспортируется в клетку посредством эндоцитоза. Было показано, что эндоцитоз рицина реализован различными механизмами, которые, главным образом, сопряжены с распознаванием

специфических компонент мембраны клеток [12]. Существует предположение, что интернализация рицина осуществляется всеми вариантами механизмов эндоцитоза, которые возможны в данном типе клеток [25]. Первые исследования механизмов проникновения рицина в клетку показали его способность к интернализации клатрин-зависимым эндоцитозом на клетках линии Vero [26]. Впоследствии стало ясно, что в процесс интернализации рицина также вовлечены и клатрин-независимые механизмы [27].

После поглощения рицин попадает в ранние эндосомы, откуда большая часть молекул белка обратно рециркулирует на поверхность клетки или поступает в поздние эндосомы с последующей протеолитической деградацией в лизосомах. Небольшое количество нерасщепленных молекул рицина обнаруживали в транс-сети Гольджи [28]. Участие комплекса Гольджи в транспортировке рицина подтверждено с использованием различных разрушающих агентов, таких как Брефельдин А и Монезин. Фактически, предварительная обработка клеток этими агентами приводила к ингибированию цитотоксических эффектов рицина [29]. Показано, что рицин циркулирует от аппарата Гольджи до эндоплазматического ретикулума через везикулы, покрытые белком COP-1 [30], хотя позднее было доказано, что независимый от COP-1 путь также может быть вовлечен в механизм внутриклеточной транспортировки токсина [31]. Исследования последних лет показали, что для транспортировки рицина аппаратом Гольджи необходимы холестеринные рафты, следовательно, данный процесс не требует обязательного наличия гликофинголипидов [32]. После достижения эндоплазматического ретикулума (ЭПР) S-S (дисульфидная) связь, соединяющая две рициновые цепи, восстанавливается, и РТА, частично подвергаясь денатурации, ретротранслоцируется, используя клеточный путь, ассоциированный с деградацией белков (ERAD), доставляющий неправильно свернутые белки в цитоплазму для их последующей протеасомной деградации [33]. Показано, что часть РТА, которые быстро повторно сворачиваются в нативную структуру с помощью цитозольных шаперонов, способна достичь своей внутриклеточной мишени, избегая убиквитинилирования и протеасомной деградации [34]. Тем не менее, по-прежнему, не определены конкретные факторы ERAD, которые облегчают транспортировку РТА из ЭПР [12]. Существует мнение, что РТА может использовать различные мембранные транслокационные каналы для перемещения из ЭПР в цитоплазму, такие как белковый комплекс Sec61, Derlin белки и несколько мембранных убиквитин-лигаз ЭПР, включая HRD1 (Hrd1p у дрожжей) [12]. Однако роль белков Sec61 и Derlin в транспорте РТА из ЭПР на данный момент до конца не определена. До сих пор не ясно, могут ли эти каналы служить РТА реальными

транслоконами. В настоящий момент, по-видимому, в транспортировке РТА наиболее очевидна роль убиквитин-лигазы HRD1 и ее кофактора SEL1L. Но вопрос о точных молекулярных механизмах транспортировки РТА из ЭПР по-прежнему остается открытым [12].

Наряду с быстрым рефолдингом при перемещении из ЭПР в цитозоль, РТА также может избегать протеасомной деградации, благодаря содержанию в своем составе только двух остатков лизина, которые обычно остаются неубиквитинилированными во время транспорта токсина в цитозоль [35, 36]. Кроме того, взаимодействие РТА с рибосомными белками и цитозольными шаперонами, которые имеют решающее значение для формирования её правильной конформации, способствует защите цепи от деградации, а также активации её каталитических свойств [12].

Различные типы клеток имеют разные уровни чувствительности к рицину [12], возможно, из-за особенностей экспрессии рецепторов на клеточной поверхности, а также эффективности последующего эндоцитоза. В экспериментах, проведенных на клеточных линиях, было показано, что рицин представляет собой один из наиболее токсичных растительных белков с IC_{50} (концентрация, ингибирующая синтез белка на 50 %) в диапазоне от 0,1 до 1 пМ. Необходимо учитывать, что проведение прямого сравнения данных литературы о цитотоксичности рицина значительно затруднено вследствие различий в экспериментальных подходах и технических условиях проведения анализа. Активность РИБ, связанная с депуринизацией полинуклеотидных субстратов, также предполагает возможность более широкого токсического действия на многие биологические субстраты, не исключая индукцию оксидативного стресса. Это может объяснить инициацию более чем одного пути гибели клеток, например, апоптоза и некроптоза, вызванных рицином и другими представителями РИБ [37].

Различия в связывании и эндоцитозе рицина также могут быть опосредованы специфичными особенностями данного токсина. Мутация, которая изменяет вторичную структуру РТА на более спиральную конформацию, не оказывает влияния на связывание или эндоцитоз модифицированного токсина [38]. Однако мутации, которые модифицируют гидрофобные свойства РТА, значительно влияют на взаимодействие рицина с клеточной мембраной [39]. Применение люциферазного репортерного анализа с целью идентификации клеточных компонентов, необходимых для внутриклеточного транспорта РТА у дрожжей показало, что на транспортировку цепи влияют белки Syn8p, Sso1p и Snc1p [40]. Syn8p и Snc1p образуют комплекс, который играет важную роль в поглощении белка и его перемещении от плазматической мембраны в эндосомы [41]. Sso1p представляет собой плазматический мембранный t-SNARE белок, который вместе с

v-SNARE Snc2p белком необходим для слияния везикул комплекса Гольджи с плазматической мембраной. Однако в настоящий момент остается неизвестным, участвуют ли в эндоцитозе токсина гомологи этих белков у млекопитающих [12].

ПРЯМАЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РИЦИНА.

РИБОСОМ-ИНАКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ

Для реализации своего риботоксического эффекта РТА должна транспортироваться в цитозоль. Этой транслокации, как было указано выше, предшествует эндосомное поглощение токсина и ретроградный путь через транс-сеть Гольджи и ЭПР [12]. Транспорт РТА в цитозоль происходит за счет разрушения внутренней дисульфидной связи, которая связывает РТА и РТБ [42]. Разрушение дисульфидной связи в интактной молекуле рицина позволяет высвободить РТА, которая частично денатурирует и теряет свою нативную конформацию. Также предполагают, что этот процесс служит для стимуляции каталитической активности цепи [43]. После транслокации в цитозоль токсин должен повторно приобрести свою биологически активную конформацию для модификации цитозольных мишеней. В настоящее время описаны три основных пути восстановления каталитически активной конформационной структуры РТА. К ним относят связывание РТА с цитозольными шаперонами [44], рибосом-опосредованный рефолдинг [45] и взаимодействие с рибосомными и протеасомными факторами. Следует отметить, что не все молекулы РТА, транслоцированные в цитозоль, могут функционировать в качестве активного токсина. РТА частично разрушается с помощью 26S-протеасомного механизма, и эту деградацию могут блокировать специфичные ингибиторы протеасом [46]. В то же время показано, что в клетках млекопитающих большинство РТА избегают протеасомной деградации [33].

После транслокации в цитозоль, благодаря своей РНК-N-гликозидазной активности, рибосом расщепляет гликозидную связь при остатке аденина, расположенного в СРП, которая принадлежит гуанозинтрифосфатаза ассоциированному центру (ГАЦ) – рибосомному элементу, ответственному за формирование однонаправленной траектории движения трансляционного аппарата за счет гидролиза гуанозинтрифосфата при участии трансляционных гуанозинтрифосфатаз. Ферментативное удаление посредством РТА единственного аденинового основания на определенном участке СРП блокирует гидролиз гуанозинтрифосфата и, в то же время, препятствует функционированию трансляционного механизма. Само по себе взаимодействие рицина с целевым адениновым основанием в СРП реализуется через Р-стебельчатую рибосомную структуру (Р-стебель, Р-stalk). Стебель, состоящий из Р-белков, представляет собой уникальный эукариотический

элемент, взаимодействующий с РТА и отвечающий за специфичность токсина по отношению к рибосоме. Взаимодействие РТА с Р-структурой не только закрепляет и направляет РТА в сторону СРП, но также стимулирует депуринизацию инвариантного аденина на специфичном участке СРП [47]. Структура Р-стебля рибосомы человека включает три типа фосфопротеинов: Р0, Р1 и Р2. Они собраны в пентамерный белковый комплекс, состоящий из одного белка Р0, связанного двумя гетеродимерами из белков Р1 и Р2 [48, 49]. Показано, что белки Р1-Р2 представляют собой первичный сайт связывания для РТА [50] с наиболее важной ролью, продемонстрированной в отношении димера Р1В-Р2А [51]. В интактной молекуле рицина сайт связывания РТА с рибосомой блокирован РТБ, препятствуя депуринизации рибосомной рРНК. РТА приобретает каталитическую активность только после освобождения от РТБ, что делает сайт связывания рибосомы конфигурационно доступным для взаимодействия [52].

Специфичность депуринизации рибосомальной РНК с помощью РТА зависит от конформации соответствующего участка петлевой структуры СРП, а последовательность GAGA, с выступающим ключевым адениновым основанием, распознается как основной субстратный элемент [53]. Во время катализа процесса депуринизации СРП рицином консервативный аденин на ее участке размещается между двумя остатками Туг (в каталитическом центре РТА–Туг80 и Туг123) с образованием π -стэкинг взаимодействия [54]. Кроме того, положение аденина стабилизировано посредством формирования водородных связей с остатками Gly121, Val81, Glu177 и Arg180 РТА [55]. Показано, что два аминокислотных остатка РТА (Glu177 и Arg180) играют решающую роль в гидролизе N-гликозидных связей, обеспечивая переходное состояние во время катализа реакции депуринизации [56].

Таким образом, кинетическая модель взаимодействия РТА с рибосомой и депуринизации СРП предполагает, что токсин первоначально взаимодействует с Р-структурой, и это позволяет ориентировать активный сайт токсина в направлении СРП, способствуя целевому связыванию с аденином. Также считают, что вовлечение Р-стебля аллостерически стимулирует катализ депуринизации рибосом с помощью РТА, объясняя необычайную специфичность токсина по отношению к эукариотическим рибосомам [55, 56].

Все полученные к настоящему времени экспериментальные данные заложили основу для общего представления о том, что депуринизация СРП приводит к деструктивным изменениям механизма трансляции, связывая токсический эффект рицина с блокированием синтеза белка в клетке. Тем не менее, ряд исследований *in vivo* показали, что нет четкой взаимной корреляции между депуринизацией рибосомы, ингибированием

трансляции и гибелью клеток [51], поэтому вопрос о токсичности рицина на молекулярном уровне по-прежнему остается открытым. Вся имеющаяся в настоящее время информация, касающаяся повреждающего действия рицина, предполагает, что его цитотоксическое действие имеет многофакторную природу, включая индукцию многочисленных каскадных молекулярных путей, ведущих к гибели клеток [57].

В недавних исследованиях показано, что, вопреки распространенному представлению, активность рицина в отношении рибосом *in vivo*, проявляющаяся в виде депуринизации СРП, не вызывает массовую механическую инактивацию рибосом в клетке, приводящую к коллапсу трансляционного механизма и гибели клетки. Депуринизация СРП не вызывает значительных дефектов на каком-либо конкретном этапе трансляции, и замедление трансляции, вызванное активностью РТА, не может рассматриваться как единственный источник гибели клеток. В некоторых исследованиях основным метаболическим следствием депуринизации СРП *in vivo* считают ингибирование репродуктивного потенциала клетки, но жизнеспособность клеток при этом может быть сохранена [58].

ОПОСРЕДОВАННАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ РИЦИНА. РИЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ПУТИ ВОСПАЛЕНИЯ

Широкий спектр исследований направлен на изучение механизмов воспаления и апоптотической гибели клеток при взаимодействии с субъединицами рицина. Наибольшее значение в этих работах отведено воздействию рицина на органы дыхания, как наиболее опасному пути поступления этого токсина. В экспериментах с интратрахеальным введением рицина показано, что в качестве первичных клеток-мишеней для токсина выступают альвеолярные макрофаги, а также дендритные клетки и альвеолоциты 2 типа. Указанный факт может свидетельствовать о первичном вовлечении иммунокомпетентных клеток в патологический процесс. Взаимодействие токсина с эндотелиоцитами происходит только через 24–72 ч после воздействия [59]. Однако в более ранних исследованиях показано, что РТА оказывает прямое влияние на эндотелиальные клетки, которое приводит к изменению их цитоскелета с округлением клеток (приобретением наименее энергозатратной формы), отрыву клеток от базальной мембраны и дезорганизации межклеточных взаимодействий с формированием межэндотелиальных промежутков, вызывая, в конечном итоге, нарушение барьерной функции эндотелия еще до обнаруживаемого ингибирования синтеза белка [60].

Полное или частичное ингибирование рицином функции рибосом активирует провоспалительный каскад посредством индукции сигнальных путей транскрипционного фактора NF- κ B и митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК). Показано, что рицин способствует фосфорилированию p38 и JNK, активируя синтез провоспалительных цитокинов, а также апоптоз клеток [61]. Параллельно с этим инициируется сборка NLRP3-инфламмасомы – мультипротеинового комплекса, стимулирующего дополнительное образование провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и интерлейкина-18 (ИЛ-18). Причем в сравнении с МАПК-зависимым механизмом образования ИЛ-1 β , реализуемая за счет формирования NLRP3-инфламмасомы продукция этого индуцибельного цитокина, служит основополагающей при воздействии рицина [62]. Тем не менее, в настоящее время точные механизмы активации NLRP3-инфламмасомы при действии токсина не описаны.

В недавних исследованиях показано, что рицин напрямую взаимодействует с Толл-подобными рецепторами (TLR4), приводя к активации как MyD88-зависимых (цитокины: фактор некроза опухоли- α (ФНО α), интерлейкин-6 (ИЛ-6)) и так и TRIF-зависимых (интерфероны) путей [63].

Продукция различных провоспалительных факторов, а также апоптоз клеток считают итогом активации рицином вышеописанных сигнальных путей. Вслед за повышением уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α в бронхоальвеолярной лаважной жидкости при интраназальном введении рицина возрастают содержания секреторной фосфолипазы A2 (sPLA₂), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), матричной металлопротеиназы-9 (MMP9), ксантиноксидазы. При ингаляционном воздействии рицином sPLA₂ выступает одним из ключевых посредников в стимуляции хемотаксиса нейтрофилов, деградации сурфактантных фосфолипидов и формировании отека легких [64]. Интратрахеальное введение рицина приводит к ранней дестабилизации межклеточных контактов аэрогематического барьера, способствуя увеличению его проницаемости. Ряд авторов подчеркивает вклад матричных металлопротеиназ (MMP2 и MMP9) в механизмы деструкции белков межклеточных контактов (VE-кадгерина, клаудинов и коннексина 43) при рицин-индуцированном остром респираторном дистресс-синдроме (ОРДС) [59].

Гибель клеток не только вследствие риботоксического действия рицина, но и за счет индукции им механизмов апоптоза широко исследуют в последнее десятилетие. Как известно, апоптоз может быть реализован двумя путями: внешним, осуществляемым через поверхностные «рецепторы смерти» и внутренним – через цепь митохондриальных реакций. Внутреннему пути уделяют особое внимание в механизмах цитотоксического

действия рицина. *In vitro* изучено, что митохондрии в обработанных рицином клетках теряют мембранный потенциал, высвобождают в цитозоль цитохром С с активацией каспазы-9 и -3, которые участвуют в разрушении клеточных структур [65]. Кроме этого, показано стимулирующее влияние рицина на некоторые белки семейства Bcl2, контролирующие выход проапоптотических белков из митохондрий. Существует мнение, что ингибирование синтеза белка, предшествует апоптозу и необходимо для реализации этого процесса. Наряду с этим есть предположение, что в рицин-опосредованном ингибировании синтеза белка и апоптозе могут участвовать два различных мотива, присутствующих в РТА [66], и что РТБ в клетках миелолейкоза человека (U937) способна индуцировать апоптоз посредством своей лектиновой активности без вклада РТА [67].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РИЦИНА

Благодаря прямому цитотоксическому действию рицин может быть использован для разработки новых лекарственных препаратов, направленных на лечение онкологических и аутоиммунных заболеваний. Для таргетной противоопухолевой терапии перспективно создание иммунотоксинов на основе РТА и моноклональных антител. Следует отметить, что при разработке новых препаратов на основе рицина необходимо минимизировать возможные побочные эффекты, связанные с его неспецифическим повреждающим действием на клетки, которое достаточно часто проявляется в гепатотоксическом потенциале и в индукции эндотелиальной гиперпроницаемости. Одно из лимитирующих обстоятельств применения некоторых иммунотоксинов на основе РТА – быстрая наработка в организме нейтрализующих антител [68]. В недавних исследованиях *in vitro* показаны возможности инкорпорации рицина в липосомы на основе катионных производных липидов и нейтральных фосфолипидов с целью таргетной терапии злокачественной меланомы [69]. Авторы делают акцент на необходимости дальнейшего исследования механизмов интернализации и транслокации рицина в цитозоль с целью расширения области его применения в клинической практике, в том числе за счет нанотехнологий.

Использование нанотехнологий (липосомы, нано-антитела, проникающие в клетки пептиды – «cell-penetrating peptides» и др.) также позволяет осуществить внутриклеточную доставку антител, нейтрализующих РТА. Это направление имеет особую актуальность ввиду значительной вероятности отравления рицином, что формирует импульс для поиска новых средств этиотропной и патогенетической терапии.

По-прежнему одно из самых популярных направлений в разработке средств специфической терапии рициновых отравлений – это исследование нейтрализующей активности моноклональных и поликлональных антител (в том числе, химерных и гуманизированных) к РТА и РТБ в экспериментальных моделях на лабораторных животных. Однако, применение антитоксических сывороток ограничено протяженностью «терапевтического окна» (6–8 ч после интоксикации). По его истечению анти-рициновые антитела при проникновении токсина внутрь клетки уже не эффективны в его нейтрализации. Поэтому ученые делают акцент на использовании так называемых «малых молекул», которые могут быть перспективны на этапах взаимодействия рицина с мембранными рецепторами, а также при его интернализации и внутриклеточном транспорте. В качестве кандидатных средств с подобными механизмами действия рассматривают блокаторы ретроградного транспорта (Retro-2), цитохалазин Д, колхицин, аторвастатин, брефельдин А, ауранофин, бацитрацин, байкалин и др. [64].

Препараты, обладающие противовоспалительным и антиапоптотическим действием, широко исследуют как средства неспецифической терапии при рициновых отравлениях. При экспериментальном рицин-индуцированном ОРДС показан положительный эффект антицитокиновой терапии (анакинра, тоцилизумаб, химерные и гуманизированные антитела к ФНО α) [70]. Ингибиторы sPLA₂ (мепакрин), MMP9 (доксциклин), КСО (фебуксостат), VEGF (бевацизумаб, афлиберцепт) могут быть также использованы в качестве эффективных средств противовоспалительной терапии [64]. Особый интерес исследователей направлен на изучение терапевтического потенциала ингибиторов внутриклеточных сигнальных путей МАПК (антагонисты p38 и JNK), NF- κ B (широкий спектр препаратов) и образования инфламмосомы NALP3 (противодиабетическое средство глибурид, субстанция MCC950, некоторые флавоноиды). Авторы подчеркивают важность дальнейшего изучения механизмов реализации провоспалительных путей внутриклеточной сигнализации для разработки новых противовоспалительных препаратов, наиболее эффективно и таргетно действующих при отравлении рицином [64].

Ряд исследователей полагает, что наибольшим терапевтическим потенциалом обладает комбинированное использование рицин-нейтрализующих антител и противовоспалительных/иммуномодулирующих препаратов, в их числе противобактериальные средства: доксициклин и ципрофлоксацин [71, 72].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рицин – высокотоксичное соединение, обладающее способностью оказывать цитотоксическое действие на клетки организма, которое имеет многофакторную природу

и включает в себя не только ингибирующее действие на синтез белка, но также индукцию многочисленных каскадных молекулярных путей, ведущих к гибели клеток. В настоящее время существует гипотеза, свидетельствующая о том, что активация провоспалительных и проапоптотических внутриклеточных сигнальных путей при действии рицина либо предшествует его риботоксическому действию, либо запускается параллельно с инактивацией рибосом. Этот феномен представляет немаловажное значение для внедрения средств специфической и неспецифической терапии отравлений вследствие возрастающей опасности непреднамеренного и целенаправленного воздействия рицином. Детальное понимание особенностей взаимодействия рицина с клеткой-мишенью, индукция при его действии механизмов воспаления и апоптоза – актуальное направление для создания средств профилактики и терапии рициновых отравлений.

Наряду с этим, дальнейшее изучение цитотоксических свойств рицина обеспечит разработку средств таргетной терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний. Поэтому исследование ранних механизмов интернализации и внутриклеточного транспорта рицина необходимо для определения наиболее значимых токсинспецифических компартментов клетки, что представляет интерес при создании лекарственных препаратов направленного действия. Сочетанное ингибирующее действие на синтез белка, а также ранняя индукция механизмов апоптоза раскрывает большие перспективы для использования рицина в качестве противоопухолевого препарата. Применение иммунотоксинов на основе А-цепи рицина и моноклональных антител, специфически взаимодействующих с поверхностными рецепторами – онкомаркерами, позволит прицельно элиминировать опухолевые клетки и минимизировать негативное воздействие на немалигнизированные клетки.

В заключение, следует отметить, что благодаря особенностям строения и токсическим свойствам рибосом служит удобным объектом для изучения механизмов эндоцитоза, везикулярного транспорта, внутриклеточной сортировки и трансмембранного переноса белков, что с учетом доступности белка может быть использовано в медико-биологических исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Polito L., Bortolotti M., Battelli M.G., Calafato G., Bolognesi A. Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin // *Toxins*. 2019. Vol. 11. P. 324. doi: 10.3390/toxins11060324.
2. Lukey B.J. Chemical warfare agents: pharmacology, toxicology and therapeutics, 2007. 567 p.
3. Bolognesi A., Bortolotti M., Maiello S., Battelli M.G., Polito L. Ribosome-inactivating proteins from plants: a historical overview // *Molecules*. 2016. Vol. 21. P. 1627.
4. Olsnes S., Pihl A. Inhibition of peptide chain elongation // *Nature*. 1972. Vol. 238. P. 459–461. doi: 10.1038/238459a0.
5. Funatsu G., Yoshitake S., Funatsu M. Primary structure of Ile chain of ricin D // *Agric. Biol. Chem.* 1978. Vol. 42. P. 501–503. doi: 10.1080/00021369.1978.10863009.
6. 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. Vol. 262. P. 8128–8130.
7. Katzin B.J., Collins E.J., Robertus J.D. Structure of ricin A-chain at 2,5 Å // *Proteins* 1991. Vol. 10. P. 251–259.
8. Montfort W., Villafranca J.E., Monzingo A.F., Ernst S.R., Katzin B. The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å // *J. of Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 5398–5403.
9. Rutenber E., Ready M., Robertus J.D. Structure and evolution of ricin B chain // *Nature*. 1987. Vol. 326. P. 624–626. doi: 10.1038/326624a0.
10. Zentz C., Frenoy J.P., Bourrillon R. Binding of galactose and lactose to ricin. Equilibrium studies // *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. Vol. 536. P. 18–26. doi: 10.1016/0005-2795(78)90047-8.
11. Connor S.J., Paraskevopoulos N., Newman R., Cuan N., Hampartzoumian T., Lloyd A.R., Grimm M.C. CCR2 expressing CD4⁺ T lymphocytes are preferentially recruited to the ileum in Crohn's disease // *Gut*. 2004. Vol. 53. P. 1287–1294. doi: 10.1136/gut.2003.028225.
12. Sowa-Rogozińska N., Sominka H., Nowakowska-Gołacka J., Sandvig K., Słomińska-Wojewódzka M. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin Ricin // *Toxins (Basel)*. 2019. Vol. 18. P. E350. doi: 10.3390/toxins11060350.
13. Olsnes S., Refsnes K., Pihl A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin // *Nature*. 1974. Vol. 249. P. 627–631. doi: 10.1038/249627a0.
14. Simmons B.M., Stahl P.D., Russell J.H. Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. Multiple intracellular pathways for a chain translocation // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 7912–7920.

15. Magnusson S., Kjekken R., Berg T. Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells // *Exp. Cell Res.* 1993. Vol. 205. P. 118–125. doi: 10.1006/excr.1993.1065.
16. Whitfield S.J.C., Griffiths G.D., Jenner D.C., Gwyther R.J., Stahl F.M., Cork L.J., Holley J.L., Green A.C., Clark G.C. Production, characterisation and testing of an ovine antitoxin against ricin; efficacy, potency and mechanisms of action // *Toxins*. 2017. Vol. 9. P. 329. doi: 10.3390/toxins9100329
17. Sandvig K., Olsnes S., Pihl A. Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 74. P. 85–99.
18. Olsnes S. Abrin and ricin structure and mechanism of action of two toxic lectins // *Bull. de l'Inst. Paster.* 1976. Vol. 74. P. 85–99.
19. Audi J., Belson M., Patel M., Schier J., Osterloh J. Ricin poisoning - a comprehensive review // *JAMA*. 2005. Vol. 294. P. 2342–2351. doi: 10.1001/jama.294.18.2342.
20. Roy C.J., Song K., Sivasubramani S.K., Gardner D.J., Pincus S.H. Animal models of ricin toxicosis // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012. Vol. 357. P. 243–257. doi: 10.1007/82_2011_173.
21. He X., Carter J.M., Brandon D.L., Cheng L.W., McKeon T.A. Application of a real time polymerase chain reaction method to detect castor toxin contamination in fluid milk and eggs // *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55. P. 6897–6902. doi: 10.1021/jf0707738.
22. Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins // *Toxicon*. 2004. Vol. 44. P. 361–370. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.003.
23. Worbs S., Köhler K., Pauly D., Avondet M.A., Schaer M., Dorner M.B., Dorner B.G. Ricinus communis intoxications in human and veterinary medicine-a summary of real cases // *Toxins*. 2011. Vol. 3. P. 1332–1372. doi: 10.3390/toxins3101332.
24. Moshiri M., Hamid F., Etemad L. Ricin toxicity: clinical and molecular aspects // *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2016. Vol. 4. P. 60–65.
25. Sandvig K., Spilsberg B., Lauvrak S.U., Torgersen M.L., Iversen T.-G., van Deurs B.O. Pathways followed by protein toxins into cells // *Int. J. Med. Microbiol.* 2004. Vol. 293. P. 483–490. doi: 10.1078/1438-4221-00294.
26. Van Deurs B., Pedersen L.R., Sundan A., Olsnes S., Sandvig K. Receptor-mediated endocytosis of a ricin-colloidal gold conjugate in Vero cells. Intracellular routing to vacuolar and tubulo-vesicular portions of the endosomal system // *Exp. Cell Res.* 1985. Vol. 159. P. 287–304. doi: 10.1016/s0014-4827(85)80003-3.

27. Moya M., Dautry-Varsat A., Goud B., Louvard D., Boquet P. Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin // *J. Cell Biol.* 1985. Vol. 101. P. 548–559. doi: 10.1083/jcb.101.2.548.
28. Van Deurs B., Sandvig K., Petersen O.W., Olsnes S., Simons K., Griffiths G. Routing of internalised ricin and ricin conjugates to the Golgi complex // *J. Cell Biol.* 1986. Vol. 102. P. 37–47. doi: 10.1083/jcb.102.1.37.
29. Sandvig K., van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin // *Physiol. Rev.* 1996. Vol. 76. P. 949–966. doi: 10.1152/physrev.1996.76.4.949.
30. Cosson P., Letourneur F. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs // *Science.* 1994. Vol. 263. P. 1629–1631. doi: 10.1126/science.8128252.
31. Chen A., Hu T., Mikoryak C., Draper R.K. Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1589. P. 124–139. doi: 10.1016/s0167-4889(02)00163-5.
32. Sandvig K., Bergan J., Kavaliauskiene S., Skotland T. Lipid requirements for entry of protein toxins into cells // *Prog. Lipid Res.* 2014. Vol. 54. P. 1–13. doi: 10.1016/j.plipres.2014.01.001.
33. Wesche J., Rapak A., Olsnes S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 34443–34449. doi: 10.1074/jbc.274.48.34443.
34. Roberts L.M., Smith D.C. Ricin: The endoplasmic reticulum connection // *Toxicon.* 2004. Vol. 44. P. 469–472. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.07.002.
35. Deeks E.D., Cook J.P., Day P.J., Smith D.C., Roberts L.M., Lord J.M. The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41. P. 3405–3413. doi: 10.1021/bi011580v
36. Spooner R.A., Lord J.M. How ricin and Shiga toxin reach the cytosol of target cells: retrotranslocation from the endoplasmic reticulum // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012. Vol. 357. P. 19–40. doi: 10.1007/82_2011_154.
37. Polito L., Bortolotti M., Pedrazzi M., Mercatelli D., Battelli M.G., Bolognesi A. Apoptosis and necroptosis induced by stenodactylin in neuroblastoma cells can be completely prevented through caspase inhibition plus catalase or necrostatin-1 // *Phytomedicine.* 2016. Vol. 23. P. 32–41. doi: 10.1016/j.phymed.2015.11.006.

38. Sokołowska I., Wälchli S., Wegrzyn G., Sandvig K., Słomińska-Wojewódzka M. A single point mutation in ricin A-chain increases toxin degradation and inhibits EDEM1-dependent ER retrotranslocation // *Biochem. J.* 2011. Vol. 436. P. 371–385. doi: 10.1042/BJ20101493.
39. Sokołowska I., Piłka E.S., Sandvig K., Wegrzyn G., Słomińska-Wojewódzka M. Hydrophobicity of protein determinants influences the recognition of substrates by EDEM1 and EDEM2 in human cells // *BMC Cell Biol.* 2015. Vol. 16. P. 1. doi: 10.1186/s12860-015-0047-7
40. Becker B., Schnöder T., Schmitt M.J. Yeast reporter assay to identify cellular components of ricin toxin A chain trafficking // *Toxins.* 2016. Vol. 8. P. 366. doi: 10.3390/toxins8120366.
41. Lewis M.J., Pelham H.R.B. A new yeast endosomal SNARE related to mammalian syntaxin 8 // *Traffic.* 2002. Vol. 3. P. 922–929. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.31207.x.
42. Spooner R.A., Watson P.D., Marsden C.J., Smith D.C., Moore K.A.H., Cook J.P., Lord J.M., Roberts L.M. Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum // *Biochem. J.* 2004. Vol. 383. P. 285–293. doi: 10.1042/BJ20040742.
43. Richardson P.T., Westby M., Roberts L.M., Gould J.H., Colman A., Lord J.M. Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 255. P. 15–20. doi: 10.1016/0014-5793(89)81052-x.
44. Spooner R.A., Lord J.M. Ricin trafficking in cells // *Toxins.* 2015. Vol. 7. P. 49–65. doi: 10.3390/toxins7010049.
45. Argent R.H., Parrott A.M., Day P.J., Roberts L.M., Stockley P.G., Lord J.M., Radford S.E. Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 9263–9269. doi: 10.1074/jbc.275.13.9263.
46. Słomińska-Wojewódzka M., Pawlik A., Sokołowska I., Antoniewicz J., Wegrzyn G., Sandvig K. The role of EDEM2 compared with EDEM1 in ricin transport from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *Biochem. J.* 2014. Vol. 457. P. 485–496. doi: 10.1042/BJ20130155.
47. Grela P., Szajwaj M., Horbowicz-Drożdżał P., Tchórzewski M. How ricin damages the ribosome // *Toxins (Basel).* 2019. Vol. 11. P. E241. doi: 10.3390/toxins11050241.
48. Grela P., Sawa-Makarska J., Gordiyenko Y., Robinson C.V., Grankowski N., Tchórzewski M. Structural properties of the human acidic ribosomal P proteins forming the P1-P2 heterocomplex // *J. Biochem.* 2008. Vol. 143. P. 169–177. doi: 10.1093/jb/mvm207.
49. Lee K.-M., Yu C.W.-H., Chiu T.Y.-H., Sze K.-H., Shaw P.-C., Wong K.-B. Solution structure of the dimerization domain of the eukaryotic stalk P1/P2 complex reveals the structural organization of eukaryotic stalk complex // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40. P. 3172–3182. doi: 10.1093/nar/gkr1143.

50. Grela P., Li X.-P., Horbowicz P., D'zwierzyńska M., Tchórzewski M., Tumer N.E. Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 5608. doi: 10.1038/s41598-017-05675-5
51. Grela P., Li X.-P., Tchórzewski M., Tumer N.E. Functional divergence between the two P1-P2 stalk dimers on the ribosome in their interaction with ricin A chain // *Biochem. J.* 2014. Vol. 460. P. 59–67. doi: 10.1042/BJ20140014.
52. Li X.-P., Tumer N.E. Differences in ribosome binding and sarcin/ricin loop depurination by shiga and ricin holotoxins // *Toxins.* 2017. Vol. 9. P. 133. doi: 10.3390/toxins9040133.
53. Endo Y., Gluck A., Wool I.G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis // *J. Mol. Biol.* 1991. Vol. 221. P. 193–207. doi: 10.1016/0022-2836(91)80214-f.
54. Jasheway K., Pruet J., Anslyn E.V., Robertus J.D. Structure-based design of ricin inhibitors // *Toxins (Basel).* 2011. Vol. 3. P. 1233–1248. doi: 10.3390/toxins3101233.
55. Wahome P.G., Robertus J.D., Mantis N.J. Small-molecule inhibitors of ricin and Shiga toxins // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012. Vol. 357. P. 179–207. doi: 10.1007/82_2011_177.
56. Kim Y., Mlsna D., Monzingo A.F., Ready M.P., Frankel A., Robertus J.D. Structure of a ricin mutant showing rescue of activity by a noncatalytic residue // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31. P. 3294–3296. doi: 10.1021/bi00127a035.
57. Fabbrini M.S., Katayama M., Nakase I., Vago R. Plant ribosome-inactivating proteins: progresses, challenges and biotechnological applications (and a few digressions) // *Toxins (Basel).* 2017. Vol. 9. P. 314. doi: 10.3390/toxins9100314.
58. Szajwaj M, Wawiórka L, Molestak E, Michalec-Wawiórka B, Mołoń M, Wojda I, Tchórzewski M. The influence of ricin-mediated rRNA depurination on the translational machinery in vivo – new insight into ricin toxicity // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Molecular Cell Research.* 2019. Vol. 1866. Is. 12. Art. 118554. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118554
59. Sapoznikov A., Gal Y., Falach R., Sagi I., Ehrlich S., Lerer E., Makovitzki A., Aloschin A., Kronman C., Sabo T. Early disruption of the alveolar-capillary barrier in a ricin-induced ARDS mouse model: neutrophil-dependent and -independent impairment of junction proteins // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2019. Vol. 316, № 1. P. L255–L268. doi: 10.1152/ajplung.00300.2018.
60. Soler-Rodriguez A.S., Ghattie M., Oppenheimer-Marks N., Uhr J.W., Vitetta E.S. Ricin A-chain and ricin A-chain immunotoxins rapidly damage human endothelial cells: implications

- for vascular leak syndrome // *Exp. Cell Res.* 1993. Vol. 206. P. 227–234. doi: 10.1006/excr.1993.1142.
61. Wong J., Korcheva V., Jacoby D.B., Magun B.E. Proinflammatory responses of human airway cells to ricin involve stress-activated protein kinases and NF-kappaB // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007. Vol. 293, № 6. P. L1385–L1394. doi: 10.1152/ajplung.00207.2007.
62. Lindauer M., Wong J., Magun B. Ricin toxin activates the NALP3 inflammasome // *Toxins (Basel)*. 2010. Vol. 2, № 6. P. 1500–1514. doi: 10.3390/toxins2061500.
63. Dong M, Yu H, Wang Y, Sun C, Chang Y, Yin Q, Zhao G, Xu N, Liu W. Critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) in ricin toxin-induced inflammatory responses in macrophages // *Toxicol. Lett.* 2020. Vol. 321. P. 54–60. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.12.021.
64. Gal Y., Mazor O., Falach R., Sapoznikov A., Kronman C., Sabo T. Treatments for pulmonary ricin intoxication: current aspects and future prospects // *Toxins (Basel)*. 2017. Vol. 9, № 10. P. 311. doi: 10.3390/toxins9100311.
65. Tesh V.L. The induction of apoptosis by Shiga toxins and ricin // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012. Vol. 357. P. 137–178. doi: 10.1007/82_2011_155.
66. Baluna R., Coleman E., Jones C., Ghetie V., Vitetta E.S. The Effect of a Monoclonal Antibody Coupled to Ricin A Chain-Derived Peptides on Endothelial Cells in Vitro: Insights into Toxin-Mediated Vascular Damage // *Exp. Cell Res.* 2000. Vol. 258. P. 417–424. doi: 10.1006/excr.2000.4954.
67. Hasegawa N., Kimura Y., Oda T., Komatsu N., Muramatsu T.H.-J. Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. Vol. 64. P. 1422–1429. doi: 10.1271/bbb.64.1422.
68. Tyagi N., Tyagi M., Pachauri M., Ghosh P.C. Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances // *Tumour Biol.* 2015. Vol. 36, № 11. P. 8239–8246. doi: 10.1007/s13277-015-4028-4.
69. Bich Loan N.T., Trung N.N., Le Na N.T., Thang N.D. Anticancer activities of ricin-liposome complexes on SKMEL-28 cells // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2019. Vol. 20, № 7. P. 2117–2123. doi: 10.1007/s13277-015-4028-4.
70. Lindauer M.L., Wong J., Iwakura Y., Magun B.E. Pulmonary inflammation triggered by ricin toxin requires macrophages and Il-1 signaling // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. P. 1419–1426. doi: 10.4049/jimmunol.0901119.
71. Gal Y., Mazor O., Alcalay R., Seliger N., Aftalion M., Sapoznikov A., Falach R., Kronman C., Sabo T. Antibody/doxycycline combined therapy for pulmonary ricinosis: attenuation of

- inflammation improves survival of ricin-intoxicated mice // *Toxicol Rep.* 2014. Vol. 1. P. 496–504. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.07.013.
72. Gal Y., Sapoznikov A., Falach R., Ehrlich S., Aftalion M., Sabo T., Kronman C. Potent antiedematous and protective effects of ciprofloxacin in pulmonary ricinosis // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, № 12. P. 7153–7158. doi: 10.1128/AAC.01696-16.