

# Vitamin D'nin Hepatoselüler Karsinom Üzerindeki Etkisi

## The Effect of Vitamin D on Hepatocellular Carcinoma

<sup>1</sup>Çağrı Öner, <sup>2</sup>Hatice İsan, <sup>3</sup>Ranan Gülhan Aktaş, <sup>4</sup>Ertuğrul Çolak

<sup>1</sup>Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Maltepe Üniversitesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Özet:** Hepatoselüler karsinoma (HCC) dünya çapında görülme sıklığı açısından en çok görülen dördüncü kanser türüdür. Bu kanser türünün görülme nedenlerinin başında Tip II diyabet, obezite ve alkol kullanımı gelmektedir. Çalışmamızda, karaciğer hastalıklarında etkili olan, ancak hücreler mekanizmalar açısından etkileşimi henüz tam olarak belirlenemeyen vitamin D'nin hem ilaç formu hem de aktif formu olan 1,25-dihidroksivitaminin [1,25(OH)2D3] HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinin karakteristik özelliklerinde oluşturduğu değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. HepG2 hücrelerine vitamin D'nin hem ilaç formu hem de 1,25(OH)2D3 formu ayrı ayrı uygulanarak en etkili konsantrasyonları ve saatleri belirlendi. Bu aşamadan sonra uygun konsantrasyon ve saatte uygulanan her iki maddenin HepG2 hücrelerinin proliferasyonu, adezyonu ve immunohistokimyasal olarak p53 miktarındaki etkileri belirlendi. Elde edilen verilere göre, 250 nM vitamin D'nin ilaç formu HepG2 hücrelerine uygulandıktan 96 saat; 250 nM 1,25(OH)2D3 uygulandıktan sonra 48 saat sonra kontrol grubuna göre istatistiksel olarak proliferasyonun en çok görüldüğü konsantrasyon ve saat olarak belirlendi. Hem vitamin D'nin ilaç hem de 1,25(OH)2D3 formu HepG2 hücrelerinin adezyonunu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi (p<0.001). Optimal konsantrasyon ve saatte uygulanan her iki vitamin D formunun p53 miktarındaki değişimleri immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, kontrol ve sham gruplarına göre azaldığı gözlemlendi. Hepatoselüler kanser hastalarında uygulanacağı zaman, vitamin D dozuna dikkat edilmesi ve sürekli kontrol altında olunması yönünde ön veri sağlamaktadır. Her ne kadar bazı karaciğer hastalıklarından korunmak için önemli bir vitamin olmasına rağmen; kanser hücrelerinde proliferasyonu arttırması, adezyonu azaltması ve bir tümör baskılayıcı olan p53 miktarını azaltması konu üzerinde soru işaretleri yaratmaktadır. Vitamin D'nin hepatoselüler hastalar üzerinde uygulanması konusunda farklı bir bakış açısı yaratan sonuçlarımız, ilerleyen dönemlerde konu ile alakalı yapılacak olan çalışmalar önemli bir ön veri niteliği taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** 1,25(OH)2D3, vitamin d, hepatoselüler karsinom, HepG2

**Abstract:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth most common cancer in terms of its incidence worldwide. The main causes of this type of cancer are Type II diabetes, obesity and alcohol. In this study, we aimed to determine the changes of both drug form and 1,25-dihydroxyvitamin [1,25(OH)2D3] form of vitamin D which is effective in liver diseases, but the interaction of cellular mechanisms is still unknown, on characteristics of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Both drug and 1,25(OH)2D3 form of vitamin D were applied separately to HepG2 cells and optimal concentrations and hours were determined. Then the proliferation, adhesion and immunohistochemically p53 amount of HepG2 cells were determined by the effects of both substances applied at the optimal concentration and hour. According to our obtained data, the optimal concentration and hour of each vitamin D substances was determined as 96th hour at 250 nM for drug form; 48th hour at 250 nM for 1,25(OH)2D3 form by observing the proliferation rates. It was determined that both drug and 1,25(OH)2D3 forms of vitamin D decreased adhesion of HepG2 cells statistically compared to the control group (p <0.001). When the changes in p53 amount of both vitamin D forms applied at optimal concentration and hour were examined immunohistochemically, it was observed that it decreased compared to control and sham groups. Our results provide preliminary data to ensure that vitamin D dose is maintained and controlled continuously when administered in hepatocellular cancer patients. Although it is an important vitamin to protect from some liver diseases; increasing proliferation in cancer cells, reducing adhesion and decreasing the amount of p53, a tumor suppressor, raises some questions about this subject. Furthermore, our results create a different perspective on the application of vitamin D on hepatocellular patients, and support important preliminary data for the studies to be conducted in the future.

**Keywords:** 1,25(OH)2D3, Vitamin D, Hepatocellular Carcinoma, HepG2

**ORCID ID of the author:** Ç.Ö. 0000-0003-3771-3277, H.İ. 0000-0000-0000-0000, R.G.A. 0000-0002-4474-7371, E.Ç. 0000-0003-3251-1043

Received 02.07.2019

Accepted 07.08.2020

Online published 07.08.2019

**Correspondence:** Çağrı ÖNER- Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
e-mail: [cagri.oner@maltepe.edu.tr](mailto:cagri.oner@maltepe.edu.tr)

**Cite this article as:**

Oner C, Isan H, Aktas RG, Colak E. The Effect of Vitamin D on Hepatocellular Carcinoma, Osmangazi Journal of Medicine, 2020 42(3) 301-310 Doi:10.20515/otd.584749

## 1. Giriş

Vitamin D yağda eriyen bir vitamin çeşidi olup, karaciğerde metabolize edilmektedir. Çeşitli karaciğer hastalıklarında tedavi ya da koruyucu olarak kullanılmaktadır. Vitamin D hepatik patofizyolojide çok önemli olduğu düşünülmektedir. Karaciğer yağlanması, siroz, hepatik hemanjiom gibi karaciğer hastalıklarında aşırı derecede vitamin D eksikliği görülmektedir. Pre-klinik veriler de bu tip hastalıklarda vitamin D'nin terapötik etkilere sahip olabileceğini ileri sürmektedir (1).

Hem besinler ile hem de direk olarak güneş ışığından elde edilen vitamin D karaciğerde aktif formu olan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  haline getirilip daha sonra tüm vücutta kullanılmaktadır. Hücre içine alınan vitamin D, 25-hidroksivitamin D'ye [ $25(\text{OH})\text{D}$ ; Vitamin  $\text{D}_2$ ; ergocalciferol] dönüştürülür. Ayrıca D vitamininin  $25(\text{OH})\text{D}$  formu bir bitki sterolü olan ergosterolden de elde edilebilmektedir (2). İkinci basamakta  $25(\text{OH})\text{D}$ , D vitamininin hormonal formu olan  $1,25$ -dihidroksivitamin [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; Vitamin  $\text{D}_3$ ; calcitrol] formuna dönüştürülür. Bu dönüşümden farklı olarak  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , UV ışığının etkisi altında deri hücrelerinde 7-dehidrokolesterol olarak da alınabilir. Hem  $25(\text{OH})\text{D}$  hem de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mitokondri içinde bulunan ve karaciğerde önemli görevleri olan CYP24 (CYP24A1) tarafından katabolize edilebilir.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bir transkripsiyon faktörü olup vitamin D reseptörünün (VDR) uyarıcı molekülü olup DNA'da bulunan Vitamin D cevaplayıcı elementlere (vitamin D responsible elements; VDRE) bağlanırlar (3).

Hepatoselüler karsinom (HCC) dünya çapında görülme sıklığı açısından en çok görülen dördüncü kanser türü olup karaciğer kanser türlerinin % 80'ini oluşturmaktadır. Cerrahi müdahaleler, HCC'ine yakalanmış bir bireyin hayatta kalma oranında en etkili tedavi yöntemi olup; parça alarak yapılan müdahalenin düşük ve nüks ve metastaz oranının yüksek miktarda olması klinik tedaviyi temel olarak etkilemektedir (4, 5). HCC hücreleri epitel hücre yapısı gösteren hepatositlerden köken almaktadır (6). HCC kanser hücre hatlarından biri olan HepG2

hücreleri normal hepatositlere benzer özelliklere sahip olduğundan dolayı, karaciğer toksisitesi ve ksenobiyotiklerin metabolizmasının incelenmesinde daha fazla kullanılmaktadır (7, 8). HepG2 hücreleri bileşiklerini  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hidroksilleyebilirler (9).

Genel olarak vitamin D, vitamin D eksikliği ya da yetmezliğinde, sindirim sırasında görülen emilim bozukluklarında ve tedavisinde, raşitizm tedavisinde, osteoporoz tedavisinde ve aşırı paratiroid hormonu miktarı ile alakalı hastalıkların tedavisinde kullanılır. Vitamin D'nin aktif formu olan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün farmakolojik özelliklerinden biri; hücrelerin aşırı proliferasyonuna yardım etmesidir (10, 11). Hastalık tedavisi olarak hücre sayısının artması gerektiği durumlarda  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  uzun süredir kullanılmaktadır (2, 12).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün etki mekanizması hakkında günümüzde iki farklı görüş bulunmaktadır. Bu görüşlerden birincisi,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'in kanserin oluşmasını engellediği; tümör gelişimini baskılayabildiği ve bu baskılamanın hücre tipine özel olabileceği birçok olguda bildirilmiştir. Bu olgularda vitamin D, hücre döngüsünü etkileyen maddeler ile ya da büyüme faktörleri ile hücre içi sinyal iletiminin baskılanması; metastazın ve anjiyogenezin inhibisyonunun sağlanması; DNA tamirinin düzenlenmesi ve apoptozun indüklenmesi ile proliferasyonun baskılayabileceği savunulmuştur (7). Vitamin D ve kanser hakkında yakın zamanda gelişen ikinci görüş ise, bu vitaminin kanser hücrelerinde herhangi bir tedavi edici etkisinin olmadığını savunmaktadır. Yapılan yeni çalışmalar, vitamin D'nin kanserin oluşumunu engelleyebileceği hakkında hem fikir olmakla beraber; kanser tanısı konulduktan sonra yararlı olamayabileceği konusunu ele almaktadır.

Yaptığımız çalışmada, vitamin D'nin hem ilaç formunun hem de aktif formunun benign [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] HCC Hücresi olan HePG2 hücrelerinin proliferasyonu ve adezyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlandı.

## 2. Gereç ve Yöntemler

### HepG2 Hücrelerinin Yetiştirilmesi

Hepatoselüler karsinom hücre dizisi HepG2 Maltepe Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji öğretim üyesi Prof. Dr. Ranan Gülhan AKTAŞ tarafından temin edilmiştir. Laboratuvarımızda belirlenen rutin kültür koşullarında, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde, doku ve hücre kültürü flakları içerisinde (SPL, Kore), %10 Fetal Bovin Serum (FBS; Wisent, Kanada) ve %1 Penisilin/streptomisin (Wisent, Kanada) içeren Fenol red'li Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Wisent, Kanada) besiyeri kullanılarak çoğaltılıp, yapılacak deneyler için yeterli sayıya ulaştırıldı.

### En Yüksek Proliferasyonun Görüldüğü D Vitamininin Konsantrasyonunun ve Zamanının Belirlenmesi

Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra her bir kuyucukta 7x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere dağıtılıp inkübe edildi. İnkübasyondan aşamasından sonra uygun konsantrasyonun belirlenmesi için konu hakkında daha önce yapılan çalışmalar da göz önünde bulundurularak belirli konsantrasyon aralıklarıyla hücrelere kanser türlerine göre D vitamininin ilaç formu [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, bütihidroksitoluen, ayçiçek yağı] ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu (Cayman, USA) ayrı ayrı uygulandı. Farklı konsantrasyonlardaki vitamin D'nin ilaç formu 24, 48, 72 ve 96 saatlerinde; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu ise 24, 48 ve 72 saatlerinde ölçüm yapılarak hücrelerde etkin konsantrasyon ve zaman belirlendi. Bundan sonraki aşamalarda vitamin D'nin her iki formu için belirlenen uygun konsantrasyonlarda ve saatlerde deneyler tasarlandı.

### Proliferasyon Deneyi

Hücrelerde proliferasyonu belirlemek için XTT yöntemi kullanıldı. Bu deneyde, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondri enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olma etkinliği üzerine kuruludur. Tetrazolium tuzuna dayalı bir kolorimetrik yöntem olan XTT yöntemi hücrelerin canlılığının ölçülmesi ve

değerlendirilmesini kolaylaştıran bir yöntemdir. Vitamin D'nin ilaç formu 96.sa, 250 nM; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu uygulanan HePG2 hücreleri 48.sa 250 nM konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra kit protokolüne uygun olarak XTT ölçümü (Biological Industries, İsrail) gerçekleştirildi. Kit protokolüne uygun şekilde mikropate reader cihazında (Biotek, Japonya) 450 nm'de ölçüm yapıldı.

### Adezyon Deneyi

HepG2 hücrelerine ayrı ayrı olarak uygulanan vitamin D'nin her iki formu, önceden belirlenen konsantrasyon ve zamanlarda hücrelere uygulandı. D vitamininin hücrelerin adezyonuna olan etkilerini incelemek için vitamin D'nin ilaç formu 96. saat 250 nM; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu için ise 48.saat 250 nM uygulandı. HepG2 hücreleri 96 kuyucuklu platelere, kuyucuk başına 7x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre tipi için, biri adezyon uygulanacak diğeri kontrol olacak şekilde 7'şer kuyucuğa aktarıldı. Belirlenen optimal konsantrasyon ve zamanda kuyucuklardaki hücrelere vitamin D formları uygulanıp inkübe edildi. İnkübasyondan sonra adezyon kuyucukları yıkanıp. Kit protokolüne uygun olarak XTT yöntemi uygulandı. 450 nm'de mikropate reader (Biotek, Japonya) cihazında ölçümü yapıldı.

### İmmunohistokimyasal Boyamalar

Adezyon kuvveti düşen hücrelerde, hücrelerin apoptoz durumunu belirlemek amacıyla p53 immunohistokimyasal boyaması yapıldı. Belirlenen optimal konsantrasyon ve saatte ilaç formu ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu uygulanan HepG2 hücreleri fiksasyon aşamasından sonra kit protokolüne uygun şekilde p53 boyaması yapıldı. Boyamalar yapıldıktan sonra ışık mikroskopunda incelenerek, fotoğraflandı.

### İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS IBM 20.0 programı kullanıldı. Normal dağılım testi olarak Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Normal dağılım görülen deneylerde OneWay ANOVA yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi yapıldı. Normal dağılım görülmeyen

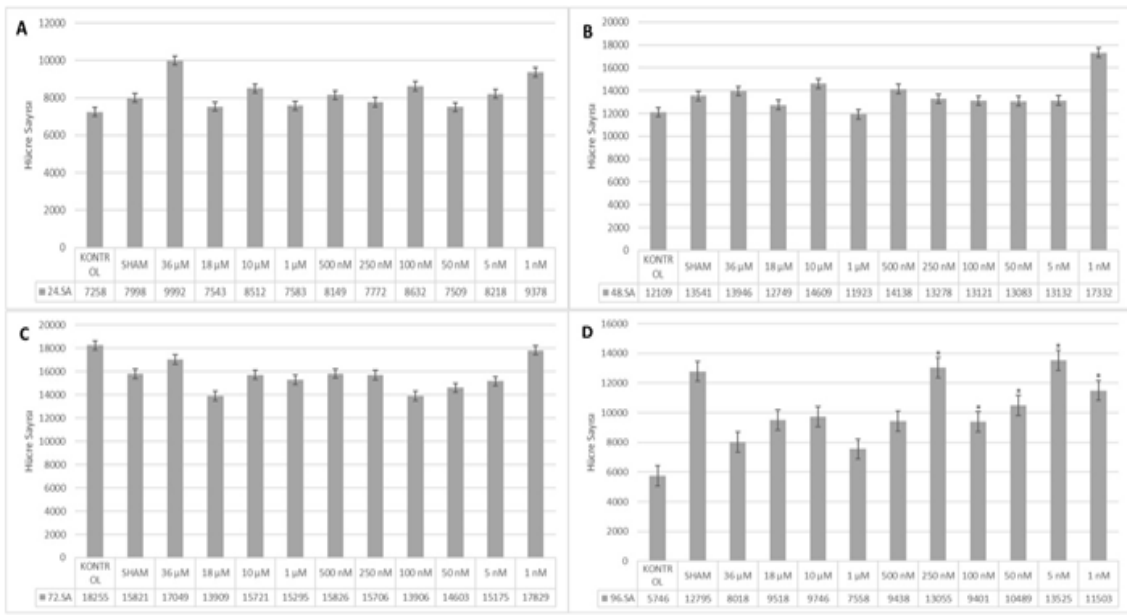
deneylerde Kruskal-Wallis Çoklu Karşılaştırma testi yapıldı. Gruplar arasında fark olup olmadığı istatistiksel değerlendirmeler sonucu değerlendirildi.

### 3. Bulgular

#### Vitamin D'nin İlaç ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Formunun Optimal Konsantrasyon ve Zamanının Belirlenmesi

Elde edilen verilere göre, farklı konsantrasyonlarda uygulanan vitamin D'nin

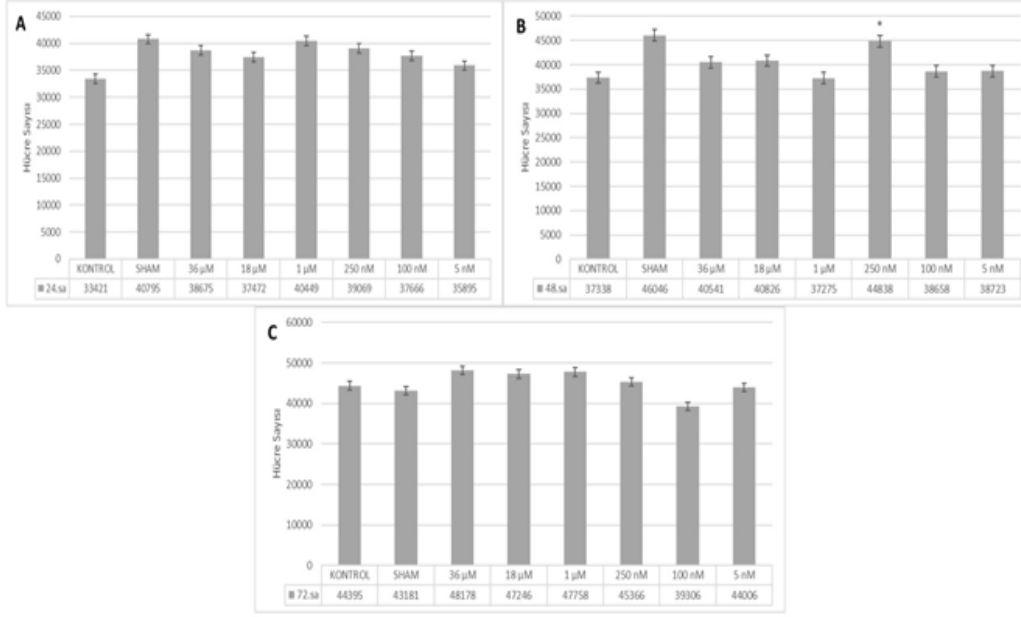
ilaç formu 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vermedi (Şekil 1A, 1B, 1C; p>0.05). Ancak, 96. Saatte, 250 nM vitamin D'nin ilaç formu uygulanan grubundan (13055±1925) başlayarak, daha düşük konsantrasyonlarında da HepG2 hücrelerinde istatistiksel olarak kontrol grubuna (5746±3294) göre artmasına neden olmaktadır (Şekil 1D; p <0.001).



**Şekil 1.** HepG2 hücrelerinde vitamin D'nin ilaç formunun etkin konsantrasyonunun ve zamanının belirlenmesi. **A;** D vitamininin ilaç formunun HepG2 hücrelerine etkisinin 24.saat grafiği (p>0.05). **B;** D vitamininin ilaç formunun HepG2 hücrelerine etkisinin 48.saat grafiği (p>0.05). **C;** D vitamininin ilaç formunun HepG2 hücrelerine etkisinin 72.saat grafiği (p>0.05). **D;** D vitamininin ilaç formunun HepG2 hücrelerine etkisinin 96.saat grafiği (p<0.001).

Elde edilen verilere göre, 48. saatte, 250 nM uygulanan vitamin D'nin 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu (44838±4815) HepG2 hücrelerinde kontrol grubuna göre (37338±4071) istatistiksel olarak anlamlı değişimlere neden olmaktadır (Şekil 2B; p<0.05). 24 ve 72. saatlerde

uygulanan konsantrasyonlarda proliferasyon gözlenmektedir, ancak bu proliferasyonlardan hiçbiri kontrol grubuna (37338±4071) göre istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 2A ve 2C; p>0.05).

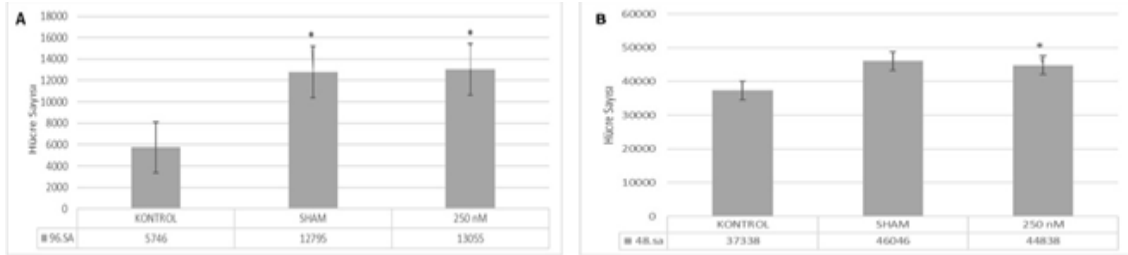


**Şekil 2.** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerindeki etkin konsantrasyon ve saat grafikleri. **A;** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerine etkisinin 24.saat grafiği (p<0.05). **B;** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerine etkisinin 48.saat grafiği (p>0.05). **C;** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerine etkisinin 72.saat grafiği (p<0.05).

### Vitamin D'nin İlaç ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Formunun Proliferasyonuna Etkisi

96.sa 250 nM vitamin D'nin ilaç formunun (13055±1925) HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu kontrol grubuna göre (5746±3294) istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı belirlendi (p<0.001).

Deneyimizde D vitamininin ilaç formunun bulunduğu çözücülerden biri Ayçiçek yağıdır. Sonuçlarımızda HepG2 hücrelerine sham grubu olarak uygulanan ayçiçek yağının etkisi (12795±2471) 96.saatte kontrol grubuna (5746±3294) göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (Şekil 3A; p<0.001).



**Şekil 3.** Vitamin D'nin HePG2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi. **A.** D vitramininin ilaç formunun (96. Sa; 250 nM) ilaç formunun HepG2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi (p<0.001). **B.** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi (p<0.05)

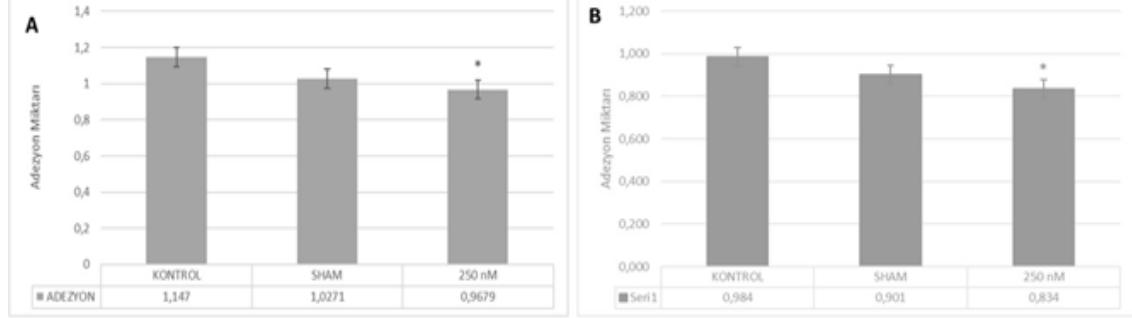
48.sa 250 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> uygulanan (44838±4815) HepG2 hücrelerinin proliferasyonu istatistiksel olarak kontrol grubuna göre (37338±4071) anlamlı derecede arttığı belirlendi (p<0.05). Etanol 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün çözücüsü olduğundan dolayı sham grubunda kullanıldı. Sham grubunda

(46046±3726) kontrol grubuna (37338±4071) göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 3B; p>0.05).

### Vitamin D'nin İlaç ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Formunun Adezyonuna Etkisi

Vitamin D'nin 96.sa 250 nM olarak uygulanan ilaç formunun (0,968±0,108) HepG2 hücrelerinin adezyonuna etkisi kontrol grubuna göre (1,147±0,167) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olarak belirlendi (Şekil 4A; p<0.05).

İlaç formuna benzer olarak, 48.sa 250 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün (0,834±0,164) uygulandığı HepG2 hücrelerinin adezyonunda kontrol grubuna (0,984±0,132) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma belirlendi (Şekil 4B; p<0.05).

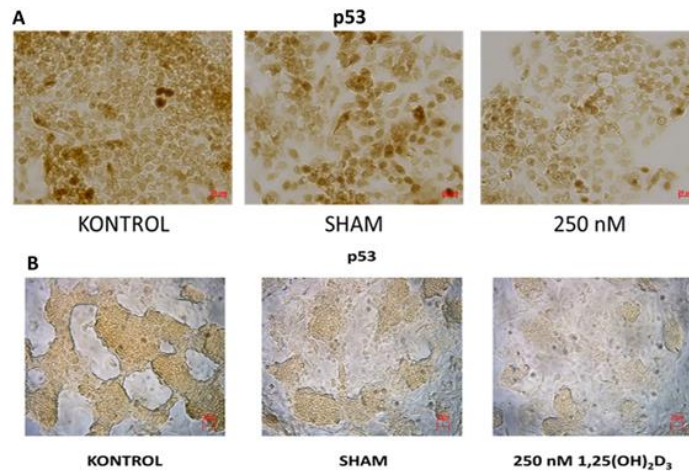


Şekil 4. Vitamin D'nin HePG2 hücrelerinin adezyonuna etkisi. **A.** D vitamininin ilaç formunun (96.sa; 250 nM) HepG2 hücrelerinin adezyonuna etkisi (p<0.05). **B.** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerinin adezyonuna etkisi (p<0.05).

### Vitamin D'nin İlaç ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Formunun İmmunohistokimyasal Olarak p53 Miktarına Etkisi

Hem 96.sa 250 nM olarak uygulanan vitamin D'nin ilaç formunun hem de 48.sa 250 nM

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün uygulandığı HepG2 hücrelerinde, p53 immunohistokimyasal boyaması kontrol ve sham gruplarına göre azalma olduğu belirlendi (Şekil 5A ve 5B).



Şekil 5. Vitamin D'nin HePG2 hücrelerinin İmmunohistokimyasal olarak p53 Miktarına Etkisi. **A.** 96.sa 250 nM uygulanan Vitamin D'nin ilaç formunun HepG2 hücrelerinde p53 miktarında yaptığı değişim. **B.** 48.sa 250 nM uygulanan Vitamin D'nin 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formunun HepG2 hücrelerinde p53 miktarında yaptığı değişim.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Tümör mikroçevre koşullarının iyi tanımlanması kanserin gerek tanısında gerekse de tedavisinde önemli olan bir konudur. Bu nedenden dolayı tümör mikroçevre koşulları bu tip çalışmalarda çok önemli yere sahiptir. Kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayırt etmede yardımcı olan bazı fizyolojik, biyokimyasal ve genetik farklılıklar bulunmaktadır. Hepatoselüler karsinomda diğer kanser türlerinde olduğu gibi tümör mikroçevresinin sitotoksitesinin de yüksek olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinde görülen temel özelliklerinden biri olan inflamasyon ve tümör çevresinde adipoz dokunun aşırı bulunmasıdır. Çoğu kanserde olduğu gibi hepatoselüler karsinomda da bu durum yüksek seviyede görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan HEPG2 hücreleri hepatoselüler karsinom hücreleri olup, adipoz dokuda artış miktarı oldukça fazladır. Diğer kanser hücre hatlarına göre daha fazla yağ molekülüne sahip hücrelerdir. Karakteristik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, vitamin D yağda çözünen bir vitamindir. Karaciğer ve bağırsak başta olmak üzere yağ emiliminin fazla olduğu bölgelerde yüksek emilim miktarına bağlı olarak yüksek vitamin D aktivitesi görülmektedir.

Vitamin D'nin kanser olgularındaki etkisi hakkında farklı iki görüş ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki, kanserin oluşumu, gelişimi, metastaz ve nüksünde vitamin D'nin koruyucu ve tedavi edici özelliğinin olduğudur. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ve/veya analogları kanser gelişimini engeller ya da daha önceden gelişen kanserin nüksetmesini ve/veya metastazını geciktirirler (13). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün çeşitli HCC hücrelerinde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda anti-tümörojenik özelliği olabileceği konusunda genel bir bilgiye varılmıştır (14, 15). Pourgholami ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 ve Hep3B HCC hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (16). HCC'de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün antiproliferatif etkisinin özellikle hücre döngüsünün G0/G1 fazında etkili olduğunu; bu fazda hücrel fraksiyonunun artmasına öncülük ettiğini ve S fazında ise hücre fraksiyonunun azaltmakta olduğu yapılan bir

araştırmada belirlenmiştir (17). Huang, J. ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu önemli derecede inhibe ettiğini ve HDAC2 ekspresyonunun azalttığını belirlemişlerdir (18). Huang, J. ve ark. (2018) yaptıkları başka bir çalışmada HepG2 hücrelerinin histon deasetilaz 2 (HDAC2) gen bölgesi inhibe edilen HePG2 hücrelerinde 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün etkisini arttırmışlardır. Sonuç olarak, HepG2 hücrelerinde proliferasyonunda azalma ve bir tümör baskılayıcı gen olan p53 ekspresyonunun artma belirlenmiştir (19). Karbon tetraklorid (CCL4) gibi bir sitotoksik ajan kullanılarak HepG2 hücrelerindeki mikroçevrenin sitotoksitesi artırılıp, vitamin D ve türevlerinin uygulanması sonucu sitotoksitesinin düşürülmüştür. (20). Bu açıdan terapötik etkiye sahip olan vitamin D'nin, bizim çalışmamızda herhangi bir sitotoksiste yaratmadan, mikroçevredeki toksisite kullanılarak, aynı etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ile yapılan çalışmalarda kolon ve meme kanserinde vitamin D'nin yararlı olabileceği savunulmakta; ancak tedavi için gerekli olan optimal konsantrasyonu ve uygulama süresinin belirlemek, hem klinik uygulamalar için hem de literatürde görülen temel bir eksikliği gidermek için gerekli olduğu belirtilmiştir (21, 22).

İkinci görüş ise, vitamin D'nin kansere koruyucu özelliğinin olabileceğinin, ancak kanserin tedavisinde, özellikle karaciğer ve hepatoselüler karsinomda, verimli bir etkisini olmadığını, hatta zararlı olabileceğini savunmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, vitamin D'nin tedavide etkili olamayabileceğini savunmaktadır. Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün farmakolojik özelliklerinden biri; hücrelerin aşırı proliferasyonuna yardım etmesidir (10, 11). Hastalık tedavisi olarak hücre sayısının artması gerektiği durumlarda 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> uzun süredir kullanılmaktadır (2, 12). Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar ile vitamin D'nin karakteristik özellikleri ve hücrel mekanizmasına göre karaciğer kanserinde herhangi bir anti-proliferatif, terapötik etkiye

sahip olamayacağı da savunulmaya başlanmıştır (23, 24). Lappe ve ark. yaptığı bir çalışmada vitamin D ve Ca suplementlerinin yaşlı kadınlarda kanser oluşmasına neden olabileceğini savunmuşlardır (25). Pivonello ve ark. (2016) vitamin D uygulamasının JHH-6 HCC hücrelerinin proliferasyonunun artmasına neden olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, vitamin D'nin HCC hücrelerinde bir mitojen olabileceğini savunmaktadırlar (26). Mahmoud A. ve El-Shemy H. yaptıkları bir çalışmada (2012), D vitamininin de içinde bulunduğu çeşitli doğal bileşenlerin HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine bakmış; vitamin D'nin HepG2'lerde diğer uygulanan maddeler göz önünde bulundurulduğunda karaciğer kanseri için orta düzeyde etkili bir terapötik ajan olabileceğini bildirmişlerdir (27).

Yağda eriyen ve metabolize olan vitamin D HepG2 hücrelerine uygulandığında, hücre ölümüne değil, proliferasyonun artmasına neden olacaktır. Elde ettiğimiz verilere göre, vitamin D'nin hem ilaç formu hem de etkin formu HepG2 hücrelerine uygulandığında proliferasyonlarının ve canlılıklarının dozu ne olursa olsun kontrol grubuna göre arttığını belirledik (Şekil 1A-D; Şekil 2A-C; Şekil 3A ve 3B).

Vitamin D'nin mezenşimal kök hücrelerin farklılaşması ve adezyon kuvvetlerinin artmasına neden olduğu yapılan bir çalışmada sunulmuştur (28). Vitamin D'nin hepatoselüler karsinom hücrelerinin adezyonu üzerindeki etkisi hakkında tam olarak yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak hücrelerin aşırı proliferasyonuna neden olan bir madde, adeziv karakteri kuvvetli olan bir hücre hattının bu karakterinde artışa neden olacağı düşünülmektedir. Adezyon başka yöntemler ile desteklenirse; HepG2 gibi adeziv karakterli hücreler için belirleyici bir yöntem olabilmektedir. Optimal konsantrasyon ve saatte uygulanan vitamin D'nin hem ilaç hem de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formu HepG2 hücrelerinin adezyon miktarını düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4A ve 4B).

Adezyon kuvvetindeki azalma ve proliferasyondaki artma, apoptotik yolda

önemli bir role sahip olan p53 miktarının değerlendirilmesinin yol açmıştır. p53 kanser gelişiminde, metastazında ve nüksünde düşük ekspresyona sahip, sağlıklı hücrelerde tümör baskılayıcı özellik gösteren proteindir. Vitamin D'nin gerek ilaç (250 nM) gerekse de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (250 nM) formu uygulanan HepG2 hücrelerinde immunohistokimyasal olarak p53 proteininin ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Uygulanan vitamin D'nin hücrelerde apoptoza gidip gitmediğini temel olarak belirleyebilmek için yapılan p53'ün immunohistokimyasal boyama sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, hücrelerin p53 üzerinden apoptotik mekanizmalarını tetiklemediği belirlenmiştir (Şekil 5A ve 5B).

Elde ettiğimiz proliferasyondaki artış, adezyondaki azalma ve p53 miktarındaki düşüş verilerini birlikte değerlendirdiğimizde, vitamin D'nin hem ilaç formu hem de etkin formu HepG2 hücrelerinin adeziv karakterini invaziv karaktere dönüşmesine neden olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, vitamin D'nin hepatoselüler karsinom hücrelerinde olumlu cevap oluşturması, hücre karakterine ve uygulanan doza bağımlı olduğu; dozun hücre karakterlerinin agresifleştirebileceği fikrini uyandırmaktadır. Ayrıca, vitamin D'nin karaciğer hücreleri özellikle, hepatoselüler karsinom hücreleri, üzerinde her zaman koruyucu ve anti-kanserojenik etkiye sahip olamayabileceğini göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler ışığında, hepatoselüler karsinoma sahip hastalarda vitamin D uygulamasının beklenmedik sonuçlar doğurabileceğini, bu hastalara vitamin D verilirken dikkat edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Vitamin D'nin hepatoselüler karsinom üzerindeki etkisi hakkında ayrıntılı bilgi ve kesin sonuçlar için pre-klinik ve klinik alanda yapılacak olan daha fazla çalışma ile kesinlik kazanacaktır. Çalışmamızda bu konu hakkında farklı bir bakış açısı yaratmaktadır. Literatürde çok fazla geçmişi olmayan bu molekülün araştırılması gelecekte keşfedilecek mekanizmalara ışık tutması nedeniyle önemlidir.



**Teşekkür**

*Bu çalışma Maltepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje komisyonu tarafından desteklenmektedir.*

**KAYNAKLAR**

1. Elangovan H, Chahal S, Gunton JE. Vitamin D in liver disease: Current evidence and potential directions. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863:907-16.
2. Kragballe K. Vitamin-D Analogs in the Treatment of Psoriasis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1992;49:46-52.
3. Zannis VI, Breslow JL, SanGiacomo TR, Aden DP, Knowles BB et al. Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry*. 1981;20:7089-96.
4. Matsuda T, Saika K. Trends in liver cancer mortality rates in Japan, USA, UK, France and Korea based on the WHO mortality database. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:360-1.
5. Sintra SN, Tome L, Cipriano MA, Bento C, Furtado E et al. Long-term outcome of the first 150 liver transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc*. 2013;45:1119-21.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001;94:153-6.
7. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 1980;209:497-9.
8. Krithika R, Mohankumar R, Verma RJ, Shrivastav PS, Mohamad IL, Gunasekaran P, et al. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl4-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chem Biol Interact*. 2009;181:351-8.
9. Masuda S, Byford V, Kremer R, Makin HLJ, Kubodera N, Nishii Y, et al. In vitro metabolism of the vitamin D analog, 22-oxacalcitriol, using cultured osteosarcoma, hepatoma, and keratinocyte cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:8700-8.
10. Akhter JYL, Finlay I, Pourgholami MH, Morris DL et al. 1,25(OH)2D3 and its analogues, EB1089 and CB1093, profoundly inhibit the in vitro proliferation of the human hepatoblastoma cell line HepG2. *ANZ J Surg* 2001;71:414-7.
11. Eisman JA, Koga M, Sutherland RL, Barkla DH, Tutton PJ et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and the regulation of human cancer cell replication. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1989;191:221-6.
12. Binderup L, Bramm E. Effects of a novel vitamin D analogue MC 903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo. *Biochem Pharmacol* 1988;37:889-95.
13. Bikle DD. Vitamin D and skin cancer. *J Nutr*. 2004;134:3472S-8S.
14. Farhan M, Rizvi A, Naseem I, Hadi SM, Ahmad A et al. Targeting increased copper levels in diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma cells in rats by epigallocatechin-3-gallate. *Tumour Biol*. 2015;36:8861-7.
15. Rizvi A, Farhan M, Naseem I, Hadi SM et al. Calcitriol-copper interaction leads to non enzymatic, reactive oxygen species mediated DNA breakage and modulation of cellular redox scavengers in hepatocellular carcinoma. *Apoptosis*. 2016;21:997-1007.
16. Pourgholami MH, Akhter J, Lu Y, Morris DL et al. In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Lett*. 2000;151:97-102.
17. Caputo A, Pourgholami MH, Akhter J, Morris DL et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) induced cell cycle arrest in the human primary liver cancer cell line HepG2. *Hepatol Res*. 2003;26:34-9.
18. Huang J, Yang G, Huang Y, Kong W, Zhang S et al. 1,25(OH)2D3 inhibits the progression of hepatocellular carcinoma via downregulating HDAC2 and upregulating P21(WAF1/CIP1). *Mol Med Rep*. 2016;13:1373-80.
19. Huang J, Yang G, Huang Y, Zhang S et al. 1,25(OH)2D3 induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and inhibited their growth in a nude mouse xenograft model by regulating histone deacetylase 2. *Biochimie*. 2018;146:28-34.
20. Ozerkan D, Ozsoy N, Yilmaz E. Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl4 induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines. *Cytotechnology*. 2015;67:995-1002.
21. Chung M, Lee J, Terasawa T, Lau J, Trikalinos TA et al. Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2011;155 827-38.
22. Manson JE, Mayne ST, Clinton SK. Vitamin D and prevention of cancer--ready for prime time? *The New England journal of medicine*. 2011;364:1385-7.
23. Jenkins K. Vitamin D does not prevent cancer: Study. *Medscape Medical News*. 2018.
24. Scragg R, Khaw KT, Toop L, Sluyter J, Lawes CMM, Waayer D, et al. Monthly High-Dose Vitamin D Supplementation and Cancer Risk: A Post Hoc Analysis of the Vitamin D Assessment Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4:e182178.

25. Lappe J, Watson P, Travers-Gustafson D. Effect of vitamin D and calcium supplementation on cancer incidence in older women: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2017;317:1234-43.
26. Pivonello C, Provisiero DP, Negri M, Di GG, De AC, Galdiero G et al. Potential role of vitamin D in restoring sensitivity to mTOR inhibitors in hepatocellular carcinoma (HCC): 1,25(OH)vitamin D (VITD) reverts everolimus (EVE) resistance in a HCC cell line. *Endocrine Abstracts*. 2016;41.
27. Mahmoud AM, El-Shemy HA. Cytotoxic Profiling of Some Compounds of Natural Origin against HepG2 Liver Cancer Cell Line in-vitro. *Journal of Arid Land Studies*. 2012;22:191 -4.
28. Posa F, Di Benedetto A, Cavalcanti-Adam EA, Colaianni G, Porro C, Trotta T, et al. Vitamin D Promotes MSC Osteogenic Differentiation Stimulating Cell Adhesion and alphaVbeta3 Expression. *Stem cells international*. 2018;2018:6958713.