

Biologická diverzita nádorových buněk karcinomu mléčné žlázy byla studována v *in vitro* podmínkách metodou expozice cytotoxickému působení zevních agens.

Pro testování byly nejprve použity primární buňky karcinomů mléčné žlázy a maligních výpotků, individuálně odebrané pro experimentální stanovení chemorezistence po krátkodobé kultivaci s cytostatiky standardním MTT testem. V několika dostupných případech byla sledována relace ke klinickému průběhu nádorového onemocnění. U 4 ze 7 vzorků byla pozorována dobrá korelace s výsledky terapie. Dále bylo MTT testem na buňkách primárních nádorů a na linii EM-G3 zjišťováno, jaký vliv má kombinace dvou cytostatik v jedné kultivační jamce na viabilitu buněk a jaké jsou možnosti chemosenzitivizace tamoxifenem.

Pro modelové řešení vývoje diverzifikace populace maligních buněk byla využita nová buněčná linie EM-G3, která byla v naší laboratoři zachycená a ustavená z kultivovaného vzorku primárního mamárního nádoru pro MTT test. Buňky linie EM-G3 reprezentují unikátní, spontánně immortalizovanou klonální buněčnou linii, prokazatelně odvozenou z premaligních progenitorů karcinomu prsu a schopnou částečně diferencovat *in vivo*. Linie byla detailně charakterizována pomocí řady cytologických i molekulárně biologických technik. Mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace prokázala relativně stabilní genom. Nebyly detekovány amplifikace ani delece žádného z genů, které se často pojí s diagnózou karcinomu prsu (HER2/neu, cyklin D, c-myc, p53 a Rb). Imunocytochemická analýza EM-G3 buněk *in vitro* odhalila pozitivitu na cytokeratiny (K) K5, K14, K18, nukleární protein p63, epiteliální membránový antigen (EMA) a jiné proteiny charakterizující mamární epiteliální bipotentní progenitory. Při porovnání metabolické aktivity tří buněčných linií (EM-G3, MCF7 a MDA-MB231) po ovlivnění estradiolem a jeho antagonistou tamoxifenem bylo zjištěno, že citlivost vykazovala jen linie MCF7.

Linie EM-G3 byla využita pro vývoj nového testu chemosenzitivity/rezistence, který umožňuje průběžně sledovat účinek cytostatik na buňky kultivované z nádorové tkáně *in vitro*. Byl označen jako NTCA (non-destructive test of cellular activity) a je koncipován jako komplementární test ke krátkodobému MTT testu. NTCA překonává limity MTT testu zavedním pružnějšího hodnocení adaptability/diverzifikace nádorových buněk v zátěžových situacích. Zajištěním možnosti izolovat subpopulace přežívajících buněk vytváří podmínky pro detailní studium diverzifikačního potenciálu individuálních populací nádorových buněk. V NTCA testu můžeme kultivovat buňky po vymytí toxického agens z kultivačních jamek po námi stanovenou dobu a ve fázovém mikroskopu průběžně hodnotit morfologické změny

buněk, jejich regenerační schopnosti nebo naopak přechod k apoptóze signalizovaný fragmentací buněk a metabolickým útlumem. Validace NTCA testu byla provedena srovnáním účinku cisplatinu na buňky linie EM-G3 s MTT testem.

NTCA testem byla studována chemosenzitivita linie EM-G3 a vzorků primárních nádorových buněk na gemcitabin a výsledky byly porovnány s MTT testem. Zatímco výsledky v MTT testu si byly navzájem velmi podobné, NTCA testem byly zjištěny značné rozdíly mezi buněčnými populacemi.

Chemosenzitivizační účinky tamoxifenu hodnocené pomocí MTT testu nebyly jednoznačně prokazatelné, vzhledem k relativně malé citlivosti metody. Proto byly paralelně použity MTT a NTCA test, kterým již bylo možno hodnotit dlouhodobý účinek expozice buněk chemosenzitoru a cytostatika, ale výrazný chemosenzitivizační účinek tamoxifenu se nepodařilo prokázat. NTCA test v jednom případě dokonce prokázal protektivní vliv tamoxifenu na buňky exponované cisplatině.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle se podařilo splnit. Výsledky získané MTT testem na klinických případech ukazují na možnost využít je s výhodou v klinickém rozhodování. Získaná linie EM-G3 je zásadním přínosem pro *in vitro* modelové studium diverzifikace karcinomu prsu. NTCA test představuje nový nástroj pro analýzu diverzifikačního potenciálu individuálního nádoru a tím perspektivně může přispět k tvorbě chemoterapeutické strategie.