

ИН ВИТРО ЦИТОТОКСИЧЕН ЕФЕКТ НА ИНХИБИРАЩ ПЕПТИД, ИЗОЛИРАН ОТ ЕНТЕРОЦИТИ НА СВИНЕ, ВЪРХУ НЯКОИ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ

*Мариан М. Драганов**, *Борислав Б. Трифонов***,
*Огнян К. Аргиров****, *Георги К. Русев*****
ПУ „Паисий Хилендарски“ — катедра Биология

Abstract

A water soluble extract was isolated from pig small intestinal epithelium through an original industrial technology. It was tested for biological activity on cell cultures: L 5178Y (mouse lymphoma assay) and 3T3 (mouse fibroblasts). The extract was purified by gel chromatography on Sephadex G-25 Medium column. It was detected biological activity fraction (BAF) with molecular weight of approximately 4500 D. This result was confirmed by HPLC chromatography on Silica gel column. The cells from cell lines: Hep2; FL; CHO were treated for cytotoxic investigations according to NR and KBP tests.

Key words: small intestinal epithelium, Inhibitor, cell proliferation, cell cultures, cell regulation.

Регулацията на пролиферацията у еукариотните клетки се осъществява с помощта на механизъм на строг контрол, при който определящ фактор се явява равновесието между стимулиращи и инхибиращи ендогенни продукти, Bjercknes and Iversen (1974).

До началото на 80-те години са били изолирани и изследвани ендогенни инхибитори от 21 типа клетки и тъкани, но не са били получени в химически чист вид, Балаж и Блажек (1982).

За екстракт от ентероцити с инхибиращо влияние върху клетъчната пролиферация съобщава Tutton (1975). Инхибитор със сходна функция и

* ПУ „Паисий Хилендарски“, кат. Обща биология, ул. „Цар Асен“ № 24, 4000 Пловдив

** МУ Пловдив, кат. по Физиология, ул. „В. Априлов“ № 15, 4000 Пловдив

*** ПУ „Паисий Хилендарски“, кат. Органична химия, ул. „Цар Асен“ № 24, 4000 Пловдив

**** ВМА — София, ул. „Г. Софийски“ № 1, 1400 София

молекулна маса $2 \cdot 10^3$ е изолиран от възрастни пльхове и ембриони от Gajaard et al. (1972); Philpott (1971). Sassier and Bergeron (1977) получават екстракт от тънки черва на заек и отделят фракция *F*, която обратимо инхибира ин виво деленето на клетките на тънките и дебелия черва, но не действа на клетките на бъбреците и черния дроб. Trifonov et al. (1989) в *екстракт* от тънки черва на кучета доказват 7 инхибитора с общоклетъчно действие, един локализирано-специфичен и четири индуктивно действащи, като на един от последната категория инхибитори, изолиран от дистален илеум с молекулна маса 940 D, е определена и химичната структура — Arg — Asp — Asp — His — Arg — NH₂. Scraastad and Reichelt (1989) изолират кейлон от тънки черва на мишки, инхибиращ епителната митоза на колона, който е бил идентифициран като трипептид pGlu — His — Gly — OH.

В настоящата работа сме си поставили за цел да изследваме влиянието на един нов интестинален нуклеопептид ин витро върху клетки от клетъчни линии: Hep2, FL, CHO.

Материал и методи

Екстрактът от тънчочревна мукоза е получен при промишлени условия по оригинална методика на Трифонов и др. 1990. Пречиства се на гел-хроматографска колона със *Sephadex G-25 Medium*, Trifonov et al. (1994) и е определена биологично-активната фракция (БАФ), като нуклеопептид с молекулна маса около 4500 D. В експеримента БАФ е използвана в крайни концентрации: 300, 250, 200, 150, 100, 50 мкг/мл.

Използваните клетки от клетъчни линии — FL (аминионна тъкан от човек), Hep2 (епидермоидна карцинома от ларинкс на човек), ни бяха любезно предоставени от д-р Мандулов, лаборатория по Вирусология — ХЕИ, гр. Пловдив. Клетъчна линия CHO (клетки от овариум на китайски хамстер) получихме от д-р Браварова, Лаборатория по клетъчни култури, Институт по Вирусология, гр. София.

Клетките от клетъчни линии FL и Hep2 са отглеждани в хранителна среда DMEM (SERVA), обогатена с 10% телешки серум. CHO клетките са култивирани в хранителна среда Ham's F12 (SERVA) + 10% телешки серум. Всички клетъчни култури са поддържани в термостат Heraeus (Germany) при 37° C, 5% ниво на CO₂ и висока влажност. Култивирането провеждаме в стъклени епруветки от 10 см³ — Leighton Tube (FLOW), 100 см³ — Почишки, 250 см³ — Brockway (FLOW) и 24 гнездови плаки за клетъчни култури Falcon (Becton Dickinson). Клетките са довеждани до суспензионно състояние чрез трипсинизация INVITTOX Protocol (1992). Клетъчната численост на суспензията определяхме в бройтелна камера.

Ход на експеримента: Суспензия от FL, Hep2 и CHO клетки с гъстота $4 \cdot 10^4$ кл/мл и $1,5 \cdot 10^4$ кл/мл са залагани в пластмасови 24 гнездови плаки. След 24 часа, оценяйки тяхното състояние в инвертен микроскоп Karl Zeiss, бяха третирани с БАФ в избраните концентрации, а контролите са третирани с тройно дестилирана вода. След 24 часа инкубационно време е проведен анализ за тяхното състояние и визуална оценка на тяхното морфологично състояние и цитотоксични увреждания. Направената количествена цитотоксична оценка е по NR и KBP тестове Babich and Borenfreund (1987); Riddel et al. (1986). Измерването на E_{540 nm} е проведено на Specol — 11 (Karl Zeiss).

Таблица 1 Клетки от клетъчна линия Hep2 (клетъчна гъстота — 4.10^4 кл/мл), третирани с БАФ за 24 часа. Стойностите са по NR* и KBP — тестове.
Cells from cell line Hep2 (cell density — 4.10^4 cells/ml) treated with BAF for 24 hours. The values obtained are from NR* and KBP tests.

Конц. в мкг/мл	Екстинция при 540 нм	$\bar{X} \pm SD$	% оцелели кл/контр.
300	*0.479; 0.455; 0.461; 0.450; 0.467; 0.455 0.695; 0.690; 0.669; 0.708; 0.694; 0.728	0.461 0.010 0.697 0.020	*80.5 84.8
250	*0.493; 0.489; 0.485; 0.501; 0.476; 0.508 0.723; 0.722; 0.716; 0.722; 0.726; 0.718	0.490 0.011 0.721 0.005	*85.7 87.5
200	*0.513; 0.509; 0.499; 0.520; 0.521; 0.530 0.751; 0.750; 0.748; 0.759; 0.762; 0.760	0.515 0.011 0.755 0.006	*90 91.6
150	*0.529; 0.521; 0.537; 0.527; 0.522; 0.536 0.801; 0.788; 0.782; 0.780; 0.780; 0.798	0.529 0.007 0.788 0.009	*92.4 95.6
100	*0.539; 0.563; 0.567; 0.555; 0.571; 0.569 0.820; 0.810; 0.833; 0.813; 0.822; 0.799	0.564 0.006 0.816 0.012	*98.6 99
50	*0.564; 0.570; 0.573; 0.578; 0.589; 0.570 0.830; 0.815; 0.814; 0.815; 0.825; 0.822	0.574 0.009 0.820 0.006	*100 99.5
К	*0.575; 0.570; 0.575; 0.572; 0.569; 0.572 0.830; 0.829; 0.832; 0.822; 0.816; 0.814	0.572 0.003 0.824 0.008	

Таблица 2 Клетки от клетъчна линия Hep2 (клетъчна гъстота — $1.5.10^4$ кл/мл), третирани с БАФ за 24 часа. Стойностите са по NR* и KBP — тестове.
Cells from cell line Hep2 (cell density — $1.5.10^4$ cells/ml) treated with BAF for 24 hours. The values obtained are from NR* and KBP tests.

Конц. в мкг/мл	Екстинция при 540 нм	$\bar{X} \pm SD$	% оцелели кл/контр.
300	*0.103; 0.100; 0.095; 0.105; 0.095; 0.108 0.300; 0.300; 0.287; 0.299; 0.287; 0.287	0.101 0.005 0.293 0.007	*48.5 52.5
250	*0.109; 0.124; 0.110; 0.124; 0.115; 0.119 0.382; 0.384; 0.381; 0.399; 0.405; 0.391	0.117 0.007 0.390 0.010	*56.3 69.4
200	*0.126; 0.120; 0.125; 0.134; 0.128; 0.130 0.408; 0.405; 0.414; 0.426; 0.419; 0.399	0.127 0.005 0.412 0.010	*61 73.3
150	*0.170; 0.174; 0.165; 0.173; 0.159; 0.160 0.510; 0.497; 0.494; 0.503; 0.513; 0.515	0.167 0.006 0.505 0.010	*80.2 89.8
100	*0.183; 0.174; 0.188; 0.191; 0.180; 0.184 0.508; 0.515; 0.500; 0.525; 0.534; 0.522	0.183 0.006 0.517 0.012	*87.9 91.8
50	*0.224; 0.201; 0.207; 0.199; 0.209; 0.217 0.560; 0.539; 0.553; 0.571; 0.565; 0.548	0.209 0.009 0.559 0.010	*100 99.5
К	*0.208; 0.204; 0.220; 0.201; 0.212; 0.203 0.553; 0.555; 0.560; 0.571; 0.566; 0.569	0.208 0.007 0.562 0.007	

Резултати

В таблица 1 и 2 са отразени резултатите, получени при третиране с БАФ на Нер2 клетките за 24 часа. Данните за NR и KBP — тестовете са отразени в обща таблица, като стойностите по NR теста са означени със знак (*). При концентрация 300 мкг/мл БАФ, 80,5% са оцелелите клетки с гъстота на клетъчната плътност 4.10^4 кл/мл и 48,5% при по-ниската $1,5.10^4$ кл/мл по NR-теста, а по KBP-теста тези стойности са съответно: 84,8% и 52,5% оцелели клетки. При понижаване на концентрацията на 250 мкг/мл от БАФ, нараства процентът оцелели клетки до 85,7% при по-високата клетъчна плътност и 56,3% за пробите с по-ниска клетъчна плътност, отчетени по теста с неутрал ред, а измерването на общия белтък показва съответно стойности от 87,5% и 69,4% за пробите с различна клетъчна гъстота. Тенденцията за нарастване на процента оцелели клетки при понижаване на концентрацията на БАФ се запазва и в двата теста, и при използване на проби с различна клетъчна плътност. Така при 200 мкг/мл концентрация на тест-агента имаме 90% и 61% по NR и 91,6% и 73,3% по KBP-теста. За концентрации: 150, 100 и 50 мкг/мл смъртността намалява още повече, като оцелелите клетки са в границите между 80% — 100% за двете клетъчни гъстоти, отчетани по двата теста. При концентрация 50 мкг/мл от БАФ оцелелите клетки се изравняват с пробите на контролните клетки, като по NR-теста те са 100%, а по KBP-теста те са съответно 99,5% както за пробите с клетъчна гъстота 4.10^4 кл/мл, така и $1,5.10^4$ кл/мл. Резултатите за клетките от клетъчна линия FL, третирани при същите условия, и концентрации на БАФ при двете клетъчни плътности са отразени в таблици 3 и 4.

Таблица 3 Клетки от клетъчна линия FL (клетъчна гъстота — 4.10^4 кл/мл), третирани с БАФ за 24 часа. Стойностите са по NR* и KBP — тестове.
Cells from cell line FL (cell density — 4.10^4 cells/ml) treated with BAF for 24 hours. The values obtained are from NR* and KBR tests.

Конц. в мкг/мл	Екстинция при 540 нм	$\bar{X} \pm SD$	% оцелели кл/контр.
300	*0.252; 0.273; 0.267; 0.272; 0.259; 0.272 0.575; 0.561; 0.564; 0.604; 0.597; 0.585	0.266 0.008 0.579 0.019	*73.2 91.5
250	*0.329; 0.326; 0.320; 0.333; 0.338; 0.329 0.600; 0.597; 0.600; 0.579; 0.599; 0.569	0.329 0.006 0.598 0.016	*90.4 94.5
200	*0.343; 0.335; 0.332; 0.329; 0.343; 0.342 0.624; 0.595; 0.600; 0.580; 0.612; 0.618	0.337 0.006 0.604 0.016	*92.7 95.4
150	*0.366; 0.358; 0.366; 0.350; 0.344; 0.361 0.625; 0.614; 0.615; 0.617; 0.627; 0.619	0.357 0.009 0.620 0.005	*98.2 97.9
100	*0.357; 0.371; 0.350; 0.366; 0.369; 0.356 0.613; 0.618; 0.639; 0.642; 0.625; 0.643	0.362 0.008 0.630 0.013	*100 99
50	*0.365; 0.364; 0.359; 0.370; 0.368; 0.370 0.628; 0.657; 0.630; 0.624; 0.642; 0.634	0.366 0.004 0.636 0.012	*100 100
K	*0.338; 0.384; 0.355; 0.369; 0.375; 0.350 0.615; 0.641; 0.629; 0.622; 0.644; 0.648	0.362 0.016 0.633 0.013	

Таблица 4 Клетки от клетъчна линия FL (клетъчна гъстота — $1,5 \cdot 10^4$ кл/мл), третирани с БАФ за 24 часа. Стойностите са по NR* и KBP — тестове.
Cells from cell line FL (cell density — $1,5 \cdot 10^4$ cells/ml) treated with BAF for 24 hours. The values obtained are from NR* and KBP tests.

Конц. в мкг/мл	Екстинция при 540 нм	$\bar{X} \pm SD$	% оцелели кл/контр.
300	*0.008; 0.006; 0.009; 0.004; 0.010; 0.011 0.055; 0.048; 0.051; 0.052; 0.058; 0.056	0.008 0.003 0.053 0.004	*12 32.3
250	*0.029; 0.021; 0.026; 0.021; 0.029; 0.023 0.098; 0.090; 0.092; 0.098; 0.089; 0.096	0.025 0.004 0.094 0.006	*37.8 57.3
200	*0.040; 0.036; 0.052; 0.044; 0.032; 0.037 0.113; 0.122; 0.108; 0.109; 0.120; 0.116	0.040 0.007 0.114 0.006	*60.6 69.5
150	*0.048; 0.048; 0.066; 0.046; 0.058; 0.053 0.141; 0.130; 0.131; 0.142; 0.130; 0.144	0.053 0.007 0.136 0.007	*80.3 82.7
100	*0.072; 0.068; 0.063; 0.061; 0.069; 0.066 0.143; 0.142; 0.156; 0.156; 0.152; 0.142	0.066 0.004 0.149 0.005	*100 90.8
50	*0.066; 0.059; 0.065; 0.069; 0.069; 0.065 0.169; 0.155; 0.172; 0.158; 0.163; 0.156	0.064 0.003 0.162 0.007	*96.9 98.8
К	*0.052; 0.074; 0.059; 0.074; 0.068; 0.070 0.167; 0.170; 0.158; 0.158; 0.171; 0.160	0.066 0.008 0.164 0.005	

За концентрациите от 50 мкг/мл до 250 мкг/мл инхибиращ пептид се наблюдава един висок процент на оцеляване на клетките при пробите с клетъчна плътност $4 \cdot 10^4$ кл/мл. Така например те са 100% по NR-теста и 99% по KBP-теста, а 90,4% и 94,5% по теста с неутрал ред и за общ белтък при 250 мкг/мл от изследваната БАФ. При най-високата използвана концентрация 300 мкг/мл имаме 73,2% по NR и 91,5% по KBP оцелели клетки спрямо контролата, когато клетъчната плътност е $4 \cdot 10^4$ кл/мл, докато при същата концентрация на БАФ, но с гъстота на клетките в пробите $1,5 \cdot 10^4$ кл/мл, само 12% са оцелелите клетки по NR и 32,3% по KBP-теста. При същите условия, но третирани с 250 мкг/мл концентрация на тест-агента, стойностите са 37,8% и 57,3% по двата теста. Когато клетките са подложени на въздействието на инхибиращия пептид за 24 часа при концентрация 200 мкг/мл, то и по двата теста е отчетена смъртност, по-ниска от 50%, респективно стойностите на оцелелите клетки в тези проби са 60,6% с NR и 69,5% по теста за тотален протеин. За концентрации, по-ниски от 150 мкг/мл от БАФ, стойностите на оцелелите клетки спрямо контролните клетки се увеличават, потвърждавайки зависимостта доза—ефект, като обхващат границите от 80 до 99% оцелели клетки и по двата теста.

Таблица 5 Клетки от клетъчна линия СНО (клетъчна гъстота — 4.10^4 кл/мл), третиран с БАФ за 24 часа. Стойностите са по NR* и KBP — тестове.
Cells from cell line СНО (cell density — 4.10^4 cells/ml) treated with BAF for 24 hours. The values obtained are from NR* and KBP tests.

Конц. в мкг/мл	Екстинция при 540 нм	$\bar{X} \pm SD$	% оцелили кл./контр.
300	*0.268; 0.270; 0.274; 0.259; 0.266; 0.276 0.624; 0.636; 0.630; 0.619; 0.622; 0.626	0.268 0.006 0.626 0.006	*69.2 80
250	*0.306; 0.317; 0.301; 0.305; 0.314; 0.321 0.686; 0.693; 0.684; 0.688; 0.697; 0.696	0.311 0.007 0.691 0.005	*80.4 88.4
200	**		**
150	*0.387; 0.394; 0.392; 0.382; 0.384; 0.387 0.789; 0.777; 0.778; 0.783; 0.787; 0.781	0.387 0.005 0.783 0.005	*100 100
100	*0.385; 0.386; 0.391; 0.396; 0.385; 0.387 0.793; 0.787; 0.780; 0.783; 0.791; 0.788	0.388 0.004 0.787 0.005	*100 100
50	*0.390; 0.386; 0.379; 0.386; 0.393; 0.381 0.793; 0.779; 0.780; 0.791; 0.776; 0.790	0.386 0.005 0.785 0.007	*99.8 100
К	*0.380; 0.375; 0.396; 0.399; 0.385; 0.387 0.780; 0.796; 0.785; 0.775; 0.780; 0.778	0.387 0.009 0.782 0.007	

** Нестерилни проби

Резултатите в таблица 5 са получени при третиране на клетки от клетъчна линия СНО с клетъчна плътност на пробите 4.10^4 кл/мл. За концентрации 300 и 250 мкг/мл от БАФ стойностите са между 69,2% и 88,4% оцелили клетки и по двата теста. За концентрации, по-ниски от 150 мкг/мл, увреждания, получени в резултат на въздействие на инхибиращия пептид, не се отчитат и по двата теста и оцеляемостта на клетките е колкото тази на клетките в контролните проби. За концентрация 200 мкг/мл данни липсват, поради контаминиране на пробите. Това не би могло да повлияе анализа и оценките за цитотоксичното влияние на гест-агента, тъй като зависимостта доза—ефект е съпоставима с резултатите, получени в други изследвания. При гъстота $1,5.10^4$ кл/мл от СНО клетъчна линия (табл. 6), дори при концентрация 50 мкг/мл от БАФ, влиянието се изразява с 83% по NR и 83,4% оцелили клетки по KBP-теста.

Таблица 6 Клетки от клетъчна линия СНО (клетъчна гъстота — $1,5 \cdot 10^4$ кл./мл), третирани с БАФ за 24 часа. Стойностите са по NR* и КВР — тестове.
Cells from cell line CHO (cell density — $1,5 \cdot 10^4$ cells/ml) treated with BAF for 24 hours.
The values obtained are from NR* and KBP tests.

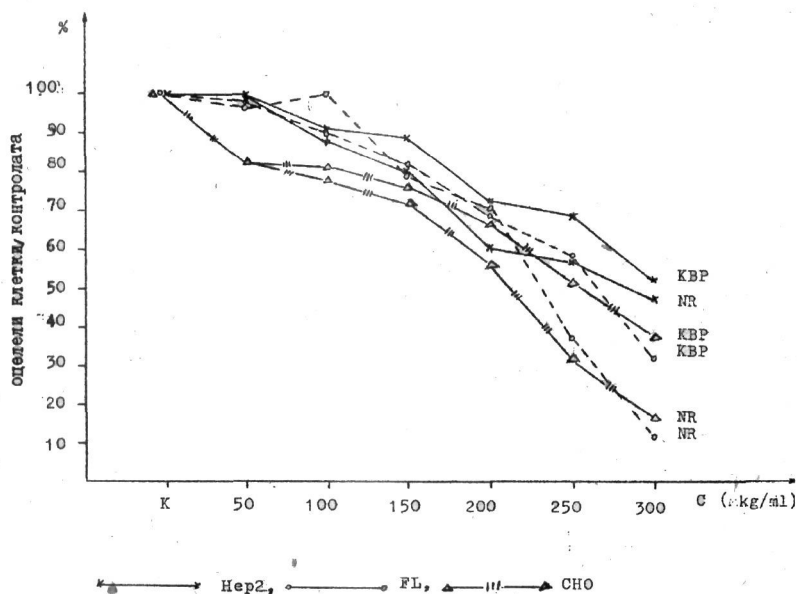
Конц. в мкг/мл	Екстинция при 540 нм	$\bar{X} \pm SD$	% оцелели кл./контр.
300	*0.042; 0.040; 0.036; 0.037; 0.037; 0.043 0.195; 0.209; 0.193; 0.191; 0.208; 0.211	0.039 0.003 0.201 0.009	*17 38.3
250	*0.073; 0.079; 0.075; 0.080; 0.081; 0.074 0.272; 0.274; 0.263; 0.278; 0.275; 0.264	0.077 0.004 0.271 0.006	*33.6 51.7
200	*0.131; 0.128; 0.130; 0.124; 0.128; 0.126 0.344; 0.343; 0.335; 0.362; 0.339; 0.336	0.128 0.008 0.348 0.013	*55.9 66.4
150	*0.168; 0.156; 0.170; 0.171; 0.178 0.397; 0.410; 0.389; 0.405; 0.383	0.168 0.008 0.397 0.009	*73.4 75.8
100	*0.182; 0.185; 0.182; 0.180; 0.180; 0.178 0.425; 0.419; 0.417; 0.422; 0.423; 0.435	0.181 0.003 0.425 0.007	*79 81.2
50	*0.187; 0.199; 0.194; 0.190; 0.181; 0.192 0.450; 0.429; 0.425; 0.433; 0.445; 0.440	0.190 0.006 0.437 0.009	*83 83.4
К	*0.241; 0.236; 0.223; 0.228; 0.222; 0.226 0.530; 0.522; 0.531; 0.526; 0.517; 0.520	0.229 0.007 0.524 0.004*	

Значително е количеството на увредените клетки, когато те са третирани с 300 мкг/мл от инхибиращия пептид — 17% по NR и 38,3% по КВР-теста са получените стойности. Над 50% оцелели клетки са получени за концентрация 250 мкг/мл БАФ, и то само по КВР-теста — 51,7%, а по NR е едва 33,6%. Стойностите 55,9% и 66,4% са получени за концентрация 200 мкг/мл, което показва, че смъртността и по двата теста е по-ниска от 50% спрямо контролата. При 150 и 100 мкг/мл концентрация на БАФ, процентът на оцелелите клетки спрямо контролата е между 70 и 82%, отчетени и по двата теста. От таблици 2, 4 и 6 се вижда, че се получават стойности, които са по-ниски от половината от оцелелите клетки спрямо контролата. Това ни позволява да изчислим IC_{50} (теоретически намерената концентрация, при която клетъчната пролиферация се инхибира с 50%). За Нер2 клетките $IC_{50} = 290,4$ мкг/мл по NR-теста и $IC_{50} > 300$ мкг/мл по КВР. За клетките от клетъчна линия FL те са съответно $IC_{50} = 223,2$ мкг/мл и $IC_{50} = 264,4$ мкг/мл, а за СНО клетките по NR-теста се получава, че $IC_{50} = 213,2$ мкг/мл и $IC_{50} = 256,4$ мкг/мл по КВР-теста.

Дискусия

Първоначалната оценка за биологичната активност на БАФ бе проведена и върху трите клетъчни линии при клетъчна плътност на пробите $4 \cdot 10^4$ кл./мл. От изложените резултати е видно, че влиянието на интестиналния пептид не е показателно, особено за ниските концентрации: 50, 100 и дори 150 мкг/мл. При най-високата концентрация 300 мкг/мл от БАФ се отчита и по двата теста инхибиране на пролиферацията. Стойностите по NR-теста са между 69,2% за СНО клетките и 80,5% за Нер2 клетките, а по КВР-теста те са от 80%

оцеляемост за CHO до 91,5% FL клетките. Зависимостта доза—ефект е много слабо изразена и за концентрации под 200 мкг/мл тя практически трудно би могла да се оцени. Тази зависимост ясно се очертава, когато третираните клетки са с клетъчна плътност $1,5 \cdot 10^4$ кл/мл. Графично това е демонстрирано на фигура 1.



Фиг. 1. Динамика на зависимостта доза-ефект за клетките от клетъчни линии: Hep2, FL, CHO.
Dynamics of the dose-effect correlation for cells from cell lines: Hep2, FL, CHO.

Проследявайки динамиката на зависимостта доза — ефект се вижда, че тя е най-добре изразена за CHO и FL клетките, което се потвърждава и от сравняването на IC_{50} стойностите на изследваните клетки. И по двата теста те са най-ниски за CHO и FL клетките, а за Hep2 клетките IC_{50} е по-ниска от 300 мкг/мл. Количествената оценка на цитотоксичния ефект, направена по NR и KBP-теста, бе допълнена от визуалното наблюдение в нативните препарати. При това наблюдение се установи, че още на 8-12 час от началото на третирането с тестирания пептид се забелязват морфологични отклонения в сравнение с контролните нетретираните клетки. Цитоплазмата се вакуолизира, клетките се окръглят и лесно се отделят от субстрата при разклащане на съдовете за култивиране. Това са указания за необратими увреждания, които имат летален характер за клетките. Тези анализи съвпадат с оценките, направени за мишите лимфомни клетки от клетъчна линия L5178Y и мишите фибробласти от клетъчна линия 3T3, Trifonov et al. (1994). Сравнявайки IC_{50} стойностите на изследваните клетъчни линии: Hep2, FL, CHO с тези стойности, изчислени и за клетки от клетъчни линии: МДСК, HeLa, RD и други (непубликувани резултати), трудно би могло да се заключи, че клетките от определена клетъчна

линия реагират избирателно на въздействието на инхибиращия пептид. Напротив, тези резултати биха потвърдили предположението, че този интестинален пептид може да се отнесе по категориите, дадени от Trifonov et al. (1989) към пептиди с общоклетъчно инхибиращо действие, като механизъмът на цитотоксичното въздействие е сходен. Силата на този ефект е значително повлияна от клетъчната плътност на третираните култури както при лепящите, така и при суспензионните клетъчни култури. Корелацията е интересна и предполага по-нататъшни изследвания за инхибиращия интестинален пептид не само върху стабилни клетъчни култури, но и върху клетки в първични клетъчни култури.

ЛИТЕРАТУРА

- Балаж, А., И. Блажек. 1982. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. Москва, Мир, с. 302.
- Трифонов, Б., Т. Русев, Н. Бошев, Г. Тянев. 1990. Метод за получаване на биостимулиращо вещество. Патент № 49 927 МПК А61 К 37/02 с държавен рег. № 92322 София.
- Babich, K., E. Borenfreund. 1987. Structure-Activity Relationship (SAR) models established in vitro with the Neutral red cytotoxicity assay. Toxic. in vitro. 1, 1: 3-9.
- Bjerknes, R., O. H. Iversen. 1974. „Antichalone“: a theoretical treatment of the possible role of the antichalone in the growth control system. Acta path. microbiol. scand. Sect. A 248: 33-42.
- Gajaard, H., W. Meer — Fleggen, J Van Der Giessen. 1972. Feedback control by functional epithelium. Exp. Cell Res. 73: 197-207.
- INVITOX. The ERGATT FRAME. 1992. Balb c 3T3 Cytotoxicity test. Data bank of in vitro techniques in toxicology. Protocol 46.
- Philpott, G. W. 1971. Tissue-specific inhibition of cell proliferation in embryonic stomach epithelium in vitro. Gastroenterology, 61: 25-35.
- Riddel, R. L., R. H. Glothier, M. Bolls. 1986. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assay. Fd. Chem. Toxic. 24, 6/7: 469-471.
- Sassier, P., M. Bergeron. 1977. Specific inhibition of cell proliferation in the mouse intestine an aqueous extract of rabbit small intestine. Cell Tissue Kinet., 10: 223-231.
- Scraastad, O., K. L. Reichelt. 1989. An endogenous colon mitosis inhibitor reduces proliferation of colon carcinoma cells (HT 29) in serum restricted medium. Virchows Archiv B Cell Pathol., 56, 16: 393-396.
- Trifonov, B., L. Gabrovcsa, G. Rousev, N. Boshev. 1989. Isolation and Action Enterocytogenins. F. E. C. S. Fifth International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Activity Natural Products. Varna, Conference Proceedings. 3: 423-426.
- Trifonov, B., M. Draganov, G. Rousev, O. Argirov, E. Kamberov. 1994. Biological effects of a novel intestinal peptid-inhibiting Enterocytogenin on cultured 3T3 mouse fibroblasts and L 5178 mouse lymphoma cells. Regulatory peptides. 51: 111-119.
- Tutton, P. J. M. 1973. Control of epithelial cell proliferation in the small intestinal/scrypt. Cell Tissue Kinet. 8: 259-266.

IN VITRO CYTOTOXIC EFFECT OF INHIBITING PEPTIDE, ISOLATED FROM PIG ENTEROCYTE ON SOME CELL CULTURES

*Marian M. Draganov**, *Borislav B. Trifonov***,
*Ognian Arzirov****, *George K. Rousev*****

(Summary)

A novel inhibiting peptide isolated from pig intestinal epithelium was studied on a cell cultures. The cells from cell lines: Hep2, FL, CHO were tested with cell density $4 \cdot 10^4$ /ml and $1,5 \cdot 10^4$ /ml. The cells were grown for 24 hours in the presence of bioactivity fractions (BAF) in final concentrations: 300; 250; 200; 150; 100; 50 and 0 $\mu\text{g/ml}$. The cytotoxic effect was detected according to NR and KBP — tests. According to the NR test IC_{50} values are: 290,4 $\mu\text{g/ml}$ (Hep2 cells); 223,2 $\mu\text{g/ml}$ (FL); 213,2 $\mu\text{g/ml}$ (CHO cells) and according to the KBP test they are: 300 $\mu\text{g/ml}$ (Hep2 cells); 264,4 $\mu\text{g/ml}$ (FL cells); 256,4 $\mu\text{g/ml}$ (CHO cells). The highest concentration (300 $\mu\text{g/ml}$) from BAF caused damaged and necrosis of the cells. It is suggested that the cytotoxic action of the nucleopeptide contained in BAF has general cellular toxicity.