

# CITOSZTATIKUMOK SCREENELÉSE ÉS SEJTCIKLUS VIZSGÁLATOK SZÖVETTENYÉSZETBEN

PÁLYI ISTVÁN

Onkopathológiai Kutató Intézet, Budapest

A szövettenyészti módszert kidolgozásától kezdve alkalmazták a daganatkutatásban. Ugyanez érvényes a daganatok kemoterápiájára irányuló kutatásokra is. Az *in vitro* tenyésztett sejtek alkalmas objektumnak bizonyultak annak megállapítására, vajon a kipróbálandó vegyületek befolyásolják-e a sejtek növekedését, szaporodását, vagy elpusztítják-e a sejteket. Hosszú fejlődés után nyert polgárjogot a módszer a daganat-kemoterápiás anyagok tömeges elővizsgálatában, a screeningben. A különböző metodikák kidolgozásával és fejlődésével a szövettenyészti módszert egyre szélesebb körben kezdték alkalmazni, nemcsak a daganatsejtek citomorfológiai vizsgálatára, hanem a humánterápiában használt citosztatikumok hatásmechanizmusának tanulmányozására is. A sejtkinetikai eljárások lehetővé tették, hogy egyrészt megismerjük a különböző sejtféleségek *in vitro* proliferációs kinetikáját, továbbá a citosztatikumoknak a sejtkinetikára gyakorolt hatását.

## I. Screening módszerek

Közel fél évszázada, hogy az első *in vitro* daganat-kemoterápiás vizsgálatot elvégezték. NÉMETH [28] 1929-ben közölte azt a vizsgálatát, melyben KCN és HCN hatását tanulmányozta Ehrlich egérekarcinoma sejtek tenyésztésében. A kolhicin toxikus hatását LUDFORD [25], különböző aminokét LETTRÉ és ALBRECHT [21] tanulmányozta *in vitro*. A II. világháború utáni években egyre intenzívebbé váló daganat-kemoterápiás kutatásban mind nagyobb szerepet kapott a szövettenyészti [2, 32, 42]. A kutatások ebben az időszakban elsősorban arra irányultak, lehetséges-e *szelektív daganatsejt-károsító hatást* megállapítani szövettenyészti, a nem-malignus sejtek károsodása nélkül. CORNMAN [6, 7] kimutatta, hogy a tisztítatlan, crude penicillin készítmény szelektív módon letális volt daganatsejtekre *in vitro*. Ugyancsak szelektív hatásúnak bizonyult a podophyllin [31], a mustár-nitrogén [8], a 2,6-diaminopurin [3], a trietilénmelamin [TEM; 33, 39], a puril-hisztamin [22] és más vegyületek. Ez a szelektivitás azonban csak szűk dózis-intervallumon belül érvényes [11, 36] és nincs szükségszerű korrelációban az *in vivo* daganatellenes

hatással. Ez metodikai szempontból fontos megállapítás, mert ebből következett, hogy *egyetlen sejtféleség is elegendő a screeninghez*.

A daganatellenes szereket hatásmódjuk, eredetük és egyéb szempontok alapján, különbözőképpen csoportosították. Egyik eléggé elterjedt osztályozást itt ismertetjük:

1. Alkilező szerek (mustár-nitrogén, Myleran),
2. Alkaloidok (kolhicin, Vinblasztin, Vinkrisztin).
3. Antimetabolitok (Ametopterin, 6-Merkaptopurin, 5-Fluorouracil).
4. Antibiotikumok (Mitomicin C, Bleomicin, Adriamicin).
5. Hormonok (Prednizolon).
6. Egyéb anyagok (uretán).

Ezenkívül más csoportosítások is léteznek [27], egyikre a sejtciklusról szóló fejezetben még visszatérünk.

Szövettenyészetben a vizsgált anyagok citotoxikus, citosztatikus hatását értékeljük ki. Ebben a relációban a kétféle kifejezés azonos értelmet takar, bár néha a citosztatikus hatáson a sejtszaporodás megszűnését értik, a sejt pusztulása nélkül. A hatás kiértékelése szempontjából nagy jelentőségű volt a különböző, ismert összetételű, szintetikus tápfolyadékok kidolgozása, és különféle, elsősorban emberi daganatokból származó sejtörzsek stabilizálása szövettenyészetben. Ezáltal lehetővé vált a sejtnövekedés, a sejtszaporodás standardizálása, így a növekedés gátlásának pontosabb mérése.

A bethesdai rákkutató intézetben EAGLE és munkatársai dolgozták ki azt a szövettenyésztő módszert [11], amelyet az amerikai Cancer Chemotherapy National Service Center *screening eljárásaként* fogadott el [5]. A módszerben előírt KB sejtörzset EAGLE [10] stabilizálta emberi epidermoid larynx karcinómából, de helyette más, hasonló sejtörzs, pl. HeLa is használható. A sejtszaporodás mértékét a *fehérje mennyiségének mérése* útján határozzák meg. ED<sub>50</sub> azt a szerdózist jelöli  $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezve, amely a nem-kezelt, kontroll tenyészetekhez képest felére csökkenti a sejtszaporodást. Jóllehet a módszer kvantitatív eredményt ad, de csak egyetlen paraméterre, a fehérje szintézisre van alapozva, amely nem mindig arányos a sejtszaporodás mértékével és a sejtszámmal (19, 36).

A szövettenyészeteknek a daganat-kemoterápiás screeningben való széles körű, szisztematikus alkalmazásáról, a metodikák továbbfejlődéséről HIRSCHBERG [14], valamint FOLEY és EPSTEIN [13] ad jó áttekintést. Ezekből az összefoglalókból kitűnik, hogy a különböző szerzők más és más paraméterek segítségével mérték le a citosztatikus hatást. Saját vizsgálatainkban [39] azt tapasztaltuk, hogy a *citomorfológiai alapon történő kiértékelés* nemcsak a toxicitásról tájékoztat, hanem a *szerhatás jellegére* is lehet bizonyos következtetéseket levonni. Az alkilező szerek többsége például, szubtoxikus dózisban, a kezelést követő első napon mitózásszám csökkenést, kismértékű sejtmegegyeztetést idéz elő. A kezelést követő 2. naptól kezdve a mitózisok száma fokoza-

1. táblázat

Abnormális mitózisok és többmagvú sejtek arányának változása citotoxikus hexitek hatására, HeLa sejttenyészetekben

Anyag és dózis	Idő (óra)	Szabályos	Torz	Többmagvú sejtek %
		mitózisok %		
Kontroll	24	6,1	0,9	4,2
	48	2,3	0,6	1,25
	72	2,9	1,3	1,2
	96	5,0	1,0	2,5
Degranol 5 µg/ml	24	1,3	1,8	5,9
	72	0,7	8,3	34,2
	168	0,2	5,7	42,3
Mannitmyleran 50 µg/ml	24	1,8	0,8	8,2
	96	—	1,4	18,5
Dibrómmannit 25 µg/ml	24	0,7	0,4	6,1
	96	0,	9,0	7,4
Dibrómdulcit 25 µg/ml	24	0,7	0,2	5,2
	48	0,95	0,55	3,6
	72	0,65	3,9	5,7
	96	—	11,5	13,6
DAD 2,5 µg/ml	24	0,4	0,3	2,0
	48	0,2	2,9	3,1
	72	—	1,4	2,6
	96	—	0,9	3,8

2. táblázat

Vinblasztin hatása a mitózisok és többmagvú sejtek gyakoriságára HeLa sejttenyészetekben

	Időpont (óra)	Szabályos	Torz	Többmagvú sejtek, %
		mitózisok %		
Nem kezelt kontroll	24	3,2	0,7	3,8
Vinblasztin-kezelt, 0,001 µg/ml, 48 órás kezelés	24	—	76,6	2,0
	48	—	24,0	60,0
	72	—	14,6	75,0
	96	—	3,4	75,8
	120	—	7,2	77,6
	144	—	4,6	84,2

tosan emelkedik és meghaladja a nem kezelt, kontroll értéket [34, 35, 40], a populáció egy- és többmagvú óriássejtekből áll. Citosztatikus hatású alkaloidok (kolhicin, Vinblasztin, Vinkrisztin) hatására már néhány óra múlva megfigyelhető a mitózisban (metafázisban) arretált sejtek felszaporodása, amelyek később szétessenek, vagy többmagvú óriássejteké alakulnak [37]. A különböző időpontokban vett mintákon végzett sejtszámolással a mennyiségi változás is megállapítható és a szerhatás dinamikája is követhető (1–2. táblázat).

*Szuspenzióban tenyésztett sejtek* ugyancsak alkalmasak citosztatikus hatás értékelésére. Ma már számos átoltható, szolid vagy aszcitesz formában

növő állati daganatsejt tenyésztethető nem letapadó formában, szuszpenzióban (L 1210, Yoshida, Ehrlich, NK/Ly, P388 stb.). A sejtszaporodás gátlása a szer hozzáadása után vett mintákon, sejtszámolással könnyen megállapítható, a citológiai hatás pedig a szuszpenzióból készített keneten vizsgálható [24].

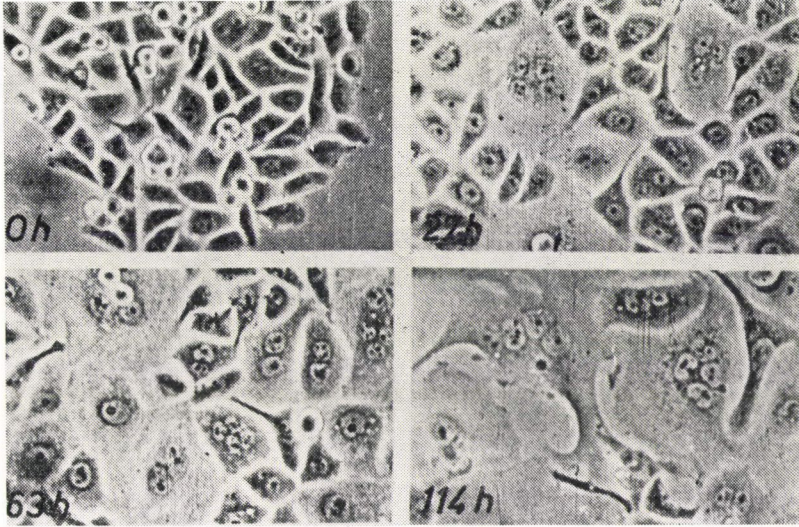
A *primér emberi daganattenyészeteken történő kemoterápiás vizsgálat* célja az, hogy a klinikumban használt citosztatikumok közül a leghatásosabbat válasszák ki. Az első ilyen irányú vizsgálatokat WRIGHT és mtsai [47] közzölték 1957-ben, és ezzel elsősorban egyéni, individuális terápiát próbálnak megvalósítani. Az „in vitro predictive test”-nek is nevezett módszer azóta széles körben elterjedt.

Az *in vitro screening használhatóságát* az in vivo adatokkal való összevetés és az *in vitro — in vivo korreláció mértéke* határozza meg. Az irodalom [9, 12] és saját adataink szerint [36], a korreláció a hatásos anyagoknál 70–80 százalék. Ugyanakkor elég magas (44%) a fals pozitív anyagok aránya. Az in vitro vizsgálatokban „kihagyott”, fals negatív anyagok száma alacsony volt (12%). A téves eredmény a vegyület kémiai jellegével (Endoxan: „Transportform”), oldhatatlanságával magyarázható. Az Endoxannak a szervezetben aktiválódnia kell ahhoz, hogy hatását kifejthesse. Ez az egyetlen példa is felhívja a figyelmet arra a szempontra, hogy a citosztatikus hatás kiértékelésénél csakúgy, mint más, szövettanban végzett vizsgálatnál, mindig figyelembe kell venni a gazdaszervezet hiányát, amelynek komplex (detoxikáló, metabolizáló) hatása nem érvényesül.

Konklúzióként megállapíthatjuk, hogy az in vitro eljárások komoly segítségét jelentenek a daganat-kemoterápiás elővizsgálatokban, a vizsgált anyagok toxicitásának, citosztatikus és citomorfológiai hatásának felderítésében. Előnye, hogy igen kevés (néhány mg) anyaggal, rövid idő alatt, viszonylag olcsón elvégezhető a vizsgálat.

## II. Sejtciklus vizsgálatok

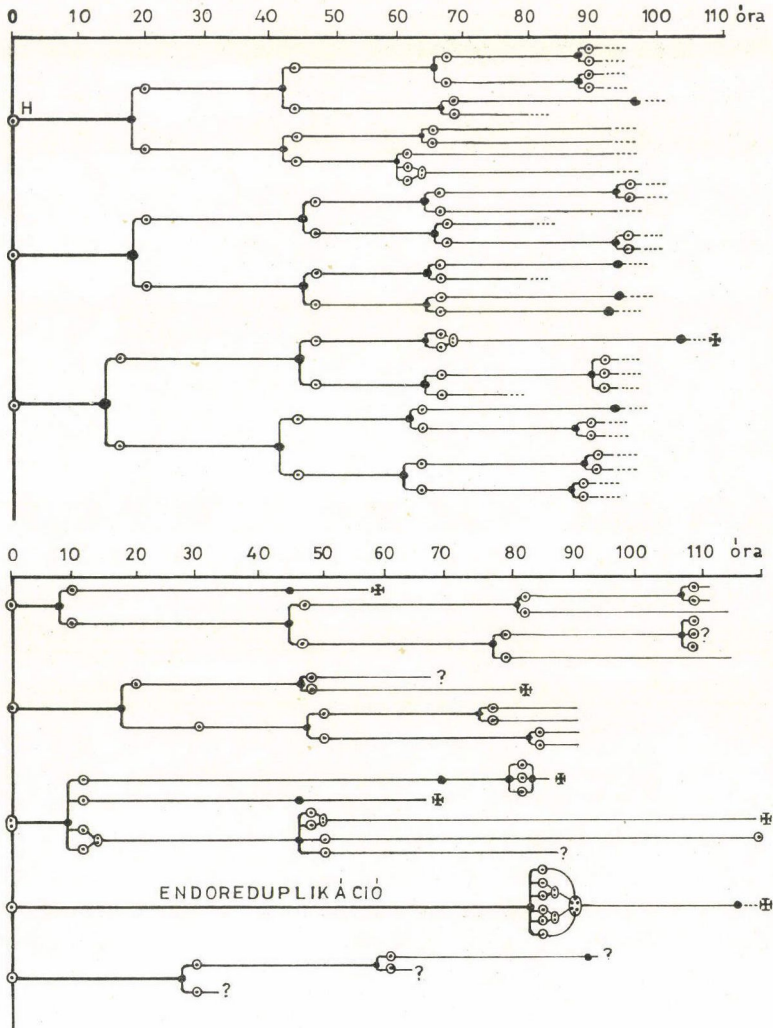
A citosztatikumok a sejtek életében mélyreható változásokat hoznak létre. A citomorfológiai változások *dinamikája* legjobban közvetlen megfigyeléssel, *fázis-kontraszt mikrokineomatográfiás módszerrel* követhető. Egyedi sejtek generációs ideje pernyi pontossággal határozható meg, egyik anafázistól a következő anafázisig (16, 18). Vizsgálatainkban kezeletlen és 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Degranollal (mannit-mustár) kezelt HeLa sejtek generációit követtük 5 napon keresztül (1. ábra) (36). A kezelt sejtek tenyészetében a nem kezeltékhez képest (2. ábra) mélyreható változások következtek be. Ez részben a mitózisok késésében, vagy megszűnésében, részint a posztmitotikus sejtfúziók útján létrejövő többmagvú óriássejtek felszaporodásában manifesztálódott (3. ábra). E módszer hátránya, hogy viszonylag kevés sejt analizálható egy-egy kísérletben.



I. ábra. HeLa sejtenyészet óriássejtes átalakulása, 5  $\mu\text{g/ml}$  Degranol kezelés hatására. Fázis kontraszt-mikrokinematográfiás felvétel sorozat.

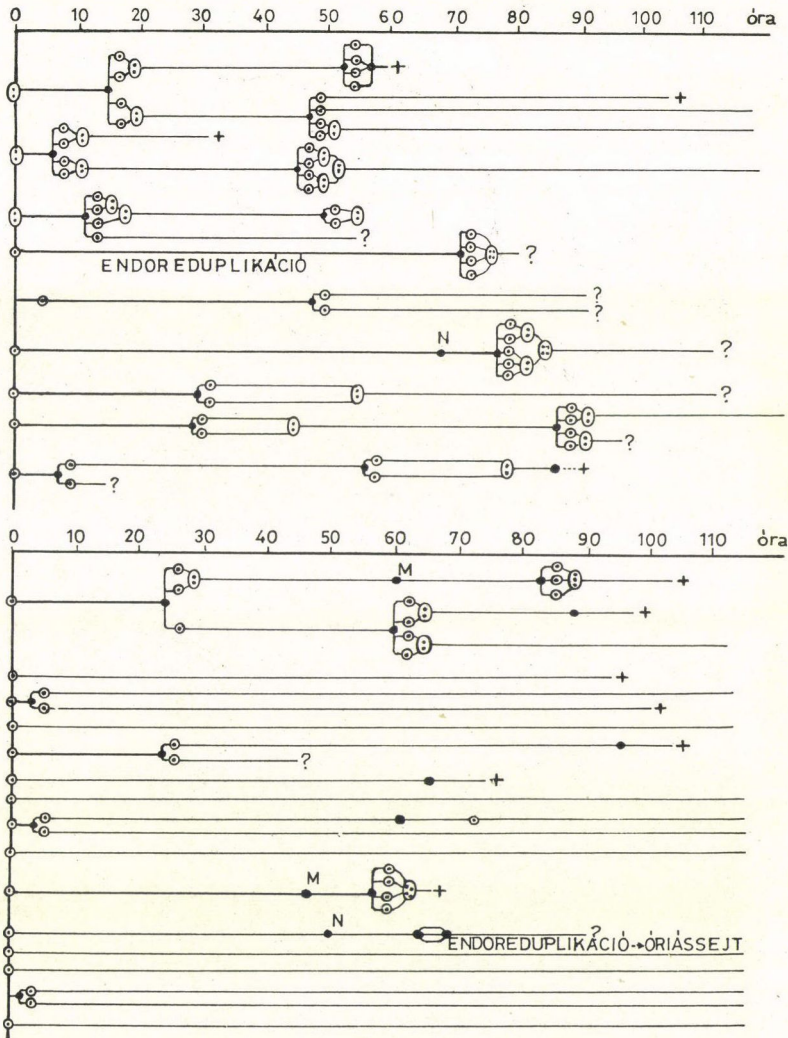
A szoros értelemben vett sejtciklus vizsgálatok a  $^3\text{H}$ -timidin felhasználásával és az *autoradiográfiás technika* kidolgozásával kezdődtek. HOWARD és PELC [15], valamint LAJTHA [20] mutatták ki, hogy a sejt életciklusa 4 külön fázisra osztható: M. (mitózis),  $G_1$  (preszintetikus), S (DNS szintézis) és  $G_2$  (posztiszintetikus). A sejt életciklusának ez a felosztása ma már minden kézikönyvben megtalálható. A sejtciklus és fázisai időtartamának meghatározására szolgál a *jelölt mitózis módszer* [45]. Ennek lényege a nem-szinkron növekedő tenyészetek rövid ideig tartó jelölése  $^3\text{H}$ -timidinnel, majd az időnként vett mintákban a jelölt és nem-jelölt mitózisok arányának megállapítása. Ezzel a módszerrel vizsgáltuk meg a Degranol [35], a dibrómdulcit (4. ábra) [41] és a dianhidrodulcit [38] hazai gyártmányú citosztatikumok sejtciklusra gyakorolt hatását. Mindhárom vegyület jelentősen meghosszabbította az átlagos sejtciklus időt, azon belül elsősorban a  $G_1$  és S fázis időtartamát. A jelzett mitózis módszer így arról is tájékoztat, hogy a sejtciklus egyik vagy másik fázisa érzékenyebb-e a szerek hatására, mint a többi.

A citosztatikumok fázis-specifitásának a megállapításához a *telepképző képesség* (cloning efficiency) *módszerét* [43] használják. Segítségével mennyiségiileg meghatározható a citosztatikumok vagy más természetű effektusok (röntgen-, ultrabolya sugár) sejtkárosító hatása. Alkilező szerekkel történő kezelés esetén, a dózis emelésével logaritmikusan csökken a túlélő sejtek, illetve az azokból kifejlődött telepek aránya (5. ábra). Ha a kezelést fázis-specifikus citosztatikummal (Vinkrisztin, arabinozil-citozin) végzik, a telepek számának



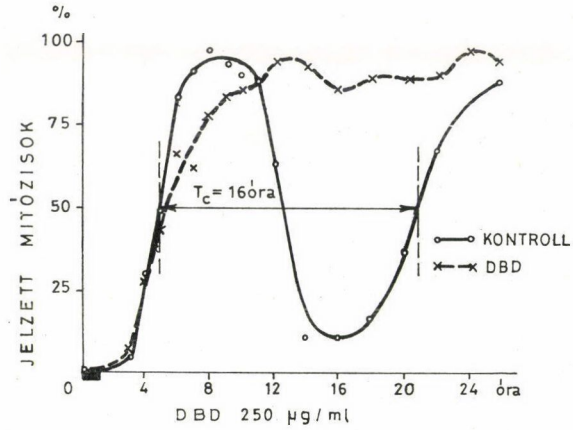
2. ábra. HeLa sejtek generációs idejének vizsgálata mikrokinematográfiai módszerrel. Nem kezelt kontroll tenyészet. A körök a sejteket, a körökben levő pontok a sejtmagok számát, a fekete körök a mitózisokat, a keresztek a sejt pusztulását jelzik.

a csökkenése egy bizonyos dózis után már megszűnik (6. ábra) [17, 26]. Annak eldöntésére, hogy a fázis-specifikus sajátságokkal rendelkező vegyület a sejtciklus melyik fázisában hat, a sejteket szinkronizálni kell. A *sejtszinkronizálás* számos módszert írtak le, melyekről jó összefoglalást ad NIAS és Fox [29]. Két csoportot különböztethetünk meg annak alapján, hogy fizikai vagy kémiai módszert választunk. A sejtek életét legkevésbé megzavaró, fizikai eljárás a mitózis szelekció, amely azon az elven alapul, hogy a lekerekedett, mitózisban

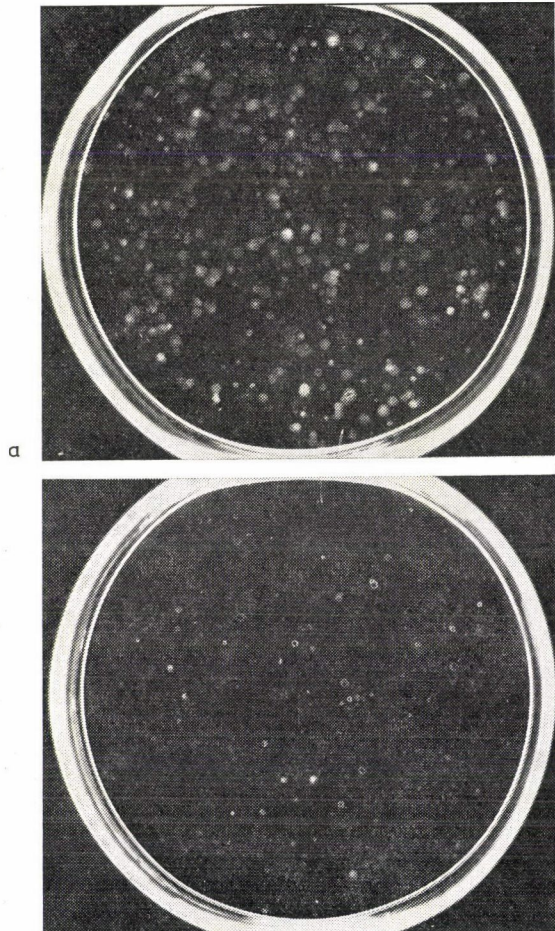


3. ábra. 5  $\mu\text{g/ml}$  Degranollal kezelt HeLa tenyészet. Jelmagyarázat: a 3. ábra szövegében. Kezelés hatására meghosszabbodott az interfázis-idő, gátolt a mitózisba lépés, fokozódott a sejtfúziók aránya és számos sejt pusztult el.

(metafázisban) levő sejtek kevésbé tapadnak a szubsztrátumhoz, mint a többi sejt, így azok a tápfolyadék segítségével lerázhatók a monolayer felületéről és összegyűjthetők (7. ábra). A módszer hátránya, hogy viszonylag kevés sejt nyerhető így, de ismételt lerázással és a lerázott sejtek  $+4^\circ\text{C}$ -on történő 1–2 órás tárolásával a sejtmennyiség növelhető. Az említett összefoglalásban nem szerepel egy újabb módszer, mely szerint az izoleucinnak a tápfolyadékból való kihagyásával kínai hőreség sejtek  $G_1$  fázisban arretálódnak. Izoleucin hozzáadása után a sejtek szinkron kezdik meg a DNS-szintézist [23].

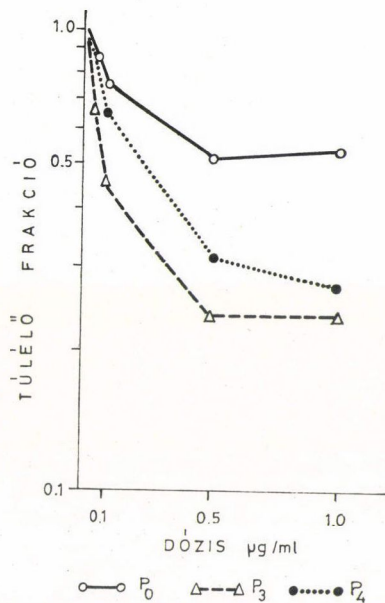


4. ábra. Dibrómdulcít (DBD) hatásának vizsgálata kínai hörcsög sejtek életciklusára, jelölt mitózis módszerrel. Jelölés:  $^3\text{H}$ -timidinnel ( $0,2 \mu\text{Ci/ml}$ ) 15 percig. A sejtek normális ciklusa jelentősen megváltozott.

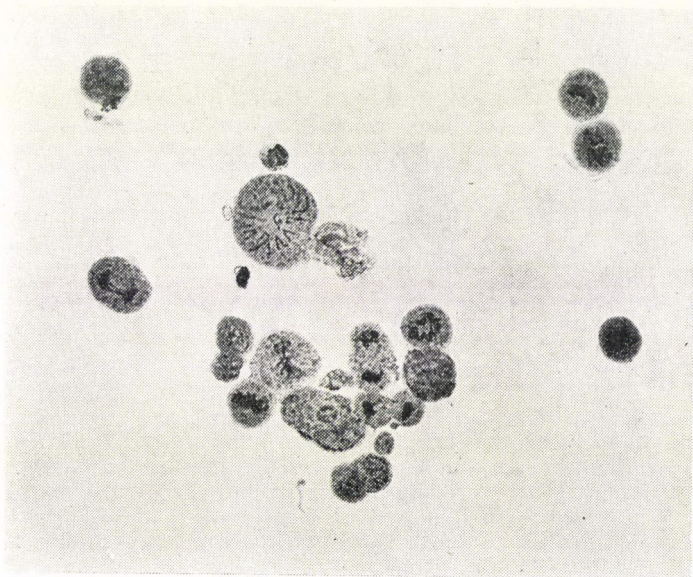


5. ábra. Dibrómdulcít hatásának vizsgálata L sejtek (Earle) túlélésére telepkepző képesség (cloning efficiency) módszerrel. a) Nem kezelt tenyészet, b)  $75 \mu\text{g/ml}$  DBD-vel 2 óráig kezelt tenyészet, 12 napos tenyésztés. Kezelés hatására a telepek száma csökkent, nagysága kisebb lett.





6. ábra. Vinkrisztin hatása egér szarkóma sejtek túlélésére. A szer fázis-specifikus sajátosságára utal, hogy 0,5 µg/ml dózis felett a telepek száma nem csökken.



7. ábra. Mitózis szelekcióval szinkronizált kínai hörsög sejtek. Ecetsavas orcein festés.

A sejtek *fázis-érzékenységét* az előzőekben leírt cloning efficiency és sejt-szinkronizálás *kombinálásával* állapítják meg, és a sejt korától függő válasznak (age response) nevezik [27]. BRUCE és mtsai [4] vezették be a citosztatikumoknak sejtkinetikai szempontból történő osztályozását:

1. Nem-fázis-specifikus szerek; a hatás a proliferációs állapottól független (HN2, gamma sugárzás).
2. Fázis-specifikus szerek; a szerek a generációs ciklusnak csak egyik fázisában hatnak (Vinblasztin, Ametopterin, arabinozil-citozin = S fázis).
3. Nem-fázis-specifikus szerek; a hatás függ a proliferációs állapottól (Endoxan, Aktinomycin D).

Az utóbbi időben a citosztatikumokat többnyire 2 csoportra, fázis-specifikus és nem-fázis-specifikus szerekre osztják [44]. A sejtciklus vizsgálatok alapján tehát egy — az előzőeknél racionálisabb alapon nyugvó — új osztályozás valósult meg. Ma már a legtöbb, hatásos daganat-kemoterápiás vegyületről megállapították, van-e fázis-specifikus hatása, és ha igen, a sejtciklus melyik fázisa a legérzékenyebb [1, 27]. A nem-fázis-specifikus szerekkel szemben sem egyformán érzékeny mindegyik fázis [27]. Kimutattuk, hogy a dianhidrodulcitol nagyobb mértékben károsítja a HeLa sejteket  $G_1$ , késői S és M fázisban, mint a sejtciklus többi fázisában [38]. Számos vizsgálatot végeztek annak megállapítására is, melyek azok a citosztatikumok, amelyek a nem-proliferáló, ún.  $G_0$  sejteket is károsítják vagy elpusztítják [30, 46].

A szövettényészetben végzett sejtciklus vizsgálatok jelentős mértékben járultak hozzá, hogy jobban megismerjük a daganatsejt-populációk kinetikáját, a citosztatikumok hatásmódját. Ezzel segítséget adtak a humánterápiában alkalmazott kombinált kemoterápiás kezelések megtervezéséhez.

#### IRODALOM

1. BHUYAN, B. K., SCHEIDT, L. G., FRASER, T. J.: *Cancer Res.* **32**, 398 (1972).
2. BIESELE, J. J.: In: M. B. Visscher (ed.): *Methods in Medical Research. The Yearbook Publ. Inc. Vol. 4*, p. 272 (1951).
3. BIESELE, J. J., BERGER, R. E., WILSON, A. Y., HITCHINGS, G. H., ELION, G. B.: *Cancer* **4**, 186 (1951).
4. BRUCE, W. R., MEEKER, B. E., VALERIOTE, F. A.: *J. nat. Cancer Inst.* **37**, 233 (1966).
5. *Cancer Chemotherapy National Service Center: Specifications for screening in tissue culture.* *Cancer Chemot. Rep.* **1**, 63 (1959).
6. CORNMAN, I.: *J. Gen. Physiol.* **28**, 113 (1944).
7. CORNMAN, I.: *Science* **99**, 247 (1944).
8. CORNMAN, I., ORMSBEE, R. A.: *Feder. Proc.* **6**, 390 (1947).
9. DIXON, G. J., SCHABEL, F. M., SKIPPER, H. E., DULMADGE, E. A., DUNCAN, B.: *Cancer Res.* **21**, Pt. 2, 535 (1961).
10. EAGLE, H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 362 (1955).
11. EAGLE, H., FOLEY, G. E.: *Amer. J. Med.* **21**, 739 (1956).
12. EAGLE, H., FOLEY, G. E.: *Cancer Res.* **18**, 1017 (1958).
13. FOLEY, G. E., EPSTEIN, S. S.: *Adv. Chemotherapy* **1**, 175 (1964).
14. HIRSCHBERG, E.: *Cancer Res.* **18**, 869 (1958).
15. HOWARD, A., PELC, S. R.: *Heredity, Suppl.* **6**, 261 (1953).

16. HSU, T. C.: *Texas Rep. Biol. Med.* **18**, 31 (1960).
17. KARON, M.: *Cancer Res.* **29**, 687 (1969).
18. KOZUKA, S., MOORE, G. E.: *J. nat. Cancer Inst.* **36**, 623 (1966).
19. KRUSE, P. F., WHITE, P. B.: *Exp. Cell Res.* **23**, 423 (1961).
20. LAJTHA, L. G., OLIVER, R., ELLIS, F.: *Brit. J. Cancer* **8**, 367 (1954).
21. LETTRÉ, H., ALBRECHT, M.: *Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.* **279**, 206 (1943).
22. LETTRÉ, H., BALLWEG, H., ENDO, H., SCHLEICH, A., SIEBS, W.: *Biochem. Pharmacol* **1**, 137 (1958).
23. LEY, K. D., TOBEY, R. A.: *Exp. Cell Res.* **47**, 453 (1970).
24. LIPPMAN, M. M.: *Cancer Chemoth. Rep.* **58**, 181 (1974).
25. LUDFORD, R. J.: *Arch. exper. Zellforsch* **18**, 411 (1936).
26. MADOC-JONES, H., MAURO, F.: *J. Cell. Physiol.* **72**, 185 (1968).
27. MAURO, F., MADOC-JONES, H.: *Cancer Res.* **30**, 1397 (1970).
28. NÉMETH, L.: *Arch. exper. Zellforsch.* **8**, 177 (1929).
29. NYAS, A. H. W., FOX, M.: *Cell Tissue Kinet.* **4**, 375 (1971).
30. OLÁH, E., PÁLYI, I., SUGÁR, J.: In: *European Study Group for Cell Proliferation. 7th Meeting, Amsterdam, 1975. Abstracts*, p. 73 (1975).
31. ORMSBEE, R. A., CORNMAN, I.: *Cancer Res.* **7**, 717 (1947).
32. ORMSBEE, R. A., CORNMAN, I.: *Cancer Res.* **8**, 384 (1948).
33. PÁLYI, I.: In: *Twenty-five Years in the Fight against Cancer. Ed.: State Oncological Institute, Budapest* p. 345 (1966).
34. PÁLYI, I.: *Neoplasma* **14**, 159 (1967).
35. PÁLYI I.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **12**, 125 (1969).
36. PÁLYI I.: *Kandidátusi értekezés, Budapest* (1969).
37. PÁLYI, I.: In: *Fifth Hung. Conf. for Therapy and Pharmacol. Research. Acad. Press Hung. Budapest* p. 525 (1971).
38. PÁLYI, I.: *Cancer Chemoth. Rep.* **59**, 493 (1975).
39. PÁLYI, I., GRÉCZI, E.: *Neoplasma* **8**, 195 (1961).
40. PÁLYI, I., GYESKÓ, A., SUGÁR, J.: *Cancer Chemoth. Rep.* **53**, 115 (1969).
41. PÁLYI, I., OLÁH, E., PÁLYI, V.: In: M. Heijzlar, M. Semonsky, S. Masak (eds.): *Antineoplastic Chemotherapy and Radioprotectives. Vol. 2, Urban and Schwarzenberg, München—Berlin—Wien* p. 423 (1972).
42. POMERAT, C. M.: In: M. B. Visscher (ed.): *Methods in Medical Research. The Yearbook Publ. Inc. Chicago Vol. 4*, p. 267 (1951).
43. PUCK, T. T., MARCUS, P. I., CIECIURA, S. J.: *J. Exp. Med.* **103**, 273 (1956).
44. PUTTEN, L. M. VAN: *Cell Tissue Kinet* **7**, 493 (1974).
45. QUASTLER, H., SHERMAN, F. G.: *Exp. Cell Res.* **17**, 420 (1959).
46. THATCHER, C. J.: *J. nat. Cancer Inst.* **42**, 363 (1969).
47. WRIGHT, J. C., COBB, J. P., GUMPORT, S. L., GOLOMB, F. M., SAFADI, D.: *New England J. Med.* **257**, 1207 (1957).