

IN VITRO TENYÉSZTETT PERMANENS SEJTVONALAK STABILIZÁLÁSA, SAJÁTSÁGAI ÉS FELHASZNÁLÁSA

BRIGITTE MAUERSBERGER

Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Akademie der Wissenschaften der
DDR, Berlin

Ha szomatikus sejteket explantálunk in vitro, azok vagy egyáltalában nem, vagy csökkenő mértékben növekednek, csökkenő plating efficiency-vel, korlátozott számú generáción keresztül. Alkalmanként el is pusztulnak, ha csak nem jön létre egy megváltozott sajátságokkal rendelkező, új populáció a krízis következtében: az ún. stabilizált sejtvonal. Ez rendszerint képes a korlátlan növekedésre, és növekedésének mértéke, valamint plating efficiency-je fokozatosan növekszik, amíg el nem ér egy olyan szintet, amely minden egyes sejtvonalra jellemző.

A Committee for Terminology of the Tissue Culture Association [4] definíciója szerint egy stabilizált sejtvonal akkor tekinthető stabilizáltnak, ha rendelkezik azzal a képességgel, hogy in vitro korlátlanul passzálható.

Az emberi fibroblaszt-típusú sejtekkel szerzett tapasztalatokat tekintve azt mondhatjuk, hogy az azokból készült tenyészetet legalább 70-szer kell tudni átoltani, háromnapos időközökben.

Azok az okok, amelyek egy permanens sejtvonal stabilizálásához vezetnek, fizikai vagy kémiai eszközökkel válthatók ki, vagy a stabilizálódás „spontán” következik be. A változás folyamatát transzformációnak, malignus transzformációnak, vagy — a Committee terminológiája szerint — tenyészet alterációnak nevezik.

A sejt *alterációja* új sajátságok megszerzéséhez vezet, amelyek jellemzője analóg az átoltható tumorokéval.

A következő sajátságok figyelhetők meg:

1. korlátlan osztódási képesség;
2. szabályos növekedési ráta, a mitózisok közötti meghatározott időtartammal, amely állandó körülmények között különböző szokott lenni a különböző sejtvonalak esetében;
3. a kromoszómák megváltozott száma és morfológiája;
4. megváltozott sejtmorfológia, összehasonlítva az eredeti sejtekével in vivo. A kontakt gátlás rendszerint megszűnik, amely a „piled-up” sejtek elszórtan történő megjelenéséhez vezet. A fő sejttípusok: fibroblaszt-, és epitel-típus;
5. A legtöbb megváltozott populáció szuszpenziós tenyészetben is szaporodik.

6. Specifikus sejtfunkció elvesztése, amely azonban nem mindig teljes;
7. A legtöbb megváltozott populáció képes *in vivo* megeredni, ha a sejteket elegendő számban oltjuk be.

A) Stabilizálás

Spontán transzformáció

Az emlőssejtek tenyészetben történő transzformációja, amennyiben az ok nem ismeretes, „spontán” transzformáció. A tenyésztési körülmények különböző aspektusait mint lehetséges kiváltó okokat tekintik, amilyen pl. a tápfolyadék összetétele, az átoltás és sejtsűrűség, szennyező vírusok jelenléte.

a) Tápfolyadék

A spontán transzformáció olyan tenyészetekben is előfordul, amelyeket szérummentes tápfolyadékokban tenyésztnek; mégis úgy tűnik, hogy a tenyészetekhez adott szérum fajtája fontos szerepet játszik ebben a folyamatban.

Így egyes szerzők kimutatták [10, 19, 38], hogy borjú-, vagy lószérumon tenyésztett egérembrió sejtek transzformációja 4–12 hónap után következett be, míg főtális szérum alkalmazása esetén később, vagy egyáltalában nem. Főtális borjúszérum karcinogén hatású, ha hosszú ideig érintkezik a sejtekkel. Egy másik feltételezés szerint az ilyen szérumban valamilyen faktor van jelen, amely stabilizálja a sejteket, ezáltal akadályozva meg a malignus változást.

b) Atmoszféra

Amint azt Warburg feltételezte, az oxigén fontos szerepet játszhat a normális sejtek malignus átalakulásában. Ez a gondolat szolgáltatta az alapot azokhoz a kutatásokhoz, amelyek a tenyésztő edényben levő atmoszféra összetételének befolyásával foglalkoztak a sejtranszformációs folyamatra *in vitro*. Ilyen kísérleteket végzett SANFORD és PARSHAD [45], és újabban GOLDBLATT és FRIEDMAN [24], akik megpróbálták kivédeni a hipoxiát a tenyésztő edényben nemcsak gázkeverék befújásával, hanem emberi oxihemoglobinnak patkányembrió tenyészetek tápfolyadékához való adásával.

A sejtenyészet normális körülményei között egy epitél és fibroblaszt sejtekből álló keverék transzformációja ismételt átoltások esetén 13 hónap múlva következett be. Ha ugyanazon körülmények között 1% emberi oxihemoglobint és 45% vagy 20,9% O_2 -t is adtak a tenyészetekhez, permanens sejtvonalak jöttek létre; azonban ezek, az ismételt passzálások ellenére sem képeztek átoltható daganatokat 29 hónap alatt. Ez azt jelenti, hogy a sejtek megnövekedett oxigénellátása nem gátolja a tenyészet transzformá-

cióját permanensen növe sejtvonallá, de ezek a tenyészetek nem válnak malignussá. Így tehát a hipoxiának jelentős szerepe van az emlőssejtek malignus transzformációjának elősegítésében, tartós tenyésztés esetén.

c) Sejtsűrűség és az átoltás körülményei

Néhány kísérletet végeztek annak felderítésére, milyen szerepe van a sejtsűrűségnek és a sejtátoltás módjának. BARSKI és CASSINGENA [5] szerint a sejtek akkor válnak malignussá, ha az átoltást tripszinezéssel végzik, szemben azzal az esettel, ha mechanikusan történik a passzálás. A 3T3 sejtekkel végzett kísérletekben ki lehetett mutatni [2], hogy minimálisra csökkentve a sejtsűrűséget, vagyis a sejt—sejt kontaktust, a sejtek nem váltak malignussá, míg ha azokat addig hagyták szaporodni, hogy a sejtek egymással szorosán érintkeztek, a tenyészet malignussá vált. Másrészt, hőresögembrió sejtek sűrű monolayer-ben tenyésztve sem váltak malignussá, míg olyan sejtvonalak, amelyek primer klónokból származtak, képesek daganatot kelteni néhány in vitro átoltás után is, ha az eredeti állattörzs állataiba oltották vissza [25]. Ez a néhány példa is mutatja, hogy ez a probléma még tele van ellentmondásokkal.

d) Szennyező vírusok

A daganatvírusok széles körű elterjedése, különösen egerekben, azt sugallja, hogy a vírusok szóba kerülhetnek a spontán transzformáció okaiként.

Nemrégben 31, az American Type Culture Collection-ból származó sejt vonalat vizsgáltak meg C-típusú RNS vírus-tartalmuk szempontjából [33]. Azt találták, hogy ezek közül 3 patkány, 2 kínai hőresög, 1 sertés és 2 főtális macskasejt-törzs produkált vírusokat, közepes és magas titerben.

Számos bizonyíték van, hogy ilyen vírusokat vittek be tenyészetekbe gondatlanságból, vagy állati vírusfertőzéssel oly módon, hogy az állatból vették ki a sejteket; továbbá szérumokkal, tripszinnel, vagy a tápfolyadék útján. Vírusmentes sejtvonalakkal történő különböző kísérletek útján kimutatták, hogy az ilyen vírussal fertőzött állatokból származó sejtekben nagy valószínűséggel szabadulnak fel C-típusú vírusok. 5-bromdeoxiuridin-nel történő tartós kezeléssel szelektálnak mutánsokat. Egy ily módon kezelt kínai hőresögsejt-vonalból folyamatosan szabadul fel C-típusú vírus.

Indukált transzformáció

A spontán transzformáció mellett lehetséges besugárzással, vírusokkal, vagy kémiai karcinogénekkal permanensen megváltozott sejt kultúrákat indukálni. A röntgensugárral indukált transzformáció igen gyors folyamatnak látszik, mivel egy sejtgeneráción belül kiváltja a változást [11].

Számos DNS és RNS daganatvírussal végeztek sejtranszformációs kutatást [8]. Ilyen transzformáló hatást értek el polyoma és SV-40 [15], szárnyas-szarkoma [48] és alacsony dózisu vakcinavírussal [30] történő fertőzéssel.

Kémiai karcinogénekkal történő *in vitro* transzformációt emlőssejteken BERWALD és SACHS [7] végeztek elsőként meggyőző eredményekkel. Hasonló vizsgálatokat végzett még SANDERS és BURFORD [42].

Hörcsögsejteket N-methyl-N'-Nitroso-N-Nitrosoguanidin (MNNG)-vel történő 24 órás kezeléssel transzformáltak. Az első morfológiai változásokat 27–48 nap múlva észlelték [28]. Újabban HENDERSON és mtsai [27] írták le a permanens, proliferáló emberi limfoblasztoid sejtvonalak MNNG-vel történő transzformálását. A transzformáció gyakorisága a mutációkkal azonos nagyságrendű, azaz 5×10^{-7} /sejt.

B) S a j á t s á g o k

A permanensen transzformált sejtvonalak már ismert sajátságai között egyesek még vita tárgyát képezik, ezért azokat az alábbiakban tárgyaljuk.

Kromoszómák

Az explantált sejt kromoszómáiban bekövetkező változások, melyek a megváltozott kariotípushoz vezetnek, nyilvánvalóan nem egységesek. A kromoszóma változások szekvenciája a következő módokon történhet: diploidia-szubdiploidia-hipotetraploidia, vagy diploidia-triploidia-hipotetraploidia, vagy diploidia-tetraploidia-kvazidiploidia [32, 47].

Azt a feltételezést, hogy a poliploidizáció elősegítené az explantált sejtek permanens növekedését, TERZI és HAWKINS [49] vizsgálták, akik primer egérembriósejteket inaktivált Sendai vírussal kezeltek, hogy elősegítsék a sejtfúziót és poliploid sejteket indukáljanak. A kifejlődő kolóniákat izolálták és stabil sejtvonalakat hoztak létre. Ugyanezt érték el aranyhörcsög sejtekkel, míg csirke fibroblasztokból nem fejlődtek kolóniák. A kezelés után néhány nappal a mitózis index megnövekedett, míg a poliploid frakció csökkent. Ez azt bizonyította, hogy nem a poliploid sejtek képezték a proliferáló frakciót, hanem az azokból szegregálódott sejtek. Mindezen sejtvonalak kromoszóma összetételét az első passzázstól a 7. hónapig követték. A sejtek többsége kvazidiploid volt, de egyértelmű törzsvonalat (stem line) nem lehetett megállapítani. Sávtechnika segítségével kimutatható, valódi diploid metafázisok nem fordultak elő. Leggyakoribbak a triszómiák és monoszómiák voltak. E kísérletekből azt a következtetést lehet levonni, hogy a poliploidizálódás

és azt követően a pszeudo- és kvazidiploid sejtek megjelenése fontos szerepet játszik a fejlődésben, amely a stabilizálódáshoz vezet, és egy meglehetősen általános jelenségről van szó.

Miután egy sejtvonal stabilizálódott, rendszerint egy kvazidiploid- vagy near-triploid tartományban lévő modális kromoszóma számhoz vezető stabilitás következik be, azonban ez nagymértékben függ a környezeti feltételektől. Tapasztalható, hogy a különböző laboratóriumokban az L-sejteknek pl. különböző kromoszómaszáma van, amely a törzsvonaltól kb. 20 kromoszómával térhet el [37].

Jól ismert tény, hogy mitózis aberrációk mindig előfordulnak olyan heteroploid sejtpopulációkban, amelyek bizonyos kromoszóma egyensúlyba jutottak [31, 41]; e mitózis zavarok új kariotípushoz vezetnek, amelyek vagy eliminálódnak, vagy adaptációhoz vezetnek. Mindezek végül is stabil sejtvonalak nagymértékben megváltozott szublineáit produkálják, amint azt L és HeLa sejteknél magunk is kimutattuk. Mindkét sejtvonal spontán új törzsvonalakhoz vezetett, melyekben a kromoszóma szám kb. 60-ról kb. 120-ra változott [36]. E változások okait már számtalanszor megvitatták. Új lehetőségeket tárt fel FREED és SCHATZ [21] munkája, akik egyetlen esszenciális aminosavnak a tápfolyadékából való kihagyásával kromoszóma aberrációkat tudtak létrehozni kínai hőrcsősejtekben. E megfigyelések azt sugallják, hogy a kariotípus labilis volta a sejtek aminosav igénye és e komponensek hozzáférhetősége között fennálló ellentmondásból származik. Az említett szerzők kromoszóma és kromatid töréseket, transzlokációkat, endoreduplikációt és fragmentációt figyeltek meg. Ez különösen érdekes azzal kapcsolatban, hogy a *Mycoplasma*, amely közismerten elvonja az arginint a tápfolyadékából a deimináz rendszerén keresztül, ugyancsak kromoszóma aberrációkat képes előidézni. Hasonló változások várhatók olyan szerek adása esetén is, amelyek az aminosav felhasználását gátolják. Az ilyen szerek lebonthatják az aminosavat, befolyásolhatják felvételét, vagy zavarhatják annak hasznosítását. Más vegyületek, mint pl. az LSD, amely a sejt aminosav-anyagcseréjére hat, ugyanilyen módon fejtheti ki a hatását [13]. Ezzel kapcsolatban érdekes megjegyezni, hogy az LSD-nek a hatása a kromoszómákra in vivo sokkal csekélyebb; a sejt in situ védve lehet a homeosztatis mechanizmus által, amely hiányzik a tenyészetben.

Morfológia

A sejtek permanens in vitro növekedési képességével kapcsolatos változások egyike a sejt alakjának és növekedési módjának a megváltozása. Ezt úgy is emlegetik, mint a sejt-orientáció hiánya, „criss-cross” növekedés, a sejtek többrétegű, hálózatos növekedése, és „fusiform” alak felvétele.

E morfológiai változást a „kontakt gátlás elvesztésé”-nek tulajdonítják. A kontakt gátlást [3] úgy definiálják, mint a sejtmozgás megszűnését egy meghatározott irányban azáltal, hogy egy másik sejttel kerül érintkezésbe. Kontakt gátlással rendelkező sejtek monolayeret képeznek anélkül, hogy egymásra nőnének. Tehát a kontakt gátolt sejtek monolayerben nőnek, míg a kontakt gátlást elvesztett sejtek sokrétegű növekedési típussal rendelkeznek. Ez arra a leegyszerűsített következtetésre vezetett, hogy a monolayerről többrétegűre történő változás azonos a normális sejtpopulációnak malignussá válásával. A vírusokkal és a kémiai szerekekkel történő daganatos transzformációra vonatkozó számos publikáció említi ezt a kritériumot. Ennek ellenére számos esetben kimutatták, hogy több rétegben növekedő sejtek nem szükségszerűen malignusak [44].

Tengerimalac-sejtekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy egyes növekedési paraméterekben bekövetkezett változások — beleértve a morfológiai transzformációt is — bekövetkezhetnek a sejteknek malignus átalakulása előtt, de nem függenek össze azzal szükségszerűen [20]. A morfológiai transzformáció megelőzheti a sejtek malignizálódását, így a morfológiai transzformáció a daganatkeltő képességének nem reális jelzője. A sejtek daganatkeltő képességét először azzal lehet kimutatni, hogy a sejtek képesek kolóniák képzésére agarban. Ez az összefüggés nemcsak a tengeri malac sejtekre vonatkozik, megfigyelték kémiai rákkeltőkkel, vagy vírusokkal transzformált hörsög, egér és patkánysejtek esetében is.

A telepképzés és daganatkeltés között fennálló viszony élettani háttere nem ismert és további kutatást érdemel. Úgy tűnik azonban, hogy a transzformált sejtek agarban való növekedése a daganatkeltő képességnek jó indikátora.

Daganatkeltő képesség

A sejtek permanens növekedése *in vitro* és daganatkeltő képessége között igen gyakori az összefüggés. Ezért egyes szerzők úgy vélik, hogy minden stabil sejtvonal malignus, és megfordítva, csak a malignus sejtek képesek állandó növekedésre. Valójában egy sejttörzsnek folytonosan növekvő sejtvonallá való változását *in vitro* onkogenézisnek tekintik.

A malignus átalakulás sebessége a különböző fajok esetében eltérő. Az Albany patkányembrió-sejtek stabilabbnak tűnnek, a szíriai hörsög-sejtek közepes mértékben, míg az egérembrío sejtek könnyen alakulnak malignussá.

Másrészt számos közlemény szól hosszú ideje létező heteroplóid egér sejtvonalokról, amelyek nem malignusak több mint két éves *in vitro* tenyésztés után sem [44]. E kérdés nemrég új megvilágításba került BOONE [9] kutatásai alapján. A 3T3 sejtvonal, amely morfológiai alapon nem-daganatosnak

minősült, mint pl. a sejtosztódás gátlása összefüggő növekedés esetén, alacsony telítődési sűrűség, letapadási készség, valamint tumorkeltő képesség hiánya, amennyiben sejtszuszpenzió formájában oltották be a gazdaállatba, hemangioendoteliomákat képezett egérben. Ez azonban csak speciális oltási technikával volt lehetséges. Ezek a sejtek, amelyek letapadási képességgel rendelkeznek, három mm átmérőjű üvegyöngyökön nőttek. Egerenként 2 üvegyöngyöt oltottak be szubkután, összesen 15 ezer sejtet. Nyolc hetes késéssel nagy tumorer fejlődtek.

C) Permanens sejtvonalak különböző típusai és felhasználása

A permanens sejtvonalak száma állandóan növekszik, ami új sejtvonalak izolálásáról szóló számos közleményből is szembetűnik.

A permanens sejtvonalakat három különböző osztályba sorolhatjuk:

- I. Heteroploid vonalak
- II. Diploid vonalak
- III. Differenciált vonalak.

I. Heteroploid vonalak

A szövettanyésztés történetében ezt a típust stabilizálták először. Heteroploid kariotípus és — mint azt jelenlegi ismereteink alapján feltételezhetjük — a specializált funkciók elvesztése jellemzi. Ebbe a csoportba a legismertebb és legszélesebb körben alkalmazott sejtvonalak tartoznak (néhány példáját az I. táblázatban tüntettük fel).

Számos egyéb permanens heteroploid sejtvonalat találhatunk meg az American Cell Culture Collection-ban. Ezek a sejtek igen alkalmasak víruskutatásokra, sejtciklus vizsgálatokra, a sejtszaporodás biokémiai analízisére, valamint farmakológiai vizsgálatokra.

II. Diploid vonalak

Ezekre a sejtvonalakra a diploid kariotípus és a kontakt gátlás jellemző. Tekintettel a múltban végzett vizsgálatokra, amelyeket még a konvencionális technikákkal folytattak, a „diploid” terminust revideálnunk szükséges. A modern technikákkal (quinacrin fluoreszcencia, Giemsa sávtechnika, konstitutív heterokromatin lokalizáció) végzett vizsgálatok szerint precízebb lenne pszeudodiploidnak definiálni, mivel a kromoszómák száma alapján ugyan diploid vonalak, azonban nem minden kromoszóma azonosítható szabályosnak [34]. Néhány diploid sejtvonalat az I. táblázatban tüntettünk fel. Ezek a sejtvonalak alkalmasak genetikai kutatásokra, a sejtszaporodás biokémiai tanulmányozására, víruskutatásokra, vírus-vakcinák termelésére, sejtfarmakológiai vizsgálatokra.

I. táblázat

1. Heteroploid permanens sejtvonalak

Jelzés	Eredeti (species)	Eredeti (szövet)	Szerzők
L HeLa Detroit 6	C ₃ H egér ember ember	subcutis uterus karcinoma sternum csontvelő	EARLE és mtsai (1943) [18] GEY és mtsai (1952) [23] BERMAN és STULBERG (1954) [6]
CHL KB 3T3/Balb/c	ember ember egér/Balb/c	máj larynx karcinoma embrió	CHANG (1954) [12] EAGLE (1955) [17] AARONSON és TODARO (1968) [1] TODARO és GREEN (1963) [50]

2. Diploid permanens sejtvonalak

Jelzés	Eredeti (species)	Eredeti (szövet) s	Szerzők
Vero	African green monkey	vese	YASUMURA és KAWAKITA (1963) [52]
B14FAF28	kínai hörcsög	hasüregi sejtek	YERGANIAN és LEONARD (1961) [53]
BHK 21	szíriai hörcsög	vese	MACPHERSON és STOKER (1962) [35]
CHO	kínai hörcsög	ovarium	PUCK és mtsai (1958) [40]

3. Differenciált permanens sejtvonalak

Jelzés	Eredeti (species)	Eredeti (szövet)	Szerzők
C-6 RLC	patkány patkány	glia daganat máj	DONTA (1973) [16] GERSHENSON és mtsai (1972) [22]
WIRL-3	patkány	máj	DIAMOND és mtsai (1973) [14]
Bewo	ember	trofoblaszt sejtek koriokarcinómából	PATILLO és GEY (1968) [39]
HTC	patkány	hepatoma	THOMPSON és mtsai (1966) [51]

III. Differenciált sejtvonalak

Az elmúlt néhány év folyamán számos, specializált funkcióval rendelkező, folytonos sejtvonalat hoztak létre. Ezekből többet klónoztak. E vonalat általában kétfajta tápfolyadékban tenyésztik: az egyik az állandó sejtosztódást biztosítja, a másik a differenciálódást teszi lehetővé. A proliferációs állapotból differenciált állapotba való átalakulás szabályozható. Ezek a sejtvonalak legtöbb esetben daganatból fejlődnek ki, de néhány esetben normál szövetből történő stabilizálást is közöltek. Ezek kariotípusa pszeudodiploid, vagy heteroploid, és képesek daganatok képzésére a gazdaállatban.

Eredetüket és funkcionális sajátágaikat tekintve ezeket a vonalakat endokrin, máj, limfoid, ideg és izomszövetből stabilizálják.

Ezeket a differenciált rendszereket igen jól lehet alkalmazni a differenciálódás, hormonszintézis, neuron differenciálódás és -funkció, immunológiai problémák tanulmányozására, továbbá genetikai kutatásokra szolgáló komplement-törzsek előállítására, amelyek a genetikai potenciál és a fenotípusos expresszió vizsgálatára szolgálnak; továbbá hibridizációra, receptor és transzport, ideg-izom kölcsönhatás és egyéb kutatásokra (I. táblázat).

D) Sejt vonalak megőrzése

Az eddig megtárgyalt tények nyilvánvalóvá teszik, hogy egy permanens sejtvonal stabilizálása után, valamint stabilizálása folyamán, amikor különböző sajátságok egyensúlyba kerülése fejeződik ki, hirtelen drasztikus változások következhetnek be. Ezeket a környezet által kiváltott változásokat lehetőleg ki kell küszöbölni. E kérdés megoldására számos javaslat született az utóbbi évek folyamán. Először PUCK javasolta azt, hogy a sejteket fél-évenként klónozzák. A sejtek mélyhűtésének újabb technikái e problémát teljesen megoldották. Ma már lehetséges az emlőssejteket -190°C -on megőrizni korlátlan ideig anélkül, hogy a sejtek sajátosságai megváltoznának, vagy a sejtek életképessége megszűnnék. Egyes üzleti érdekeltségű intézmények egyre több permanens sejtvonalat helyeznek sejtbankba abból a célból, hogy onnan beszerezhető legyen a kívánt sejtörzs, továbbá a sejtmintákat különböző paraméterekkel jellemzik.

E) Következtetések

A sejtváltozások természete a permanens sejtnövekedés kialakulása folyamán még nem teljesen tisztázott.

Lehetséges, hogy a sejtfelület változása a felelős a sejt szabályozó mechanizmusában bekövetkezett változásért. A membrán változások csökkenthetik a felülethez való tapadást, csökkenthetik a sejtnek azt a képességét, hogy gátló molekulákat termeljenek, vagy a sejt reagáljon ilyen molekulákra, illetve a normál szérumban jelenlévő faktor befolyását nagy sejtsűrűség esetén.

Végül lehetséges ma már a sejtenyészti technikák tökéletesedése révén megtartani a normál in vivo sejtek jellegzetességeit, mivel vannak near-diploid kariotípushoz és differenciált állapothoz kötődő funkciók.

Másrészt úgy látszik, hogy a daganatkeltő sajátságok megszerzése tartós tenyésztés folyamán a legtöbb esetben nem gátolható meg.

Összegezeként azt állíthatjuk, hogy az utóbbi tíz év jelentős sikerei ellenére a tenyésztéssel foglalkozó szakember nem tudja a sejtet eredeti, normális állapotában, tartós tenyésztésben fenntartani.

IRODALOM

1. AARONSON, S. A., TODARO G. J.: *J. Cell Physiol.* **72**, 141 (1968).
2. AARONSON, S. A., TODARO G. J.: *Science* **162**, 1024 (1968).
3. ABERCROMBIE, M.: *Symp. Quant. Biol.* **27**, 427 (1962).
4. ANONYM: *J. Nat. Cancer Inst.* **33**, 607 (1967).
5. BARSKI, G., CASSINGENA, R.: *Folia Biol. (Praha)* **9**, 323 (1963).
6. BERMAN, L., STULBERG, C. S.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **92**, 730 (1956).
7. BERWALD, Y., SACHS, L.: *Nature* **200**, 1182 (1963).
8. BLACK, P. H.: *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 391 (1968).
9. BOONE, Ch. W.: *Science* **183**, 68 (1975).
10. CARVONE, G., PIAZZA, R., PARMIANI, G.: *J. Nat. Cancer Inst.* **52**, 387 (1974).
11. CHANG, R. S., MEI-WHEY HSIEH, M., BLANKENSHIP W.: *J. Nat. Cancer Inst.* **47**, 479 (1971).
12. CHANG, R. S. M.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **87**, 440 (1954).
13. COHEN, M. M., MARINELLO, M. J., BACK, N.: *Science* **155**, 1417 (1967).
14. DIAMOND, L., MCFALL, R., TASHIRO, Y., SABATINI, D.: *Cancer Res.* **33**, 2627 (1973).
15. DEFENDI, V.: *Progress in Exp. Tumor Research* **8**, 125 (1966).
16. DONTA, S. T.: *Exp. Cell Res.* **82**, 119 (1973).
17. EAGLE, H.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **89**, 362 (1955).
18. EARLE, W. R.: *J. Nat. Cancer Inst.* **4**, 165 (1943).
19. EVANS, V. J., ANDRESEN W. F.: *J. Nat. Cancer Inst.* **37**, 274 (1966).
20. EVANS, Ch. H., DiPAOLO, J. A.: *Cancer Res.* **35**, 1035 (1975).
21. FREED, J. J., SCHATZ, S. A.: *Exp. Cell Res.* **55**, 393 (1969).
22. GERSHENSON, L. E., OKIGAKI, T., ANDERSSON, M., MOLSON, J., DAVIDSON, M. B.: *Exp. Cell Res.* **71**, 49 (1972).
23. GEY, G. O., COFFMAN, W. D., KUBICEK, M. T.: *Cancer Res.* **12**, 264 (1952).
24. GOLDBLATT, H., FRIEDMAN, J.: *PNAS* **71**, 1780 (1974).
25. GOTLIEB-STEMATSKY, T., YANIV, A., GAZITH, A.: *J. Nat. Cancer Inst.* **36**, 477 (1966).
26. HEIDELBERGER, C., IYPE, P. T.: *Science* **155**, 214 (1967).
27. HENDERSON, E. E., NORIN, A. J., STRAUSS, B. S.: *Cancer Res.* **35**, 358 (1975).
28. INUI, N. S., TAKAYAMA, SUGIMURA, T.: *J. Nat. Cancer Inst.* **48**, 1409 (1972).
29. KAO, F. T., PUCK, T. T.: *Genetics* **55**, 513 (1967).
30. KOZIOROWSKA, J., WLODARSKI, K., MAZUROWA, N.: *J. Nat. Cancer Inst.* **46**, 225 (1971).
31. KUWERT, E., SVORC, R., HIENZ, H. A., MANOJLOVIC, N.: *Z. med. Mikrobiol. u. Immunol.* **154**, 97 (1968).
32. LEVAN, A., BIESELE J. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **71**, 1022 (1958).
33. LIEBER, M. M., BENVENISTE, R. E., LIVINGSTON, D. M., TODARO, G. J.: *Science* **182**, 56 (1973).
34. LOCURTO, SCAPPATICCI, F. S., FRACCARO, M.: *Cytogenetics* **11**, 305 (1972).
35. MACPHERSON, E., STOKER, M.: *Virology* **16**, 147 (1962).
36. MAUERSBERGER, B.: *Acta biol. med. german.* **14**, 196 (1965).
37. MAUERSBERGER, B. (Hrsg.): *Aktuelle Probleme der Zellzüchtung*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1971) p. 152
38. MITCHELL, J. T., ANDRESEN, W. F., EVANS, V. J.: *J. Nat. Cancer Inst.* **42**, 709 (1969).
39. PATTILLO, R. A., GEY G. O.: *Cancer Res.* **28**, 1231 (1968).
40. PUCK, T. T., CIECIURA, S. J., ROBINSON, A.: *J. Exp. Med.* **108**, 945 (1958).
41. PŮŽA, V.: *Experientia* **24**, 824 (1968).
42. SANDERS, F. K., BURFORD, B. O.: *Nature* **213**, 1171 (1967).
43. SANFORD, K. K., MERWIN, R. M., HOBBS, F. L., FIORAMONTI, M. C., EARLE, W. R.: *J. Nat. Cancer Inst.* **20**, 121 (1958).
44. SANFORD, K. K.: *Nat. Cancer Inst. Monograph No.* **26**, 387 (1967).
45. SANFORD, K. K., PARSHAD, R.: *J. Nat. Cancer Inst.* **41**, 1389 (1968).
46. SCHUBERT, D., HARRIS, A. J., DEVINE, C. E., HEINEMANN, S.: *J. Cell Biol.* **61**, 398 (1974).
47. STAROVEROVA, N. S.: *Vopr. Onkologii* **7**, in Russian 3 (1961).
48. TEMIN, H. M.: *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 679 (1965).
49. TERZI, M., HAWKINS, T. S. C.: *Nature* **253**, 361 (1975).
50. TODARO, F. J., GREEN, H.: *J. Cell Biol.* **17**, 299 (1963).
51. THOMPSON, E. B., TOMKINS, G. M., CURRAN, J. F.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (N. Y.)* **56**, 296 (1966).
52. YASUMURA, R., KAWAKITA, Y.: *Nippon Rinsho* **21**, 1201 (1963).
53. YERGANIAN, G., LEONARD, M.: *Science* **133**, 1600 (1961).