

Patrycja Tudrej, Katarzyna Aleksandra Kujawa, Alexander Jorge Cortez,  
Katarzyna Marta Lisowska

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

# Charakterystyka modeli *in vitro* do badań nad rakiem jajnika

Characteristics of *in vitro* model systems for ovarian cancer studies

**Artykuł jest tłumaczeniem pracy:**

Tudrej P, Kujawa KA, Cortez AJ, Lisowska KM. Characteristics of *in vitro* model systems for ovarian cancer studies. *Oncol Clin Pract* 2019; 15: 246–259. DOI: 10.5603/OCP.2019.0024.

Należy cytować wersję pierwotną.

**Adres do korespondencji:**

Dr hab. n. med. Katarzyna Lisowska  
Centrum Badań Translacyjnych  
i Biologii Molekularnej Nowotworów  
Centrum Onkologii — Instytut  
im. Marii Skłodowskiej-Curie  
Oddział w Gliwicach  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15,  
44–101 Gliwice  
Tel.: 32 278 98 88, faks: 32 231 35 12  
e-mail: katarzyna.lisowska@io.gliwice.pl

## STRESZCZENIE

W leczeniu onkologicznym coraz większą rolę odgrywają leki celowane molekularnie. W terapii raka jajnika najbardziej obiecujące wyniki daje zastosowanie leków z grupy inhibitorów polimerazy poliADP-rybozy (PARP). Badania kliniczne ostatnich lat wykazały, że inhibitory PARP stosowane w terapii podtrzymującej wydłużają czas wolny od progresji o wiele miesięcy. To zachęca do poszukiwania kolejnych leków celowanych i stwarza nadzieję, że rak jajnika może się stać chorobą przewlekłą, o wieloletnim przebiegu.

Problemem w badaniach nad rakiem jajnika jest heterogenność choroby. Ostatnie badania wskazują, że różne typy histologiczne mogą mieć odrębne pochodzenie tkankowe. Według współczesnej wiedzy określenie „rak jajnika” jest sztucznym pojęciem, obejmującym różne inwazyjne raki zlokalizowane w obrębie miednicy. Badania genetyczne i immunofenotypowe wskazują, że niskozróżnicowany rak surowicy, najczęstszy i najgorzej rokujący typ histologiczny, w większości przypadków wywodzi się z nabłonka jajowodu, raki endometrioidalne i jasnokórkowe wywodzą się zaś prawdopodobnie z endometrium. Dlatego w badaniach podstawowych i przedklinicznych nad rakiem jajnika potrzebne są dobrze scharakteryzowane modele odpowiadające poszczególnym typom histologicznym.

W niniejszej pracy omówiono najczęściej wykorzystywane linie komórkowe stosowane w badaniach *in vitro*. Opracowanie ma na celu podsumowanie zalet i ograniczeń różnych modeli, obejmujących hodowle pierwotne i stabilne linie komórkowe, model hodowli dwu- i trójwymiarowej itp. W szczególności autorzy chcą zwrócić uwagę badaczy, że najczęściej stosowane linie komórkowe SKOV3 i A2780 nie są właściwym modelem do badań nad niskozróżnicowanym rakiem surowiczym.

**Słowa kluczowe:** rak jajnika, badania *in vitro*, linie komórkowe, hodowla 3D, niskozróżnicowany surowicy rak jajnika, chemiooporność

## ABSTRACT

Nowadays, targeted therapy plays a growing role in oncological treatment. In ovarian cancer, particularly promising results are achieved with poliADP-ribose (PARP) inhibitors. Recent clinical trials have shown that PARP inhibitors can result in significantly longer progression free survival. These results encourage for the search for other targeted therapies and bring the hope that ovarian cancer can soon become a manageable chronic disease.

Main problem in ovarian cancer research is a heterogeneity of this disease. Recent studies have shown that different histological types of ovarian cancer can originate from distinct tissues. According to the recent knowledge, “ovarian cancer” is an artificial term for distinct invasive cancers localized within the pelvis. Genetic and immunophenotype analyses have shown that high-grade serous ovarian cancer, the most frequent histological type and the one with the worst prognosis, originates mainly from fallopian tube epithelium, while endometrioid and clear cell cancers originate from endometrium. For these reasons, in basic and preclinical studies on ovarian cancer one has to carefully choose a well-defined model system, corresponding to the histological type of interest. In this article, we discuss ovarian cancer cell lines most frequently used in *in vitro* studies. Our aim is to indicate advantages and disadvantages of different models, encompassing primary and established cell cultures, two-

and three-dimensional models, etc. In particular, we would like to alert the researchers, that most popular cell lines SKOV3 and A2780, do not represent suitable model for the studies on high-grade serous ovarian cancer.

**Key words:** ovarian cancer, *in vitro* models, ovarian cancer cell lines, 3D cell culture, high-grade serous ovarian cancer, chemoresistance

Copyright © 2019 Via Medica

ISSN 2450-1646

Onkol Prakt Klin Edu 2019; 5: 314-328

## Wstęp

Rak jajnika charakteryzuje się wysoką śmiertelnością. Przyczyną tego zjawiska jest późne rozpoznanie choroby, związane z bezobjawowym przebiegiem jej początkowych stadiów i z brakiem skutecznych narzędzi do wczesnej diagnostyki i do badań przesiewowych.

Standardowe leczenie zaawansowanego raka jajnika obejmuje zabieg chirurgiczny i chemioterapię na bazie paklitakselu i pochodnych platyny. Większość pacjentek odpowiada bardzo dobrze na leczenie, problemem są jednak nawroty choroby i narastająca chemiooporność. Zazwyczaj w przebiegu raka jajnika występuje kilka nawrotów, przeplatanych okresami wolnymi od objawów choroby. Wznovy są leczone głównie za pomocą chemioterapii, aż do czasu wykształcenia się oporności. W ostatnich latach w leczeniu nawrotowego raka jajnika znajdują zastosowanie tzw. leki celowane, ukierunkowane na określone cele biologiczne. Badania kliniczne wskazują, że czas przeżycia chorych z rakiem jajnika może zostać znacząco wydłużony dzięki takim lekom, jak inhibitory polimerazy poliADP-rybozy (PARP) czy też — w mniejszym stopniu — lek antyangiogeny bewacyzumab. Rak jajnika ma zatem szansę jako jeden z pierwszych nowotworów stać się chorobą przewlekłą, którą będzie można z powodzeniem kontrolować przez lata [1]. Leki celowane są jednak obecnie bardzo drogie i dlatego rekomenduje się je do ograniczonej liczby wskazań. W wielu krajach nie są refundowane i dlatego nie są jeszcze powszechnie stosowane w praktyce klinicznej [2].

Pozytywne wyniki badań klinicznych z wykorzystaniem nowych leków biologicznych zachęcają do dalszych poszukiwań. Ważnym problemem w badaniach nad rakiem jajnika jest heterogenność tej choroby [1]. Aby można było prawidłowo zaprojektować eksperyment i uzyskać wiarygodne wyniki, kluczową rolę odgrywa sprecyzowanie, jaki typ histologiczny raka jajnika ma być przedmiotem badań, i wybranie właściwego modelu.

## Heterogenność raka jajnika

W raku jajnika wyróżnia się kilka typów histologicznych; najczęściej występują raki: surowiczy, endometrioidalny, jasnokomórkowy i śluzowy. Klasyczna

teoria zakładała, że wszystkie te nowotwory wywodzą się z pojedynczej warstwy mezotelialnego nabłonka pokrywającego jajnik (OSE, *ovarian surface epithelium*). Przyjmowano, że inicjacja procesu nowotworowego zachodzi w OSE pod wpływem cyklicznej stymulacji przez hormony, cytokiny i czynniki wzrostu, wydzielane w procesie owulacji i gojenia się tkanek po uwolnieniu oocytu. Różnicowanie się guza w kierunku poszczególnych typów histologicznych miało być zjawiskiem wtórnym.

W 1999 roku Louis Dubeau zakwestionował powyższy scenariusz i przedstawił koncepcję, zgodnie z którą większość przypadków raka jajnika wywodzi się z nabłonek wyściełających struktury pochodzące z przewodów Müllera, czyli szyjkę macicy, macicę i jajowody [3]. Z czasem zgromadzono dowody eksperymentalne na poparcie teorii Dubeau. Wykazano zasadnicze różnice immunofenotypowe, genetyczne i molekularne pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi raka jajnika. Przykładowo, większość raków surowiczych wykazuje cechy wspólne z müllerowskim nabłonkiem wyściełającym jajowody, m.in. ekspresję białek HOXA i PAX8. Ekspresji tych białek nie obserwuje się natomiast w OSE. Obecnie przyjmuje się, że większość przypadków niskozróżnicowanego raka surowiczego jajnika (HGSOC, *high-grade serous ovarian cancer*) wywodzi się z zezłośliwiających komórek nabłonkowych jajowodu, które wtórnie implantują się na powierzchni jajnika i/lub otrzewnej. To tłumaczy błyskawiczny rozsiew HGSOC. Z kolei dobrze zróżnicowane raki surowicze (LGSOC, *low-grade serous ovarian cancer*) wywodzą się z torbieli inkluzyjnych jajnika i mają zróżnicowane pochodzenie. Część tych torbieli powstaje wskutek inwaginacji OSE, a część — w wyniku implantacji nabłonka strzępków jajowodu. Pod wpływem lokalnego mikrośrodowiska w torbieli może nastąpić inicjacja procesu nowotworowego. Za prekursorzy raka endometrioidalnego i jasnokomórkowego uważa się ogniska endometriozy — fragmenty endometriu, które przemieściły się w górę jajowodu i zagnieździły na powierzchni jajnika. Przemawia za tym m.in. ochronny efekt zabiegu podwiązania jajowodów, co obniża ryzyko rozwoju tych typów histologicznych wskutek zablokowania drogi migracji ich prekursorów. Raki śluzowe mają wiele cech morfologicznych wspólnych z rakami przewodu pokarmowego oraz komórkami

gruczołowymi kanału szyjki macicy. Ich pochodzenie jest dotychczas wciąż niewyjaśnione [4, 5].

Poszczególne typy histologiczne raka jajnika różnią się także profilem molekularnym. Nisko zróżnicowany rak surowiczy jajnika charakteryzuje się wysokim odsetkiem mutacji w genie *TP53* (ponad 95% przypadków) oraz utratą funkcji genów *BRCA1* lub *BRCA2*. W HGSOE nie występują mutacje innych genów, charakterystyczna jest natomiast wysoka zmienność liczby kopii DNA w całym genomie (CNV, *copy number variation*). Dobrze zróżnicowane raki surowicze charakteryzują się obecnością mutacji w genie *BRAF* lub *KRAS*. Raki typu endometrioidalnego i jasnokomórkowego wykazują niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych i mutacje w genie *PIK3CA* oraz *PTEN*. W raku jasnokomórkowym dodatkowo występują mutacje w genie *ARID1A*, a w endometrioidalnym — w *CTNNB1*. Dla typu śluzowego charakterystyczne są mutacje genu *KRAS* [5, 6].

W 2004 roku Ie-Ming Shih i Robert Kurman zaproponowali podział raków jajnika na dwa typy (tab. 1). Typ II obejmuje HGSOE; czasem są tu zaliczane również nisko zróżnicowane raki jasnokomórkowe. Raki typu II są zazwyczaj rozpoznawane w III lub IV stopniu zaawansowania według FIGO (*Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique*) i cechują się bardzo złym rokowaniem. Stanowią one około 75% wszystkich zachorowań. Na typ I składają się pozostałe typy histologiczne. Ich rozpoznanie ustalane jest we wcześniejszych stadiach, a rokowanie jest dużo lepsze [7].

Podsumowując, można stwierdzić, że wiedza nagromadzona w ciągu ostatnich kilkunastu lat każe zredefiniować rozumienie choroby nazywanej tradycyjnie rakiem jajnika. Wiele danych wskazuje, że jest to

szuczny termin, obejmujący różne nowotwory zlokalizowane w miednicy, które mają odrębną histogenezę, inne tory mutacyjne i zróżnicowany obraz kliniczny. Wiedzę o heterogenności raków jajnika należy zatem uwzględniać zarówno w postępowaniu klinicznym, jak i w projektowaniu badań.

### Modele *in vitro* wykorzystywane w badaniach nad rakiem jajnika

Głównym modelem w badaniach podstawowych i przedklinicznych nad rakiem jajnika są linie komórkowe utrzymywane w hodowli *in vitro*. Linie komórkowe mogą być ustabilizowane (zdolne do nieskończonej liczby podziałów *in vitro*) lub pierwotne, czyli świeżo pobrane z organizmu. Najczęstszymi obiektami badań są komórki nowotworowe, prawidłowe komórki prekursorowe danego nowotworu oraz komórki macierzyste.

Ograniczeniami modelu hodowli komórkowej są utrata histologii tkanek, brak sygnalizacji dokrewnej, parakrynej i nerwowej oraz brak gradientów składników odżywczych i innych substancji występujących w organizmie żywym. Olbrzymie zalety modelu — łatwość propagowania komórek, stabilność i powtarzalność — decydują jednak o jego popularności i niezastąpionej roli.

#### Pierwotne linie komórkowe

Krótkotrwałe hodowle komórek świeżo pobranych z organizmu są cennym modelem, zwłaszcza jeżeli wyniki badań *in vitro* można skorelować z danymi klinicznymi. Cechują się one jednak wieloma ograniczeniami, takimi jak konieczność każdorazowej preparacji komórek

Tabela 1. Podział raków jajnika uwzględniający cechy kliniczne i molekularne [na podstawie 7]

Typ I (25% zachorowań)	Typ II (75% zachorowań)
Dobrze zróżnicowany rak surowiczy (LGSOC, <i>low-grade serous ovarian cancer</i> )	Nisko zróżnicowany rak surowiczy (HGSOE, <i>high-grade serous ovarian cancer</i> )
Rak jasnokomórkowy	
Rak endometrioidalny	
Rak mieszany	
Rak śluzowy	
Wywodzą się ze zmian prekursorowych (nowotwory graniczne, endometrioza)	Wywodzą się ze śródnałonkowego raka jajowodu (STIC, <i>serous tubal intraepithelial cancer</i> )
Mutacje somatyczne w genach <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PTEN</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>CCTNB1</i> , <i>ARID1A</i> , <i>PPP2R1A</i>	95% przypadków ma mutację w genie <i>TP53</i> 40–50% przypadków ma inaktywację genów <i>BRCA</i>
Powolny wzrost	Szybki wzrost i duża agresywność
Ograniczone do jajnika	Rzadko ograniczone do jajnika
Rozpoznanie w I i II stopniu zaawansowania wg FIGO	Rozpoznanie w III i IV stopniu zaawansowania wg FIGO
Mała wrażliwość na chemioterapię	Duża wrażliwość na chemioterapię
Rzadkie nawroty	Częste nawroty
Dobre rokowanie (80% 5-letnich przeżyć)	Złe rokowanie (10% 5-letnich przeżyć)

Tabela 2. Przykłady pierwotnych i unieśmiertelnionych nabłonek kontrolnych uważanych za tkankę prekursorową raka jajnika

Nazwa linii	Pochodzenie	Rodzaj	Rodzaj modyfikacji	Oznaczone markery	Pochodzenie
FT33-shp53-R24C	FT	I	Retrowirusowy system transferu genów (ekspresja hTERT, p53 shRNA, CDK4R24C)	CK-7, PAX8	Creative Bioarray [8]
HFTEC	FT	P	–	CK-8/18, CK-14, CK-19	Life Line Cell Technology [9]
HOSEpiC	OSE	P	–	CK-14, CK-18, CK-19	ScienCell Research Laboratories [10]
Human Primary Ovarian Surface Epithelial Cells	OSE	P	–	CD326, E-kadheryna	ABM [11]
HOSE1, HOSE2	OSE	I	Lentivirusowy system transferu genów (ekspresja hTERT, Cdk4 i cykliny D1)	–	Sasaki i wsp., 2009 [12]
iFTSEC283	FT	I	–	–	Gjyshi i wsp., 2018 [13]
IOSE-29, IOSE-80	OSE	I	Transfekcja małpim wirusem SV-40 ( <i>simian virus 40</i> )	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -katenina, CA125, E-kadheryna, F-aktyna, pan-cytokeratyna	Auersperg i wsp., 1999 [14]
IOSE-C9, IOSE-C10, IOSE-C21	OSE	I	Retrowirusowy system transferu genów (ekspresja hTERT)	CK-7, CK-8, CK-14, CK-16, CK-18, CK-19, CA125, E-kadheryna	Li i wsp., 2007 [15]
NOSE4, NOSE11, NOSE19L3	OSE	P	–	AE1/AE3, CA125, CK-7, czynnik VIII EpCAM, E-kadheryna, FSP	Lawrenson i wsp., 2009 [16]
OE-E6/E7	FT	I	Retrowirusowy system transferu genów (ekspresja onkoprotein E6/E7 HPV 16)	CK-19	Lee i wsp., 2001 [17]

Źródło: FT (*fallopian tube epithelium*) — nabłonek jajowodu, OSE (*ovarian surface epithelium*) — nabłonek pokrywający jajnik; rodzaj: I — linia immortalizowana, P — linia pierwotna

z materiału biologicznego, powolny wzrost *in vitro* i ograniczona żywotność. Powtarzalność tego modelu jest niska ze względu na fakt, że za każdym razem komórki pochodzą od innego dawcy i z innego nowotworu. Dodatkowo, w czasie hodowli postępuje selekcja komórek i zmienia się ich wyjściowy skład.

W badaniach nad rakiem często wykorzystuje się jako kontrolę hodowle pierwotne nabłonek uważanych za tkankę prekursorową danego nowotworu. W raku jajnika długo używano w tym celu komórek nabłonka jajnikowego — OSE. Odkąd uznanie znalazła teoria o pochodzeniu części HGSOE z nabłonka jajowodu, zasadne wydaje się stosowanie jako kontroli również komórek tego nabłonka. Wciąż jednak publikowane są prace, w których wykorzystywano wyłącznie OSE. Jeszcze większym błędem jest używanie całych fragmentów jajnika, zawierających elementy podścieliska oraz komórki germinalne. Zgodnie z obecną wiedzą

tkankami wyjściowymi dla różnych raków jajnika są: nabłonek jajowodu, nabłonek jajnika, endometrium i ogniska endometriozy oraz być może nabłonek jelita lub nabłonek pokrywający otrzewną. Przykłady pierwotnych i unieśmiertelnionych nabłonek kontrolnych zawiera tabela 2.

Komórki prawidłowe utrzymują się w hodowli *in vitro* przez okres 6–8 tygodni. Z czasem obserwuje się utratę swoistych markerów, następnie apoptozę lub proces starzenia (*senescence*). Zestarzałe komórki są olbrzymie, mają liczne wakuole i przestają się dzielić.

Pierwotne hodowle komórek raka jajnika mogą być wyprowadzone z guzów litych lub płynu otrzewnowego. W pierwszym przypadku preparatyka rozpoczyna się od mechanicznego rozbicia tkanki i enzymatycznego wytrawienia białek macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku płynu otrzewnowego wskazana jest wstępna eliminacja erytrocytów, np. poprzez wirowanie

w gradiencie gęstości. Z hodowli pierwotnej można eliminować fibroblasty poprzez tzw. różnicową trypsynizację — fibroblasty są odtrawiane od podłoża już po około 2 minutach traktowania trypsyną, a komórki nowotworowe wykazują silniejszą adhezję. Hodowle pierwotne komórek raka jajnika są stosunkowo łatwe do wyprowadzenia w porównaniu z innymi nowotworami — ich zalety stanowią duża żywotność, silna adhezja do podłoża i szybkie podziały komórkowe. W przypadku pozyskiwania materiału od chorych po chemioterapii żywotność komórek może być ograniczona, a ich wzrost w warunkach *in vitro* spowolniony. Należy też pamiętać, że komórki te przeszły już proces selekcji i nie reprezentują wszystkich klonów komórkowych obecnych w guzie przed rozpoczęciem leczenia [18].

Pierwotne hodowle komórek nowotworowych często zamierają po około 2–3 miesiącach utrzymywania *in vitro*. W niektórych przypadkach udaje się wyprowadzić stabilne linie komórkowe. W praktyce autorów, dysponując materiałem z płynu otrzewnowego od ośmiu pacjentek, udało się wyprowadzić jedną stabilną linię nowotworową [19]. Tan A. Ince i wsp. opracowali niedawno specjalne medium hodowlane (OCMI, *Ovarian Carcinoma Modified Ince*) do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych raka jajnika. Medium to bazuje na komercyjnie dostępnej pożywce WIT-T (*Cellaria*), przeznaczonej do hodowli ludzkich komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego, zawiera dodatek surowicy oraz naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), insuliny, hydrokortyzonu, toksyny cholery, a dla komórek wywodzących się z raka endometrioidalnego lub śluzowego także 17- $\beta$ -estradiol (wariant OCMIe). Według Ince i wsp. medium OCMI pozwala otrzymać stabilne linie raka jajnika w 95% przypadków [20].

#### Stabilne linie komórkowe

Ustabilizowane linie komórkowe są najczęściej wykorzystywanym modelem w badaniach nad rakiem. Ich zastosowaniu zawdzięczamy znaczący postęp w rozumieniu biologii nowotworów. Za ustabilizowane można uznać takie linie, które były pasażowane *in vitro* co najmniej 60 razy, mają stabilny profil genetyczny, dobrze się dzielą, są żywotne, a ich utrzymanie w hodowli jest bezproblemowe. W bazach danych, takich jak *The Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) lub *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), skatalogowano do tej pory ponad 1000 różnych linii komórek nowotworowych, w tym kilkadziesiąt linii raka jajnika.

Stabilne linie komórek nowotworowych dość wiernie odzwierciedlają spektrum zmian genetycznych guzów wyjściowych. Jednak proces nieśmiertelniania i długotrwała hodowla *in vitro* mogą wpłynąć na zmianę ich profilu molekularnego. Linie komórkowe udostępniane współcześnie przez profesjonalne repozytoria mają

scharakteryzowany profil genetyczny; w tym celu najczęściej wykorzystuje się analizę długości wybranych powtarzających się sekwencji (STR, *short tandem repeats*). Laboratoria badawcze powinny co kilka lat weryfikować profil STR posiadanych linii komórkowych i w przypadku wykrycia niezgodności pozyskać nową transzę komórek z autoryzowanego repozytorium. Takie postępowanie powoli staje się standardem. Redakcje czasopism naukowych coraz częściej wymagają podania źródła komórek i nie akceptują wykorzystania komórek o niezwyfikowanym profilu genetycznym.

Wiele powszechnie wykorzystywanych linii komórkowych zostało wyprowadzonych kilkadziesiąt lat temu. W niektórych przypadkach dopiero współczesne analizy molekularne pozwoliły wykryć pewne pomyłki w ich klasyfikacji. Prawdopodobnie niektóre linie zostały na początku źle sklasyfikowane bądź zamienione z innymi. Takie sytuacje wykryto nawet w panelu NCI-60, obejmującym 60 linii komórkowych wyprowadzonych w *National Cancer Institute* w Bethesda, powszechnie stosowanym do badań przedklinicznych nowych leków [21]. Przykładem jest linia MDA-MB-435, przez wiele lat uznawana za linię raka piersi. Na podstawie oceny profilu ekspresji genów [22], analizy kariotypu, porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH, *comparative genomic hybridization*) oraz analizy polimorfizmów SNP (*single nucleotide polymorphism*) [23] wykazano, że linia ta jest identyczna z linią komórkową czerniaka M14. Dyskusja dotycząca pochodzenia obu tych linii wciąż trwa [24]. Inna linia raka piersi, znana jako MDA-N, na podstawie analizy molekularnej okazała się identyczna z linią MDA-MB-435. Z kolei linia MCF-7/ADR-RES, opisywana jako odporna na adriamycynę wariant linii raka piersi MCF-7, najprawdopodobniej jest wariantem linii raka jajnika OVCAR8 [25]. Okazało się też, że wiele klasycznych linii komórkowych jest zanieczyszczonych domieszką komórek raka szyjki macicy HeLa — pierwszej w historii ustabilizowanej nowotworowej linii komórkowej [26, 27]. Z takich niepewnych modeli komórkowych najlepiej zrezygnować już na etapie planowania eksperymentów.

#### Modele komórkowe do badań nad rakiem jajnika

W przypadku badań nad rakiem jajnika dokładne sprecyzowanie pochodzenia linii komórkowych jest szczególnie ważne, ponieważ poszczególne typy histologiczne stanowią właściwie odrębne jednostki chorobowe. Niestety, świadomość tego jest wciąż jeszcze zjawiskiem nowym i niezupełnie powszechnym. Co więcej, wiele powszechnie stosowanych linii komórkowych raka jajnika ma niejasne pochodzenie histologiczne — albo od początku nieokreślone, albo zakwestionowane współcześnie, w toku pogłębianych analiz.

W 2013 roku ukazała się praca Michaela S. Anglesio i wsp., w której po raz pierwszy zwrócono uwagę na



potrzebę reklasyfikacji dostępnych modeli komórkowych raka jajnika pod względem ich wyjściowego typu histologicznego [28]. Kolejne dwie prace, Silvi Domcke i wsp. [29] oraz Corine Beaufort i wsp. [30], które miały na celu uporządkowanie wiedzy o dostępnych modelach komórkowych i uczulenie badaczy na problem ich pochodzenia histologicznego, analizują panel kilkudziesięciu linii komórkowych raka jajnika. Mimo wyczerpujących analiz molekularnych, morfologicznych i genetycznych, pochodzenia wielu linii nadal nie udało się precyzyjnie ustalić.

Jak opisano w części pt. „Heterogenność raka jajnika”, najczęstszym typem raka jajnika jest niskozróżnicowany rak surowiczy (HGSOC), który cechuje się również najgorszym rokowaniem. Należałoby zatem oczekiwać, że ten typ histologiczny stanowi główny przedmiot badań podstawowych i przedklinicznych. Analiza publikacji indeksowanych w bazie PubMed wskazuje, że najczęściej cytowane są linie SKOV3, A2780, OVCAR3, CAOV3 i IGROV1, wśród których nie ma dobrego modelu HGSOC [29].

Linie SKOV3 zwyczajowo uznaje się za model raka surowiczego. Jednak w oryginalnym artykule opisującym jej wyprowadzenie została ona jedynie lakonicznie opisana jako „linia komórkowa gruczolakoraka pochodząca z płynu wysiękowego pacjentki z rakiem jajnika” [31]. Z kolei linia A2780 została opisana jako wyprowadzona z gruczolakoraka endometrioidalnego [32] i późniejsze badania potwierdzają tę klasyfikację.

Domcke i wsp. wykorzystali dane z publicznych repozytoriów — CCLE oraz TCGA — aby porównać profile ekspresji genów w liniach komórkowych i w preparatach pooperacyjnych raka jajnika. Biorąc dodatkowo pod uwagę profile genetyczne komórek (obecność określonych mutacji i zmienność liczby kopii DNA — CNV), autorzy zaproponowali ranking 47 linii komórkowych pod kątem ich przydatności jako modeli HGSOC. Linie komórkowe SKOV3 i A2780 otrzymały etykietę *unlikely HGSOC* (nie odpowiadają HGSOC) [29]. Komórki tych linii nie mają głównych cech HGSOC, takich jak wysoki poziom CNV oraz obecność mutacji w genach *TP53* i *BRCA1* lub *BRCA2*. Zamiast tego posiadają mutacje w genach niezwiązanych z HGSOC, takich jak *ARID1A* (charakterystyczne dla raka jasnokomórkowego i endometrioidalnego) oraz *PIK3CA* (związane z rakiem jasnokomórkowym).

Także Anglesio i wsp. jednoznacznie kwestionują przydatność linii SKOV3 i A2780 jako modeli HGSOC [28]. Beaufort i wsp. klasyfikują linie SKOV3 i A2780 jako pochodzące z raka jasnokomórkowego lub endometrioidalnego (*putative histology: endometrioid/clear cell*) [30]. Shaw i wsp. wykazali, że guzy rozwijające się z komórek SKOV3 po podaniu myszom nagim mają morfologię raka jasnokomórkowego z akumulacją glikogenu w cytoplazmie (obraz mikroskopowy „jasnych” komórek) [33]. Podobny obraz obserwowano w hodowli

trójwymiarowej (3D, *three-dimensional culture*) komórek SKOV3 [34].

Podsumowując, analizy wykonane w ostatnich latach potwierdziły, że komórki A2780 wywodzą się z raka endometrioidalnego, oraz wykazały, że komórki SKOV3 reprezentują najprawdopodobniej raka jasnokomórkowego. Klasyfikacja komórek SKOV3 nadal nie jest całkiem jednoznaczna, ponieważ niektórzy autorzy raportują obecność mutacji *TP53*, co stanowi typową cechę raków surowiczych.

OVCAR3 jest trzecią najczęściej cytowaną linią raka jajnika. Uzyskano ją z płynu wysiękowego od pacjentki z nawrotowym rakiem jajnika zdiagnozowanym jako „słabo zróżnicowany gruczolakorak brodawkowaty” [32]. Zarówno OVCAR3, jak i CAOV3 mają mutację *TP53*, jednak zdaniem Domcke i wsp. pod względem innych cech odbiegają od charakterystyki HGSOC [29]. Inni badacze uznają, że komórki linii OVCAR3 z dużym prawdopodobieństwem reprezentują HGSOC [30, 34].

Linia IGROV1, ostatnia spośród pięciu najczęściej cytowanych, wykazuje fenotyp hipermutatorowy, a w klasteryzacji hierarchicznej na podstawie profilu ekspresji genów lokalizuje się z dala od linii jajnikowych, a blisko linii komórkowych pochodzących z nowotworów płuca, wątroby, żołądka i jelita cienkiego [29]. W analizie Beaufort i wsp. komórkom IGROV1 przypisano etykietę *mixed histology* [30]. Jest to więc linia, którą trudno jednoznacznie sklasyfikować, i dlatego lepiej z niej zrezygnować przy planowaniu badań, na rzecz innych, bardziej wiarygodnych modeli.

Linie komórkowe OAW42 i ES2 są rzadziej wykorzystywane w badaniach nad rakiem jajnika, a ich pochodzenie histologiczne jest również niejasne. Linia ES2 jest sprzedawana przez kolekcję ATCC (*American Type Culture Collection*) jako model raka jasnokomórkowego, jednak histologia guza wyjściowego nie została opisana w artykule źródłowym [35]. Na podstawie cech molekularnych Beaufort i wsp. uznali, że komórki ES2 odpowiadają rakowi jasnokomórkowemu [30], natomiast Anglesio i wsp. kwestionują ten typ histologiczny na podstawie badań *in vivo*: w guzach z komórek ES2 nie zaobserwowali oni komórek z jasną cytoplazmą bogatą w glikogen [28]. Z kolei Domcke i wsp. klasyfikują komórki ES2 jako *possibly HGSOC* [29].

Linie OAW42 opisano w publikacji źródłowej jako wyprowadzoną z surowiczego raka jajnika. Współczesne badania w większości potwierdzają typ surowiczy [30, 36], ale nie niskozróżnicowany. W pracy Domcke i wsp. linia ta otrzymała etykietę *unlikely HGSOC* [29]. Lee i wsp. ocenili, że architektura struktur tworzonych przez komórki OAW42 w hodowli 3D odpowiada dobrze zróżnicowanemu (G1) rakowi surowiczemu [34]. Wątpliwości nastrożają jednak obecność mutacji genów *ARID1A* i *PIK3CA* (cecha raków endometrioidalnych i jasnokomórkowych) [29, 30]. Jest to więc kolejny niepewny model raka jajnika, który powinien zostać

zastąpiony współcześnie wyprowadzonymi liniami komórkowymi o zdefiniowanym pochodzeniu.

Jak wykazano powyżej, wśród najczęściej stosowanych linii raka jajnika nie ma wiarygodnego modelu HGSO: dwie linie pochodzą z raka surowiczego, ale niekoniecznie niskozróżnicowanego (OVCAR3 i CAO3), linia SKOV3 najprawdopodobniej odpowiada rakowi jasnokomórkowemu, a A2780 — endometrioidalnemu; IGROV1 być może wywodzi się z innego narządu, dwa modele mają niepewne pochodzenie histologiczne (ES2 i OAW42).

Najrozsądniej byłoby zrezygnować z używania linii o niejasnym pochodzeniu, jednak — paradoksalnie — są one wciąż powszechnie wykorzystywane. Przyczyn tego zjawiska może być kilka. Część badaczy prawdopodobnie nie ma świadomości problemu. Czasami zaś o popularności danej linii decydują aspekty techniczne — duża żywotność komórek, małe wymagania, szybkie podziały itp. Pewnym argumentem za stosowaniem tych linii jest też fakt, że są one dobrze scharakteryzowane i mają obszerną dokumentację literaturową, do której można odnieść wyniki swoich badań.

### Niestabilność modeli komórkowych

Kolejnym problemem może być niestabilność linii komórkowych w hodowli *in vitro*. Wiele linii jest w użyciu od lat 70. i 80. XX wieku. W różnych laboratoriach na świecie, a nawet w różnych repozytoriach pod jedną nazwą występują różne klonny tej samej linii komórkowej.

Beaufort i wsp. porównali dwa warianty komórek SKOV3 i A2780 — pochodzące z europejskiego repozytorium ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Lines*) i z laboratorium akademickiego, w którym są one propagowane od lat. Większość analiz dała takie same wyniki dla obu wariantów, jednak zaobserwowano także różnice, np. we wrażliwości na docetaksel i paklitaksel w przypadku linii A2780 oraz we wrażliwości na paklitaksel, karboplatinę, doksorubicynę i gemcytabinę w przypadku SKOV3. Dwa warianty SKOV3 różniły się też obecnością mutacji w genach *HRAS* i *APC* oraz poziomem ekspresji białka EpCAM. Z kolei warianty A2780 różniły się pod względem mutacji w genie *BRCA2*.

Innym przykładem takich różnic jest mutacja genu *TP53* w linii SKOV3. W pracy Beaufort i wsp. stosowano dwie metody detekcji mutacji: głębokie sekwencjonowanie wybranych amplikonów oraz sekwencjonowanie eksonów metodą SOLiD (*supported oligo ligation detection*). W linii SKOV3 tylko metodą głębokiego sekwencjonowania wykryto mutację przesunięcia ramki odczytu (c.del267C) [30]. Obecność tej mutacji w komórkach SKOV3 została wcześniej opisana przez zespół Ogechi Ikediobi [37]. Stosując sekwencjonowanie metodą Sanger, autorzy niniejszej pracy w swoich badaniach wykryli tę mutację w komórkach SKOV3 z kolekcji amerykańskiej (ATCC) [19]. Elias i wsp. wspomnieli obecność (nieokreślonej) mutacji delekcji/zmiany ramki odczytu

w opornym na cisplatinę wariantcie linii SKOV3-cis [38]. Z kolei Anglesio i wsp. nie zaobserwowali mutacji *TP53* w komórkach SKOV3 [28], na co powołano się w pracy Ince i wsp. [20]. Domcke i wsp. powołali się na dane z encyklopedii CCLE, która również nie odnotowuje mutacji *TP53* w linii SKOV3 [29].

Opisane rozbieżności mogą być skutkiem wieloletniej hodowli; linia SKOV3 jest w użyciu od 1973 roku i obecnie na całym świecie istnieje wiele jej różnych klonów. Inną przyczyną może być stosowanie różnych metod detekcji mutacji przez różnych autorów. Ponadto, wielu autorów powołuje się na wyniki cudzych badań i nie weryfikuje ich eksperymentalnie.

Innym przykładem różnic występujących w ustalonych modelach komórkowych jest ekspresja markera WT1. Ince i wsp. nie zaobserwowali ekspresji WT1 w linii A2780 [20], podczas gdy autorzy niniejszej pracy w swoim eksperymencie wykrywali pojedyncze komórki WT1-dodatnie. Różnice dotyczą też ekspresji EpCAM w linii OVCAR3: Domcke i wsp. uzyskali wynik negatywny [29], podczas gdy autorzy zaobserwowali umiarkowany odczyn we wszystkich komórkach [19]. Także wyniki oznaczania przez autorów ekspresji markera CD44 w przypadku trzech linii komórkowych: SKOV3, OVCAR3 i OAW42 [19] odbiegały od wyników Beaufort i wsp. [30].

Warto natomiast zwrócić uwagę, że trzy typy morfologii komórek (epitelialny, wrzecionowaty i okrągły) opisane przez Beaufort i wsp. [30] są prawdopodobnie cechą dość stabilną i charakterystyczną dla różnych linii komórkowych. W swoich badaniach autorzy niniejszego opracowania poczynili identyczne obserwacje: komórki SKOV3, OAW42 i OVCAR3 wykazywały morfologię epitelialną, ES2 miały kształt opisywany jako wrzecionowaty, a A2780 — okrągły. Beaufort i wsp. wykazali istotny związek pomiędzy morfologią komórek a pochodzeniem linii komórkowej: 14 spośród 19 linii o morfologii epitelialnej pochodziło z płynu wysiękowego. Dodatkowo, komórki o morfologii epitelialnej częściej pochodziły z raka surowiczego (83%) w porównaniu z komórkami okrągłymi (33%) i wrzecionowatymi (56%). Typ morfologiczny korelował również z leczeniem związkami platyny: 10 na 14 pacjentek, od których pochodziły komórki typu epitelialnego, otrzymywało wcześniej chemioterapię opartą na związkach platyny [30]. Wyprowadzona przez autorów linia OVPA8 wykazuje morfologię epitelialną i ma cechy przypisywane temu typowi morfologicznemu: pochodzi z płynu wysiękowego od chorej z surowiczym rakiem jajnika, która była wcześniej leczona pochodnymi platyny [19].

### Modele komórkowe niskozróżnicowanego raka surowiczego jajnika

Jak wynika z wcześniej przytoczonych danych, dużą część badań nad rakiem jajnika wykonano na liniach komórkowych, które nie odpowiadają HGSO. Wynika

to z dwóch przyczyn — po pierwsze, do niedawna nie było wiedzy na temat fundamentalnych różnic pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi raka jajnika, po drugie zaś, brakuje dobrze zdefiniowanych modeli komórkowych HGSOE. Prawdopodobnie nie bez znaczenia są też aspekty praktyczne: chętniej wybierane są linie komórkowe, które cechują się niskimi wymaganiami hodowlanymi, krótkim cyklem podziałowym, dobrym wzrostem guzów po zaszczerpieniu *in vivo* itp. To może częściowo tłumaczyć ogromną popularność linii SKOV3.

Według Domcke i wsp. najlepszymi modelami HGSOE są stosunkowo mało znane komórki KURAMOCHI i OVSAHO [29]. Te dwie linie oraz JHOS4 (również rekomendowana przez Domcke) były obszernie testowane przez Kevina Eliasa i wsp. [38], którzy potwierdzili cechy HGSOE. Okazało się jednak, że komórki tych linii cechują się pewnymi ograniczeniami, takimi jak słaby wzrost w myszach z niedoborem odporności (SCID, *severe combined immunodeficiency*), obserwowany szczególnie w przypadku linii JHOS4 [38].

Jak wspomniano wcześniej, Ince i wsp. opracowali medium hodowlane OCMI, które umożliwia wydajne wyprowadzanie linii komórkowych raka jajnika. Stosując OCMI, wyprowadzono pięć nowych linii komórkowych: OCI-P5x, OCI-U1a, OCI-P8p, OCI-P2a i FCI-P2p od chorych z potwierdzonym HGSOE [20]. Linie te są udostępniane przez *Sylvester Comprehensive Center Life Tumor Culture Core* w *UM Miller School of Medicine* w Miami. Są już pierwsze publikacje, w których wykorzystano te linie [39, 40], wciąż jednak nie ma prac bezpośrednio poświęconych HGSOE.

Wyprowadzona niedawno przez zespół autorów linia OVPA8 jest kolejnym modelem HGSOE, który zostanie wkrótce udostępniony poprzez ECACC. Linia ta ma ważne zalety praktyczne: stosunkowo szybki wzrost (czas podwojenia — 44 godziny) i odporność na niekorzystne warunki hodowli, takie jak wysoka konfluencja czy zużyte podłoże [19].

### Modele do badania podłoża oporności na chemioterapię

W leczeniu zaawansowanego raka jajnika ważną rolę odgrywa chemioterapia. W większości przypadków odpowiedź na leczenie jest bardzo dobra; pierwotna chemiooporność guza jest zjawiskiem rzadkim. Problem stanowi natomiast oporność pojawiająca się w przypadku nawrotów choroby.

Do badań nad molekularnym podłożem nabytej chemiooporności wykorzystuje się linie komórkowe, które cechują się zróżnicowaną wrażliwością na leki cytotoksyczne. Wiele linii komórkowych pochodzących z płynu otrzewnowego od pacjentek z wodobrzuszem wykazuje oporność na związki platyny i inne leki. W tym czasie nastąpiła selekcja klonalna i przetrwały wyłącznie

komórki tolerujące wysokie stężenie leków. Przykładem są odporne na cisplatinę komórki KURAMOCHI czy OVPA8, w przypadku których IC50 dla cisplatin wynosi 16,23  $\mu\text{M}$  [19].

Linie wyprowadzone z guzów pierwotnych zwykle wykazują wrażliwość na związki cytotoksyczne i mogą być wykorzystane do otrzymania wariantu komórkowego opornego na badany lek. Przykładem są komórki A2780 pobrane z guza przed rozpoczęciem chemioterapii. Komórki tej linii są wrażliwe na cisplatinę i paklitaksel. Wyprowadzono jednak liczne warianty, które cechują się opornością na te i inne leki, np. topotekan, doksorubicynę czy auranofinę. Również linia IGROV1 pochodzi od pacjentki nieleczzonej i jest wrażliwa na cisplatinę oraz ma liczne, stworzone w laboratoriach warianty odporne na różne leki. Linia SKOV3 pochodzi od chorej, która była leczona za pomocą tiotepy, i komórki te wykazują wrażliwość na pochodne platyny. Na potrzeby badań wyprowadzono liczne warianty komórkowe odporne na cisplatinę, karboplatinę, etopozyd, paklitaksel, winblastynę czy winkrystynę (tab. 3).

Klasyczne mechanizmy chemiooporności obejmują usuwanie leku przez transportery ABC, detoksyfikację z udziałem glutationu, nasilenie sygnalizacji proprzeżyciowej, wydajną naprawę uszkodzeń DNA i zahamowanie apoptozy w komórkach nowotworowych. Nowsze badania wskazują, że w raku jajnika występuje wiele bardziej złożonych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój chemiooporności. Wśród istotnych czynników wymienia się obecność fibroblastów związanych z rakiem (CAF, *cancer associated fibroblasts*) [68, 69], zmiany składu białkowego macierzy zewnątrzkomórkowej [70, 71], zjawisko przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) [72], obecność komórek macierzystych [73], a także mechanizmy epigenetyczne [74–76]. Wrażliwość na chemioterapię i rokowanie mogą być także związane z określonym profilem ekspresji genów w guzie, chociaż wyniki badań genomicznych nie są spójne [77–79].

### Nowotworowe komórki macierzyste

Teoria nowotworowych komórek macierzystych (CSLC, *cancer stem-like cells*) zakłada istnienie swoistej populacji komórek cechujących się zdolnością samooodnowy oraz różnicowania w kierunku wszystkich populacji komórkowych guza. Komórki te mają zwiększony potencjał klonogenny i zdolność tworzenia sferoidów *in vitro* oraz potencjał tworzenia guzów (tumorgenność) *in vivo*. Zgodnie z niektórymi koncepcjami w raku jajnika komórki macierzyste guza są odpowiedzialne zarówno za rozwój guza pierwotnego, jak i śródtrzewnowy rozsiew choroby, jej nawroty i chemiooporność [80, 81].

Próby wyodrębnienia komórek macierzystych raka jajnika z guza lub z hodowli komórkowych bazują na detekcji określonych markerów, ocenie cech funkcjonal-



Tabela 3. Linie komórkowe raka jajnika stosowane do badań nad mechanizmami oporności na leki

Linia wyjściowa	Pochodzenie	Czas pobrania	Chemioterapia	Warianty komórkowe	Odpowiedź na cytostatyki	
					Wrażliwość	Oporność
A2780	T	P	N	A2780 <sup>AF-R</sup> (Landini, 2017) [41]	CP, P	Aura
				A2780 <sup>CP</sup> (Behrens, 1987) [42]; A2780 <sup>CIS</sup> (Masuda, 1988) [43]; A2780 <sup>CR1</sup> , A2780 <sup>CR2</sup> (Januchowski, 2014) [44]; A2780 <sup>C30</sup> , A2780 <sup>C200</sup> , A2780 <sup>CP70</sup> (Sak, 2015) [45]; A2780 <sup>C12</sup> (Sun, 2018) [46]		CP
				A2780 <sup>ADR</sup> (ECACC) [47]; A2780 <sup>DR1</sup> , A2780 <sup>DR2</sup> (Januchowski, 2014) [44]		D
				A2780 <sup>PTX</sup> (Han, 2013) [48]; A2780 <sup>PR1</sup> , A2780 <sup>PR2</sup> (Januchowski, 2014) [44], A2780 <sup>TR</sup> , A2780 <sup>PTX10</sup> (Sak, 2015) [45]		P
				A2780 <sup>W1TR1</sup> , A2780 <sup>W1TR2</sup> (Januchowski, 2014) [44]		Topo
COLO-704	A	R	b.d.	COLO-704 <sup>CDDP1000</sup> (RCCLC) [49]		CP
ES2	T	P	N	ES2 <sup>PR20</sup> (Jazaeri, 2013) [50], ES2 <sup>C12</sup> (Sun, 2018) [46]		CP
				ES2 <sup>TR160</sup> (Ho, 2018) [51]		P
IGROV1	T	P	N	IGROV1 <sup>Pt0.5</sup> , IGROV1 <sup>Pt1</sup> (Perego, 1996) [52], IGROV1 <sup>CP</sup> (Stewart, 2006) [53], IGROV1 <sup>CDDP</sup> (Stordal, 2012) [54]	CP	CP
				IGROV1 <sup>OHp</sup> (Benedetti, 2008) [55]		OP
				IGROV1 <sup>MX3</sup> (Maliepaard, 1999) [56]		MK
				IGROV1 <sup>T8</sup> (Maliepaard, 1999) [56]		Topo
KURAMOCHI	A	R	CP			CP
OAW28 (41M)	A	R	b.d.	41M <sup>cisR</sup> (Judson, 2012) [57]		CP
OAW42	A	R	CP	OAW42 <sup>A</sup> (Redmond, 1993) [58]		CP, D, EP, TP, WB, WK
OV90	A	b.d.	b.d.	OV90 <sup>C-A</sup> , OV90 <sup>C-D</sup> (Sherman-Baust, 2011) [59]		CP
				OV90 <sup>D-6</sup> , OV90 <sup>D-7</sup> (Sherman-Baust, 2011) [59]		D
				OV90 <sup>P-3</sup> , OV90 <sup>P-7</sup> (Sherman-Baust, 2011) [59]		P
OVCAR3	A	R	CF, CP, D	OVCAR3 <sup>DDP</sup> (Liu, 2017) [60]		CP, P
OVCAR4	A	R	CP			CP
PEO1	A	R	CP	PEO1 <sup>CDDP</sup> (Macleod, 2005) [61]		CP
SKOV3	A	R	T	SKOV3 <sup>ip1</sup> (Yu, 1993) [62]		P
				SKOV3 <sup>CDDP-P</sup> (Yan, 2007) [63], SKOV3 <sup>PR25</sup> (Jazaeri, 2013) [50]		CP
				SKOV3 <sup>VP</sup> (Kubota, 1994) [64]		EP
				SKOV3 <sup>CBP</sup> (Li, 2004) [65]		MK
				SKOV3 <sup>Taxol-P</sup> (Yan, 2007) [63], SKOV3 <sup>TR</sup> (Lee, 2015) [66]		P
SK VCR <sup>0.015</sup> , SK VCR <sup>0.1</sup> , SK VCR <sup>0.25</sup> , SK VCR <sup>2.0</sup> (Bradley, 1989) [67]		WK				
OVPA8	A	R	CP, KP, P			P CP

Pochodzenie: A (ascites) — płyn wysiękowy, T (tumor) — guz; czas pobrania: P (primary disease) — choroba pierwotna, R (relapsed disease) — wznowa, b.d. — brak danych; cytostatyki: Aura — auranofina, CF — cyklofosamid, CP — cisplatyna, D — doksorubicyna, EP — etopozyd, KP — karboplatyna, MK — mitoksantron, OP — oksaliplatyna, P — paklitaksel, T — tiotepa, Topo — topotekan, TP — tenopozyd, WB — winblastyna, WK — winkrystyna, N — nietraktowane

nych i potencjału klonogenności oraz tumorogenności. Wśród proponowanych markerów CSLC są białka typowe dla embrionalnych komórek macierzystych, jak NANOG, OCT4, NESTIN, ABCG2 czy BMI-1, oraz markery powierzchniowe CD133, CD117, CD44, CD24, EpCAM. Niektórzy autorzy wskazują aktywność dehydrogenazy aldehydowej ALDH1 jako typową dla CSLC [82]. Inną cechą funkcjonalną przypisywaną CSLC jest aktywność transporterów ABC, która umożliwia usuwanie związków cytotoksycznych i innych substancji. Cechę tę wykorzystuje się do selekcji metodą cytometrii przepływowej (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*). Komórki wydajnie usuwające barwnik Hoechst 33342 tworzą w cytogramie FACS tzw. populację boczną (SP, *side population*). W niektórych badaniach potwierdzono, że komórki SP cechują się większą tumorogennością.

Niestety, żadne dotychczasowe badania nie pozwoliły wyodrębnić wiarygodnego zestawu markerów umożliwiającego izolację komórek macierzystych raka jajnika. Wiele badań wskazuje, że fenotyp tych komórek może być bardzo zmienny. Najczęściej wskazuje się na markery CD133, CD44, CD24 i CD117 w połączeniu z aktywnością ALDH1. Przyjmuje się, że CSLC stanowią niewielki odsetek komórek obecnych w guzie pierwotnym. Jednak — paradoksalnie — ekspresja CD44 czy CD24 bywa obserwowana w bardzo dużym odsetku komórek guza. Może to być efekt plastyczności fenotypowej komórek guza, które podlegają przejściu epithelialno-mezenchymalnemu (EMT) i dalszym przemianom w kierunku fenotypu niezróżnicowanego/macierzystego [83]. Prawdopodobnie nie wszystkie komórki z ekspresją tych markerów mają cechy funkcjonalne CSLC. Wykazano natomiast, że wysoka ekspresja CD133, CD117, CD44 czy CD24 może korelować z niekorzystnymi cechami kliniczno-patologicznymi (jak np. niski stopień zróżnicowania histologicznego, wyższy stopień zaawansowania klinicznego, chemiooporność czy krótszy czas przeżycia).

Teoria komórek macierzystych guza ma istotne implikacje w terapii: wskazuje się, że CSLC potrafią przetrwać chemioterapię i dać początek wznowie. Celowanie w nowotworowe komórki macierzyste może więc stanowić atrakcyjną opcję terapeutyczną [18]. Dla wielu markerów CSLC opracowano już inhibitory, które są obecnie testowane w badaniach przedklinicznych (obszerny przegląd w pracy Klemby i wsp. [81]).

#### Mezenchymalne komórki macierzyste

W wielu nowotworach wykrywa się obecność mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, *mesenchymal stem cells*). W przypadku raka jajnika komórki te pochodzą prawdopodobnie z tłuszczu trzewnego [84, 85].

Zespół Ann Klopp wykazał, że komórki macierzyste trzewnej tkanki tłuszczowej wyizolowane z sieci (*omen-*

*tum*) wpływają stymulująco na komórki raka jajnika w doświadczeniach *in vitro*: stymulują ich proliferację, tempo migracji oraz chemio- i radiooporność [84]. Zespół Ronald J. Buckahnovica zaobserwował, że wyizolowane z guza mezenchymalne komórki macierzyste (CA-MSC, *cancer-associated mesenchymal stem cells*) stymulują proliferację, ekspresję markerów macierzystości i wzrost chemiooporności komórek raka jajnika *in vitro* [86]. W opinii tych badaczy CA-MSC obecne w raku jajnika pochodzą z sieci. Prawidłowe MSC migrują do guza i ulegają przemianom do CA-MSC pod wpływem lokalnego mikrośrodowiska, na które składają się czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe oraz hipoksja. CA-MSC mają zmieniony wzór ekspresji ponad 1000 genów w porównaniu z prawidłowymi MSC z tkanki tłuszczowej. Lan G. Coffman i wsp. wykazali, że dla oddziaływań z komórkami raka kluczowe znaczenie ma pochodzenie MSC. MSC ze szpiku kostnego stymulują proliferację komórek raka piersi, ale nie komórek raka jajnika. Komórki raka jajnika reagują natomiast na stymulację przez MSC z tłuszczu trzewnego (sieci). I odwrotnie — mikrośrodowisko guza piersi powoduje przemianę MSC ze szpiku kostnego w CA-MSC, ale nie wywiera takiego wpływu na MSC z tkanki tłuszczowej. Te zjawiska mogą mieć związek z tkankowo swoistym przerzutowaniem raka piersi do kości, a raka jajnika — do otrzewnej [85]. Być może wyjaśnia to też występujące w literaturze rozbieżności — raz obserwowano stymulujący efekt MSC w stosunku do komórek raka, kiedy indziej zaś — hamujący ([87]). Odmienne efekty mogły być związane z rodzajem użytych MSC.

#### Trójwymiarowe modele komórkowe (3D)

Omówione wcześniej modele *in vitro* dotyczyły hodowli komórek w monowarstwie (2D, *two-dimensional culture*), która jest technicznie wygodniejsza i łatwiejsza, ale bardziej odbiega od warunków fizjologicznych w guzie. Główne ograniczenie tego modelu stanowi brak typowego mikrośrodowiska. Ma to szczególne znaczenie w przypadku testowania nowych leków — dlatego wyniki badań uzyskane w modelu 2D często nie potwierdzają się później w badaniach *in vivo* [88, 89].

Częściowym rozwiązaniem tego problemu są trójwymiarowe modele *in vitro* (3D). Wypełniają one lukę pomiędzy modelami dwuwymiarowej hodowli komórkowej a modelami zwierzęcymi. Modele 3D z jednej strony pozwalają częściowo symulować cechy środowiska *in vivo*, a z drugiej strony oferują większość zalet hodowli tradycyjnej.

Modele 3D są konstruowane przez stworzenie komórkom warunków wzrostu promujących tworzenie tzw. sferoidów (struktur 3D) lub poprzez wszczepianie komórek w trójwymiarowe rusztowania, zbudowane z białek macierzy zewnątrzkomórkowej lub syntetycznych biomateriałów [89, 90].

Janet Lee i wsp. do indukcji formowania sferoidów użyli płytek powlekanych poli-2-hydroksyetylometanolem (poliHEMA), otrzymując hodowle 3D dla 31 różnych linii raka jajnika. Porównanie cech biologicznych i molekularnych komórek w hodowli 2D i 3D oraz w formie ksenoprzeszczepów mysich wykazało, że modele 3D w dużo większym stopniu odzwierciedlały cechy guzów. Komórki w hodowli 3D charakteryzowały się wolniejszą proliferacją i większą chemioopornością. Występowały także różnice w ekspresji wybranych biomarkerów: w modelu 3D obserwowano wyższą ekspresję E-kadheryny i b-kateniny oraz niższą ekspresję wimentyny niż w hodowli 2D. Tylko 30% badanych linii wykazywało ekspresję WT1, CA125 i PAX8, przy czym CA125 i PAX8 miały podwyższoną ekspresję, a WT1 — obniżoną w hodowlach 3D [34].

Victoria Heredia-Soto i wsp. badali sferoidy raka jajnika wytworzone przez komórki 16 różnych linii. Sferoidy o średnicy 400  $\mu\text{m}$  pozwalały uzyskać poziom dyfuzji składników odżywczych i tlenu charakterystyczny dla głębokości guza wynoszącej 100  $\mu\text{m}$ . Testy na tym modelu można było prowadzić nawet przez 14 dni, bez wytworzenia się nadmiernych obszarów martwicy. Testy cytotoksyczności wykazały wyższą tolerancję komórek na traktowanie platyną w modelach 3D niż 2D [91].

Unikalną cechą raka jajnika jest przerzutowanie w formie tzw. wszczepów do otrzewnej i sieci. Sieć stanowi fałd trzewny, bogaty w tłuszcz, który osłania narządy jamy brzusznej. Powierzchnię sieci i otrzewnej pokrywa pojedyncza warstwa komórek mezotelialnych, umieszczonych na błonie podstawnej, zbudowanej z kolagenu typu I i IV, fibronektyny, wiktronektyny i lamininy. Zrąb tkanki zawiera fibroblasty, komórki układu odpornościowego, komórki śródbłonna oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Wszczepy raka jajnika mogą być inicjowane zarówno przez pojedyncze komórki nowotworowe, jak i przez sferyczne agregaty komórkowe o wielkości 30–200  $\mu\text{m}$ , które złuszczyły się z guza pierwotnego. Struktury te krążą w płynie otrzewnowym i mogą ulec adhezji do nabłonka otrzewnej. Dokładny skład oraz cechy funkcjonalne sferoidów raka jajnika w procesie przerzutowania dootrzewnowego nie zostały jeszcze poznane [91].

Maria Barbolina i wsp. opracowali trójwymiarowy model przerzutów dootrzewnowych, w którym komórki raka jajnika hodowano w żelach 3D zbudowanych z kolagenu typu I. Wykazano, że sygnalizacja integryny inicjowana przez wiązanie kolagenu prowadzi do ekspresji czynnika transkrypcyjnego EGR1 (*early growth response 1*), który indukuje ekspresję MT1-MMP (*metallothionein-matrix metalloproteinase*), promując proteolityczną degradację kolagenu i inwazję do otrzewnej [92, 93]. Podobny model został wykorzystany przez Daniellę Loessner i wsp. do badania interakcji pomiędzy komórkami raka jajnika a macierzą zewnątrzkomórkową

oraz mechanizmów oporności na leki. Komórki OV-MZ-6 i SKOV3 były wprowadzane do syntetycznych hydrożeli na bazie glikolu polietylenowego, z możliwością modulowania cech biofizycznych (jak sztywność) i biochemicznych (miejsca wiążące integrynę, stopień aktywności proteazy). Żele te są stabilne nawet przez 28 dni, co umożliwia prowadzenie dłuższych eksperymentów. Wykazano, że proliferacja komórek w środowisku 3D była zależna od proteolitycznej przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki raka jajnika w hodowli 3D wykazywały wyższą przeżywalność po traktowaniu paklitaksemem niż komórki w hodowli 2D [94].

Taru Muranen i wsp. wykorzystali model 3D do analizy mechanizmów nabywania oporności przez komórki raka jajnika i raka piersi na leczenie drobnocząsteczkowym inhibitorem ścieżki PI3K/mTOR — BEZ235. Testowano sferoidy utworzone na matrycy rBM (*reconstituted basement membrane*) oraz bez udziału rBM. Komórki zakotwiczone w matrycy rBM były bardziej odporne na BEZ235; komórki pozbawione kontaktu z rBM łatwiej ulegały apoptozie. W komórkach przyłączonych do rBM obserwowano wyższą ekspresję wielu białek sygnałowych warunkujących przeżycie, co może tłumaczyć ich lepszą odpowiedź adaptacyjną i wyższą oporność na inhibitor [95].

Modele hodowli 3D są wykorzystywane również do otrzymywania kultur organotypowych, zawierających mieszane populacje komórek (np. adipocyty, makrofagi, komórki śródbłonna), co lepiej odwzorowuje fizjologię guza. Modele te mogą być tworzone z wykorzystaniem ustalonych linii komórkowych lub komórek pierwotnych [96]. W modelach organotypowych wskazane jest używanie komórek znakowanych, np. fluorescencyjnie. To umożliwia wizualizację, a także odseparowanie i badanie czystych populacji komórek, np. pod kątem zmian poziomu ekspresji mRNA, miRNA i/lub określonych białek [90, 96].

Bardzo interesujące obserwacje poczyniono w modelu hodowli mieszanej komórek raka jajnika z pierwotnymi ludzkimi adipocytami zawierającymi znakowane fluorescencyjnie lipidy. W układzie tym zaobserwowano transfer lipidów z adipocytów do komórek nowotworowych, co prowadziło do przyspieszonej proliferacji komórek raka, zarówno *in vitro*, jak i po podaniu myszom. Obecność adipocytów stymulowała również tempo migracji i inwazji komórek nowotworowych. Te wyniki sugerują, że kwasy tłuszczowe dostarczane przez adipocyty mogą stanowić źródło energii dla komórek raka jajnika [97]. W opinii autorów to zjawisko może także mieć związek z obserwacjami wskazującymi na gorsze rokowanie w raku jajnika u kobiet z otyłością [98].

Podjęto też próbę stworzenia modelu 3D odwzorowującego kancerogenezę komórek nabłonka jajowodu. Badania Kate Lawrenson i wsp. opierały się na modelu sferoidów z pierwotnych ludzkich komórek FTSEC (*fallopian tube secretory epithelial cells*), wyizolowanych

z jajowodów bezpośrednio po zabiegu chirurgicznym. Formowanie sferoidów indukowano poprzez posiew FTSEC na podłożach powleczonych poliHEMA. Sferoidy składały się z cylindrycznej warstwy komórek nabłonkowych otaczających rdzeń hialinowy, przypominający macierz zewnątrzkomórkową nabłonka jajowodu. Sferoidy utrzymywały się w hodowli przez 30–60 dni. Analiza profilu ekspresji genów ujawniła zmiany w ekspresji ponad 1000 genów w komórkach hodowanych w modelu 3D w porównaniu z hodowlą klasyczną. Były to głównie geny zaangażowane w proces replikacji DNA i kontrole cyklu komórkowego [99]. Stosując podobną technikę, zespół ten otrzymał model 3D unieśmiertnionych, transformowanych pierwotnych komórek nabłonka pokrywającego jajnik. Opisane modele nadają się do badania mechanizmów kancerogenezy i pochodzenia HGSOE, a także do badań przesiewowych potencjalnych nowych leków [96].

Systemy hodowli 3D, chociaż technicznie bardziej skomplikowane, zyskują coraz większe znaczenie, gdyż pozwalają uzyskać warunki bardziej zbliżone do rzeczywistych. Wyniki eksperymentów prowadzonych równocześnie w hodowlach 2D i 3D potwierdzają dużo lepsze odwzorowanie biologii raka jajnika w hodowlach trójwymiarowych. Ograniczeniami modelu 3D pozostają brak funkcjonalnego unaczynienia oraz brak komórek pośredniczących w adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej [88]. Inne ograniczenia obejmują małą dostępność komórek pierwotnych i krótką żywotność hodowli 3D [96].

## Wnioski

Linie komórkowe raka jajnika są wygodnym modelem do badań *in vitro*. Hodowla komórkowa jest stosunkowo tania i prosta, cechy molekularne komórek nowotworowych w hodowli dość wiernie odwzorują wyjściowy profil guza. Przy wykorzystaniu stabilnych linii komórkowych powtarzalność modelu pomiędzy różnymi laboratoriami i poszczególnymi eksperymentami jest stosunkowo duża.

Do ograniczeń modelu komórkowego należą brak typowej histologii tkanek, brak funkcjonalnego unaczynienia oraz komórek pośredniczących w adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej, a także brak sygnalizacji dokrewnej, parakrynej i nerwowej oraz gradientów różnych substancji występujących w organizmie żywym.

Częściowym rozwiązaniem powyższych problemów są hodowla trójwymiarowa (3D) w obecności białek macierzy zewnątrzkomórkowej lub biopodobnych polimerów oraz hodowle mieszane komórek nowotworowych z innymi elementami komórkowymi guza (hodowla organotypowa).

Niestety, w przypadku wielu popularnych linii komórkowych raka jajnika problemem jest ich lakoniczna charakterystyka, którą znajdujemy w oryginalnych artykułach opisujących ich wyprowadzenie. Mimo dużych wysiłków czynionych w ostatnich latach nie udało się w pełni zweryfikować pochodzenia histologicznego kilku powszechnie używanych linii komórkowych.

Co więcej, wśród najczęściej stosowanych linii raka jajnika nie ma pewnego modelu HGSOE, jest natomiast jedna linia, która może nawet pochodzić z innego narządu (IGROV1), są dwa modele o niepewnej histologii (ES2 i OAW42) i dwa modele raka surowiczego, ale niekoniecznie niskozróżnicowanego (OVCAR3 i CAOV3). Najczęściej wykorzystywana linia SKOV3 najprawdopodobniej pochodzi z raka jasnokomórkowego, a druga najbardziej popularna A2780 odpowiada rakowi endometrioidalnemu.

Jako najbardziej wiarygodne modele niskozróżnicowanego raka jajnika są obecnie wskazywane dwie niemal nieznanne linie KURAMOCHI i OVSAHO, a także trochę częściej wykorzystywana w badaniach linia OVCAR4 [29]. Ince i wsp. opisują pięć wyprowadzonych przez siebie linii (OCI-P5x, OCI-U1a, OCI-P8p, OCI-P2a i FCI-P2p) jako posiadające fenotyp HGSOE [20], jednak linie te do tej pory niemal nie były wykorzystywane w nauce. Również linia OVPA8 wyprowadzona przez zespół autorów pochodzi od pacjentki z histologicznie potwierdzonym HGSOE i wszystkie badania molekularne i genetyczne przeprowadzone przez autorów potwierdzają ten fenotyp. Linia ta zostanie wkrótce udostępniona przez ECACC.

Przy wyborze modelu do badań nad rakiem jajnika trzeba zwrócić uwagę na jego specyfikę — zarówno zalety, jak i ograniczenia. Nie ma modelu doskonałego ani uniwersalnego — do postawionych sobie celów badawczych należy dobrać najlepszy możliwy model.

## Piśmiennictwo

1. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, et al. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018; 81(1): 17–38, doi: [10.1007/s00280-017-3501-8](https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8), indexed in Pubmed: [29249039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29249039/).
2. Lee JY, Kim S, Kim YT, et al. Changes in ovarian cancer survival during the 20 years before the era of targeted therapy. *BMC Cancer*. 2018; 18: 1–8, doi: [10.1186/s12885-018-4498-z](https://doi.org/10.1186/s12885-018-4498-z), indexed in Pubmed: [29843633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29843633/).
3. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol*. 1999; 72(3): 437–442, doi: [10.1006/gyno.1998.5275](https://doi.org/10.1006/gyno.1998.5275), indexed in Pubmed: [10053122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10053122/).
4. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol*. 2008; 9(12): 1191–1197, doi: [10.1016/S1470-2045\(08\)70308-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70308-5), indexed in Pubmed: [19038766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038766/).
5. Kujawa KA, Lisowska KM. Ovarian cancer — from biology to clinic. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015; 69: 1275–1290, indexed in Pubmed: [26671919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26671919/).
6. Cobb LP, Gaillard S, Wang Y, et al. Adenocarcinoma of Mullerian origin: review of pathogenesis, molecular biology, and emerging treatment paradigms. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2015; 2: 1–16, doi: [10.1186/s40661-015-0008-z](https://doi.org/10.1186/s40661-015-0008-z), indexed in Pubmed: [27231561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27231561/).
7. Shih IM, Kurman R. Ovarian tumorigenesis — A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004; 164(5): 1511–1518, doi: [10.1016/s0002-9440\(10\)63708-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63708-x).



8. Creative Bioarray: Immortalized human fallopian tube secretory epithelial cells (FT33-shp53-R24C). Available online: <https://www.creative-bioarray.com/immortalized-human-fallopian-tube-secretory-epithelial-cells-ft33-shp53-r24c-cat-csc-i92041-item-2114.htm> (accessed on 2019-03-14).
9. Life Line Cell Technology: Fallopian tube epithelial cells. Available online: <https://www.lifelinecelltech.com/shop/tissue-type/reproductive-tissue/fallopian-tube-epithelial-cells-fc-0081/> (accessed on 2019-03-13).
10. ScienCell Research Laboratories: Human Ovarian Surface Epithelial Cells. Available online: <https://www.sciencellonline.com/human-ovarian-surface-epithelial-cells.html> (accessed on 2019-03-14).
11. Applied Biological Materials: Human Primary Ovarian Surface Epithelial Cells. Available online: <https://www.abmgood.com/Human-Primary-Ovarian-Surface-Epithelial-Cells-T4198.html> (accessed on 2019-03-14).
12. Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, et al. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis*. 2009; 30(3): 423–431, doi: [10.1093/carcin/bgp007](https://doi.org/10.1093/carcin/bgp007), indexed in Pubmed: [19126650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19126650/).
13. Gjysli A, Dash S, Cen L, et al. Early transcriptional response of human ovarian and fallopian tube surface epithelial cells to norepinephrine. *Sci Rep*. 2018; 8: 1–11, doi: [10.1038/s41598-018-26670-4](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26670-4), indexed in Pubmed: [29844388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29844388/).
14. Auersperg N, Pan J, Grove BD, et al. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(11): 6249–6254, doi: [10.1073/pnas.96.11.6249](https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6249), indexed in Pubmed: [10339573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10339573/).
15. Li NF, Broad S, Lu YJ, et al. Human ovarian surface epithelial cells immortalized with hTERT maintain functional pRb and p53 expression. *Cell Prolif*. 2007; 40(5): 780–794, doi: [10.1111/j.1365-2184.2007.00462.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00462.x), indexed in Pubmed: [17877616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17877616/).
16. Lawrenson K, Benjamin E, Turmaine M, et al. In vitro three-dimensional modelling of human ovarian surface epithelial cells. *Cell Prolif*. 2009; 42(3): 385–393, doi: [10.1111/j.1365-2184.2009.00604.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00604.x), indexed in Pubmed: [19397591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19397591/).
17. Lee YL, Lee KF, Xu JS, et al. Establishment and characterization of an immortalized human oviductal cell line. *Mol Reprod Dev*. 2001; 59(4): 400–409, doi: [10.1002/mrd.1046](https://doi.org/10.1002/mrd.1046), indexed in Pubmed: [11468776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11468776/).
18. Kuhn ET, Rimondi E, Secchiero P. Current preclinical models of ovarian cancer. *J Carcinog Mutagen*. 2015; 6(2): 1–9, doi: [10.4172/2157-2518.1000220](https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000220).
19. Tudrej P, Olbryt M, Zembala-Nożyńska E, et al. Establishment and characterization of the novel high-grade serous ovarian cancer cell line OVPAB. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(7): 1–26, doi: [10.3390/ijms19072080](https://doi.org/10.3390/ijms19072080), indexed in Pubmed: [30018258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30018258/).
20. Ince TA, Sousa AD, Jones MA, et al. Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nat Commun*. 2015; 6: 1–14, doi: [10.1038/ncomms8419](https://doi.org/10.1038/ncomms8419), indexed in Pubmed: [26080861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26080861/).
21. National Cancer Institute: Cell lines in the in vitro Screen. Available online: [https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/cell\\_list.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm) (accessed on 15.03.2019).
22. Ellison G, Klinowska T, Westwood RFR, et al. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol*. 2002; 55(5): 294–299, doi: [10.1136/mp.55.5.294](https://doi.org/10.1136/mp.55.5.294), indexed in Pubmed: [12354931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12354931/).
23. Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, et al. MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells — a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 104(1): 13–19, doi: [10.1007/s10549-006-9392-8](https://doi.org/10.1007/s10549-006-9392-8), indexed in Pubmed: [17004106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17004106/).
24. Chambers AF. MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer Res*. 2009; 69(13): 5292–5293, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-09-1528](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1528), indexed in Pubmed: [19549886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19549886/).
25. Roschke AV, Tonon G, Gehlhaus KS, et al. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res*. 2003; 63(24): 8634–8647, indexed in Pubmed: [14695175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14695175/).
26. Gartler SM. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature*. 1968; 217(5130): 750–751, doi: [10.1038/217750a0](https://doi.org/10.1038/217750a0), indexed in Pubmed: [5641128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5641128/).
27. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of Hela cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1977; 58(2): 209–214, doi: [10.1093/jnci/58.2.209](https://doi.org/10.1093/jnci/58.2.209), indexed in Pubmed: [833871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/833871/).
28. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, et al. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PLoS One*. 2013; 8(9): e72162, doi: [10.1371/journal.pone.0072162](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072162), indexed in Pubmed: [24023729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24023729/).
29. Domcke S, Sinha R, Levine DA, et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun*. 2013; 4: 1–10, doi: [10.1038/ncomms3126](https://doi.org/10.1038/ncomms3126), indexed in Pubmed: [23839242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23839242/).
30. Beaufort CM, HelmiJR JCA, Piskorz AM, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One*. 2014; 9(9): 1–16, doi: [10.1371/journal.pone.0103988](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103988), indexed in Pubmed: [25230021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25230021/).
31. Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. *Human Tumor Cells in Vitro*. 1975: 115–159, doi: [10.1007/978-1-4757-1647-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1647-4_5).
32. Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Experimental-model systems of ovarian-cancer — applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin Oncol*. 1984; 11(3): 285–298, indexed in Pubmed: [6385258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6385258/).
33. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, et al. Characterization of intra-peritoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther*. 2004; 10(6): 1032–1042, doi: [10.1016/j.ymthe.2004.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.013), indexed in Pubmed: [15564135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15564135/).
34. Lee JM, Mhawech-Fauceglia P, Lee N, et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest*. 2013; 93(5): 528–542, doi: [10.1038/labinvest.2013.41](https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.41), indexed in Pubmed: [23459371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23459371/).
35. Lau DHM, Lewis AD, Ehsan MN, et al. Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian-carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res*. 1991; 51(19): 5181–5187, indexed in Pubmed: [1717140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1717140/).
36. Wilson AP. Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *J Natl Cancer Inst*. 1984; 72(3): 513–521, indexed in Pubmed: [6583437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6583437/).
37. Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(11): 2606–2612, doi: [10.1158/1535-7163.MCT-06-0433](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0433), indexed in Pubmed: [17088437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17088437/).
38. Elias KM, Emori MM, Papp E, et al. Beyond genomics: critical evaluation of cell line utility for ovarian cancer research. *Gynecol Oncol*. 2015; 139(1): 97–103, doi: [10.1016/j.ygyno.2015.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.08.017), indexed in Pubmed: [26321251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26321251/).
39. Hew KE, Miller PC, El-Ashry D, et al. MAPK activation predicts poor outcome and the MEK inhibitor, selumetinib, reverses antiestrogen resistance in ER-positive high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(4): 935–947, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-15-0534](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0534), indexed in Pubmed: [26482043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26482043/).
40. Witt AE, Lee CW, Lee TI, et al. Identification of a cancer stem cell-specific function for the histone deacetylases, HDAC1 and HDAC7, in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2017; 36(12): 1707–1720, doi: [10.1038/onc.2016.337](https://doi.org/10.1038/onc.2016.337), indexed in Pubmed: [27694895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27694895/).
41. Landini I, Lapucci A, Pratesi A, et al. Selection and characterization of a human ovarian cancer cell line resistant to auranofin. *Oncotarget*. 2017; 8(56): 96062–96078, doi: [10.18632/oncotarget.21708](https://doi.org/10.18632/oncotarget.21708), indexed in Pubmed: [29221187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29221187/).
42. Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, et al. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian-cancer cell-line and its use in evaluation of platinum analogs. *Cancer Res*. 1987; 47(2): 414–418, indexed in Pubmed: [3539322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3539322/).
43. Masuda H, Ozols RF, Lai GM, et al. Increased DNA-repair as a mechanism of acquired-resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in human ovarian-cancer cell-lines. *Cancer Res*. 1988; 48(20): 5713–5716, indexed in Pubmed: [3139281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3139281/).
44. Januchowski R, Zawierucha P, Ruciński M, et al. Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomed Pharmacother*. 2014; 68(4): 447–453, doi: [10.1016/j.biopha.2014.02.002](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.02.002), indexed in Pubmed: [24814220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24814220/).
45. Sak K. In vitro cytotoxic activity of flavonoids on human ovarian cancer cell lines. *Cancer Science & Research: Open Access*. 2015; 2(1): 1–13, doi: [10.15226/csroa.2015.00112](https://doi.org/10.15226/csroa.2015.00112).
46. Sun Si, Zhao S, Yang Q, et al. Enhancer of zeste homolog 2 promotes cisplatin resistance by reducing cellular platinum accumulation. *Cancer Sci*. 2018; 109(6): 1853–1864, doi: [10.1111/cas.13599](https://doi.org/10.1111/cas.13599), indexed in Pubmed: [29630768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29630768/).
47. ECACC General Cancer Collection: A2780ADR. Available online: [https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112520&collection=ecacc\\_gc](https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112520&collection=ecacc_gc) (accessed on 2019-03-15).
48. Han X, DU F, Jiang Li, et al. A2780 human ovarian cancer cells with acquired paclitaxel resistance display cancer stem cell properties. *Oncol Lett*. 2013; 6(5): 1295–1298, doi: [10.3892/ol.2013.1568](https://doi.org/10.3892/ol.2013.1568), indexed in Pubmed: [24179511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24179511/).
49. Resistant Cancer Cell Line Collection. Available online: <http://www.wass-michaelislab.org/drug.php?drug=cisplatin> (accessed on 2019-03-15).
50. Jazaeri AA, Shibata E, Park J, et al. Overcoming platinum resistance in preclinical models of ovarian cancer using the neddylation inhibitor MLN4924. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12(10): 1958–1967, doi: [10.1158/1535-7163.MCT-12-1028](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1028), indexed in Pubmed: [23939375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23939375/).

51. Ho CM, Lee FK, Huang SH, et al. Everolimus following 5-aza-2-deoxycytidine is a promising therapy in paclitaxel-resistant clear cell carcinoma of the ovary. *Am J Cancer Res*. 2018; 8(1): 56–69, indexed in Pubmed: [29416920](#).
52. Perego P, Giarola M, Righetti SC, et al. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*. 1996; 56(3): 556–562, indexed in Pubmed: [8564971](#).
53. Stewart JJ, White JT, Yan X, et al. Proteins associated with cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5(3): 433–443, doi: [10.1074/mcp.M500140-MCP200](#), indexed in Pubmed: [16319398](#).
54. Stordal B, Hamon M, McEneaney V, et al. Resistance to paclitaxel in a cisplatin-resistant ovarian cancer cell line is mediated by P-glycoprotein. *PLoS One*. 2012; 7(7): 1–13, doi: [10.1371/journal.pone.0040717](#), indexed in Pubmed: [22792399](#).
55. Benedetti V, Perego P, Beretta GL, et al. Modulation of survival pathways in ovarian carcinoma cell lines resistant to platinum compounds. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7(3): 679–687, doi: [10.1158/1535-7163.MCT-07-0450](#), indexed in Pubmed: [18347153](#).
56. Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, et al. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res*. 1999; 59(18): 4559–4563, indexed in Pubmed: [10493507](#).
57. Judson PL, Al Sawah E, Marchion DC, et al. Characterizing the efficacy of fermented wheat germ extract against ovarian cancer and defining the genomic basis of its activity. *Int J Gynecol Cancer*. 2012; 22(6): 960–967, doi: [10.1097/IGC.0b013e318258509d](#), indexed in Pubmed: [22740002](#).
58. Redmond A, Moran E, Clynes M. Multiple drug resistance in the human ovarian carcinoma cell line OAW42-A. *Eur J Cancer*. 1993; 29A(8): 1078–1081, indexed in Pubmed: [8100138](#).
59. Sherman-Baust CA, Becker KG, Wood lii WH, et al. Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin. *J Ovarian Res*. 2011; 4(1): 1–11, doi: [10.1186/1757-2215-4-21](#), indexed in Pubmed: [22141344](#).
60. Liu Y, Han S, Li Y, et al. MicroRNA-20a contributes to cisplatin-resistance and migration of OVCAR3 ovarian cancer cell line. *Oncol Lett*. 2017; 14(2): 1780–1786, doi: [10.3892/ol.2017.6348](#), indexed in Pubmed: [28789409](#).
61. Macleod K, Mullen P, Sewell J, et al. Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*. 2005; 65(15): 6789–6800, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-04-2684](#), indexed in Pubmed: [16061661](#).
62. Yu DH, Wolf JK, Scanlon M, et al. Enhanced C-ErbB-2/Neu expression in human ovarian-cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1a. *Cancer Res*. 1993; 53(4): 891–898, indexed in Pubmed: [8094034](#).
63. Yan XD, Li M, Yuan Y, et al. Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and taxol by two different administrations. *Oncol Rep*. 2007; 17(5): 1163–1169, indexed in Pubmed: [17390060](#).
64. Kubota N, Nishio K, Takeda Y, et al. Characterization of an etoposide-resistant human ovarian cancer cell line. *Cancer Chemoth Pharm*. 1994; 34(3): 183–190, doi: [10.1007/s002800050126](#).
65. Li L, Luan YZ, Wang GD, et al. Development and characterization of five cell models for chemoresistance studies of human ovarian carcinoma. *Int J Mol Med*. 2004; 14(2): 257–264, indexed in Pubmed: [15254775](#).
66. Lee C. Overexpression of Tyro3 receptor tyrosine kinase leads to the acquisition of taxol resistance in ovarian cancer cells. *Mol Med Rep*. 2015; 12(1): 1485–1492, doi: [10.3892/mmr.2015.3542](#), indexed in Pubmed: [25815442](#).
67. Bradley G, Naik M, Ling V. P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human ovarian-carcinoma cell-lines. *Cancer Res*. 1989; 49(10): 2790–2796, indexed in Pubmed: [2565764](#).
68. Leung CS, Yeung TL, Yip KP, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate endothelial adhesion protein LPP to promote ovarian cancer chemoresistance. *J Clin Invest*. 2018; 128(2): 589–606, doi: [10.1172/JCI95200](#), indexed in Pubmed: [29251630](#).
69. Dasari S, Fang Y, Mitra AK. Cancer associated fibroblasts: naughty neighbors that drive ovarian cancer progression. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(11): 1–18, doi: [10.3390/cancers10110406](#), indexed in Pubmed: [30380628](#).
70. Januchowski R, Zawierucha P, Ruciński M, et al. Microarray-based detection and expression analysis of extracellular matrix proteins in drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2014; 32(5): 1981–1990, doi: [10.3892/or.2014.3468](#), indexed in Pubmed: [25199881](#).
71. Wu YH, Chang TH, Huang YF, et al. COL11A1 confers chemoresistance on ovarian cancer cells through the activation of Akt/c/EBP $\beta$  pathway and PDK1 stabilization. *Oncotarget*. 2015; 6(27): 23748–23763, doi: [10.18632/oncotarget.4250](#), indexed in Pubmed: [26087191](#).
72. Cornelison R, Llaneza DC, Landen CN. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: a mini-review. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10): 1–20, doi: [10.3390/ijms18102171](#), indexed in Pubmed: [29057791](#).
73. Roy L, Cowden Dahl KD. Can stemness and chemoresistance be therapeutically targeted via signaling pathways in ovarian cancer? *Cancers (Basel)*. 2018; 10(8): 1–23, doi: [10.3390/cancers10080241](#), indexed in Pubmed: [30042330](#).
74. Suh D, Kim MK, Kim H, et al. Epigenetic therapies as a promising strategy for overcoming chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Journal of Cancer Prevention*. 2013; 18(3): 227–234, doi: [10.15430/jcp.2013.18.3.227](#).
75. Smith HJ, Straughn JM, Buchsbaum DJ, et al. Epigenetic therapy for the treatment of epithelial ovarian cancer: A clinical review. *Gynecol Oncol Rep*. 2017; 20: 81–86, doi: [10.1016/j.gore.2017.03.007](#), indexed in Pubmed: [28378010](#).
76. Moufarrij S, Dandapani M, Arthofer E, et al. Epigenetic therapy for ovarian cancer: promise and progress. *Clin Epigenetics*. 2019; 11(1): 7, doi: [10.1186/s13148-018-0602-0](#), indexed in Pubmed: [30646939](#).
77. Lisowska KM, Olbryt M, Student S, et al. Unsupervised analysis reveals two molecular subgroups of serous ovarian cancer with distinct gene expression profiles and survival. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016; 142(6): 1239–1252, doi: [10.1007/s00432-016-2147-y](#), indexed in Pubmed: [27028324](#).
78. Lisowska KM, Olbryt M, Dudaladava V, et al. Gene expression analysis in ovarian cancer — faults and hints from DNA microarray study. *Front Oncol*. 2014; 4: 1–11, doi: [10.3389/fonc.2014.00006](#), indexed in Pubmed: [24478986](#).
79. Konecny GE, Winterhoff B, Wang C. Gene-expression signatures in ovarian cancer: Promise and challenges for patient stratification. *Gynecol Oncol*. 2016; 141(2): 379–385, doi: [10.1016/j.ygyno.2016.01.026](#), indexed in Pubmed: [26827964](#).
80. Lupia M, Cavallaro U. Ovarian cancer stem cells: still an elusive entity? *Mol Cancer*. 2017; 16(1): 64, doi: [10.1186/s12943-017-0638-3](#), indexed in Pubmed: [28320418](#).
81. Klemba A, Purzycka-Olewiecka JK, Wcislo G, et al. Surface markers of cancer stem-like cells of ovarian cancer and their clinical relevance. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018; 22(1A): 48–55, doi: [10.5114/wo.2018.73885](#), indexed in Pubmed: [29628794](#).
82. Ottevanger PB. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. *Semin Cancer Biol*. 2017; 44: 67–71, doi: [10.1016/j.semcancer.2017.04.009](#), indexed in Pubmed: [28450177](#).
83. Luo X, Dong Z, Chen Y, et al. Enrichment of ovarian cancer stem-like cells is associated with epithelial to mesenchymal transition through an miRNA-activated AKT pathway. *Cell Prolif*. 2013; 46(4): 436–446, doi: [10.1111/cpr.12038](#), indexed in Pubmed: [23869765](#).
84. Nowicka A, Marini FC, Solley TN, et al. Human omental-derived adipose stem cells increase ovarian cancer proliferation, migration, and chemoresistance. *PLoS One*. 2013; 8(12): e81859, doi: [10.1371/journal.pone.0081859](#), indexed in Pubmed: [24312594](#).
85. Coffman LG, Pearson AT, Frisbie LG, et al. Ovarian Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem Cells Arise from Tissue-Specific Normal Stroma. *Stem Cells*. 2019; 37(2): 257–269, doi: [10.1002/stem.2932](#), indexed in Pubmed: [30353617](#).
86. Coffman LG, Choi YJ, McLean K, et al. Human carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote ovarian cancer chemotherapy resistance via a BMP4/HH signaling loop. *Oncotarget*. 2016; 7(6): 6916–6932, doi: [10.18632/oncotarget.6870](#), indexed in Pubmed: [26755648](#).
87. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, et al. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*. 2011; 29(1): 11–19, doi: [10.1002/stem.559](#), indexed in Pubmed: [21280155](#).
88. Bernardo AD, Thorsteinsdóttir S, Mummery CL. Advantages of the avian model for human ovarian cancer. *Mol Clin Oncol*. 2015; 3(6): 1191–1198, doi: [10.3892/mco.2015.619](#), indexed in Pubmed: [26807219](#).
89. Kitel R, Czarnecka J, Rusin A. Three-dimensional cell cultures. Applications in basic science and biotechnology. *Postepy Biochemii*. 2013; 59(3): 305–314, indexed in Pubmed: [24364213](#).
90. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007; 130(4): 601–610, doi: [10.1016/j.cell.2007.08.006](#), indexed in Pubmed: [17719539](#).
91. Heredia-Soto V, Redondo A, Berjón A, et al. High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical model of disease. *Oncotarget*. 2018; 9(31): 21893–21903, doi: [10.18632/oncotarget.25098](#), indexed in Pubmed: [29774110](#).

92. Barbolina MV, Adley BP, Ariztia EV, et al. Microenvironmental regulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in ovarian carcinoma cells via collagen-induced EGR1 expression. *J Biol Chem.* 2007; 282(7): 4924–4931, doi: [10.1074/jbc.M608428200](https://doi.org/10.1074/jbc.M608428200), indexed in Pubmed: [17158885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17158885/).
93. Barbolina MV, Moss NM, Westfall SD, et al. Microenvironmental regulation of ovarian cancer metastasis. *Cancer Treat Res.* 2009; 149: 319–334, doi: [10.1007/978-0-387-98094-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-0-387-98094-2_15), indexed in Pubmed: [19763443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19763443/).
94. Loessner D, Rizzi SC, Stok KS, et al. A bioengineered 3D ovarian cancer model for the assessment of peptidase-mediated enhancement of spheroid growth and intraperitoneal spread. *Biomaterials.* 2013; 34(30): 7389–7400, doi: [10.1016/j.biomaterials.2013.06.009](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.009), indexed in Pubmed: [23827191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23827191/).
95. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, et al. Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells. *Cancer Cell.* 2012; 21(2): 227–239, doi: [10.1016/j.ccr.2011.12.024](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.024), indexed in Pubmed: [22340595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22340595/).
96. White EA, Kenny HA, Lengyel E. Three-dimensional modeling of ovarian cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 79-80: 184–192, doi: [10.1016/j.addr.2014.07.003](https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.07.003), indexed in Pubmed: [25034878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25034878/).
97. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011; 17(11): 1498–1503, doi: [10.1038/nm.2492](https://doi.org/10.1038/nm.2492), indexed in Pubmed: [22037646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22037646/).
98. Zhang Y, Coletta AM, Allen PK, et al. Perirenal adiposity is associated with lower progression-free survival from ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2018; 28(2): 285–292, doi: [10.1097/IGC.0000000000001165](https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001165), indexed in Pubmed: [29303933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29303933/).
99. Lawrenson K, Notaridou M, Lee N, et al. In vitro three-dimensional modeling of fallopian tube secretory epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 2013; 14: 43, doi: [10.1186/1471-2121-14-43](https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-43), indexed in Pubmed: [24070420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24070420/).