

Diss. B 913

Kísérletek primer sejt kulturákkal

Doktori disszertáció

Készült: SZBK Genetikai Intézetében  
1972-73.

Készítette: Fekete Éva



Diss.

B 913



## V á z l a t

### I. B e v e z e t é s /irodalmi áttekintés/

1. A szövettenyésztésnél általánosan használt anyagok és módszerek.
2. A szövetkulturák típusai
3. Sejttypusok a szövetkulturákban.
4. A rovar szövetkulturák felhasználási területe.

### II. K i s é r l e t i r é s z

#### 1. Anyagok és módszerek

- a./ Primer kulturák előállításához alkalmazott anyagok és módszerek.
- b./ A primer sejtkulturákon végzett kísérletekhez alkalmazott anyagok és módszerek.

#### 2. Eredmények értékelése

- a./ Primer sejtkulturák értékelése.
- b./ Primer sejtkulturákon végzett kísérletek értékelése.

### III. E r e d m é n y e k m e g b e s z é l é s e

### IV. I r o d a l o m

I. 1./ A szövettenyésztésnél általánosan használt anyagok és módszerek

A szövettenyésztést ma már a biológia és az orvostudomány sok területén alkalmazzák. A módszer jelentősége a sejtbiológia és a patológia területén általánosan elismert.

A gerinces sejtek és szövetek tenyésztésének ma már több évtizedes multja és hatalmas irodalma van. A gerinctelenek sejtjeinek in vitro tenyésztésével kapcsolatos irodalomban is vannak fél évszázados adatok, de az irodalom jelentős része az elmúlt tíz év kutatásainak eredménye.

A rovarszövettenyésztés irodalmát áttekintve, megfigyelhető a törekvés egy jól definiált, szintetikus tápfolyadék előállítására. Az irodalomban egységesen képviselt álláspont az, hogy a kémiaailag definiált, szintetikus tápfolyadék előállításánál a vizsgált rovar hemolympa analizisét kell szem előtt tartani. Ennek megfelelően sok szerző végzett részleges, vagy teljes hemolympa analizist.

A hemolympa: szerves ion koncentrációjának meghatározására jól bevált és általánosan alkalmazott módszer a lángfotometria. /Florkin, 1965./

A protein tartalom meghatározására a gélfiltrációt alkalmazzák, de jól beváltak a különböző elektroforetikus módszerek is. /Loughton, 1968./

A vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a hemolympában igen magas a szabad aminosavak koncentrációja. Ezek meghatározása aminosav analizátor segítségével történik.

A rétegekromatográfia alkalmazásával lehetőség nyílik a cukrok kromatográfiás analizisére. Az ilyen vizsgálatoknál szembetűnő az, hogy a monoszaharidok koncentrációja igen alacsony. Míg az egész állatvilágban a cukoranyagcsere központjában egy monoszaharid áll, addig itt a központi szerep egy nem redukáló diszaharidék, a trehalózé. /Alumot, 1969./

Ioncserélő kromatográfia alkalmazásával sikerült megvizsgálni néhány rovar hemolyphájának savoldékony foszfát mennyiségét és milyenségét. /Wyatt, 1956./

A *Hyalophora cecropia* esetében négy komponenst sikerült meghatározni, amelyek 26-44 mM koncentrációban, anorganikus ortofoszfát, L- glicerofoszfát, foszforilkolin formájában van jelen.

A hemolympa összetételéről szerzett ismeretek alapján S, S Wyatt /1956/. készített először tápfolyadékot, melyben hosszabb ideig lehetett fenntartani moszkito ováriumból nyert sejteket. Wyatt médiuma anorganikus sókból, cukrokból, aminosavakból, 10 % hőkezelt hemolympából állt. A szerző két héten keresztül figyelt meg intenzív növekedést ebben a médiumban. Ezt a médiumot néhány szerző továbbfejlesztette, mások új típusú tápfolyadékokat állítottak össze különböző rovarokból származó sejtek tenyésztésére. Hirumi és Maramorosch /1964./ levéltetvek, Landureau /1966./ csótányok, Echaliér és munkatársai *Drosophila* /1968/, Schneider mosquitók számára készített tápfolyadékot. /Schneider, 1964./

Más szerzők a gerinces szöveteknél használt tápfolyadékokat vették át és alkalmazták gerinctelenek sejtjeinek tenyésztésére. Necco és Martini /1961/ pd. Octopus sejteket tenyésztett Parker 199-es médiumban, melyet az ozmotikus nyomás emelése érdekében NaCl-al egészített ki.

A sok próbálgatás ellenére sem sikerült olyan tápfolyadékot előállítani, amelyben a gerinctelenek különböző osztályaiba tartozó állatok sejtjei jól tenyészthetők. Ennek okát a hemolympa analizisek eredményei megmagyarázzák. Az eddig elvégzett vizsgálatok azt bizonyítják, hogy még fajok között is lényeges különbségek vannak az ozmotikus és pH viszonyok vonatkozásában. A Na/K arány is igen változó 0,1-25 közötti értékeket vesz fel.

Mivel in vitro körülmények között a tápfolyadék jelenti a közvetlen környezetet a sejtek számára, amelyből a növekedésükhöz szükséges anyagokat felvesszük, bomlástermékeiket pedig leadják, a tápfolyadék összetétele döntő jelentőségű a tenyésztés szempontjából.

Az eddigi vizsgálatok eredményeit összefoglalva a tápfolyadék elkészítésénél a következő szempontokat célszerű figyelembe venni:

- 1./ A hemolymphában jelenlévő anorganikus ionok koncentrációja.
- 2./ A hemolymphában lévő cukrok koncentrációja és minősége.
- 3./ A hemolymphában lévő proteinek ill. szabad aminosavak koncentrációja.
- 4./ A hemolymphában lévő vitaminok koncentrációja ill. milyensége.
- 5./ A hemolymphában lévő szerves savak koncentrációja.
- 6./ Egyéb anyagok jelenléte a hemolymphában.

A tápfolyadékokban felhasznált anyagok élettani jelentősége:

#### A./ Anorganikus sók

A gerinctelenek hemolymphájában lévő anorganikus sók szükségesek a sejtek növekedéséhez, életfunkcióik végzéséhez. A hemolympa ozmotikus nyomásának és pH-jának szabályozásában szerepük nem olyan lényeges, mint a gerincesek vérében lévőké. A tápfolyadék összeállításánál különös gondot kell fordítani a Na/K arány helyes megtartására és a  $\frac{Na + K}{Ca + Mg}$  arány alacsony voltára, a vizsgált rovar hemolympa analíziséből nyert adatoknak megfelelően.

#### B./ Szerves savak

A legtöbb állat véréből eltérően a rovarok hemolymphája tartalmaz szabad szerves savakat.

Lényeges szerepet játszanak a hemolympa kation egyensúlyának fenntartásában, mivel a benne lévő szervetlen ionok nagy részét megkötik. Ezen kívül hozzájárulnak még a hemolympa ozmotikus nyomásához és pufferkapacitásához.

### C./ A m i n o s a v a k

A rovarok hemolypháját igen magas aminosavszint jellemzi. A hemolympa teljes ozmotikus nyomásának 40 %-át az aminosavak teszik ki. A hemolympa magas aminosav szintje a rovarok számára készített tápfolyadékokban is tükröződik, annak ellenére, hogy a sejtek tényleges aminosav igényével kapcsolatos vizsgálatok igen hiányosak, az irodalmi adatok ellentmondóak. Landureau és mts /1969./ anyagcsere vizsgálatokat végeztek szövetkulturákban, az esszenciális aminosavak és vitaminok meghatározása céljából. Vizsgálataik alapján néhány aminosav: Arginin, Histidin, Methinnin, Leucin, Phenilalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, esszenciálisnak, mások Glycin, Cystein, Prolin, előnyösnek bizonyultak.

### D./ S z é n h i d r á t o k

A hemolympában jelenlévő szénhidrátok feltehetően a növekedő sejtek energia igényét biztosítják. A rovarok hemolyphájában lévő redukálható cukrok koncentrációja igen alacsony, főleg glükóz és fruktóz formájában van jelen.

A gyakorlatban használt tápfolyadékokat tekintve úgy tűnik, hogy ezek szénhidrát tartalma nincs tekintettel a hemolympa analízisből nyert értékekre. A szerzők a különböző szénhidrátokat igen különböző koncentrációkban alkalmazzák. A koncentráció 100 mg/ 100 ml-től 5400 mg /100 ml /Grace 1966./ értékek között változik.

### E./ V i t a m i n o k

Kizárólag a B vitamin csoportról mutatták ki, hogy esszenciálisak a rovarok számára. /Grace, 1962./

Elsőként Grace /1958/ közölte 1958-ban, hogy tápfolyadékba tett B vitamin hatására a sejtek növekedése fokozódott. Az általa kidolgozott tápfolyadék a B vitamin csoport minden tagját tartalmazza, 0,002mg/100 ml koncentrációban.

A szerzők nagy része a sejtek növekedéséhez szükséges vitaminokat Yeast extrakt formájában alkalmazza.

F./ N u k l e o t i d o k , s z t e r o l o k

Néhány szerző tápfolyadékában alkalmazta azokat a nukleotidokat, amelyek az emlős sejtek számára in vitro körülmények között igen lényegesnek bizonyultak.

A közölt adatokból kiderült, hogy a gerinctelen sejtek in vitro növekedésére ezek hatástalanok.

G./ K i e g é s z i t ő a n y a g o k

A tápfolyadék előállításánál alapvető cél, hogy az kémiaailag minél definiáltabb legyen. A gyakorlat azonban azt mutatja, hogy a szintetikus médiumok önmagukban nem elegendők a sejtek életfolyamatainak biztosítására.

A szintetikus médiumokat ezért különböző adalék anyagokkal egészítik ki. Ilyenek pl. különböző biológiai folyadékok, savók, homológ vagy idegen hemolympha, amnionfolyadék, szövetkivonatok, fehérje hidrolizátumok.

Az adalék anyagok sok ismeretlen faktort jelentenek, ezért több kísérletet végeztek kiküszöbölésükre. Horikawa és Kuroda /1959/ közölték Drosophila sejtek több hónapos túlélését, kémiaailag teljesen definiált médiumban. A legtöbb kísérlet azonban eredménytelen volt. A tenyésztés szempontjából a tápfolyadék összetételén kívül jelentős probléma a steril kulturák létrehozása. A rovarok fenntartása steril körülmények között általában nehézkes. Ma már több szintetikus, autoklávozható táptalajt dolgoztak ki, de ezeknek csak kis része alkalmas a rovarok teljes fiziológiai kifejlődéséhez. /Sang, 1956, Friend 1958, Bougherty 1959/.

A legjobb, de igen költséges megoldás a rovarok fenntartása steril körülmények között létrehozott növény tenyésztéken. /Mitsuhashi, 1964./

Steril rovartenyészetek felületileg sterilizált embriókból, illetve tojásokból nyerhetők. A felületi sterilizálásra különböző módszerek ismertek. Általában Na-hypchlorit, alkohol, alkoholban oldott HgCl<sub>2</sub> különböző koncentrációju oldatait használják.

/Schneider, 1967./



## 2./ A szövetkulturák típusai:

### A./ P r i m e r k u l t u r á k

a./ Tulélő sejtek, alacsony mitotikus aktivitással.

b./ Explantált tenyészetek

Az ilyen típusu kulturák rögzített szövetfragmentumokból történő sejtkiváncsorlással, majd a kíváncsorolt sejtek osztódásával jönnek létre.

c./ Monolayer tenyészetek

Ha szövetdarabokból, vagy intakt embriókból nyert sejtszuspenziót ülepítjük, a sejtek kiülnek a tenyésztedény falára, ott osztódnak. Az osztódás után létrejött sejtek a kontakt inhibíció következtében egyrétegű tenyészetet alkotnak.

### B./ S z e k u n d e r k u l t u r á k

Szekunder kulturákhoz a primer sejtek passzálása révén jutunk. A szekunder kulturákban a sejtek néhány hétig megtartják mitotikus aktivitásukat, majd a mitózis sebessége fokozatosan csökken, a kulturák elpusztulnak.

### C./ S e j t v o n a l a k

Ha a sejtek képesek adaptálódni az in vitro körülményekhez, elvileg korlátlanul fenntartható sejtvonallá alakulhatnak. Bár az adaptáció mechanizmusa szinte teljesen ismeretlen, az bizonyos, hogy közben a sejtek lényeges morfológiai és genetikai változásokon mennek keresztül.

## 3./ Sejt típusok a szövetkulturákban

Az emlős szövetkulturákban általában három sejt típus fordul elő: fibroblaszt, epiteliális és kerek forma.

A rovar szövetkulturák sejt típusainem sorolhatók határozott csoportokban. Az irodalomban fibroblaszt-epitelszerű, vagy amöboid néven szerepelnek.

A tenyésztett sejtek morfológiája általában függ a kiindulási állat rendszertani helyétől. Pl.: a levéltetveknél epítészzerű, a csótányoknál fibroblasztszerű, a Drozophilánál amöboid formák a leggyakoribbak.

### 3./ A gerinctelen szövetkulturák felhasználási területe

#### A./ G e n e t i k a i k u t a t á s

A genetikai kutatás megfelelő objektuma olyan szomatikus sejt lehet, amelyet alacsony kromoszóma szám, a kromoszóma párok között jól látható különbség és több kromoszóma marker jellemez. Ezeknek a követelményeknek a Drozophila szomatikus sejtjei teljes egészében eleget tesznek. Ennek ellenére igen kevés adat utal a Drozophila szomatikus sejtjeinek genetikai felhasználására, bár napjainkban már több kutató rendelkezik Drozophila eredetű sejtvonallal. /Echalier 1965, Dolfini 1966, Scheider 1967./

#### B./ H o r m o n k u t a t á s

A hormonkutatásban kiemelt szerepe van az ekdizon hatás tanulmányozásának. Mind az  $\alpha$ , mind a  $\beta$  - ekdizon hatását tanulmányozták sejtkulturákon. A vizsgálatokról közölt adatok megkérdőjelezően ellentmondóak. Egyes szerzők RNS DNS szintézis fokozódást, mások csökkenést tapasztaltak. /Marks, 1970/

#### C./ V i r u s k u t a t á s

Az elmúlt hét évben jelentősen megnőtt azoknak a munkáknak a száma, amelyek során növényi vírusokat a virust hordozó rovar szövetében tenyésztették in vitro.

Ezek a munkák igen jelentősek mind a növénypatológia, mind a virológia szempontjából. /Maramorosch, 1962./

Ha lehetőség lenne a hordozó rovar sejtjeit monolayerben tenyészteni, majd a monolayert fertőzni a hordozott növényi vírussal, ez új lehetőségeket teremtene a növényi vírusok kvantitatív sajátosságainak tanulmányozására.

## D./ D i f f e r e n c i á l ó d á s t a n u l m á n y o z á s a

Néhány kutatócsoport, pl. Seecof és mts.-i /1968/ intenzíven tanulmányozza a különböző differenciálódási stádiumban levő embrionális sejtek in vitro viselkedését. A kutatások fő iránya a differenciálódás genetikai hátterének tisztázása. /Seecof, 1968./

## K I S É R L E T I R É S Z

A rovargenetikai kutatócsoport az intézet megalakulásakor kezdte meg munkáját, s ez a Magyarországon szinte teljesen hiányzó rovargenetikai kutatások kezdete is volt. Mivel napjainkban a rovarok hormonális folyamatainak vizsgálata áll a kutatások középpontjában és ezen folyamatok fiziológiája a nemzetközi irodalomban már elég jól tisztázott, mi a rovarhormon hatás genetikai regulációjának vizsgálatát tűztük ki kutatási feladatul.

A vizsgálatokat különböző szinteken kezdtük el. Mivel az egész állat, illetve a szervszinten folytatott vizsgálatok sok olyan problémát vetettek fel, amelyek a kísérletek reprodukálhatóságát nehezítették, célszerűnek tűnt a vizsgálatokat párhuzamosan sejtszinten is folytatni. A hormonhatás mechanizmusának vizsgálatá főleg primer sejt kultúrákon történhet. A sejtvonal erre a célra nem megfelelő, mivel, mint az irodalmi áttekintésben már említettem a sejtvonalban a kiindulási sejtekhez képest genetikailag és morfológiailag megváltozott sejt populációval állunk szembe. Így ezek reakciója egy esetleges hormonkezelésre lényegesen eltérhet a vizsgált állat egy-egy szervében keletkező válaszreakciótól.

Mivel vizsgálatainkat első sorban *Sarcophaga bullata* lárvákon végeztük, az én feladatomban az lett, hogy ezekből primer sejt kultúrákat készítsek. Ezzel párhuzamosan *Leptinotarsa decemlineata* embriókat és lárvákat is felhasználtam erre a célra.

Mivel a lárvákat steril körülmények között nem tudtam fenntartani, célszerű volt olyan sejt típust választani, amely viszonylag könnyen elérhető steril körülmények között. Az előkísérletek alapján a lárva hemocytá sejtjeit használtam fel primer kultúrák készítésére, mivel ezek jó hatásfokkal sterilen nyerhetők a felületileg sterilizált lárvákból.

A kísérletek során kipróbáltam néhány sejtosztódást stimuláló anyag hatását a primer kulturákon. Első sorban olyan anyagokat választottam, amelyek az emlős szövettényésztési gyakorlatban bevált stimuláló szerek. Ilyen volt aphytohaemagglutinin /PHA/, amely a Phaseolus vulgaris glikoproteinje és rutinszerűen alkalmazzák limfocita tenéyszetek stimulálására. Irodalmi adatok szerint maximálisan 70 %-os stimuláló hatás érhető el alkalmazásával. /D. ROOS 1972./ Hatásmechanizmusa viszonylag jól ismert, iniciálja a histon acetilációt, fokozza az RNS szintézist, a sejtek  $K^+$  felvételét.

A legújabb adatok szerint a PHA limfocita aktiváló hatását szérumszint tartalmu tápfolyadékban úgy fejti ki, hogy reakcióba lép a szérumszint  $\alpha$ - globulin frakciójával, amely normális körülmények között gátolja a limfocita transzformációt. /Forsdyke 1973./

Megvizsgáltam ezen kívül a putrescin és az inzulin hatását a sejtosztódás és az RNS szintézis változására. Ezek hatásmechanizmusa kevésbé ismert, tény, hogy a putrescin, inzulinnal együtt fokozza a  $^3H$  uridin beépülését az RNS-be in vitro körülmények között. /Santti 1973./

A vizsgált anyagokat az idő függvényében történő sejtszám növekedés változása, illetve az össz-RNS szintézis változása alapján értékelttem.

Mivel így jól mérhető és reprodukálható paramétereket kaptam, később ilyen módszerrel értékelttem a  $\beta$ -ekdizon hatását is a sejt-kulturákra. Mivel a sejteket a hormonra legérzékenyebb periódusban lévő állatokból nyertem mindkét érték növekedését vártam a hormon kezelés hatására.

## A n y a g o k   é s   m ó d s z e r e k

### A./ Primer kultura előállítása

#### Felhasznált állatok:

##### 1./ *Leptinotarsa decemlineata* embrió.

Az előkísérletekből megállapítottam, hogy sejtmigráció kizárólag a már differenciálódott embrióból indul meg in vitro körülmények között. Az embrió fejlettségi állapota a tojás színe, nagysága alapján állapítható meg. Primer sejt-kultura készítéséhez a sötétsárga színű tojásban levő, jól megformált embriót használtam fel.

##### 2./ *Leptinotarsa decemlineata* IV. stádiumu lárva.

Mivel a lárvális sejtekből készített sejt-kulturákat a későbbiekben hormonhatás tanulmányozására fogjuk használni, a felhasznált állatok korát ennek megfelelően választottam. Az ekdizonhatás szempontjából a lárvastádium utolsó szakasza a legérzékenyebb. Ez *Leptinotarsa* esetében a IV. stádium.

##### 3./ *Sarcophaga bullata* késői III. stádiumu lárva.

Mivel *Sarcophaga* esetén az utolsó lárvastádium a késői harmadik, az előző pontban leírtaknak megfelelően ezt választottam primer kultura készítéséhez.

#### Állatok felületi sterilizálása:

##### 1./ Embrió felületi sterilizálása:

- a./ mosószer oldattal a szennyeződések eltávolítása
- b./ 70 %-os etanolban mosás 15 percig
- c./ steril fiziológiás oldatban öblítés
- d./ 3 %-os Na-hipoklorit oldatban mosás, majd antibiotikum tartalmu deszkillált vízben öblítés. /Az antibiotikumokat az előzetes rezisztencia vizsgálatnak megfelelően választottam./

2./ Lárvák felületi sterilizálása:

Leptinotarsa decemlineata lárvák felületi sterilizálása:

a./ felhasználás előtt 24 óra éheztetés

b./ felhasználás előtt három órával a lárvák fürdetése

3 %-os Na-hypoklorit oldatban, felhasználásig autoklávozott papírvattán tarthatók.

c./ 70 %-os etanolban fürdetés 6 percig

d./ az állat hátának lemosása jódtinktúrával, majd 70 %-os etanollal.

Sarcophaga bullata lárvák felületi sterilizálása azonos módon történt a Leptinotarsa lárvákéval.

A felületi sterilizálás egyes lépései között az állatok mindkét esetben autoklávozott papírvattán száradtak.

Sejtek nyérése:

1./ Embrionális sejtek nyérése:

A differenciált embrió a korionból kioperálható. Az embriókat tápfolyadékban összegyűjtöttem, majd Pasteur pipettával sejtekké diszpergáltam. Egy-egy kultúra készítéséhez 20 db embriót használtam fel.

2./ Lárvális hemocita sejtek nyérése:

A sejtek nyérése mind a Leptinotarsa, mind a Sarcophaga esetében azonos módon történt.

a./ Az aortát fecskendőtüvel megszurttam, a kicseppenő hemolimfát tápfolyadékban gyűjtöttem.

b./ A sejteket alacsony fordulatszámú centrifugálással üleptettem. /100 g-vel 5 percig/

c./ A sejteket kétszer mostam antibiotikum tartalmú tápfolyadékkal.

Inkubálás módja:

1./ Embrionális sejtek inkubálási módja:

A 20-25 embrió diszpergálásával nyert sejtszuspenziót üveg-Petri csészében üleptettem. Az inkubálás 27 fokon, normál levegő atmoszférában történt.

2./ Lárvális hemocita sejtek inkubálása:

Az inkubációs körülmények a *Leptinotarsa decemlineata* és *Sarcophaga bullata* lárváknál azonosak voltak.

a./ A statikus tenyészeteket Barka flaskában, 27 fokon normál levegő atmoszférában tartottam.

b./ A rázatott tenyészeteket Erlenmayer lombikban, levegőztetve /vattadugóval lezárva/ illetve gumidugóval lezárva tartottam 27 fokon. A tenyészetek rázatása vibrotermenben, alacsony fordulatszámra történt.

A tenyésztéshez alkalmazott tápfolyadékok:

Az előkísérletekből kiderült, hogy a gyakorlatban általánosan ismert és alkalmazott tápfolyadékokban, /Grace 1962, Gvozdev C-15, Robb R-14/ a lárvális hemocita sejtek igen lassan osztódtak és osztódásuk néhány nap alatt teljesen leállt. Így szükséges volt új tápfolyadékot kidolgozni.

Ebből a célból elvégeztem a két faj részleges lárvális hemolimfa analizisét és ennek alapján tápfolyadékot készítettem a hemocita sejtek tenyésztéséhez.

Hemolimfa analizis kivitelezése

Mindkét vizsgált állatnál azonos módon végeztem.

1./ A hemolimfa  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  koncentrációjának meghatározása:

A hemolimfát ionmentes desztillált vízzel hígítottam, majd a tirozináz aktivitás gátlása céljából 100 fokon 5 percig hőkezelttem. A képződött csapadékot kicentrifugáltam, a felülusztót  $0,45\mu$  porusméretű filteren szűrtem. Az így nyert szűrlet  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  koncentrációját lángfotométerrel határoztam meg.

2./ Hemolimfában lévő szabad aminosavak koncentrációjának meghatározása.

a./ Egy ml hemolimfát liofileztem, majd hozzá adtam 8 ml 1 %-os HCl-t tartalmazó acetont.

b./ Két óra állás után ionmentes vízben mostam háromszor, majd 2000 g-n 10 percig centrifugáltam.

- c./ A csapadékot 1 ml ionmentes vízben szuszpendáltam, majd 37 fokon vákumban bepároltam.
- d./ A párlatot 1 ml ionmentes vízben oldottam, majd liofileztem.
- e./ Az így előkészített preparátum szabad aminosav koncentrációját aminosav analízátorban meghatároztam.

A tápfolyadék összeállításánál első sorban a hemolimfa analízisből nyert adatokat tartottam szem előtt, de a tápfolyadék ozmotikus nyomásának megállapításánál figyelembe vettem az irodalomban szereplő egyéb tápfolyadékokat is.

#### B./ Kísérletek primer hemocita kultúrákon

##### Felhasznált anyagok:

- 1./ PHA - Difco Laboratories Detroit Misch USA készítményt használtam,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  M koncentrációban, Grace /1962/, Gvozdev C-15, Sarcophaga, Robb R-14 médiumokban tenyésztett Sarcophaga bullata hemocita sejteken.  
A kísérletek során minden tápfolyadékot 10 % borju savóval egészítettem ki. Kontrollnak a PHA mentes tápfolyadékban nőtt sejteket tekintettem.
- 2./ Putrescin -  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M koncentrációban, Gvozdev C-15, Parker 199, Sarcophaga médiumokban nőtt sejteken.  
Mindenes tápfolyadékot 10 % borju savóval egészítettem ki. Kontrollnak a putrescin mentes tápfolyadékban nőtt sejteket tekintettem.
- 3./ Insulin - Novo Industri A/S Copenhagen, Denmark 40 iu/ml készítményt használtam, 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , iu koncentrációkban vizsgáltam, Gvozdev C-15, Parker 199, Sarcophaga médiumban.  
Mindenes tápfolyadékot 10 % borjusavóval egészítettem ki. Kontrollnak az insulin mentes tápfolyadékban nőtt sejteket tekintettem.



4.  $\beta$  - ekdizon - a Kőbányai Gyógyszergyár által szintetizált ekdizon vizes oldatát használtam 1 $\gamma$  , 5 $\gamma$  , 10 $\gamma$  /ml, koncentrációkban, Parker 199, Robb, Sarcophaga tápfolyadékban. Minden tápfolyadékot 10 % főtális borjuszavóval egészítettem ki. Kontrollkísérlet a megfelelő ekdizon nélküli tápfolyadék volt.

Értékelés módszerei:

1./ Sejtszámnövekedés változása az idő függvényében. A változásokat a kontroll százalékában mértem.

2./ A sejtek össz- RNS szintézisének változása.

a./  $PO_4^{32}$ , beépülés alapján. A sejteket 24 óráig jeleltem 10  $\mu$  C/ml  $Na_2HP^{32}O_4$ -el. 24 óra után a jelölést 20 %-os TCA-val felfüggesztettem. Friss,  $PO_4$  mentes tápfolyadékkal mostam a sejteket, majd Schneider- Smith - Tannhauser módszerrel az RNS-t feldolgoztam.

A preparátum aktivitását Triton-X 100 tartalmu toluolos scintillációs folyadékban Packard Scintillációs spektrométeren mértem. /Scintillációs folyadék összetétele: 2 rész toluolus folyadék, 1 rész Triton X-100/

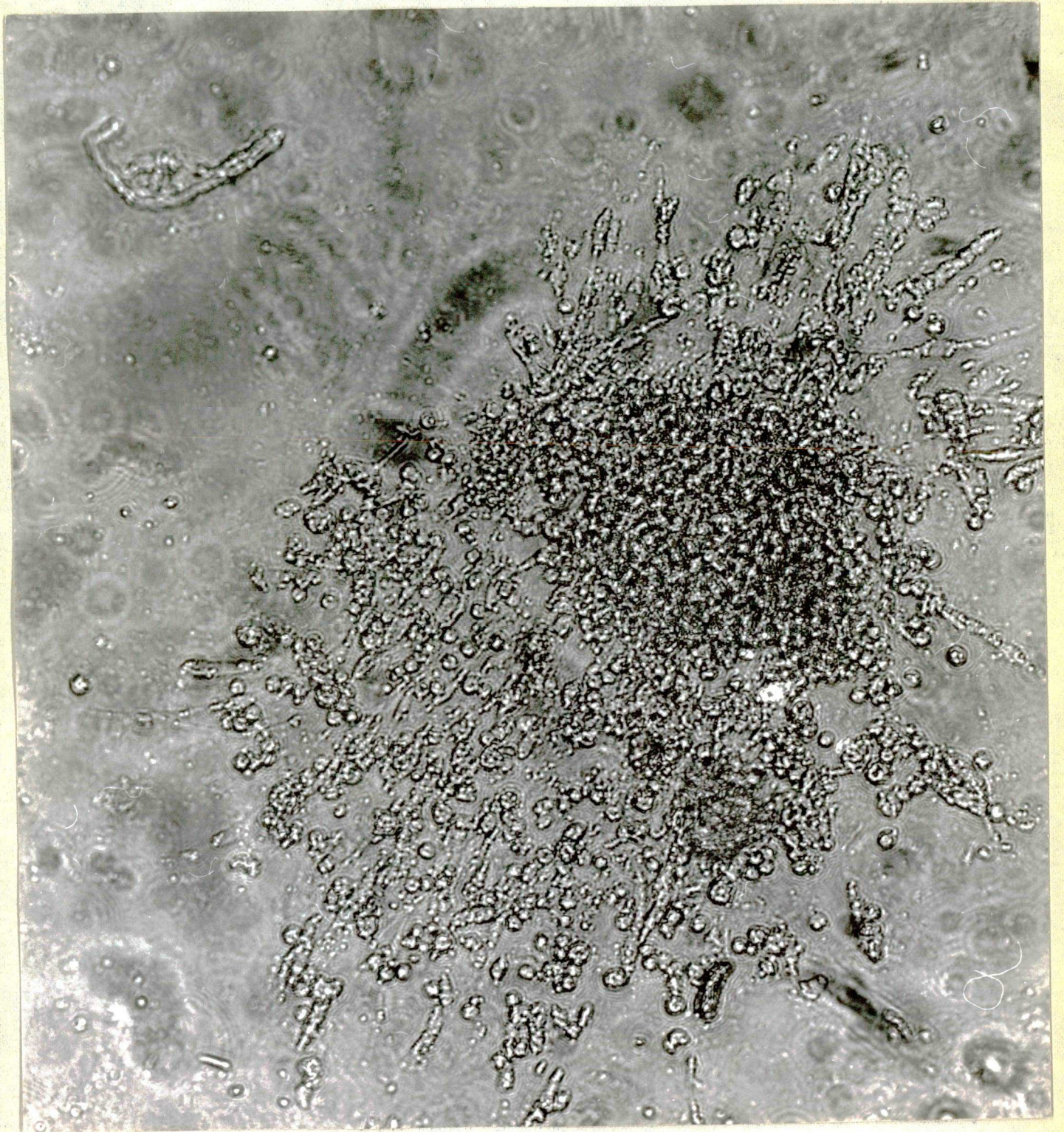
b./  $H^3$  uridin beépülés alapján. A 48 óráig inkubált sejteknél 1 C/ml  $H^3$  uridinnel /30 Ci/mmol/ két órás pulzusjelölést alkalmaztam. Két óra után a jelölést megszüntettem, majd Gilbert /1971/ módszerével feldolgoztam az RNS-t.

A feldolgozás eredményeként kapott, 10 %-os TCA-ban nem oldódó csapadékot 0,45 $\mu$  pórusméretű filteren összegyűjtöttem, majd toluolos scintillációs folyadékban Packard Scintillációs spektrométeren mértem.

E r e d m é n y e k   é r t é k e l é s e

1./ Beptinotarsa decemlineata embrionális kulturák értékelése:

A letapadt embrionális fragmentumokból a tenyésztés negyedik napján intenzív sejtmigráció indult meg. Az explantátumok növekedését 9 napig lehetett megfigyelni.



1. kép Explantátum a tenyészet nyolcadik napján

2. Hemolimfa analízis eredményeinek értékelése:

a./ A vizsgált állatok hemolimfájában lévő  $\text{Na}^{\#}$ , és  $\text{K}^+$ ,  
koncentrációja:

anyag	koncentráció $\gamma/\text{ml}$ hemolimfa	
	Leptinotarsa	Sarcophaga
Na	5000	3200
K	10000	700

1. táblázat  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  koncentráció a vizsgált állatok  
hemolimfájában.

$$\frac{\text{Na}}{\text{K}} = \text{Sarcophaga bullata: } \frac{3200}{700} = 4,57$$
$$\text{Leptinotarsa decemlineata: } \frac{5000}{10000} = 0,5$$

b./ A vizsgált állatok hemolimfájában lévő szabad aminosavak  
koncentrációja: /A táblázatban összehasonlításképp fel-  
tüntettem a Grace tápfolyadék aminosav koncentrációját  
is./

Anyag	Koncentráció $\gamma/\text{ml}$		
	Sarcophaga	Leptinotarsa	Grace
Asp	4,928	0,716	350
Thr	27,969	2,668	175
Szer	48,585	4,617	550
Glu	1,604	25,429	600
Pro	8,849	381,680	350
Gli	2,067	24,070	650
Ala	7,703	22,636	250
Val	7,676	23,082	100
Meth	15,438	25,093	50
Ileu	33,042	120,296	50

Leu	29,083	27,741	50
Phe	22,341	13,581	75
Lys	1,131	0,784	150
Hys	1,782	0,967	625
Arg	-	-	700
Tyr	167,000	-	50
<b>Össz.:</b>	<b>378,698</b>	<b>673,360</b>	<b>4725,00</b>

2. táblázat Szanad aminosav koncentráció a vizsgált állatok hemolimfájában és a Grace tápfolyadékban.

A részleges hemolimfa analízis eredményei alapján készített tápfolyadékok. Mindkét tápfolyadékot Grace vitaminkeverékkel, valamint glükózzal és szaharózzal egészítettem ki.

Anyag	Koncentráció mg/l	
	Leptinotarsa	Sarcophaga
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.680	1.360
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.460	5.874
K Cl	9.680	740
NaCl	8.770	3.800
CaCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	220	220
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	250	250
glükóz	1.801	1.801
Szaharóz	30.122	30.122
Asp c	0,710	4,92
Thr	2.670	27,96
Ser	4,610	48,58
Glu	25,43	1,60
Pro	381,68	8,84
Gli	24,07	2,06
Ala	22,64	7,70
Val	23,08	7,67
Meth	25,09	15,43

Ileu	120,30	33,04
Leu	27,74	29,08
Phe	13,58	22,34
Lys	0,78	1,13
Hys	0,96	1,28
Tyr	-	167,00

3. táblázat Részleges hemolimfa analízis alapján készített tápfolyadékok

3. Hemocita kulturák értékelése

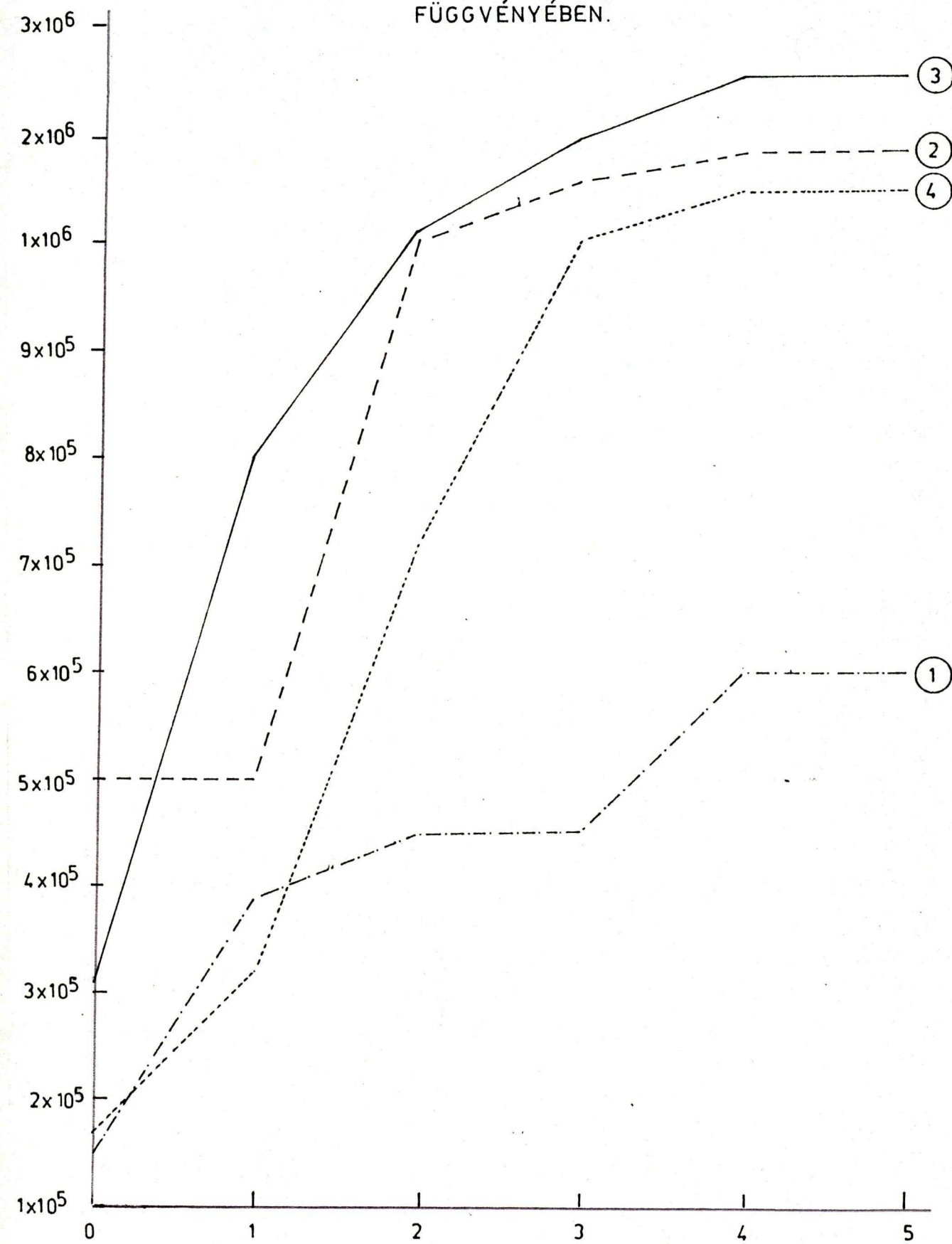
a./ *Leptinotarsa decemlineata* kulturák értékelése. A sejtek életképességét a sejtszámnövekedés alapján értékeltem. Intenzív osztódást a tenyésztés első napjaiban tapasztaltam. A tenyésztés negyedik napjától a kulturák generációs ideje megnyult. Két hét után sejtszámnövekedést már nem tapasztaltam.

tápfolyadék	SEJTSZÁM/ ml				
	0 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>
Grace /levegőztetett/ <sup>(1)</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>
Grace /zárt/ <sup>(2)</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	1,7x10 <sup>6</sup>
Ld /levegőztetett/ <sup>(3)</sup>	3,2x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>	2 x10 <sup>6</sup>	7,8x10 <sup>6</sup>
Ld /zárt/ <sup>(4)</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	3,2x10 <sup>5</sup>	7,2x10 <sup>5</sup>	1 x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>

4. táblázat Sejtszámnövekedés az inkubáció módjától függően különböző tápfolyadékokban.

sejtszám/ml

SEJTSZÁM NÖVEKEDÉS AZ INKUBÁCIÓ MÓDJÁTÓL FÜGGŐEN AZ IDŐ  
FÜGGVÉNYÉBEN.



nap

Ha az inkubálás Barka flaskában, gumidugóval lezárva történt, a generációs idők megnyultak, a sejtpopuláció duplázódása 48 óra előtt nem következett be és 96 óra után már csak lassu sejtszám növekedés volt.

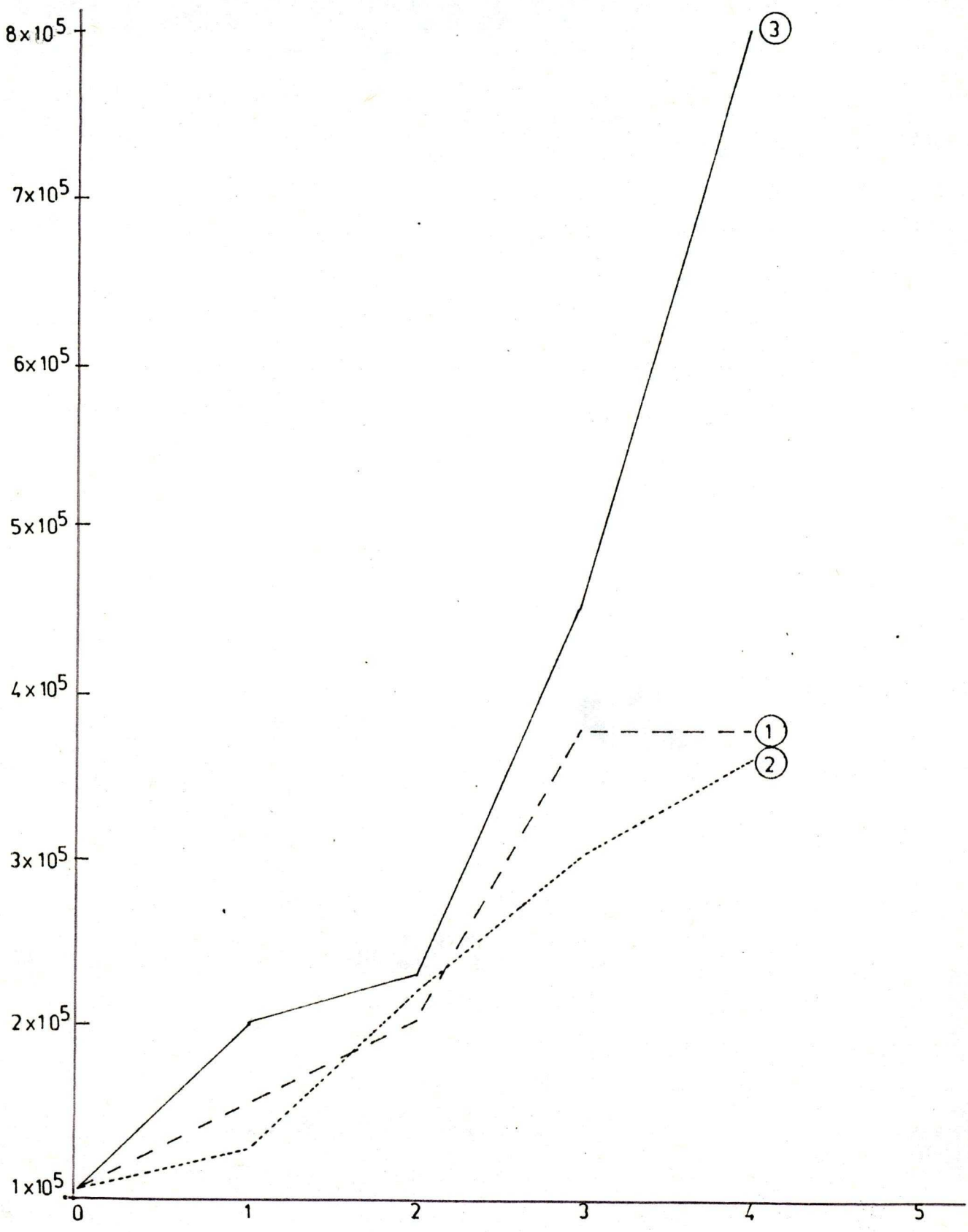
SEJTSZÁM /ml					
Tápfolyadék	0 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>
Grace <sup>①</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>
Gvozdev <sup>②</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>5</sup>	3,6x10 <sup>5</sup>
Ld <sup>③</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>5</sup>

5. táblázat Sejtszám növekedés az idő függvényében különböző tápfolyadékokban.

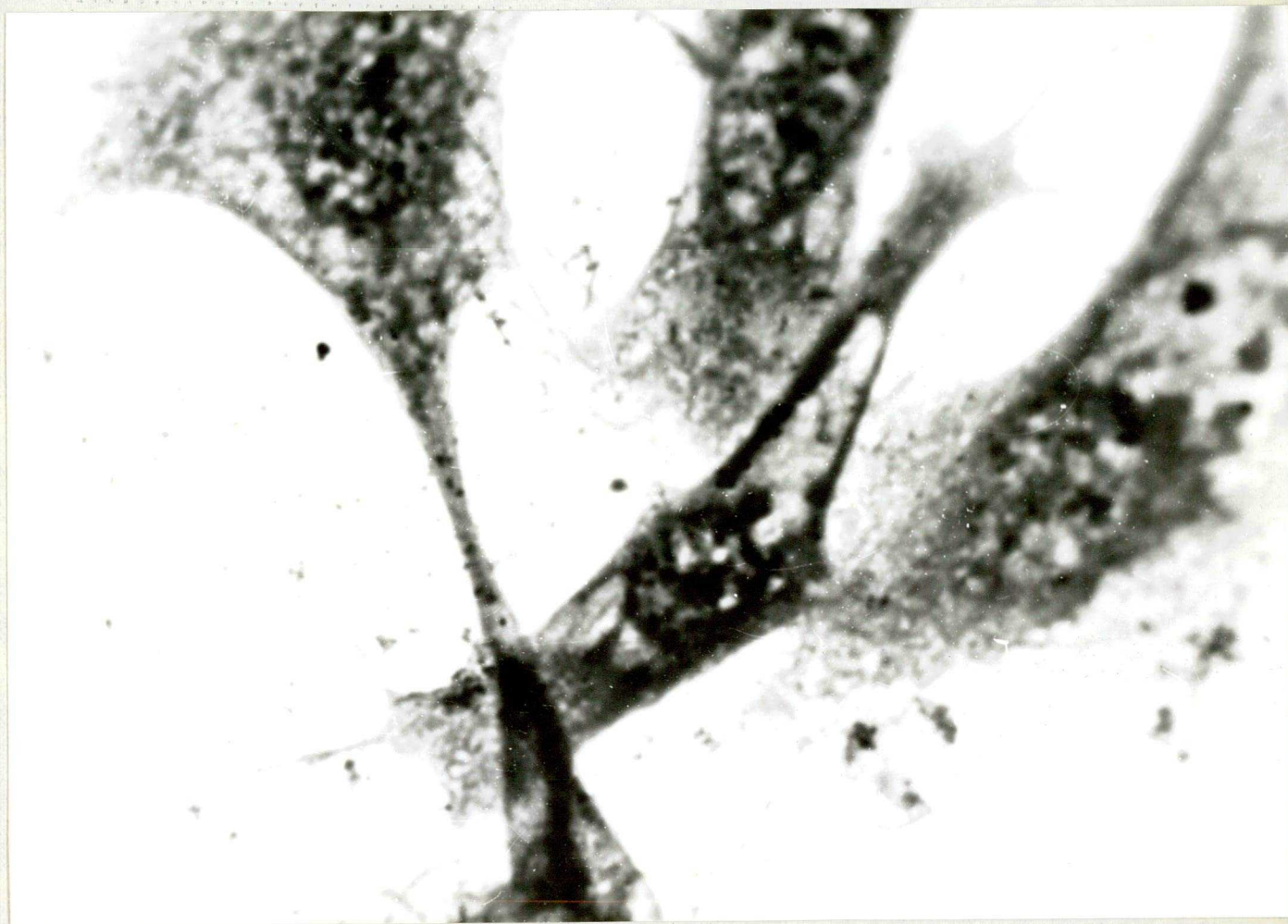


SEJTSZÁM NÖVEKEDÉS KÜLÖNBÖZŐ TÁPFOLYADÉKBAN AZ IDŐ FÜGG-  
VÉNYÉBEN.

sejtszám/ml



nap



2. kép *Leptinotarsa decemlineata* sejtek statikus tenyésztésben  
lá tápfolyadékban.

b./ Sarcophaga bullata hemocita kulturák értékelése.

A sejtek életképességét a sejtszám növekedése, illetve a sejtek  $P^{32}O_4$  beépítése alapján, össz-RNS szintézis változás mérésével értékeltm.

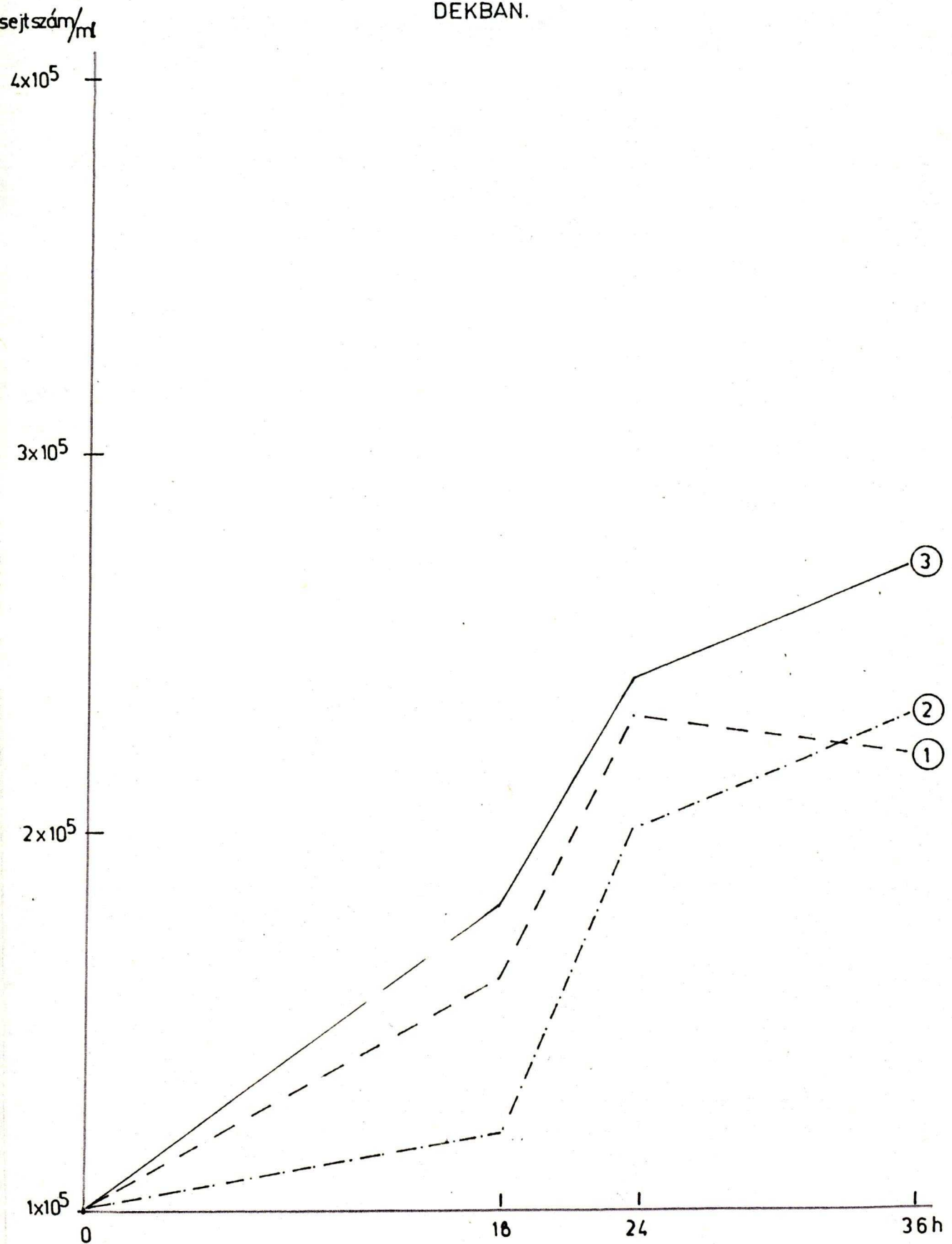
A sejtszám növekedése alapján megállapítottam, hogy a sejtpopuláció megkétszereződésének ideje minden vizsgált tápfolyadékban 24 óránál rövidebb. Ezért találtam alkalmasnak ezeket a sejteket a már említett kísérletek elvégzésére.

Tápfolyadék	SEJTSZÁM /ml			
	0 <sup>h</sup>	18 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	36 <sup>h</sup>
Gvozdev ①	$1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
Robb ②	$1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
Sarcophaga ③	$1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$

6. táblázat Sejtszám növekedés az idő függvényében különböző tápfolyadékokban.

o

SEJTSZÁM NÖVEKEDÉS AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN KÜLÖNBÖZŐ TÁPFOLYADÉKBAN.



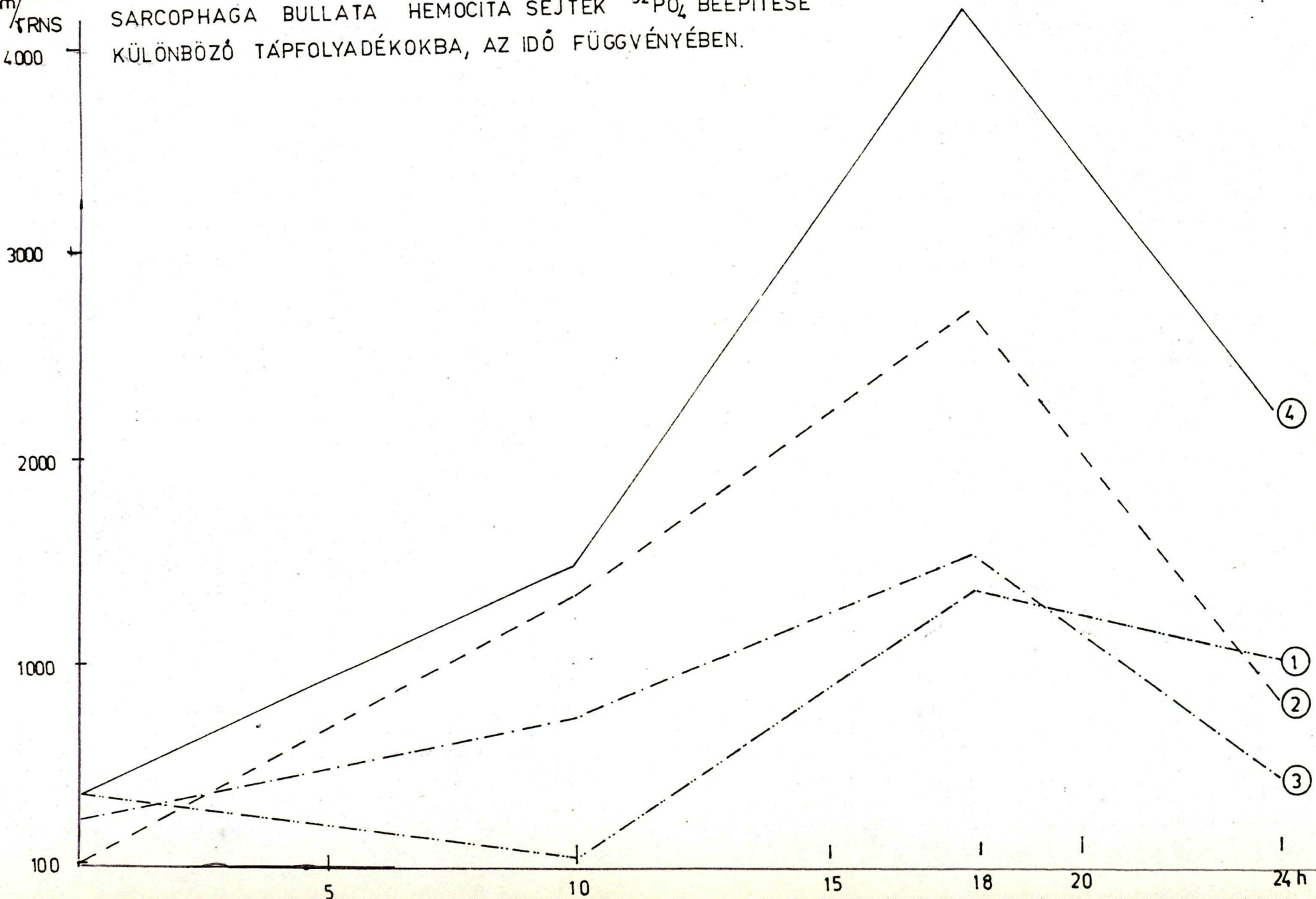
A  $P^{32}O_4$  jelzés, majd RNS feldolgozás alapján megállapítottam, hogy a sejtek RNS szintézise a tenyésztés 18 óráig emelkedik, ezután erősen csökken. A csökkenés mértéke függ az alkalmazott tápfolyadéktól.

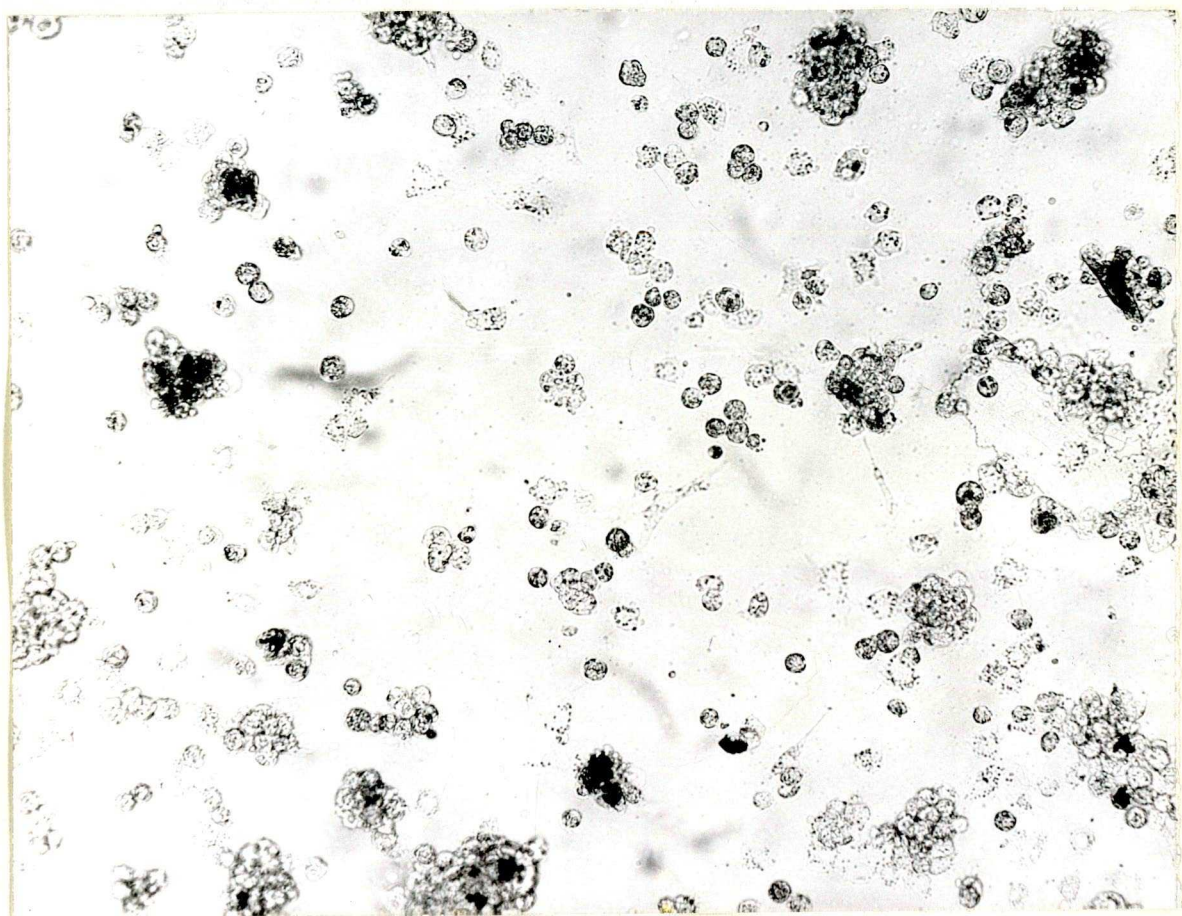
Tápfolyadék	Inkubációs idő /órában/	cpm/ $\gamma$ RNS
Ephrussi-Beedle ringer ①	0	401
	10	98
	18	1.222
	24	975
Gvozdev C-15 ②	0	141
	10	1.215
	18	250
	24	660
Robb R-14 ③	0	205
	10	684
	18	1.396
	24	350
Sarcophaga ④	0	310
	10	1.350
	18	4.220
	24	2.100

7. táblázat Sarcophaga bullata hemocita sejtek  $P^{32}O_4$  beépítése 24 órás inkubációs idő alatt.

cpm/  
TRNS

SARCOPHAGA BULLATA HEMOCITA SEJTEK  $^{32}\text{PO}_4$  BEÉPÍTÉSE  
KÜLÖNBÖZŐ TÁPFOLYADÉKOKBA, AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN.





3. kép *Sarcophaga bullata* hemocita sejtek, az inkubáció második hetében, *Sarcophaga* tápfolyadékban.

4. A *Sarcophaga bullata* hemocita kulturákon végzett kísérletek értékelése.

a./ A PHA-val kezelt sejtek morfológiája alapján megállapítható, hogy a kezelt sejteknél kerek, erősen granulált forma dominál. A kezelt sejtek nagy része nem ült ki az edény falára.

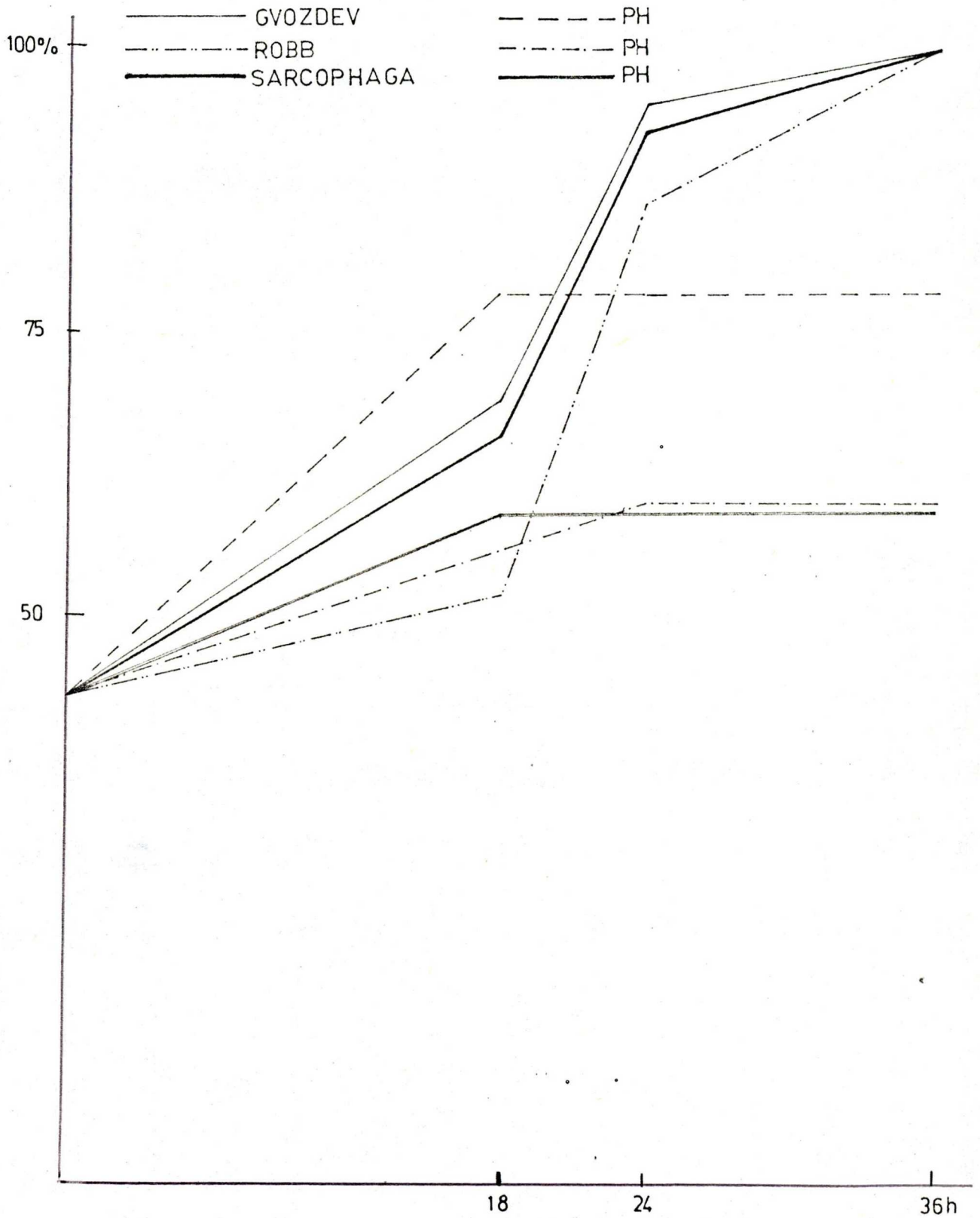
A kontrollhoz képest történt sejtszám növekedés, valamint a sejtek morfológiai változásai alapján megállapítottam, hogy a vizsgált PHA koncentrációk gátolták a sejtek növekedését, 24 óra után már 50 %-ban gátolt a kezelt sejtek növekedése a kontrollhoz viszonyítva.

Tápfolyadék	SEJTSZÁM x 10 <sup>7</sup> /ml							
	0 <sup>h</sup>		18 <sup>h</sup>		24 <sup>h</sup>		36 <sup>h</sup>	
	K	PHA	K	PHA	K	PHA	K	PHA
Gvozdev C-15	1	1	1,6	1,8	2,2	1,8	2,3	1,8
Robb R-14	1	1	1,2	1,4	2	1,4	2,3	1,4
<i>Sarcophaga</i>	1	1	1,8	1,6	2,4	1,6	2,7	1,6

8. táblázat Sejtszám növekedés változása PHA hatására különböző tápfolyadékokban.



PHYTOHEMAGGLUTININ HATÁSA A SEJTSZÁM NÖVEKEDÉSRE A KONTROLL SZÁZALÉKÁBAN KIFEJEZVE.



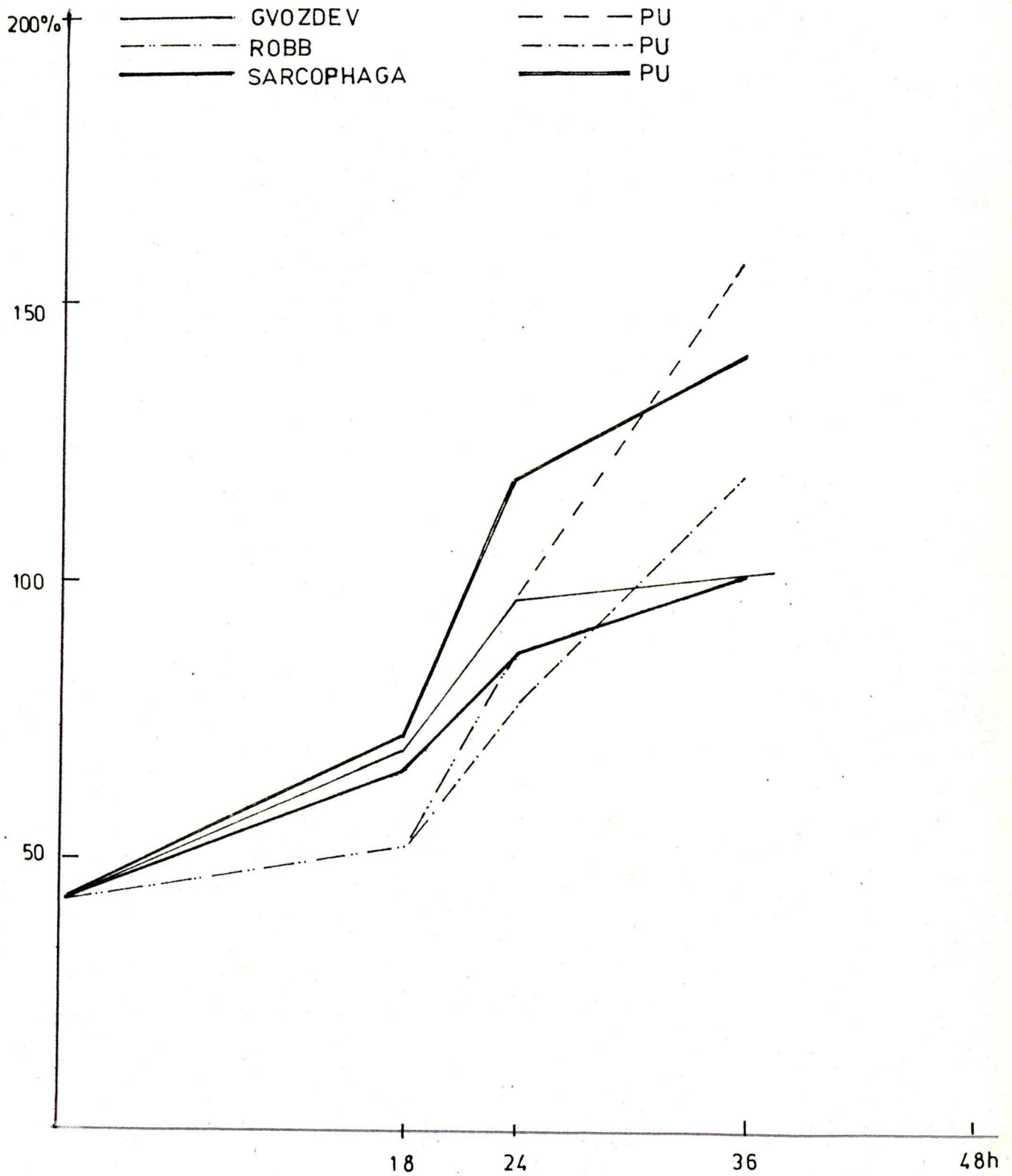
b./ A putrescinnel kezelt sejteknél a kontrollhoz képest kifejezett sejtszám növekedést, a sejtek generációs idejének csökkenését tapasztaltam, a putrescin hatását a Sarcophaga bullata hemocita sejtek osztódására pozitívnak értékeltem.

A 9. táblázatban látható, hogy a putrescin hatása legkifejezettebb a Sarcophaga, valamint a C-15 tápfolyadékban.

Tápfolyadék	SEJTSZÁM $\times 10^7$ /ml									
	0 <sup>h</sup>		18 <sup>h</sup>		24 <sup>h</sup>		36 <sup>h</sup>		48 <sup>h</sup>	
	K	P	K	P	K	P	K	P	K	P
Gvozdev	1	1	1,6	1,6	2,2	2,2	2,3	3,6	2,3	4
Robb R-14	1	1	1,2	1,2	2	1,8	2,3	2,6	2,3	2,6
Sarcophaga	1	1	1,8	1,9	2,4	3,2	2,7	3,8	2,7	3,8

9. táblázat Sejtszámnövekedés változása putrescin hatására Sarcophaga bullata hemocita sejteken. /K - kontroll, P - kezelt/

PUTRESCIN HATÁSA A SEJTSZÁM NÖVEKEDÉSRE A KONTROLL SZÁZ -  
LÉKABAN KIFEJEZVE.

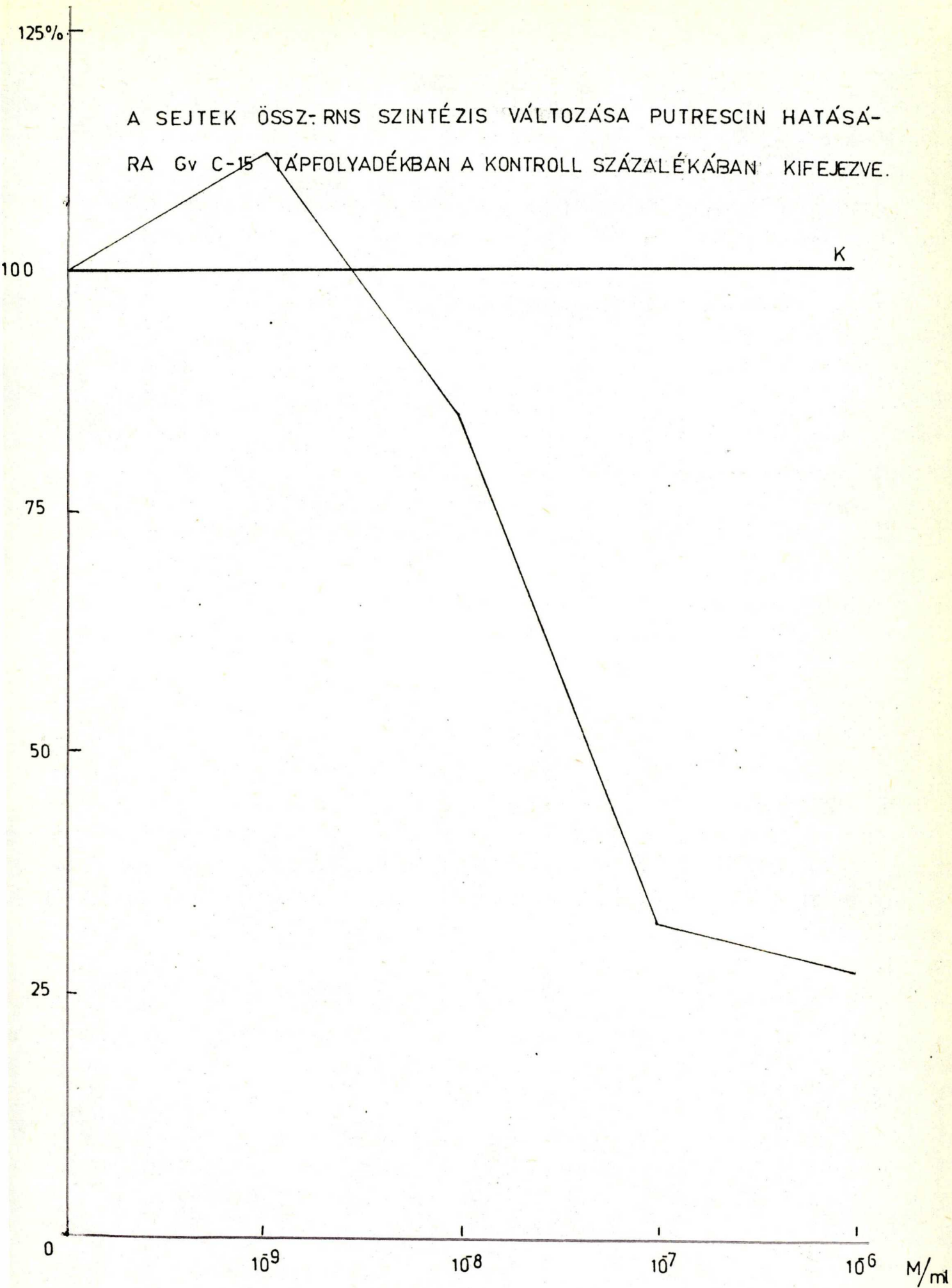


A putrescinnel kezelt sejtek össz-RNS szintézise a kontrollhoz viszonyítva lényegesen nem változott.

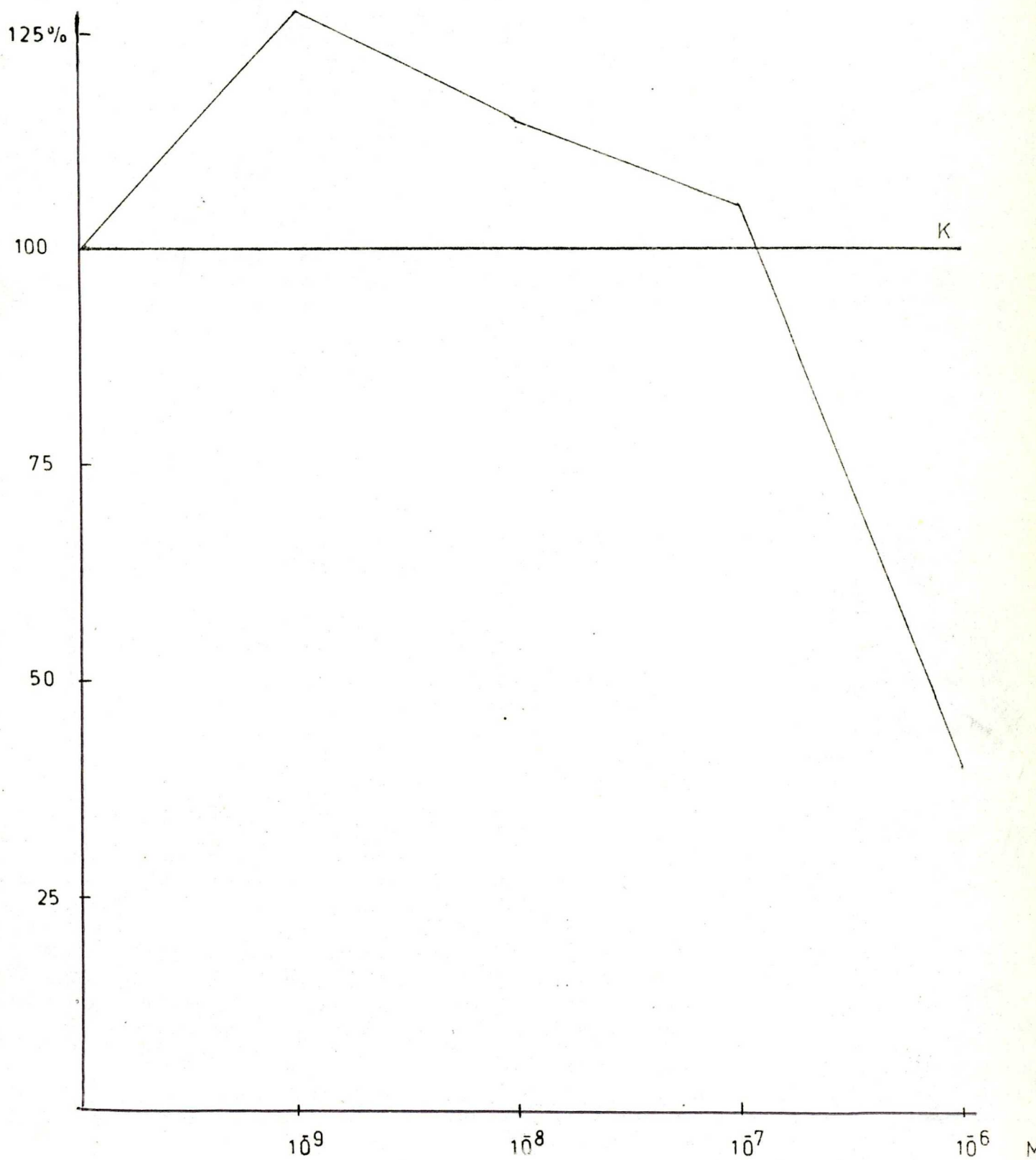
Tápfolyadék	Putrescin konc. M/ml	count/ $1 \times 10^6$ sejt
Gvozdev C-15	K	408
	$10^{-6}$	92
	$10^{-7}$	107
	$10^{-8}$	360
	$10^{-9}$	480
Sarcophaga	K	280
	$10^{-6}$	120
	$10^{-7}$	300
	$10^{-8}$	320
	$10^{-9}$	360
Parker - 199	K	90
	$10^{-6}$	87
	$10^{-7}$	180
	$10^{-8}$	220
	$10^{-9}$	230

10. táblázat Sarcophaga bullata hemocita sejtek össz-RNS szintézisének változása putrescin hatására, különböző tápfolyadékokban.

A SEJTEK ÖSSZ-RNS SZINTÉZIS VÁLTOZÁSA PUTRESCIN HATÁSÁ-  
RA Gv C-15 TÁPFOLYADÉKBAN A KONTROLL SZÁZALÉKÁBAN KIFEJEZVE.



A SEJTEK ÖSSZ-RNS SZINTÉZIS VÁLTOZÁSA PUTRESCIN HATÁSÁRA SARCOPHAGA TÁPFOLYADÉKBAN A KONTROLL SZÁZALEKÁBAN KIFEJEZVE.

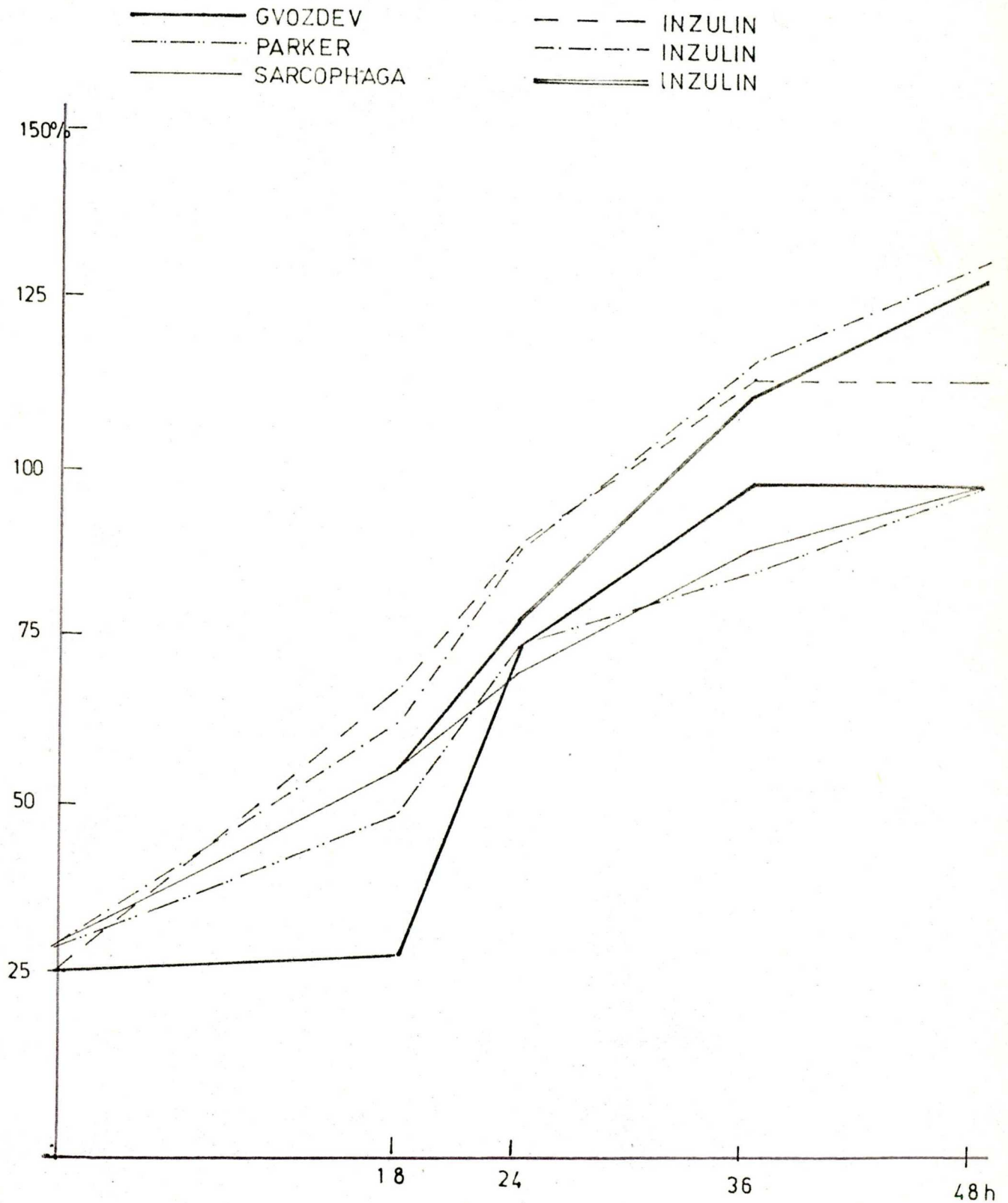


c./ Az inzulinnal kezelt sejtek viselkedése alapján megállapítottam, hogy az inzulin hatására a sejtek generációs ideje csökkent, az RNS szintézis pedig emelkedett.

Tápfolyadék	SEJTSZÁM x 10 <sup>7</sup> /ml									
	0 <sup>h</sup>		18 <sup>h</sup>		24 <sup>h</sup>		36 <sup>h</sup>		48 <sup>h</sup>	
	K	I	K	I	K	I	K	I	K	I
Gvozdev	1	1	1,5	2	2,3	2,8	2,8	3,6	3	4
Sarcophaga	1	1	1,8	1,8	2,3	2,5	2,9	3,7	3,2	4,2
Parker - 199	1	1	1	1,4	1,5	1,8	2	2,3	2	2,3

11. táblázat    Sejtszám növekedés változása insulin hatására,  
különböző tápfolyadékokban. /K-kontroll, I-kezelt/

INZULIN HATÁSA A SEJTSZÁM NÖVEKEDÉSRE A KONTROLL SZÁZALÉKÁBAN KIFEJEZVE.



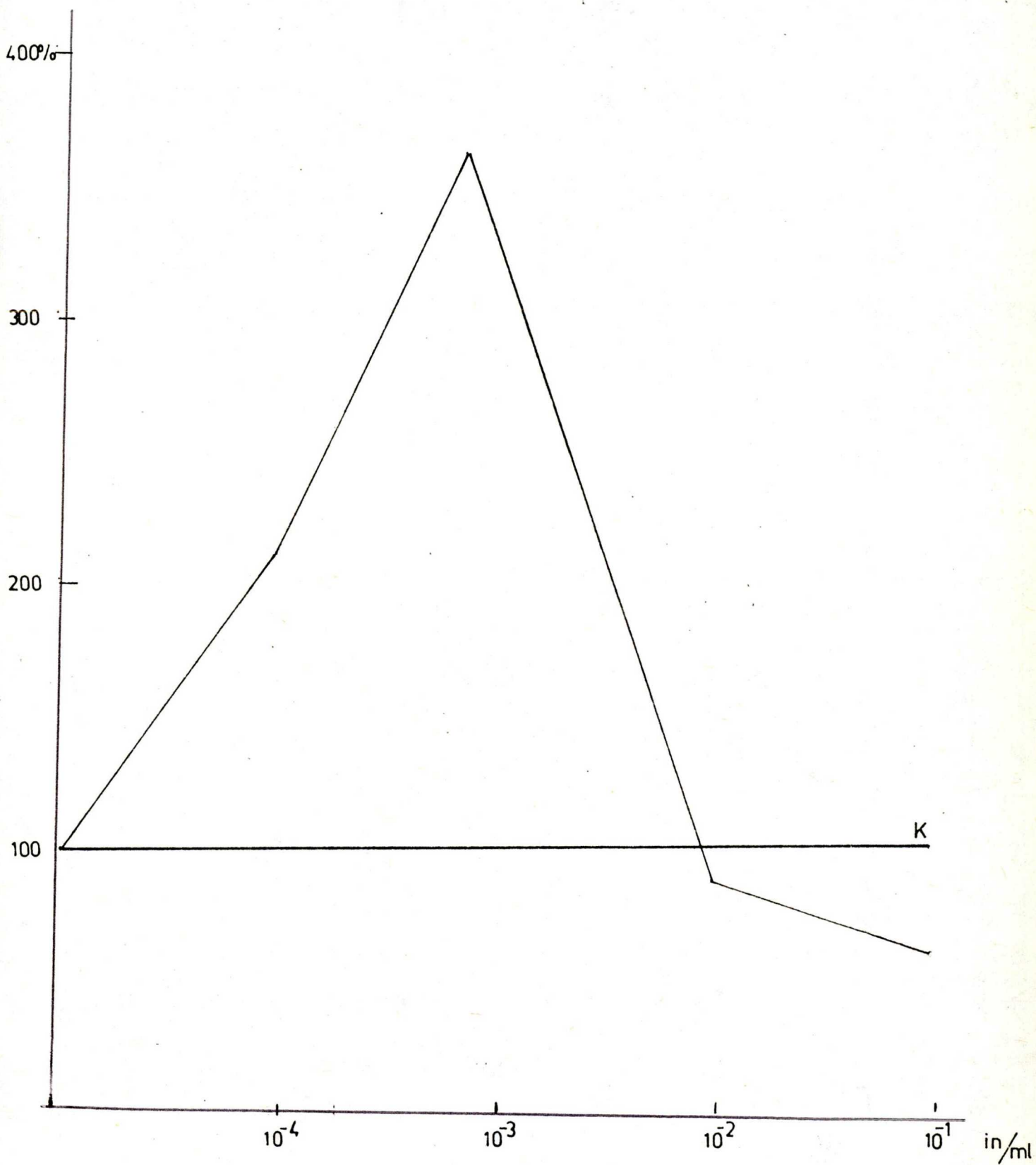


Insulin hatására a sejtek össz-RNS szintézise fokozódott, az insulin koncentrációjának függvényében.

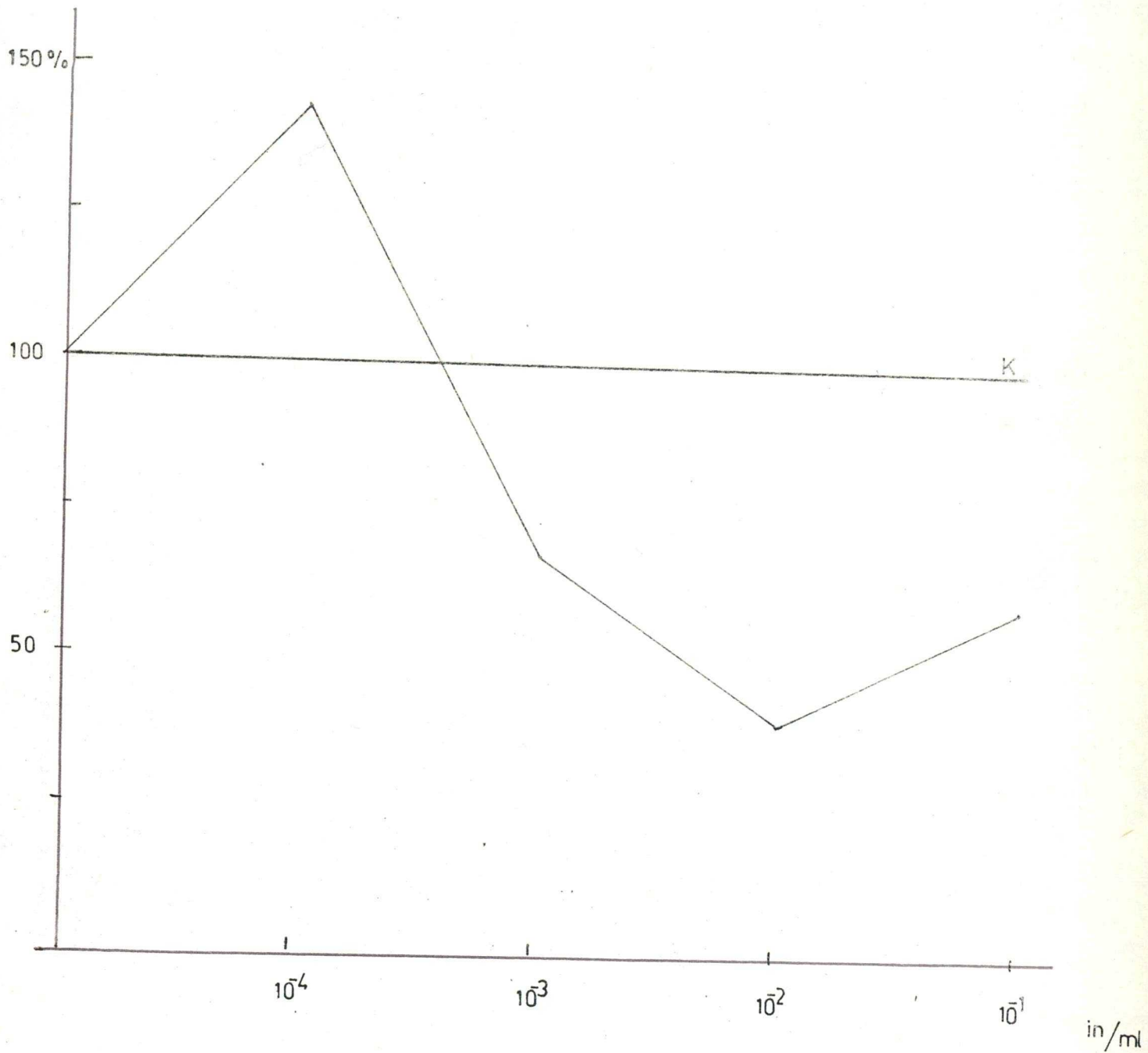
Tápfolyadék	Insulin konc. i.u./ml	count/ $1 \times 10^7$ sejt
Gvozdev C-15	K	464
	$10^{-1}$	295
	$10^{-2}$	406
	$10^{-3}$	1.727
	$10^{-4}$	967
Parker 199	K	588
	$10^{-1}$	390
	$10^{-2}$	240
	$10^{-3}$	346
	$10^{-4}$	841
Sarcophaga	K	
	$10^{-1}$	
	$10^{-2}$	
	$10^{-3}$	
	$10^{-4}$	Nem kaptam értékelhető adatot.

12. táblázat Össz-RNS szintézis változás inzulin hatására Sarcophaga bullata hemocita sejteken.

A SEJTEK ÖSSZ.-RNS SZINTÉZIS VÁLTOZASA INZULIN HATÁSÁRA  
Gv C-15 TÁPFOLYADÉKBAN A KONTROLL SZÁZALÉKÁBAN KIFEJEZVE.



A SEJTEK ÖSSZ-RNS SZINTÉZIS VÁLTOZÁSA INZULIN HATÁSÁRA  
PARKER 199 MÉDIUMBAN, A KONTROLL SZÁZALÉKÁBAN KIFEJEZVE.

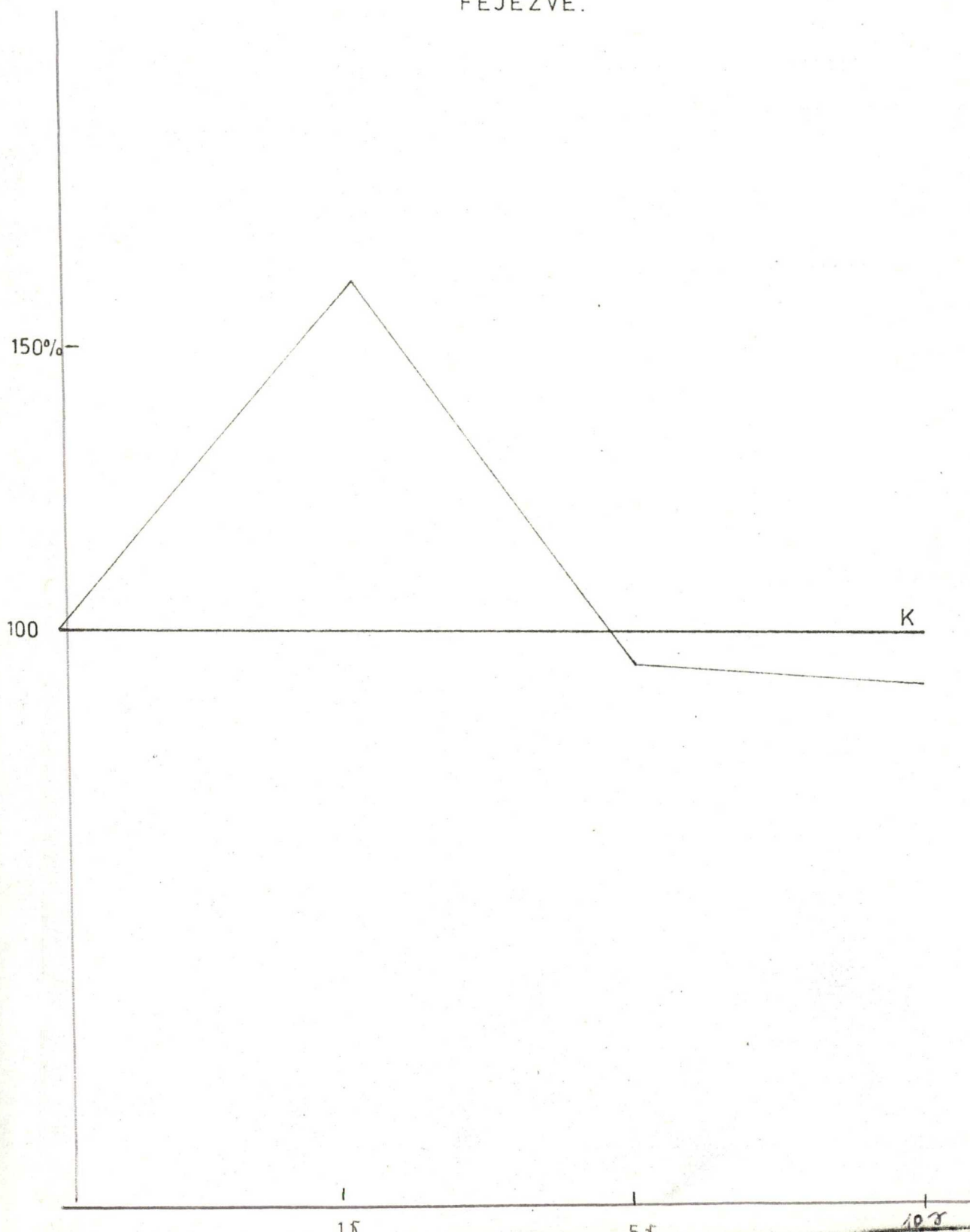


d./  $\beta$  - ekdizon hatást csak abban az esetben tudtam értékelni, ha a rendszerben főtál borjusavó volt jelent. Sarcophaga és Robb médiumokban az RNS szintézis jelentős fokozódását tapasztaltam a kontrollhoz viszonyítva.

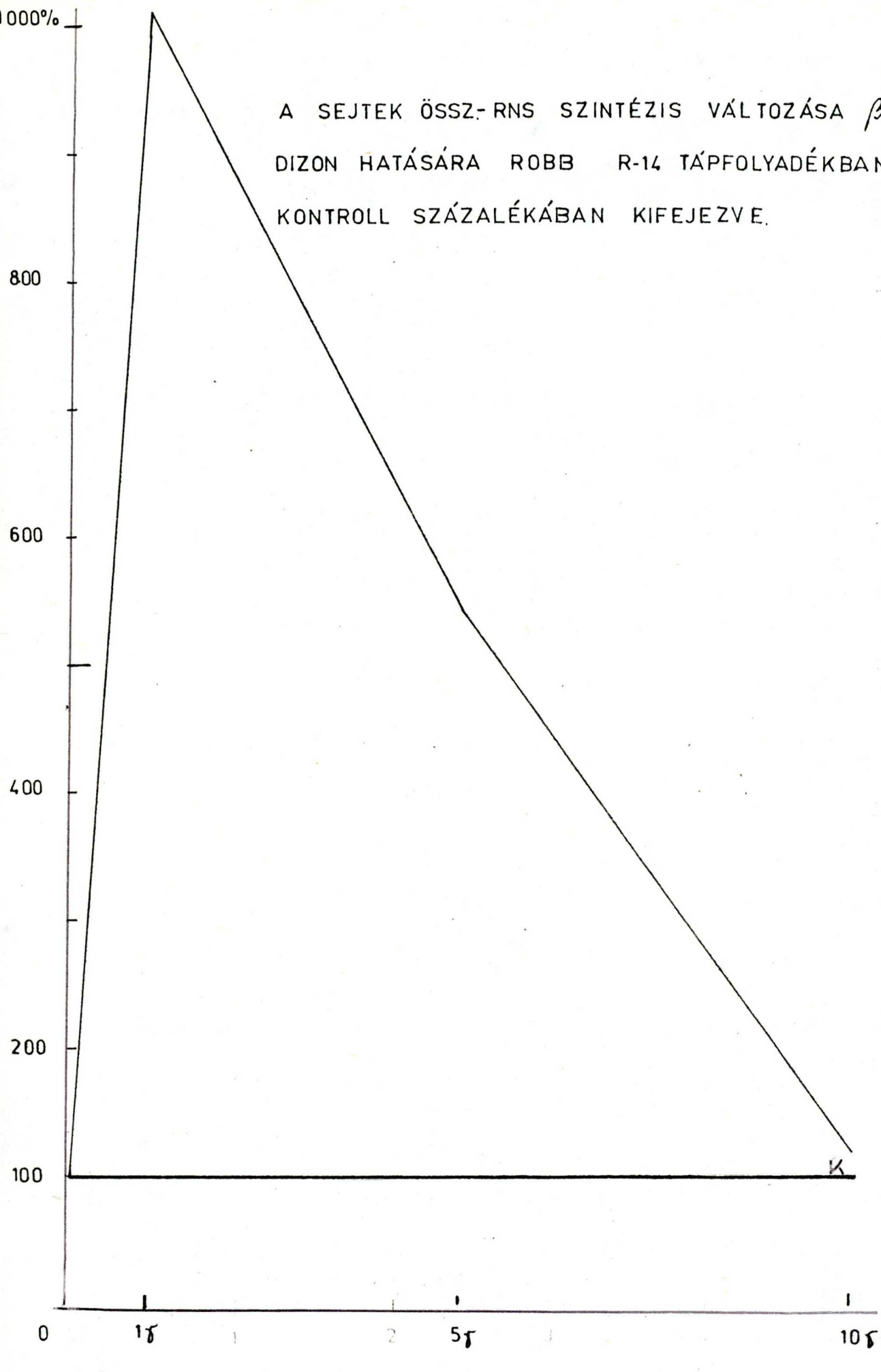
Tápfolyadék	$\beta$ -ekdizon konc. $\gamma$ /ml	count/ $1 \times 10^7$ sejt
Parker-199	K	98,75
	1	400
	5	239
	10	233
Robb R-14	K	115,8
	1	1.200
	5	612
	10	223
Gvozdev C-15	K	295
	1	485
	5	289
	10	270

13. táblázat RNS szintézis változás  $\beta$ -ekdizon hatására.  
Sarcophaga bullata hemocita sejteken.

A SEJTEK ÖSSZ-RNS SZINTÉZIS VÁLTOZÁSA  $\beta$ -EKDIZON HATÁ-  
SÁRA GV C-15 TÁPFOLYADÉKBAN A KONTROLL SZÁZALEKABAN KI-  
FEJEZVE.



A SEJTEK ÖSSZ-RNS SZINTÉZIS VÁLTOZÁSA  $\beta$ -EK-DIZON HATÁSÁRA ROBB R-14 TÁPFOLYADÉKBAN, A KONTROLL SZÁZALÉKÁBAN KIFEJEZVE.



$\tau$ /ml

## E r e d m é n y e k   m e g b e s z é l é s e

A disszertációmban tárgyalt kísérletek eredményeképp sikerült kidolgozni egy olyan módszert, mellyel primer kulturák rutinszerűen előállíthatók *Leptinotarsa decemlineata* embrióból, *Leptinotarsa decemlineata* IV. stádiumu és *Sarcophaga bullata* III. stádiumu lárvákból. A vizsgált állatok hemolimfa analízise alapján olyan tápfolyadékokat készítettem, amelyekben a sejtszám növekedés és az összRNS szintézis lineárisan emelkedett a tenyésztés 48 órájáig.

A primer kulturák jellemzésére felhasznált paraméterek - sejtszám növekedés az idő függvényében, össz-RNS szintézis változás mérése  $P^{32}O_4$ , ill.  $H^3$  uridin beépülés alapján - a kísérleti körülmények között jól mérhető és reprodukálhatóak voltak.

A választott paraméterek változásainak figyelembevételével megvizsgáltam a PHA, putrescin, insulin és  $\beta$ -ekdizon hatását a primer hemocita kulturákon.

A PHA vizsgált koncentrációi a kísérleti körülmények között toxikusok voltak.

A putrescin,  $\beta$ -ekdizon, inzulin, fokozta az idő függvényében történő sejtszám növekedést és a sejtek össz-RNS szintézisét.

A primer sejt-kultúra készítéséhez kidolgozott módszerek, illetve a sejtek jellemzésére felhasznált paraméterek a későbbi tervezett kísérletek szempontjából igen hasznosak, melyek során a hormonhatás genetikai hátterét szeretnénk tisztázni in vitro körülmények között.

Köszönettel tartozom a rovargenetikai csoport tagjainak elméleti és technikai segítségükért, valamint a Genetikai Intézet minden dolgozójának, akik munkámat közvetve, vagy közvetlenül lehetővé tették.

IRODALOM

1. Alumot E., Lensky Y., 1969.  
Sugars and trehalose in the reproductive organs and haemolymph of the queen and drone Honey bees  
Comp. Biochem. Physiol. 28. 1419-1425.
2. Clements A. N., Grace T. D. C., 1967.  
The utilization of sugars by Insect cells in culture  
J. Insect Physiol. 13. /9/ : 1327-32.
3. Counce S. J., 1966.  
Culture of insect embryos in vitro  
Ann. Rev. Entomol. 4. 17.
4. Dolfini S., 1966.  
Changes of chromosome number in cells of *Drosophila melanogaster* cultured in vitro  
Experientia 22. 144.
5. Dolfini S., 1969.  
Some comparative data on embryonic cells of *Drosophila melanogaster* cultured in vitro  
*Drosophila* Information Service 44. 189.
6. Dolfini S., and Courgeon A. M., 1966.  
The cell cycle of an established line of *Drosophila melanogaster* cells in vitro  
Experientia 26. 1020.
7. Echaliier G., Ohanessian A., 1968.  
Cultures in vitro de cellules de *Drosophile*  
Second Int. Colloq. Invertebrata Tissue Cult. 174-181.



8. Echalier G., 1970.  
In vitro culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells  
In vitro 6. 162-172.
9. Echalier G., Ohanessian A., 1965.  
Cultures primaires de cellules embryonnaires de *Drosophila melanogaster*  
Compt. Rend. Acad. Sci. /Paris/ 261. 3211.
10. Eide P. E., Chang T. H., 1969.  
Cell cultures from dispersed embryonic house fly tissues  
Exp. Cell Res. 54. 302-308.
11. Florkin M., Jeuniaux C., 1965.  
Insect haemolymph composition  
The Physiology of Insecta Acad. Press. New York vol. 3.  
p. 109-152.
12. Florkin M., Jeuniaux C. 1963.  
Cationic pattern of haemolymph in adult Hymenoptera  
Life Sci. 12. 982-85.
13. Friend W. G. 1958.  
Nutritional requirements of phytophagous insects  
Ann. Rev. Entomol. 3. 57.
14. Grace T. D. C., 1962.  
Effects of various substances on growth silkworm tissues in vitro  
Aust. J. Biol. Sci. 11. 407-417.
15. Grace T. D. C., 1962.  
Insect tissue culture and its use in virus research  
Adv. Virus. Res. 14. 201-220.
16. Grace T. D. C., 1967.  
Viruslike particles in three type insect cells  
H. Invertebr. Pathol. 9. /2/: 271-73.

17. Grace T. D., C., Brzostowski H. W., 1966.  
Analysis of the amino acids and sugars in an insect cell culture medium during cell growth  
J. Insect Physiol. 12. 625-33.
18. Grace T. D. C., 1967.  
Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*  
Nautre 216. 613.
19. Grace T. D. C., 1958.  
The prolonged growth and survival of ovarian tissue of the promethea moth in vitro  
J. Gen. Physiol. 41. 1027.
20. Gilbert I., 1971.  
Metabolic study on two insect cell line  
J. Insect Physiol 15 /6/ 1061.
21. Gupta K. S., 1963.  
Role of haemolymph in insect tissue culture  
Ann. Epiphit. /Paris/ 14. /3/: 39-42.
22. Gupta K. S., 1964.  
Studies on the specificity of haemolymph from differents insect for the culture of tissues of other insets  
Propc. Indian Acad. Sci. 59 /2/: 103-109.
23. Gupta K. S., 1965.  
Studies on ~~I~~sect Tissues culture  
Z. Wiss Zool. 171. /3/4/: 210-239.
24. Greenberg B., 1969.  
In vitro cultuvation of *Musca domestica* and *Musca sorbens* tissues  
Exp. Cell Res. 54. 284-287.

25. Grace T. D. C., 1962.  
Establishment of four strains of cells from insect tissues  
grown in vitro  
Nature 195. 788.
26. Gvozdev V. A., Kakpakov V. T., 1968.  
In vitro culture of embryonic cells of *Drosophila melanogaster*  
Genetika 4. /2/: 129-42.
27. Hirumi H., Maramorosch K., 1964.  
The in vitro cultivation of embryonic Leafhopper tissues  
Exp. Cell. Res. 36. /3/: 625-631.
28. Hirumi H., Maramorosch K., 1964.  
Tissue culture of the monarch butterfly  
Contrib. Boyce Thompson Inst. 22 /5/: 259.
29. Horikawa M., Masakatsu., 1959.  
In vitro cultivation of blood cells of *Drosophila melanogaster*  
Nature 184. 2017-18.
30. Horikawa M., Allen S., 1968.  
The use of *Drosophila* cell cultures in study of differentiation  
In vitro 3. 65-68.
31. Horikawa M., Fox A. S., 1964.  
Culture of embryonic cells of *Drosophila melanogaster* in  
vitro  
Science 145. 1437.
32. Judy K. J., 1969.  
Cellular response to ecdysterone in vitro  
Science 165. 1374-75.

33. Hones B. M., Cunnigham I., 1961.  
Growth by cell division in insect tissue culture  
Exp. Cell Res. 23. 386-401.
34. Loughton B. G., Wost A. S., 1968.  
Gel filtration of insect haemolymph proteins  
Can. J. Zool. 46. /4/: 625-628.
35. Landureau J. C., 1969.  
Study on the requirements of an Insect cell line  
I. Aminoacids  
Exp. Cell Res. 54. /3/: 391-398.
36. Landureau J. C., 1969.  
Study on the requirements of an Insect cell line  
II. Water soluble vitamins  
Exp. Cell Res. 54 /3/: 399-402.
37. Landureau J. C., 1966.  
Cultures in vitro de cellules embryonnaires de Balttes  
Exp. Cell Res. 41. 545-556.
38. Landureau J. C., 1965.  
Cultures primaries de cellules embryonnaires d'un insecte:  
Blabera fusca  
Compt. Rend. Acad. Sci. /Paris/ 260. 5379.
39. Leloup A. M., 1966.  
The persistence of neurosecretion in organotypic culture by a  
dipterous insect, Calliphora erythrocephala  
Ann. Endocr. /Paris/ 27. 506-508.
40. Marks E. P., Reinecke., 1966.  
Regenerating tissues from the cocroach leg  
Nutritient media for maintenance in vitro  
J. Kans. Ent. Soc. 38. /2/: 1366.

41. Marks E. P. 1970.  
The action of hormones in insect cell and organ cultures  
Gen. Comp. Endocr. 15. 289-302.
42. Martignoni M. E., 1961.  
Preparation and uses of insect hemocyte monolayers in vitro  
Biol. Bull. 121. 507-520.
43. Martignoni M. E., 1960.  
Problems of insect tissue culture  
Experientia /Basel/ 16. 125-128.
44. Martignoni M. E., 1962.  
Insect tissue culture: a tool for the physiologist  
Biol. Colloq. Oregon State 23. 89-110.
45. Mazzone H. M., in press  
cultivation of gypsy moth hemocytes  
Curr. Top. Microbiol. Immunol.
46. Maramorosch K., 1956.  
Multiplication of aster yellows virus in in vitro preparations  
of insect tissues  
Virology 2. 362-376.
47. Maramorosch K., 1962.  
Present status of insect tissue culture  
Proc. Intern. Congr. Entomol. 11.  
Vienna, 2. 801-807.
48. Mitsuhashi J., Maramorosch K., 1964.  
Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal, and imaginal  
tissues from aseptic insects  
Contrib. Boyce Thompson Inst. 22. /8/: 435.

49. Oberlander H., 1969.  
Effects of ecdysone, ecdysterone, inokosterone on the in vitro initiation of metamorphosis of wing disk of *Galleria mellonella*  
*J. Insect Physiol.* 15. 297-304.
50. Oberlander H., Berry S., 1965.  
RNA and DNA synthesis during activation and secretion of the prothoracic glands of Saturniid moths  
*J. Exp. Zool.* 159. 15-32.
51. Ohanessian A., Echalié G., 1967.  
Multiplocation of *Drosophila* hereditary virus in *Drosophila* embryonic cells cultured in vitro  
*Nature /Lond/* 213. 1049-1050.
52. Paul J., 1965.  
Cell and Tissue Culture  
Edinburgh and London: E. S. Livingstone Ltd. 312.
53. Peleg J., 1965.  
Growth of mosquito, Tissues in vitro  
*Nature* 206. 427.
54. Raymond S., 1964.  
Acrylamid gel electrophoresis  
*Ann. N Y. Acad. Sci.* 121. 350-365.
55. Schneider I., 1964.  
Culture in vitro of *Drosophila* ovarian tissue  
*Genetics* 50. /2/: 284.
56. Schneider I., 1967.  
Insect tissue culture  
*Methods in developmental biology* 543-551.  
New York Thomas Y. Crowell Co.



57. Sutcliffe D. W., 1963.  
The chemical composition of haemolymph in insect and some other arthropods in relation to their phylogeny  
Comp. Biochem. and Physiol 9. 121.
58. Seecof R. L., 1968.  
Differentiation of embryonic drosophila cells in vitro  
Exp. Cell. Res. 50. 654-660.
59. Trager W., 1935.  
Culture of Insect tissue  
J. Exptl. Med. 61. 501-513.
60. Trager W., 1935.  
The culture of mosquito larvae free from living micro organism  
Am. J. Hys. 22. 18.
61. Wyatt G. Re., 1961.  
The biochemistry of insect haemolymph  
Ann. Rev. Entomol. 6. 75-102.
62. Wyatt S. S., 1956.  
Culture in vitro of tissue from the silkworm Bombyx mori L  
J. Gen. Physiol. 39. 841.
63. Vago C., 1963.  
Pathogenesis of Insect viruses  
Recent Progr. Microbiol. 8. 162-174.
64. Vago C., 1967.  
Invertebrata tissue culture  
Methods in virology 1. 567-602. New york Acad. Press
65. Williams C. M., 1968.  
Ecdysone and ecdysone analogues - their assay and action on diapausing pupae of the cynthia silk Worm  
Biol. Bull. 134. 344-355.

66. Williams C. M., 1966.

Reaggregation of insect cells as studied by a new method  
of tissue and organ culture

Science 154. 516-517.