



ARAŞTIRMA

F.U.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2026; 40 (2): 159 - 166
<http://www.fusabil.org>

J:NU Farelerde HEPG2 Kaynaklı Ortotopik Modelleme Zorlukları: Düşük Engraftman Potansiyeline Dair Deneysel Kanıtlar

Engin SÜMER^{1, a}
Fatma DEMİR^{1, b}
Furkan YAŞARYILDIZ^{2, c}
Aysun ÖZBAY ÖNAL^{3, d}
Reyhan BAYRAK^{4, e}
Dilek TELCİ^{2, f}

¹ Yeditepe Üniversitesi,
Deneysel Araştırmalar
Merkezi,
İstanbul, TÜRKİYE

² Yeditepe Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa
Bilimleri Fakültesi,
Genetik ve Biyomühendislik
Bölümü,
İstanbul, TÜRKİYE

³ İstanbul Aydın Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı,
İstanbul, TÜRKİYE

⁴ İstanbul Aydın Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-9228-7963

^b ORCID: 0009-0003-1969-0152

^c ORCID: 0009-0007-8314-6871

^d ORCID: 0000-0003-4904-316X

^e ORCID: 0000-0001-7450-9828

^f ORCID: 0000-0002-2793-6533

Hepatoblastoma (HB), çocukluk çağıının en sık görülen karaciğer malignitesidir. Klinik ilerlemelere rağmen, yüksek riskli hastalarda kötü seyreden prognoz, hastalığı doğru yansıtan prelinik modellerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışma yaygın kullanılan HepG2 hücre hattının, biyoluminesans görüntüleme destekli bir ortotopik fare modelindeki tümör oluşturma kapasitesini ve güvenilirliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Lentiviral yöntemle modifiye edilen HepG2-Luc hücreleri farklı dozlar (2.5-3 milyon) ve Matrijel varlığına göre (+/-) gruplandırılan atimik çıplak farelerin karaciğerine enjekte edilmiştir. Tümör gelişimi 6 hafta boyunca IVIS sistemiyle izlenmiş ve deney sonunda histopatolojik doğrulamalar yapılmıştır. *In vitro* analizler, HepG2-Luc hücrelerinin parental hücrelere göre yaklaşık 3500 kat daha güçlü sinyal ürettiğini doğrulamıştır. Ancak *in vivo* ortamda toplam tümör tutulum sınırlı seviyede kalmıştır. Histopatolojik olarak tümör odağı, 3 milyon (+) grubunun %20'sinde ve 2.5 milyon (-) grubunun %16.7'sinde saptanmıştır. Matrijel kullanımının tutulum üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Bazı deneklerde radyometrik sinyal alınmasına rağmen dokuda kitle bulunamaması, hücrelerin mikro-odaklar halinde dağılması veya peritoneal sızıntı ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar, HepG2 hücrelerinin J:NU farelerinde düşük tümörjenik potansiyele sahip olduğunu literatürde ilk defa göstermektedir. Karaciğer kanseri araştırmaları için Huh-6, Huh 7 veya Hep 3B gibi daha agresif hücre hatlarının veya ileri derece immün yetmezlikli fare modellerinin tercih edilmesi daha verimli bir yaklaşım olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hepatoblastoma, ortotopik fare modeli, bioluminesans görüntüleme, tümörjenisite

Challenges of HEPG2-Derived Orthotopic Modeling in J:NU Mice: Experimental Evidence of Low Engraftment Potential

Hepatoblastoma (HB) is the most common liver malignancy observed in childhood. In spite of the clinical advancements, the poor prognosis in high-risk patients dictates the development of preclinical models that precisely reflect the disease. This study seeks to evaluate the tumorigenic capacity and reliability of the extensively used HepG2 cell line in a bioluminescence imaging-supported orthotopic mouse model. Lentivirally engineered HepG2-Luc cells were injected into the livers of athymic nude mice which were grouped based on cell dosage (2.5–3.0 million) with or without Matrigel (+/-). Tumor development was monitored for 6 weeks using the IVIS system, and histopathological confirmation was performed at the end of the experiment. *In vitro* analyses confirmed that HepG2-Luc cells produced approximately 3500-fold stronger signals than the parental cells. However, overall tumor engraftment remained limited *in vivo*. Histopathological examination identified tumor foci in 20% of the 3 million (+) group and 16.7% of the 2.5 million (-) group. Matrigel supplementation did not significantly affect engraftment rates. In some animals, detectable radiometric signals were recorded despite the absence of a tissue mass, which was attributed to the dispersion of cells as microscopic foci and/or peritoneal leakage. The results demonstrate, for the first time in the literature, that HepG2 cells have low tumorigenic potential in J:NU mice. For liver cancer research, using more aggressive cell lines such as Huh-6, Huh-7, Hep-3B or employing more profoundly immunodeficient mouse strains, may represent a more efficient approach.

Key Words: Hepatoblastoma, orthotopic mouse model, bioluminescence imaging, tumorigenicity

Geliş Tarihi : 07.04.2026
Kabul Tarihi : 28.04.2026

Giriş

Karaciğer kanseri küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmekle beraber görülme sıklığı dünya çapında artmaktadır. Küresel epidemiyolojik veriler incelendiğinde, karaciğer malignitelerinin kansere bağlı ölümler arasında üst sıralarda yer aldığı ve insidansının coğrafi, etiyolojik ve demografik değişkenlere göre ciddi farklılıklar gösterdiği görülmektedir (1). Primer karaciğer kansinimleri, histolojik kökenlerine göre temelde iki ana kategoriye ayrılır. Karaciğer parankimal hücrelerinden türeyen ve küresel olarak en yaygın malignite olan Hepatosellüler Karsinoma (HK) ve safra kanalı epitel hücrelerinden (Kolanjiyositler) türeyen Kolanjiyokarsinoma/İntrahepatik Kolanjiyokarsinoma (2). Bu histolojik ayrım ile beraber Hepatoblastoma (HB) ise pediatrik popülasyonda görülen en yaygın primer karaciğer malignitesidir ve embriyonik kökenli hücrelerden (hepatoblastlar) türemesi nedeniyle kendine özgü bir tümör alt tipidir (3). Hepatoblastom (HB), çocukluk çağı karaciğer malignitelerinin yaklaşık üçte ikisini oluşturan ve embriyonal kökenli

Yazışma Adresi

Engin SÜMER

Yeditepe Üniversitesi,
Deneysel Araştırmalar
Merkezi
İstanbul – TÜRKİYE

vetenginsumer@gmail.com

olmasıyla karakterize edilen nadir fakat klinik açıdan kritik bir neoplazmdır (4). Klinik yönetimdeki ilerlemeler; özellikle sispilin ± doksorubisin içeren neoadjuvan kemoterapinin gecikmiş/definitif cerrahi rezeksiyon (gerektiğinde transplantasyon) ile kombinasyonu sayesinde, risk grubuna bağlı olarak hepatoblastomda genel sağ kalımı yaklaşık %65–95 aralığına yükseltmiştir (5). Ancak bu iyileşme, hasta popülasyonunun tamamına homojen bir şekilde yansımamaktadır. Özellikle tanı anında uzak metastazi olan, vasküler invazyon gösteren veya tedavi sonrası nüks gelişen yüksek riskli hasta grubunda prognoz hala kötüdür ve beş yıllık sağkalım oranları %40 düzeylerinde seyretmektedir (6, 7). Ancak hepatoblastoma araştırmaları, uygun model eksikliği ve mevcut modellerin standardizasyon sorunları nedeniyle yavaş ilerlemektedir. Deney hayvanı modelleri, hepatoblastoma (HB) dahil solid tümörlerde tümör biyolojisi, büyüme kinetiği ve tedavi yanıtının kontrollü koşullarda incelenmesini amaçlar. Özellikle ortotopik yerleşimli modellerin, subkutan modellere kıyasla tümörün doku mikroçevresi ve histopatolojik özelliklerini daha iyi yansıtabilmesi nedeniyle translatasyonel açıdan üstün olabileceği bildirilmektedir (8). Bununla birlikte HB alanında, hastalığın biyolojik heterojenitesini ve metastatik kapasitesini bütünüyle yakalayan modellerin sınırlı olduğu ve bu durumun prelinik sonuçların güvenilirliğini/karşılaştırılabilirliğini etkilediği vurgulanmaktadır. Ortotopik tümörler, subkutan tümörlere kıyasla daha yüksek vaskülarizasyon gösterir ve klinik tümörlere benzer gen ekspresyon profilleri (örneğin β -katenin, Glypican-3, AFP) sergiler (9). Prelinik hepatoblastoma çalışmalarının temel taşı olan HepG2 hücre hattı, literatürde hem kimliği hem de *in vivo* davranışları açısından önemli tartışmaların odağındadır. Bu tartışmalar, modelin geçerliliğini (validasyonunu) ve elde edilen verilerin yorumlanmasını doğrudan etkilemektedir. HepG2 hücre hattı, 1979 yılında Aden ve ark. (10) tarafından tanımlanmış ve köken aldığı karaciğer tümörü uzun yıllar hepatosellüler karsinom olarak raporlanmıştır. Daha sonra yapılan histopatolojik yeniden inceleme ve genetik/moleküler karakterizasyon (örn. HB ile uyumlu kromozomal anomaliler, CTNNB1/ β -katenin exon 3 delesyonu ve Wnt/ β -katenin aktivasyonu) bulguları, HepG2'nin hepatoblastom kökeni ile daha uyumlu olduğunu göstermiştir (11).

HepG2'nin metabolik profilinin HCC ile örtüşüğünü ve Hepatoblastoma türevi yerine Hepatosellüler Karsinom olarak sınıflandırılmaya devam edilmesi gerektiğini savunan çalışmalar mevcuttur (12, 13). Bu çalışma, HepG2 hücrelerinin ortotopik karaciğer tümörü oluşturmadaki tümör başlatma kapasitesinin ve tekrarlanabilirliğinin sınırlı olduğu yönündeki literatür bulgularını dikkate alarak, HepG2'nin prelinik hepatoblastoma araştırmalarında kullanılabilir bir ortotopik model sağlayıp sağlamadığını değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu kapsamda HepG2'nin uygunluğu; (i) *in vivo* büyüme dinamiği ve görüntüleme ile izlenebilirlik, (ii) tümör dokusunun histopatolojik ve immünohistopatolojik doğrulanması ve (iii) aynı koşullarda uygulanan teknik/biyolojik iyileştirmelerin (örneğin; ECM desteği, hücre dozu) tutulum üzerindeki etkisi üzerinden analiz edilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Bu çalışma için Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2025-28 protokol numarasıyla etik onay alınmıştır.

Hücre Kültürü: Çalışmada kullanılan insan hepatoblastoma hücre hattı HepG2, American Type Culture Collection'dan (ATCC, Manassas, VA, ABD; Katalog No: HB-8065) temin edilmiştir. Hücreler, yüksek glikoz (4.5 g/L) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde kültüre edilmiştir. Besiyeri, hücre proliferasyonunu ve canlılığını desteklemek amacıyla %10 fetal siğir serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi ile desteklenmiştir. Hücrelerin inkübasyonu 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir ortamda gerçekleştirilmiştir.

Lusiferaz Genini İfade Eden Stabil HepG2 Hattının Oluşturulması: Tümör gelişiminin *in vivo* ortamda boyamsal olarak izlenebilmesi amacıyla HepG2 hücreleri ateş böceği lusiferazı ifade edecek şekilde genetik olarak modifiye edilmiştir. Hücreler Lenti-luciferase-P2A-Neo (Addgene, plazmid no: 105621) plazmidini taşıyan lentiviral partiküller ile enfekte edilmiştir. Viral enfeksiyonun ardından plazmidi başarıyla genomuna entegre eden stabil hücrelerin seçimi için besiyerine 1 mg/mL konsantrasyonunda G418 Sülfat seçici antibiyotiği eklenmiştir. Seleksiyon sonrası elde edilen stabil hücre hattında lusiferaz aktivitesi, Luciferase Assay System (Promega, ABD; Kat. No: E1500) kullanılarak *in vitro* ortamda doğrulanmıştır.

Ortotopik Ksenograft Farelerin Oluşturulması: Bu çalışmada, 6 ila 8 haftalık outbred atimik çıplak erkek fareler (J:NU, #007850, The Jackson Laboratory, ABD) kullanılmıştır. Lusiferaz eksprese eden HepG2 hücreleri farelerin karaciğerlerine ortotopik olarak enjekte edilmiştir. Çalışma kapsamında farklı hücre dozlarının ve matrijel varlığının tümör indüksiyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla beş ana grup oluşturulmuştur. Deney, başlangıç aşaması ve bir hafta sonra eklenen Telifi Grubu olmak üzere iki aşamada sürdürülmüştür (Tablo 1). Hücreler, belirtilen dozlarda (2.5 ya da 3 milyon) toplam 30 μ L hacimde PBS veya PBS-Matrijel karışımı içerisinde hazırlanmış ve cerrahi operasyonla doğrudan farelerin karaciğerinin sol lobuna enjekte edilmiştir.

Tablo 1. Grupların dağılımı ve kullanılan fare sayıları

Grup Kodu	Hücre Dozu (x10 ⁶)	Matrijel	İlk Grup (n)	Telifi Grubu (n)	Toplam (n)
M+ 2.5	2.5	Var	5	1	6
M- 2.5	2.5	Yok	2	4	6
M+ 3.0	3.0	Var	4	1	5
M- 3.0	3.0	Yok	3	2	5
Kontrol (Hücre içermeyen PBS-Matrijel)	0	Var	5	1	6

İmplant Edilen Hücrelerin Takibi: İmplant edilen lusiferaz ifade eden HepG2 hücrelerinin karaciğerdeki yerleşimi, canlılığı ve proliferasyonu, IVIS (In Vivo Imaging System) sistemi ile enjeksiyondan 3 hafta sonra başlanarak 6 hafta boyunca haftalık olarak takip edilmiştir. Biyoluminesans sinyallerinin tespiti sırasında emisyon filtresi açık ve eksitasyon filtresi bloklanmış konumda tutulmuştur. Görüntüleme hassasiyetini optimize etmek amacıyla binning değeri 8 (High Sensitivity - HS), görüş alanı (Field of View - FOV) 10 ve diyafram açıklığı f/1 olarak sabitlenmiştir. Her bir görüntüleme seansında sinyal kaydı 60 saniyelik pozlama süresi ile gerçekleştirilmiştir. Sinyal doygunluğunu önlemek ve verilerin doğruluğunu korumak için tüm ölçümlerde bu parametreler korunmuştur. Görüntülerin elde edilme sürecinde Andor iKon (IS1629N7008) kamera sistemi kullanılmıştır. Veri toplama, görselleştirme ve kümülatif analiz işlemleri Living Image (Sürüm 4.8.2) yazılımı aracılığıyla yürütülmüştür. Görüntüleme öncesinde her fareye 150 mg/kg dozunda D-Luciferin substratı intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 15 dakika sonra %2 izofloran gazı ile anestezi altında çekimler yapılmıştır.

Histopatolojik Değerlendirme: Deney hayvanlarının sakrifikasyonunu takiben elde edilen karaciğer doku örnekleri yapısal bütünlüğün korunması amacıyla %10 nötral tıkonlu formalin solüsyonunda fiks edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrasında dokular standart histolojik doku takip protokollerine uygun olarak artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Ardından ksilen ile şeffaflandırma işlemi uygulanmış ve parafin ile infiltrasyonun ardından parafin bloklar haline getirilmiştir. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Kesitler, genel doku morfolojisinin ve tümör odaklarının değerlendirilmesi amacıyla hematoksin-eozin (H&E) yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

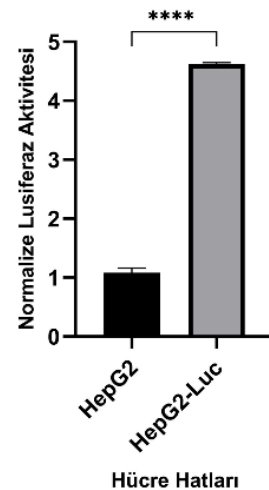
Örneklem Büyüklüğünün Belirlenmesi ve İstatistik Analiz: Bu çalışmada, hücre dozu ve matrisel varlığının ana ve kombinasyon etkilerini istatistiksel olarak test etmek üzere 2x2 faktöriyel tasarım kurgulanmıştır. Örneklem büyüklüğü 3R ilkeleri gözetilerek hayvan sayısını minimize etmek amacıyla taşıyıcı kontrol grubu dahil toplam 5 gruptan oluşan deney planı için GPower yazılımında (3.1.9.4), ana etkilerin ve faktörler arası etkileşimlerin değerlendirildiği sabit etkili Varyans Analizi (ANOVA) temel alınarak A priori güç analizi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel gücün en az %80 (Power=0.80) ve $\alpha=0.05$ anlamlılık düzeyinde olduğu, büyük bir etki büyüklüğü ($\eta^2=0.24$) hedeflenerek hesaplanan toplam 28 adet farenin bu tasarım için yeterli olacağı saptanmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen sayısal verilerin analizi ve görselleştirilmesi GraphPad Prism (Deneme Sürümü 10.6.1.892) ile R istatistiksel yazılım ortamında (v4.5.1) tidyverse paket ailesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (14, 15). *In vitro* lusiferaz aktivite verileri, teknik varyasyonları ortadan kaldırmak amacıyla modifiye edilmemiş kontrol grubu (HepG2) ortalamasına normalize edilmiştir. Normalize edilen veriler, biyolojik sinyallerin geniş dinamik aralığını stabilize etmek ve

varyans homojenliğini sağlamak amacıyla $y=\text{Log}(Y)$ formülü ile logaritmik olarak transforme edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile, varyansların homojenliği (eşitliği) ise F-testi ile kontrol edilmiştir. İki grup arasındaki farklar, transforme edilmiş veriler üzerinden Bağımsız Örneklem t-testi (iki kuyruklu) kullanılarak analiz edilmiştir. IVIS görüntüleme sisteminden elde edilen toplam sayım değerleri 6 haftalık ölçüm süresince sabit tutulan 60 saniyelik pozlama süresine bölünerek hesaplanmıştır. Her ölçüm noktasında kontrol grubuna ait arka plan sinyalleri çıkarılmıştır. Her bir deneyin 6 haftalık kümülatif biyoluminesans yükünü belirlemek amacıyla, zaman-sinyal grafiği üzerinden Eğri Altında Kalan Alan (EAA/AUC) değerleri trapezoidal yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm analizlerde $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler grafiklerde ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir.

Bulgular

Lusiferaz Ekspres Edilen HepG2 Hücre Hattının *In Vitro* Karakterizasyonu: *In vivo* ortotopik modelin başarısı enjekte edilen tümör hücrelerinin izlenebilir düzeyde ve stabil biyoluminesans sinyali üretmesine bağlıdır. Bu amaçla lentiviral transdüksiyon ve G418 seleksiyonu sonrası elde edilen HepG2-Luc hücrelerinin lusiferaz enzim aktivitesi modifiye edilmemiş parental HepG2 hücreleri (kontrol grubu) ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda, HepG2-Luc hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla ~3.5 log birimi (yaklaşık 3500 kat) daha yüksek biyoluminesans aktivitesi sergilediği saptanmıştır (Şekil 1). Bağımsız örneklem t-testi ile yapılan değerlendirmede iki grup arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=6.407 \times 10^{-7}$). Bu bulgular oluşturulan stabil hücre hattının *in vivo* boyamsal takip çalışmaları için yeterli ve güçlü bir sinyal kapasitesine sahip olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 1. Stabil HepG2-Luc hücre hattının *in vitro* lusiferaz aktivitesinin doğrulanması. Grafik, parental HepG2 (kontrol) ve lusiferaz ile transdükte edilmiş HepG2-Luc hücrelerinin normalize edilmiş ve Log10 dönüştürülmüş biyoluminesans sinyallerini göstermektedir.

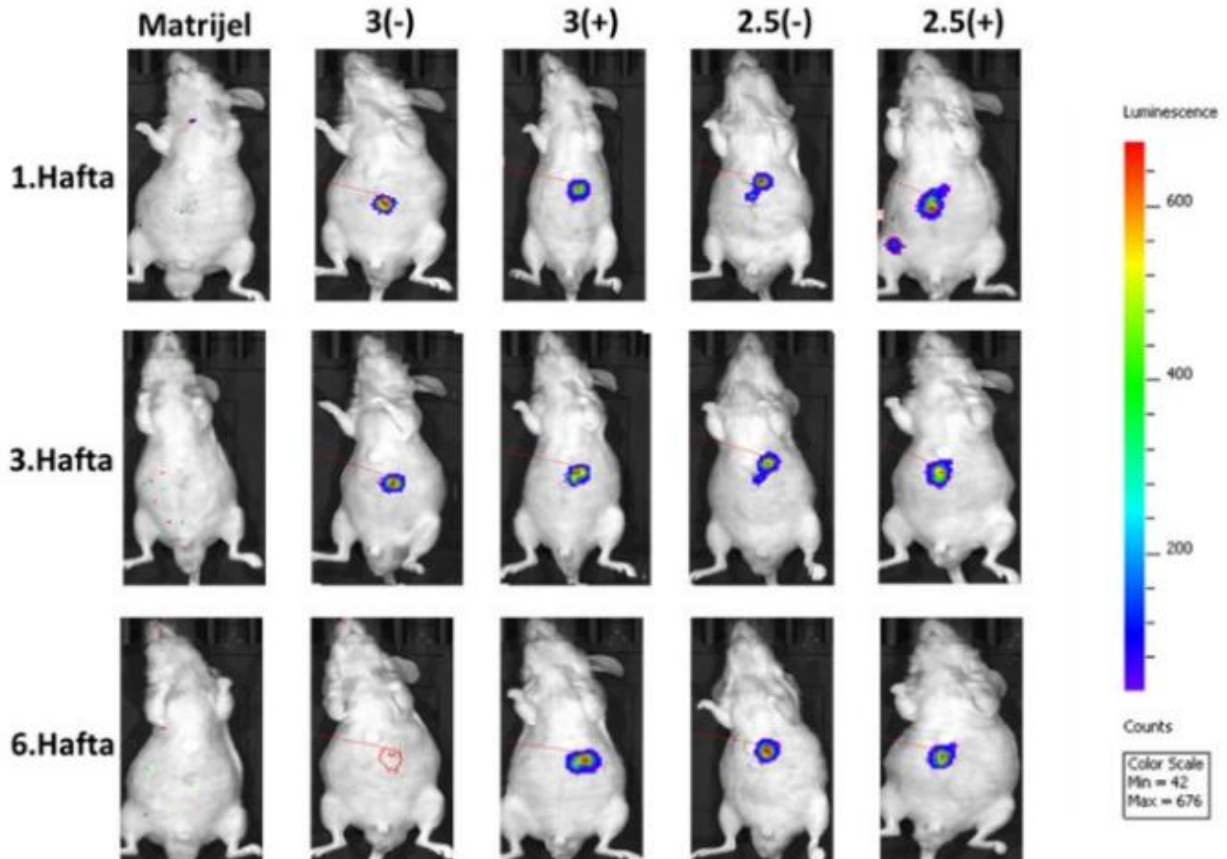
Boylamsal Biyoluminesans Sinyal Kinetiği ve Heterojen Tümör Gelişiminin Değerlendirilmesi:

Ortotopik HepG2 enjeksiyonu yapılan farelerde tümör gelişimi hücrelerin enjeksiyonunun 3 hafta sonrasında başlanarak 6 hafta boyunca haftalık olarak IVIS görüntüleme sistemi ile takip edilmiştir. Her bir deney grubundan seçilen temsili farelere ait 1, 3 ve 6. haftalardaki boylamsal biyoluminesans görüntüleri Şekil 2'de sunulmuştur. IVIS görüntüleme sisteminden elde edilen veriler, İlgi Alanı (ROI) ölçümleri ile sayısal hale getirilerek her bir deneğin 6 haftalık sinyal yörüngesi/gidişatı analiz edilmiştir. Farklı hücre dozları ve matrijel varlığının sinyal kinetiği üzerindeki etkileri incelendiğinde, gruplar arasında heterojen bir dağılım gözlemlenmiştir (Şekil 3).

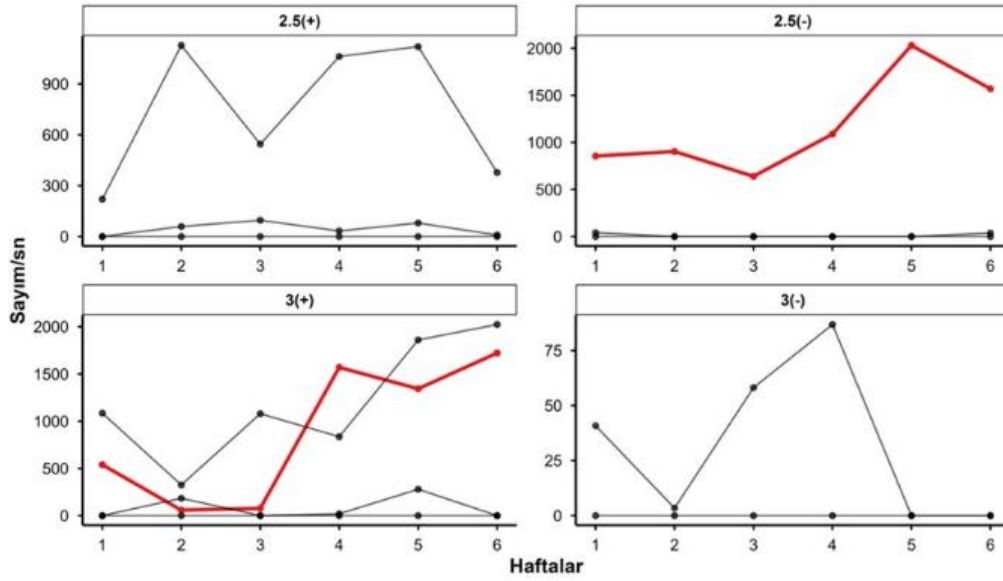
3(+) grubunda 2 farenin (kırmızı hat) sinyal şiddetinin 2. haftadan itibaren istikrarlı bir artış gösterdiği ve 6. haftada pik seviyeye ulaştığı belirlenmiş olup tümörün varlığı yalnızca kırmızı ile gösterilen tek bir farede histopatolojik değerlendirmeler sonucunda doğrulanabilmektedir. 2.5(-) grubunda da benzer şekilde bir farenin (kırmızı hat) sinyal seviyesinin diğer grup üyelerinden belirgin şekilde ayrılarak 5. haftada maksimum seviyeye (2000+sayım/sn) ulaştığı saptanmıştır. Yine histolojik değerlendirmeler ışığında

2.5(-) grubunda yalnızca bir farede tümör tespit edilebilmiştir. Diğer gruplardaki farelerin büyük çoğunluğunda sinyal şiddetinin zamanla bazal seviyeye indiği veya spesifik olmayan düşük genlikli dalgalanmalar sergilediği görülmüştür. Sinyal artışı gözlenen kırmızı ile işaretli bu iki fare, aynı zamanda doku kesitlerinde tümör odağı saptanan farelerdir.

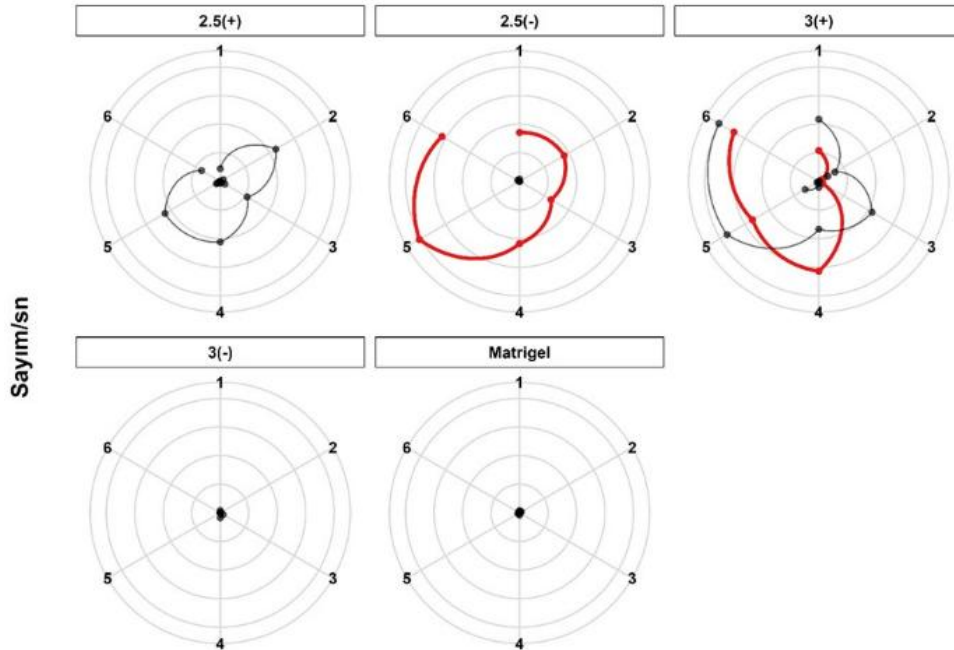
Biyoluminesans sinyalinin zaman içerisindeki değişim kinetiğini ve büyüklüğünü eş zamanlı değerlendirmek amacıyla veriler polar koordinat sisteminde görselleştirilmiştir (Şekil 4). Bu gösterimde, grafiklerin merkezi "0" sinyal noktasını (sinyalin yokluğu), dış çeperler ise artan sinyal yoğunluğunu temsil etmektedir. Zaman değişkeni (1.-6. Haftalar) ise dairesel ekseninde saat yönünde ilerlemektedir. 3(+) ve 2.5(-) gruplarında histopatolojik olarak doğrulanmış tümörlü farelere ait sinyal yörüngelerinin (kırmızı çizgiler), haftalar ilerledikçe merkezden dışarıya doğru genişleyen bir spiral çizdiği görülmektedir. Bu dışa açılma hareketi, tümör yükünün kümülatif artışını görsel olarak doğrulamaktadır. Buna karşın tümör gelişiminin gözlenmediği diğer farelerde sinyal yörüngeleri merkeze (orijin noktasına) çakılı kalmış veya merkeze yakın dar bir alanda sınırlı dalgalanmalar göstermiştir.



Şekil 2. Farklı deney gruplarındaki ortotopik tümör gelişiminin *in vivo* biyoluminesans görüntüleme (IVIS) ile takibi. Panelde, her bir deney grubunu ve 6 haftalık ölçüm sürecinin başını, ortasını ve sonunu temsil eden boylamsal görüntüler yer almaktadır. Görüntüler karaciğer bölgesindeki lusiferaz aktivitesini yansıtan biyoluminesans sinyallerini göstermektedir. Renk skalası foton sayısını ifade etmektedir. Kırmızı renk yüksek sinyal yoğunluğunu, mavi renk ise düşük sinyal yoğunluğunu belirtmektedir.



Şekil 3. Deney gruplarındaki bireysel farelerin 6 haftalık biyoluminesans sinyal değişimleri. Grafikler, dört farklı deney grubundaki her bir farenin "Haftalar" (X-ekseni) boyunca ölçülen biyoluminesans sinyal şiddetini (Y-ekseni, Sayım/sn) göstermektedir. Kırmızı çizgiler zamanla sinyal şiddeti artan ve tümör gelişiminin sürdüğü patoloji ile doğrulanan başarılı modelleri temsil etmektedir. Siyah çizgiler sinyalin zamanla kaybolduğu (regresyon) veya hiç oluşmadığı fareleri temsil eder. Düşük sinyal değişimlerinin görülebilmesi amacıyla Y-ekseni ölçekleri her grup için verinin aralığına göre (bağımsız olarak) ayarlanmıştır. 6 haftalık ölçüm boyunca sayım/sn değeri 0 olan farelerin hepsi gösterim kolaylığı açısından tek bir çizgi ile sunulmuştur.



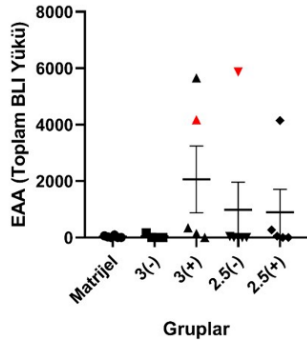
Şekil 4. Biyoluminesans sinyal yoğunluğunun zamana bağlı değişimini gösteren polar (radar) grafikler. Her bir deney grubu için oluşturulan grafiklerde dairesel eksen (1-6 arası numaralar) implantasyon sonrası haftaları; radyal eksen (merkezden dışa doğru) ise ölçülen sinyal şiddetini (Sayım/sn) temsil etmektedir.

Eğri Altında Kalan Alan (EAA/AUC) Analizi ile Kümülatif Tümör Yükünün Karşılaştırılması: Deney süresince (1-6. Haftalar) elde edilen boylamsal biyoluminesans sinyallerinin toplam büyüklüğünü

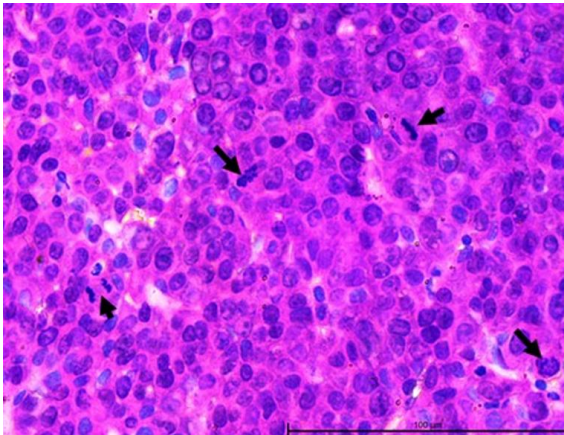
karşılaştırmak amacıyla her bir fare için Eğri Altında Kalan Alan (EAA/AUC) değerleri hesaplanmıştır. Toplam sayım/sn üzerinden yapılan bu hesaplama, anlık ölçümlerden ziyade sürecin bütünündeki toplam tümör

yükünü yansıtmaktadır (Şekil 5). Özellikle 2.5(-) ve 3(+) gruplarında ortalama EAA değerlerinin diğer gruplara göre sayısal olarak daha yüksek olduğu ancak standart hataların büyük olduğu görülmüştür. Bu durum, ilgili gruplarda tümör geliştiren tekil farelerin (yüksek sinyal) ve geliştirmeyen farelerin (sıfır sinyal) bir arada bulunmasından kaynaklanan yüksek heterojeniteyi doğrulamaktadır. 2.5(+) grubunda yüksek EAA değerine sahip tekil bir fare olmakla beraber bu farede tümör tespit edilememiştir.

Histopatolojik Değerlendirme ve Tümör Morfolojisi: Mikroskopik analizler sonucunda 3(+) grubundaki 5 fareden 1'inde (%20) ve 2.5(-) grubundaki 6 fareden 1'inde (%16.7) karaciğer parankimi içerisinde tümör odağı tespit edilmiştir (Tablo 2). Tümör gelişimi saptanan olguların H&E ile boyanan karaciğer kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde; normal karaciğer dokusu içerisinde sınırları seçilebilen, solid tabakalar ve düzensiz adalar oluşturan malign tümöral hücre proliferasyonu izlenmiştir (Şekil 6). Tümör morfolojisi hücrel düzeyde incelendiğinde hücrelerin koyu eozinofilik boyanma gösteren orta genişlikte sitoplazmalara, hiperkromatik pleomorfik nükleuslara ve belirgin nükleollere sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca tümöral alanlarda mitotik aktivitenin arttığı ve yer yer atipik mitozların varlığı dikkat çekmiştir.



Şekil 5. Deney gruplarının kümülatif potansiyel tümör yükünü gösteren EAA (Eğri Altında Kalan Alan) analizi. Grafik, 6 haftalık toplam biyoluminesans sayısının EAA değerlerini göstermektedir. Her bir nokta bireysel bir fareyi temsil etmektedir.



Şekil 6. H&E ile boyanmış karaciğer kesitinde solid paternli malign tümöral alanlar ve artmış mitotik aktivite izlenmektedir. Oklar mitozları göstermektedir.

Tablo 2. Ortotopik HepG2 Enjeksiyonu sonrası histopatolojik olarak doğrulanmış tümör tutulum oranları.

Deney Grubu	Toplam Denek Sayısı (n)*	Tümör Gelişen (n)	Tutulum Oranı (Take Rate)
2.5(+)	6	0	%0
2.5(-)	6	1	%16.7
3(+)	5	1	%20
3(-)	5	0	%0
Kontrol (PBS/Matrijel)	6	0	-
TOPLAM	28	2	%7.1

*Sayılar, ana deney grubu ve 1 hafta sonra eklenen telafi grubu farelerinin toplamını ifade etmektedir.

Tartışma

Bu çalışmanın temel amacı, karaciğer kanseri araştırmalarında yeni terapötik ajanların etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılabilecek biyoluminesans görüntüleme teknolojisi ile boyamsal olarak takip edilebilen bir ortotopik HepG2 hepatoblastoma modelinin oluşturulabilirliğini değerlendirmektir. *In vitro* aşamada, lentiviral transdüksiyon ile geliştirilen HepG2-Luc hücre hattının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (~3.5 log birimi artış) ve stabil bir lüminesans sinyali ürettiği doğrulanmıştır ($p=6.407 \times 10^{-7}$).

Çalışmanın *in vivo* görüntüleme aşamasında, özellikle 2.5(+) ve 3(+) gruplarındaki bazı farelerde belirli zaman noktalarında lüminesans sinyali tespit edilmesine rağmen deneyin sonlandırılmasının ardından yapılan histopatolojik incelemelerde tümör dokusuna rastlanmamıştır. Radyometrik veriler ile histopatolojik bulgular arasındaki bu uyumsuzluk birkaç temel biyolojik ve teknik faktörle açıklanabilir. İlk olarak, biyoluminesans görüntüleme teknolojisi canlı hücrelerin metabolik aktivitesine dayalı son derece hassas bir yöntemdir ve çok düşük sayıda canlı hücre kümesini dahi tespit edebilir (16). Enjekte edilen hücrelerin solid bir kitle oluşturmak yerine karaciğer parankimi içerisinde mikro-odaklar halinde dağılması veya histolojik kesit düzleminin dışında kalan milimetrik boyutlarda kalması sinyal alınan farelerde dokunun negatif olarak raporlanmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Ya da enjeksiyon hattından batin boşluğuna sızan az sayıdaki hücre periton sıvısı içinde canlılığını koruyarak IVIS görüntülemeye karaciğer bölgesi de dahil olmak üzere sinyal verebilmekte ancak dokuya invaze olmadıkları için organın histopatolojik incelemesinde tespit edilememektedir (17, 18). Sonuç olarak bu gözlem tümör yükünün kesin tanısı için sadece radyometrik verilerin yeterli olmadığını, sinyal varlığının canlı hücreye işaret ettiğini ancak tümör varlığının mutlaka histopatolojik olarak doğrulanması gerektiğini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Düşük engraftman oranı literatürde HepG2 hücre hattının *in vivo* tümör oluşturma kapasitesi üzerine süregelen tartışmalı verilerle örtüşmektedir (19–22). HepG2 hücreleri, iyi diferansiye morfolojileri ve düşük

metastatik potansiyelleri nedeniyle *in vitro* çalışmalar için standart bir model kabul edilse de *in vivo* ksenograft modellerinde değişken ve genellikle düşük tümör oluşturma başarısına sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (23, 24). Bu bağlamda çalışmadan elde edilen bulgular, HepG2 kaynaklı ortotopik modellerin kurulumundaki doğal zorlukları deneysel olarak doğrulamaktadır. Çalışmada matrijel kullanımı tümör tutulum oranlarında veya tümör büyüme kinetiğinde bir artış sağlayamamıştır. Literatürde matrijelin büyüme faktörleri açısından zengin içeriği sayesinde tümör mikroçevresini desteklediği ve engraftman başarısını artırdığı bilinse de bu etkinin hücre hattının içsel invazyon kapasitesine sıkı sıkıya bağlı olduğu görülmektedir (25, 26). HepG2 hücre hattının *in vivo* modellerdeki davranışı üzerine yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, bu hücrelerin yüksek oranda diferansiye epitelyal fenotipe sahip olduğunu ve E-kadherin ekspresyonunun yüksekliği nedeniyle hücre-hücre yapışıklığının korunup dokuya invaze olma yeteneğinin kısıtlandığını göstermektedir (27). Bulgularımızdaki düşük tutulum oranı HepG2 hücrelerinin

non-tümörjenik ile düşük tümörjenik arasındaki gri bölgede yer aldığına dair literatürdeki tartışmalı görüşleri destekler niteliktedir (24, 28). Bazı araştırmacılar, HepG2 ile başarılı ksenograft modelleri oluşturabilmek için çok daha ağır immün yetmezlikli farelerin (NOD/SCID veya NSG gibi) veya cerrahi implantasyon tekniklerinin (solid tümör parçasının dikilmesi gibi) gerekliliğini savunmaktadır (29). Bizim bulgularımız süspansiyon enjeksiyon yöntemiyle HepG2 kullanımının, J:NU outbred atimik çıplak farelerinde ortotopik hepatoblastoma modellemesi için verimli bir yaklaşım olmadığını, bunun yerine agresif fenotipe sahip alternatif hatların tercih edilmesi gerektiğini literatürde ilk defa deneysel olarak ortaya koymaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan Lenti-luciferase-P2A-Neo (Addgene, plazmid no: 105621) plazmidini sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Gözde KORKMAZ'a ve IVIS Biyoluminesans ölçümlerindeki teknik desteğinden dolayı Özlem BEYDİLLİ'ye teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Danpanichkul P, Pang Y, Auttapracha T, et al. Rising incidence of early-onset liver cancer and intrahepatic bile duct cancer: Analysis of the national childhood cancer registry database. *Cancers (Basel)* 2025; 17: 1133-1144.
- Choi JH, Ro JY. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: An update on pathology and diagnostic approach. *Biomedicines* 2022; 10: 1826-1843.
- Pio L, O'Neill AF, Woodley H, et al. Hepatoblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 2025; 11: 36-53.
- Litten JB, Tomlinson GE. Liver tumors in children. *Oncologist* 2008; 13: 812-820.
- Zsíros J, Maibach R, Shafford E, et al. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: Final results of the SIOPEL-3HR study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2584-2590.
- Meyers RL, Rowland JR, Krailo M, et al. Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with hepatoblastoma: A report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53: 1016-1022.
- Espinoza AF, Patel KR, Shetty PB, et al. Navigating relapsed hepatoblastoma: Predictive factors and surgical treatment strategy. *Cancer Med* 2023; 12: 21270-21278.
- Stribbling SM, Beach C, Ryan AJ. Orthotopic and metastatic tumour models in preclinical cancer research. *Pharmacol Ther* 2024; 257: 108631-108646.
- Ellerkamp V, Armeanu-Ebinger S, Wenz J, et al. Successful establishment of an orthotopic hepatoblastoma in vivo model in NOD/LtSz-scid IL2Rnull Mice. *PLoS One* 2011; 6: e23419.
- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615-616.
- Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 13135.
- Chen Y, Chen Z, Feng JH, et al. Metabolic profiling of normal hepatocyte and hepatocellular carcinoma cells via 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cell Biol Int* 2018; 42: 425-434.
- Ao L, Guo Y, Song X, et al. Evaluating hepatocellular carcinoma cell lines for tumour samples using within-sample relative expression orderings of genes. *Liver Int* 2017; 37: 1688-1696.
- Chambers JM. Object-oriented programming, functional programming and R. *Stat Sci* 2014; 29: 167-180.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, et al. Welcome to the tidyverse. *J Open Source Softw* 2019; 4(43):1686.
- Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM. In vivo molecular bioluminescence imaging: New tools and applications. *Trends Biotechnol* 2017; 35: 640-652.
- Rao Q, You A, Guo Z, et al. Intrahepatic tissue implantation represents a favorable approach for establishing orthotopic transplantation hepatocellular carcinoma mouse models. *PLoS One* 2016; 11: e0148263.
- Zeamari S, Rumping G, Floot B, Lyons S, Stewart FA. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer* 2004; 90: 1259-1264.
- Woodfield SE, Shi Y, Patel RH, et al. A novel cell line based orthotopic xenograft mouse model that recapitulates human hepatoblastoma. *Sci Rep* 2017; 7: 17751-17761.
- Wu Y, Ma Y, Xu Z, et al. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. *Cancer Lett* 2014; 351: 108-116.
- Wang W, Iyer NG, Tay HT, et al. Microarray profiling shows distinct differences between primary tumors and commonly

- used preclinical models in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2015; 15: 828-837.
22. Li H, Feng Z, Tsang TC, et al. Fusion of HepG2 cells with mesenchymal stem cells increases cancer-associated and malignant properties: An in vivo metastasis model. *Oncol Rep* 2014; 32: 539-547.
23. Song Y, Lu Q, Jiang D, Lan X. Validation and utility of HepG2 xenograft model for hepatocellular carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022; 50: 639-641.
24. Shouval D, Schuger L, Levij IS, et al. Comparative morphology and tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cell lines in athymic rats and mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1988; 412: 595-606.
25. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer* 2011; 128: 1751-1757.
26. Fliedner FP, Hansen AE, Jørgensen JT, Kjær A. The use of matrigel has no influence on tumor development or PET imaging in FaDu human head and neck cancer xenografts. *BMC Med Imaging* 2016; 16: 5-12.
27. Jiao W, Miyazaki K, Kitajima Y. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2002; 86: 98-101.
28. Labonté P, Kadhim S, Bowlin T, Mounir S. Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model. *Hepatol Res* 2000; 18: 72-85.
29. Zhang W, Sun HC, Wang WQ, et al. Sorafenib down-regulates expression of HTATIP2 to promote invasiveness and metastasis of orthotopic hepatocellular carcinoma tumors in mice. *Gastroenterology* 2012; 143: 1641-1649.