

AZ IN VITRO KARCINOGENEZIS VIZSGÁLÓ MÓDSZEREI

LAPIS KÁROLY, SZENDE BÉLA és FERENCZ GÉZA

SOTE I. sz. Kórbonctani Intézete, Budapest

Bevezetés

A szövettenyésztés helye az in vitro karcinogenezis vizsgálatokban

Régóta ismert és bizonyított, hogy kémiai anyagokkal rosszindulatú daganatok idézhetők elő különböző szervezetekben. Bizonyos RNS és DNS vírusok daganatkeltő szerepére is sok bizonyíték van állati szervezetekben. Az egyes kémiai anyagok és mikroorganizmusok daganatkeltő szerepének *feltérképezése* a rosszindulatú elfajulás megelőzése szempontjából rendkívül fontos feladat.

A környezeti ártalmak, fertőzések és különböző — egyébként ártalmatlan — gyógyszerek egymásra hatása veszélyének kitett emberi szervezet szempontjából fontos ismerni azokat a körülményeket, amelyeknek elkerülésével csökkenthető a daganatos megbetegedések száma.

A karcinogenezis vizsgálatok másik fontos feladata a malignus transzformáció folyamatának megismerése és egyre pontosabb leírása. A hatásmechanizmus ismeretében kiválaszthatók, illetve szintetizálhatók a daganatellenes gyógyszerek. Az in vitro karcinogenezis kísérletekben egy leegyszerűsített, jobban kézben tartható rendszerben — szövettenyészetben — vizsgáljuk az előbbi kérdéseket. A teljes szervezet esetében figyelembe kell venni a szervezet védekező mechanizmusait (immunrendszer, egyes szervek fokozott méregtelenítő, anyagátalakító képessége stb.).

In vitro körülmények között csak az adott kísérleti modellként használt sejt tulajdonságaival kell számolnunk. E leegyszerűsítés jelenti ugyanakkor az in vitro kísérleti eredmények szervezetre való extrapolálásának nehézségeit is.

A szövettenyészet körülményei között kapott eredmények csak kellő körültekintéssel és ellenőrző kísérletek segítségével értékelhetők. Mégis rendkívül fontosak és értékesek az ilyen irányú kísérletek.

A továbbiakban az in vitro karcinogenezis vizsgálatok elvi és módszertani kérdéseivel foglalkozunk.

3 téma köré csoportosítjuk az anyagot:

1. Karcinogén ágensek.
2. A karcinogenezis vizsgálatokban felhasznált szövettenyészetek típusai.
3. Metodikák.

1. *Karcinogén ágensek*

a) Rákkeltő vírusok

A vírusok közül 5 csoport okozhat tumort (PRESCOTT 1974). A legjobban ismert csoport a C típusú RNS vírusok. Az ide tartozó vírusok sejtmentes tumorszűrlettel passzálhatók.

A daganatkeltő DNS vírusok nem mutatnak olyan egységes képet, mint az RNS vírusok. Idetartoznak a Papova- és Adeno-vírusok, ezek sejtmentes szűrlettel nem passzálhatók, míg a Herpes- és Poxo-vírusok sejtmentes szűrlettel passzálhatók. In vitro rendszerben a Poxo-vírusoknál nem egyértelműen bizonyított karcinogenetikus hatás. Feltűnően gyakori ugyan az említett vírusok és rosszindulatú daganatok együttes előfordulása, és in vitro körülmények között gyakran igazolhatóan a vírus felelős a malignus transzformáció bekövetkezéséért, azonban előfordultak olyan esetek is, hogy a vírusfertőzés után a vírus kimutatható volt a sejtekben és a sejtek környezetében, sőt termelődött a sejtekben, de nem hozott létre malignus transzformációt.

b) *Kémiai karcinogének*

Ismert szerkezetű policiklikus szénhidrogénekkal és más vegyületekkel (benzpirén, metilkolantrén, oximetilnitrozamin stb.) különböző állatokból származó sejt kultúrák in vitro malignusan transzformálhatók (BERWALD és SACHS 1963, 1965, CHEN és HEIDEBERG 1969). Emellett vizsgáltak olyan keverékeket is, melyek összetétele ugyan nem ismert pontosan, de mint környezeti ártalom előfordul: pl. Smogs extractum (FREEMAN 1971).

c) *Sugárzások*

A röntgensugárzás megfelelő dózisban in vitro malignus transzformációt okoz (BOREK és SACHS 1966–67).

d) *„Spontán” transzformáció*

Az in vitro sejt kultúrák bizonyos idő után minden kezelés nélkül „spontán” malignusan transzformálódnak, ez különösen egér fibroblasztok esetében gyakori jelenség (SANFORD 1968). Bár itt a közvetlen ható ágens nem ismert, fel kell tételeznünk, hogy a szervezet védekező mechanizmusai alól kivont, tehát változások iránt érzékeny sejtek, kisebb mennyiségű karcinogén hatásra (pl. üveget lezáró gumidugó stb.) is transzformálódhatnak.

e) *Különböző ismert karcinogének egymásra hatása*

A karcinogén vírusok kémiai karcinogén anyagokkal együtt adva gyorsabban és nagyobb frekvenciával okoznak rosszindulatú daganatokat (TODARO és GREEN 1964, FREEMAN 1967). Egyes, egyébként ártalmatlan kémiai anyagok együttes adagolása a szervezetben vagy a sejtekben lejátszódó kémiai reakció révén karcinogént eredményezhet.

A karcinogenezis vizsgálatokban felhasznált szövettenyészetek típusai

Két alapvető típust lehet megkülönböztetni: az ún. *short term* kultúrákat és az *established* kultúrákat. A két típus nem különíthető el élesen egymástól, csak passzálás számban, mégis bizonyos mértékig eltérő tulajdonságaik vannak. A sejt-kultúra indítása után néhány passzáláson keresztül (fibroblasztokat véve alapul) a sejtek nagyon nehezen osztódnak, csak ritkán és óvatosan passzálhatók, hosszan kell tripszinizálni őket, hogy elszakadjanak az edény falától. Alakjuk jellegzetes elnyúlt, többágú.

E kultúrákban sok a degeneratív sejtalak. Irodalmi adatok szerint (HAYFLICK és MOORHEAD 1961) kb. a tizedik passzálás körül következik be az ún. *krízis*, melynek során a kultúra vagy elpusztul, vagy stabilizálódik és ún. *established* vonal alakul ki belőle. A krízis során a sejtek nagy része elpusztul, az életképes sejtek pedig klonozódnak és felveszik a jellegzetes fűszálszerű fibroblaszt alakot.

Az ilyen sejtek tenyésztete felszaporodva jól kezelhetővé válik, sűrűbben passzálható, könnyen tripszinizálható. Saját tapasztalataink alapján a megadott tizedik passzálás csak nagyon közelítő érték a krízis bekövetkezésére. Egyik legutóbbi kísérletünk során egy egérből kialakított kultúránál a krízis a negyedik passzálás körül következett be. Ez valószínűleg a sejt-kultúra egyedi sajátosságaitól függ. A krízis jelensége nemcsak a leírt sajátosságokban választóvonal a két kultúrátípus között. A krízis után változik a kromoszómakép is. A sejtek heteroploiddá válnak és a további passzálások során kromoszóma felépítésük egyre inkább változik.

Mindkét sejt-kultúra típust használják az *in vitro* karcinogenezis vizsgálatokban, de a stabilizálódott sejt-vonalakkal pontosabban lehet dolgozni, ugyanakkor ezeket munka közben állandóan ellenőrizni kell.

A vizsgálatokban felhasznált sejteket sejt-típus szerint is lehet csoportosítani. Monolayer kultúrában a leggyakrabban használt sejt-féleség a fibroblaszt, részben azért, mert ennek tenyésztése a legegyszerűbb, de használnak e vizsgálatokhoz epidermis sejteket (pl. Fusenig, Heidelbergben), szuszpenzióban növekvő limfocitákat stb.

A kezelendő sejtszám beállítása is alapvető probléma az *in vitro* karcinogenezisben. Elméletileg az optimális az volna, ha az edény felszínéhez viszonyítva kevés sejtet ülepítenénk ki, hogy a sejtekből kialakult klónokat, a karcinogén kezelés viszonylag hosszú ideje után is, külön tudnánk vizsgálni. Ezzel egyrészt számszerűen meghatározható a malignusan transzformálódott sejtek száma (a morfológiai eltérést mutató klónok alapján) az egész sejtmenyiséghez viszonyítva, másrészt (ha kezelés előtt apróra tört fedőlemezdarabkákra ülepítjük ki a sejteket) rögtön elkülöníthetők a már transzformált sejtek. E feltétel azonban csak ritkán teljesíthető, ugyanis a kezeletlen, vagy nem

malignizálódott sejtvonalak csak nehezen, a krízis előtti passzálásokból származó sejtek pedig egyáltalán nem klónozzhatók, mert a megfelelő szaporodáshoz bizonyos minimális, de az említett kísérleti feltételnél több sejt bevitele elengedhetetlen.

A gyakorlatban ezért sokszor magasabb sejtszám kezelése valósítható csak meg. Ilyenkor a transzformálódott sejteket tartalmazó kultúrában néhány passzálás után lehet arra számítani, hogy az életképesebb, ellenállóbb tumorsejtek túlnövik a malignus transzformáción át nem esett sejteket. Követhető módszer ilyenkor a lágyagaros médium alkalmazása, mert ezzel — kellő gyakorlattal — jól elkülöníthetők és tovább szaporíthatók a tumorsejtek, melyek — a kezeletlenekkel ellentétben — a lágyagaros médiumban képesek a klónképzésre.

Az in vitro karcinogenezis kimutatásához felhasznált metodikák

A karcinogenezis vizsgálatokban felhasznált módszerek a malignus transzformáción átesett sejtek megváltozott tulajdonságain alapulnak. Mielőtt a megváltozott tulajdonságokat áttekintő táblázatot demonstrálnánk, a következőket kell előrebocsátani: A táblázatban felsorolt, a malignus transzformációra jellemző tulajdonságok részben átfedik egymást, mert egy jelenség több oldalról megközelítve pontosabban leírható.

A jelenségek részben összefüggenek egymással, de ezektől az esetektől eltekintve nem szükségszerűen jelennek meg együtt, egy adott transzformáció bekövetkezése során. Tehát nem érvényes a minden vagy semmi szabály. Pl. lehet egy vonal malignusan transzformálódott, pedig kontakt szenzitív, vagy nem kontakt gátolt, de nagy a szériumigénye. Éppen ezért, mert egy adott malignus transzformáció bekövetkezésekor a leírt jelenségek nem feltétlenül egyszerre jelennek meg, nem lehetett kiválasztani az adott tulajdonságok egy a malignus transzformációra egyértelműen jellemző csoportját. Tehát nincs egy nemzetközileg elfogadott vizsgálatsor, amellyel a malignus transzformáció bekövetkezését in vitro módszerekkel el lehetne dönteni (1. táblázat).

a) Morfológiai változások

A sejtkultúrák malignus transzformációja során az egyes sejtek megjelenése, és a sejtek egymáshoz viszonyított elhelyezkedése is megváltozhat. A kezeletlen, malignusan nem transzformált kultúrákban a sejtek (fibroblasztok) hosszú, keskeny, elnyújtott dárda alakúak, míg transzformáció után poligonálissá, szabálytalan alakúvá válhatnak (DEFENDI 1963). A sejtek morfológiai változásai vírusok esetében a vírus által hordozott génektől is függenek, a kapcsolat azonban nem teljesen egyértelmű, ugyanis a célsejtek minősége, és tartási körülményei is befolyással vannak a sejtek alaki sajátosságaira.

1. táblázat

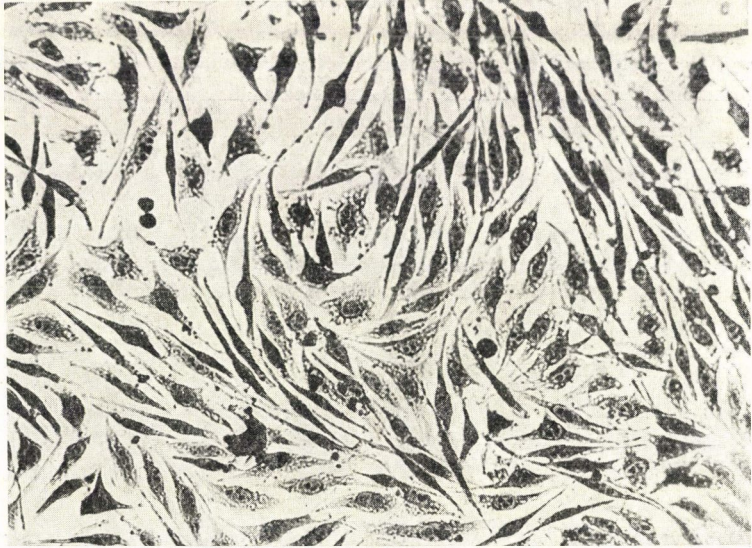
A malignus transzformáció bekövetkezésének jelei az in vitro karcinogenezis vizsgálatokban

VÁLTOZÁS	A VÁLTOZÁS LEÍRÁSA
1. A NÖVEKEDÉSI KONTROLL CSÖKKENÉSE	
a) Denzitásfüggő gátlás csökken	Multilayer alakul ki
b) „Lehorgonyzás függőség” csökken	Növekedés szemiszolid agarban
Növekedés szuszpenzióban	Alkalmazkodik a forgó kultúrához
c) Szérumfüggetlenség	Növekedés alacsony szérumkoncentrációnál
d) Klónképzés	Egy sejt (sejtszámtól független) képessége klónt létrehozni
2. SEJTMOZGÁS VÁLTOZÁSA	
a) Kontakt gátlás	Sejtek mozgásukban sem kontakt gátoltak
b) Szérummegvonásos vándorlás	Sejtek csökkent szérumk.-nál is vándorolnak
3. MORFOLOGIAI VÁLTOZÁSOK	
a) Sejtalak változása	Karc. ágenstől és egyedi tul.-tól függ
b) Sejtnövekedés	Sokirányú, többrétegű
4. TÁPLÁLÉKFELVÉTEL, ANYAGCSERE	
a) Életképesség nő	Kevésbé szérumfüggő
b) Glikolízis	Gyakran magasabb
c) Metabolitok felvétele (cukor)	Általában magasabb
d) Szer- és hormonérzékenység	Változik
5. GENETIKAI VÁLTOZÁSOK	
a) Kariotípus változik	Aneuploid
b) Génösszetétel, -expresszió vált.	Vírusgének, v. spec. RNA Protein szintézis
6. IMMUNOLÓGIAI VÁLTOZÁSOK	
a) Intracelluláris és sejtfelszíni ag.	Vírus és tumorsp. ag. megjel., vált.
7. EGYÉB SEJTFELSZÍNI VÁLTOZÁSOK	
a) Agglutináló képesség	Konkanavalin A. csírázó búza aggl.
b) Membránkapcsolatok	Csökkennek a junkcionális m. kapcs.
8. TUMORIGENITÁS	Visszaoltott sejtek megeredése

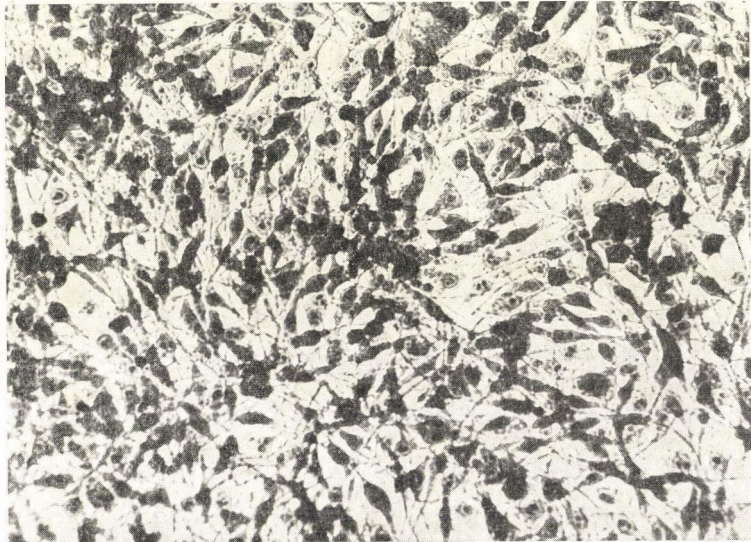
Egyéb karcinogén ágensek esetén a morfológiai változás nem jellemző a hatóanyagra.

A malignus transzformáció az egész kultúra szintjén, tehát a sejtek egymáshoz viszonyított helyzetében is megvalósulhat. Kezeletlen, normál kultúra esetében a sejtek elhelyezkedése rendezettséget mutat. Egymáshoz képest közel párhuzamos elhelyezkedésűek (1. ábra). Karcinogén ágenssel való kezelés után a rendezetlenség irányában változhat a kultúra képe; a sejtek sokirányú ún. „random” növekedést mutatnak. A kezeletlen sejt kultúrára jellemző egy sejtrétegű növekedés az ún. monolayer helyett a transzformáció után *multilayer* alakulhat ki (2. ábra). Az első in vitro karcinogenezis kísérletekben e criss-cross növekedést fontos jelnek tekintették (BORECK és SACHS 1966–68, BERWALD és SACHS 1963–65).

A fenti, fénymikroszkóppal is látható elváltozások térben is szemléletes demonstrálása vált lehetővé scanning elektronmikroszkópos vizsgálatokkal. A sejtek nyúlványai, azok megváltozott alakja és nagysága, a sejtek egymás közötti kapcsolatai igen jól tanulmányozhatók scanning elektronmikroszkópos



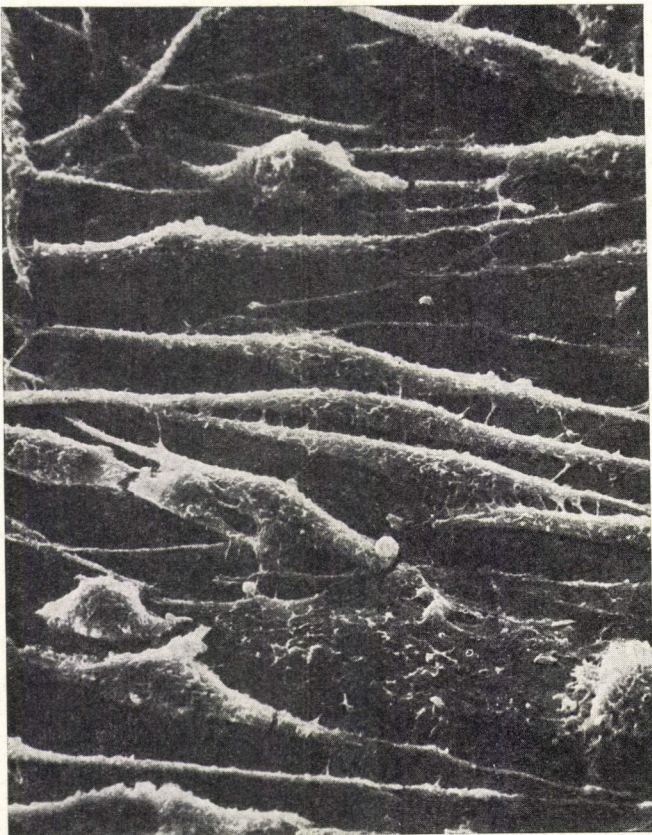
1. ábra. Kezeletlen CBA T6T6 egér embrió fibroblaszt kultúra, 13. passzáls. 10-es obj. Festés: Giemsa.



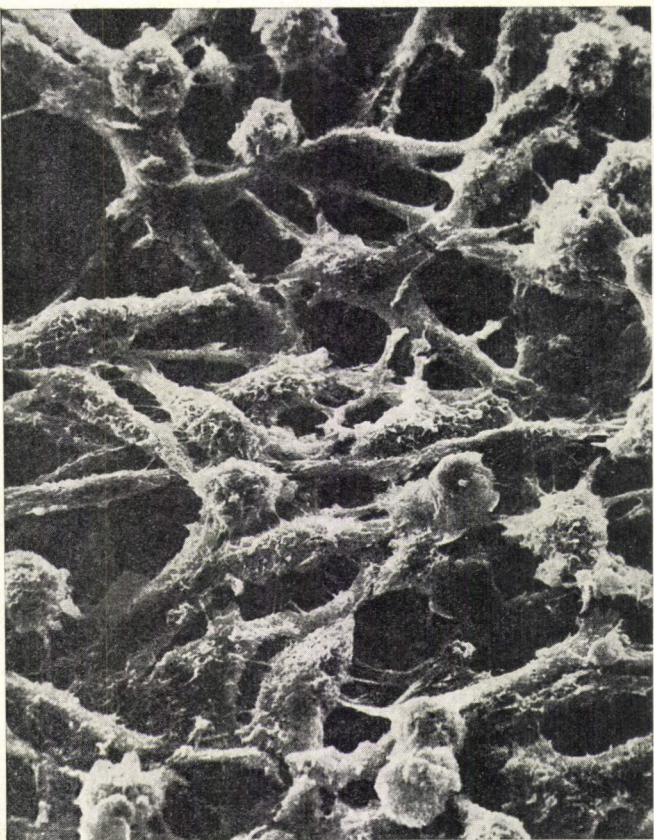
2. ábra. 0,1 µg/ml MC-vel kezelt CBA T6T6 egér embrió fibroblaszt kultúra, 3. passzáls 10-es obj. Festés: Giemsa.

képeken (3. és 4. ábra). A bemutatott képek a morfológiai változások illusztrálására az intéztünkben kialakított CBA T6T6 egér embrió sejtvonalból származnak.

Vírusok esetében a morfológiai elváltozás gyakran ún. *fókuszképzésben* nyilvánul meg. A fókus a vírusrészecske hatására megváltozott sejtek jelleg-



3. ábra. Scanning elektronmikroszkópos (SEM) kép. Kezeletlen CBA T6T6 egér embrió fibroblaszt kultúra, 17 passzálás, 1500-szoros nagyítás. A sejtek közel párhuzamos elhelyezkedésűek.



4. ábra. SEM kép. MC-vel kezelt CBA T6T6 egér embrió fibroblaszt kultúra, 7 passzázs, 1500-szoros nagyítás. A sejtek több-rétegű növekedést mutatnak.

zetes csoportja, amelyeknek száma megfelelő körülmények között arányos a fertőzés céljából bevitt víruspartikulumok számával. A titrálásnál természetesen ügyelni kell a másodlagosan termelődött vírusrészek hatástalanítására. A másodlagos vírushatás megakadályozására a tápfolyadékba agart visznek, amelyből kialakult kocsonyás réteg megakadályozza a vírusok vándorlását (DULBECCO 1954, MC CLAIN 1958).

Jellegzetes fókuszképzést tudunk bemutatni a C típusú RNS vírusok közé tartozó MC-29 vírussal történt fertőzés után csirke embrió fibroblaszt kultúrákon. A vírushatás hatására *nukleoluszmegnagyobbodás* is gyakran bekövetkezhet. A vírusok detektálása elektronmikroszkóppal és scanning elektron mikroszkóppal is történhet (HARVEN 1973).

Újabban vizsgálat tárgyát képezik a vírussal transzformált sejtek felszínén látható ún. rügyek, melyek nagyságrendje arra utal, hogy centrumokban a budding jelenségét mutató vírus-részecskék helyezkednek el.

b) *A növekedési gátlás csökkenése*

Denzitásfüggő inhibíció

A malignus transzformáció során nagyon gyakran megváltozik a sejtek növekedésének denzitásfüggő gátlása. Ez összefügg a morfológiai változásoknál tárgyalt multilayer kialakulásával. (KRUSE 1965, LEVINE 1965). A normál kezeltlen sejtek növekedése a rendelkezésre álló üvegfelszín kitöltése után leáll. Ilyenkor kialakul az ún. konfluáló monolayer, melynek sejtjei nagyrészt G_1 fázisban vannak (LEVINE 1965). Ez az ún. Stationary density, aminek értékét az egy négyzetcentiméteren elhelyezkedő sejtek számával szokták jellemezni. Ez az érték egyszeri tápfolyadék cseréje után is közelítőleg állandó marad, bár a tápfolyadék folyamatos áramoltatásával némiképp növelhető (KRUSE 1965), de ilyenkor elsősorban a sejtek magot nem tartalmazó plazma-részeinek egymásra növéseivel emelkedik meg bizonyos mértékig a sejtszám. A jelenséget a kontakt inhibíció segítségével magyarázzák, vagyis azzal, hogy a sejtek további oszlásának a sejtek tulajdonságaiból származó akadálya van (sejtfelszíni, érintkezést észlelő receptorok, gátló anyagcseretermékek). A kontakt inhibíció leírásával és magyarázatával sokan foglalkoztak (ABERCROMBIE 1954, 1958, STOKER és RUBIN 1967, EDWARDS 1971, TODARO 1964, CECCARINI és EAGLE 1971).

A malignus transzformáció után a multilayer kialakulásával kapcsolatosan a *stationary density* értéke jelentősen megnő. Irodalmi adatok szerint kb. $1,7 \times 10^4$ sejt/cm² értéket is elérhet. A transzformált és nem transzformált kultúrák közötti különbség tápfolyadékesere után még kifejezettebbé válhat.

c) *A malignusan transzformált sejtek csökkent szérumigénye*

Szintén elég gyakran megfigyelhető jelenség, hogy a transzformáción átesett sejtek alacsony szérumkoncentrációt tartalmazó médiumban is szapo-

rodni képesek (TEMIN 1970, DULBECCO 1970). A szérum hatásának összehasonlítására, transzformált és nem transzformált sejteken, a sejtek klónozása látszott a legalkalmasabb módszernek. A kísérletekben az átlagos sejtszámot hasonlítják össze a klónokban, különböző savókoncentrációk használata mellett. Egy ilyen jellegű kísérletünk táblázatba foglalt adataiból látható, hogy a malignusan transzformált sejt vonal sejtjeinek jelentősen alacsonyabb szérumkoncentráció elegendő az osztódáshoz.

Megvizsgálták, hogy a szérumnak vajon melyik komponense felelős azért, hogy egy nem transzformált szövettenyészet csak savó jelenlétében mutat osztódást. Megállapították, hogy ez az anyag a nem dializálható nagy-molekulájú fehérjék közé tartozik, igen hőlabilis és a proteolitikus enzimek bontják. A savóból alkoholos ammoniumsulfáttal a γ -globulinnal együtt csapható ki, azonban nem azonos a γ -globulinnal. Nem tisztázott, hogy a szérumban levő nélkülözhetetlen anyag (vagy anyagok) tulajdonképpen serkentő hatású a sejtosztódásra, vagy annak révén fejt ki hatását, hogy közömbösíti a sejtek által termelt növekedésgátló anyagszerűtermékeket.

A szérumigénnyel kapcsolatban még definiálható az abortív transzformáció fogalma, amin azt értik, hogy a transzformált sejtek teljesen szérummentes közegben is képesek néhány oszlásra, ill. a criptic tr., azaz az a jelenség, hogy az említett szérummentes közegben tartott sejtek továbbra is megtartják eredeti tulajdonságaikat, ha ismét komplett médiumba kerülnek. Az említett jelenségek, és az ún. sebzéses szérummegvonás jelensége is felhasználható a sejtek jellemzésére ill. összehasonlítására. Az utóbbi vizsgálatnál a már kialakult monolayert valamilyen eszközzel megsértik, a sejteket eltávolítják, és azt vizsgálják, hogy a sejtmentes terület különböző alacsony szérumkoncentrációknál hogyan népesül be sejtekkel.

d) *Növekedési képesség lágyagarban és szuszpenzióban*

A kezeletlen, normál sejtek 0,3–0,4% agart vagy metilcellulózét tartalmazó médiumban egyáltalán nem, vagy csak néhányszor képesek osztódni. Ezzel szemben a malignus transzformáció után gyakran megfigyelt jelenség, hogy a sejtek a lágyagarban 80–100 sejtet tartalmazó klónokat is képezhetnek (PRESCOTT 1974) a tíz napos inkubálás után. A jelenség magyarázatára elfogadhatónak látszik az az elmélet, hogy a cell coat malignus transzformációra jellemző vastagodása gátat jelent a lágyagarban levő sejtoszlást gátló szulfatált poliamidok számára.

e) *Metabolitok felvételének változása*

Gyakran előfordul, hogy a malignus transzformáció bekövetkezésével párhuzamosan megváltozik a sejtek anyagszeréje (HALE 1975). Valamilyen aminosav vagy cukorszármazék szempontjából egy ilyen változás detektálása nagyon hasznos lehet a sejt vonalak jellemzésében. A transzportváltozásokat

leegyszerűbben radioaktivitással jelzett prekursorokkal lehet figyelemmel kísérni.

f) *Szerérzékenység változása*

Igen egyszerű mód nyílik a kezelt és nem kezelt sejtek összehasonlítására, ha különböző ismert anyagokkal kezeljük őket, és vizsgáljuk, hogy eltérő hatás jelentkezik-e, és ha igen, ez milyen mértékű.

g) *Sejtfelszíni változások, agglutinációképesség változása*

Megfigyelték, hogy a Kon. A, a csírázó búza agglutininje (és egyéb, tehát aspecifikus agglutininek) képes összecsapni a tumorsejteket. Ez nem azt jelenti, hogy a kezeletlen, m. tr-on még át nem esett sejtek nem agglutinálhatók az említett aspecifikus agglutininekkel, csak ezeknek a hatóanyag jóval nagyobb mennyisége szükséges. Normál sejtek agglutinációja fokozható proteolitikus enzim kezeléssel (pl. tripszinnel), a sejtciklus folyamán osztódáskor könnyen agglutinálhatók a kezeletlen sejtek is (INBAR és SACHS 1969, BURGER és MARTIN 1972). Az agglutinálhatóság vizsgálatánál folyamatosan emelve a Kon. A koncentrációját, meghatározzák azt az agglutinin koncentrációt, amelynél a sejtek 75%-a összecsapódik. Ez a koncentrációérték (half max. aggl.) jellemzi a vizsgálandó sejt vonalat.

h) *Egyéb specifikus változások*

Ebben a referátumban a sejtfelszín specifikus tulajdonságainak változásaira (immunológia: tumor-spec. antigének kimutatása), a tumorsejtek biokémiai jellemzésének módszereire és a hibridizációs vizsgálatokra nem térek ki.

i) *Tumorigenitás*

Jelenleg az *in vitro* karcinogenezissel foglalkozó irodalomban (EAGLE 1970) az egyetlen biztos, a malignus transzformációt igazoló jelként az állatba visszaoltott sejtek tumorigenitását fogadják el. Természetesen e kísérleteknél is vannak hibalehetőségek: számításba kell venni az állat immunrendszerét, hormonrendszerét és táplálkozási faktorokat, amelyek gátolják a tumorsejtek megeredését. E nehézségek kiküszöbölésére célszerű az adott sejtnak megfelelő izológ állatot választani a visszaoltás elvégzésére. A pozitív eredmény mindig elfogadható abban az esetben, ha a megeredt sejtek azonosíthatók a beoltott sejtekkel, negatív eredmény esetén az átoltást többször kell ismétlni magasabb sejtszám felhasználásával.

IRODALOM

- ABERCROMBIE, M., HEAYSMAN, J.: *Exp. Cell Res.* **6**, 293 (1954).
ABERCROMBIE, M., AMBROSE, E.: *Exp. Cell Res.* **15**, 232 (1958).
BERWALD, Y., SACHS, L.: *Nature (London)* **200**, 1182 (1963).
BERWALD, Y., SACHS, L.: *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 641 (1965).
BOREK, C., SACHS, L.: *Nature (London)* **210**, 276 (1966).
BOREK, C., SACHS, L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1522 (1967).
BOREK, C., SACHS, L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 83 (1968).
BURGER, H. M., MARTIN, G. S.: *Nature New Biol.* **237**, 9 (1972).
CECCARINI, C.: *Nature New Biol* **233**, 271 (1971).
CECCARINI, C., EAGLE, H.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 229 (1971).
CHEN, T. T., HEIDELBERGER, C.: *J. Nat. Cancer Inst.* **42**, 903 (1969).
DEFENDI, et al.: *Proc. Sec. Exp. Biol. Med.* **113**, 12 (1963).
DEFENDI, et. al.: *Virology* **19**, 592 (1963).
DULBECCO, R., VOGT, M.: *J. Exp. Med.* **99**, 167 (1954).
DULBECCO, R., STOCKER, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **66**, 204 (1970).
EAGLE, H. et al.: *Exp. Med.* **131**, 863 (1970).
EDWARDS, J. G. et al.: *Nature New Biol.* **231**, 147 (1971).
FREEMAN, A. E. et. al.: *J. Virol.* **1**, 362 (1967).
FREEMAN, A. E. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 445 (1971).
HAYFLICK, L., MOORHEAD, P.: *Exp. Cell Res.* **25**, 585 (1961).
HALE, A. H. et al.: *J. Cell. Biol.* **64**, 398 (1975).
DE HARVEN, E. et al.: *Virology* **51**, 240 (1973).
INBAR, H., SACHS, L.: *Nature* 223 (1969).
KRUSE, P. F., MIEDEMA, E.: *J. Cell Biol.* **27**, 273 (1965).
KRUSE, P. F., PATTERSON, M. K.: *Tissue Culture Methods and Applications* London (1973).
LEVINE, E. M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **53**, 350 (1965).
MC CLAIN, M. E., HACKETT, A. J.: *J. Immunol.* **80**, 359 (1958).
PRESCOTT, D. M., BENJAMIN, T. L.: *Methods in Cell Biology VIII.* (1974).
SANFORD, K. K.: *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **26**, 387 (1968).
STOKER, M., RUBIN, H.: *Nature (London)* **215**, 171 (1967).
STOKER, M. et al.: *Intern. J. Cancer* **3**, 683 (1968).
TEMIN, H. M., RUBIN, H.: *Virol* **6**, 669 (1958).
TEMIN, H. M., MIZUTANI, S.: *Nature (London)* **226**, 1211 (1970).
TODARO, G. J., GREEN, H.: *Symp. Fundamental Canc. Res. University of Texas* (1967).
TODARO, G. J., GREEN, H.: *J. Cell Biol.* **17**, 299 (1964).