



## Effect of Vitamin D Against Progesterone-induced Effects on HepG2 Liver Cancer Cell Viability and Liver Function Tests

Progesteronun HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Canlılığı ve Karaciğer Fonksiyon Testleri Üzerindeki Etkilerine Karşı D Vitamininin Etkisi

Melek Naz Akkuş<sup>1</sup> | Hale Bayram<sup>2</sup> | Mustafa Erinç Sitar<sup>3</sup> | Belgin Selam<sup>4</sup> | Mehmet Cıncık<sup>2</sup> | Yaprak Dönmez Çakıl<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maltepe University Graduate Education Institute, Clinical Embryology Master's Program, Istanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Maltepe University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Istanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Maltepe University Faculty of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Istanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Istanbul, Türkiye

### Sorumlu Yazar | Correspondence Author

Yaprak Dönmez Çakıl

yaprak.cakil@maltepe.edu.tr

Address for Correspondence: Maltepe University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Istanbul, Türkiye  
Marmara Education Village 34857 Maltepe/Istanbul.

### Makale Bilgisi | Article Information

Makale Türü | Article Type: Araştırma Makalesi | Research Article

Doi: <https://doi.org/10.52827/hititmedj.1439617>

Geliş Tarihi | Received: 20.02.2024

Kabul Tarihi | Accepted: 24.05.2024

Yayın Tarihi | Published: 30.06.2024

### Atıf | Cite As

Akkuş MN, Bayram H, Sitar ME, Selam B, Cıncık M, Çakıl YD. Effect of Vitamin D Against Progesterone-induced Effects on HepG2 Liver Cancer Cell Viability and Liver Function Tests. Hitit Medical Journal 2024;6(2):108-116 <https://doi.org/10.52827/hititmedj.1439617>.

**Hakem Değerlendirmesi:** Alan editörü tarafından atanan en az iki farklı kurumda çalışan bağımsız hakemler tarafından değerlendirilmiştir.

**Etik Beyanı:** Etik kurul onayı alınmasına gerek yoktur.

**İntihal Kontrolleri:** Evet (intihal.net)

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çalışma ile ilgili çıkar çatışması beyan etmemiştir.

**Şikayetler:** [hmj@hitit.edu.tr](mailto:hmj@hitit.edu.tr)

**Katkı Beyanı:** Fikir/Hipotez: MNA, YDC, MES, HB, FBS, MC  
Tasarım: MNA, YDC, MES, HB, FBS, MC Veri Toplama/Veri İşleme: MNA, YDC, MES Veri Analizi: MNA, YDC, MES, HB Makalenin Hazırlanması: MNA, YDC, MES, HB, FBS, MC.

**Hasta Onamı:** Gerek yoktur.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Melek Naz Akkuş'un yüksek lisans projesi kapsamında Maltepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

**Bilgi:** Melek Naz Akkuş'un Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

**Telif Hakkı & Lisans:** Dergi ile yayın yapan yazarlar, CC BY-NC 4.0 kapsamında lisanslanan çalışmalarının telif hakkını elinde tutar.

**Peer Review:** Evaluated by independent reviewers working in the at least two different institutions appointed by the field editor

**Ethical Statement:** Not applicable.

**Plagiarism Check:** Yes (intihal.net)

**Conflict of Interest:** The authors declared that, there are no conflicts of interest.

**Complaints:** [hmj@hitit.edu.tr](mailto:hmj@hitit.edu.tr)

**Authorship Contribution:** Idea/Hypothesis: MNA, YDC, MES, HB, FBS, MC Design: MNA, YDC, MES, HB, FBS, MC Data Collection/Data Processing: MNA, YDC, MES Data Analysis: MNA, YDC, MES, HB Manuscript Preparation: MNA, YDC, MES, HB, FBS, MC.

**Informed Consent:** Not applicable.

**Financial Disclosure:** This study was supported by Maltepe University Scientific Research Projects within the scope of Melek Naz Akkuş's master's project.

**Information:** Produced from Melek Naz Akkuş's Master's thesis.

**Copyright & License:** Authors publishing with the journal retain the copyright of their work licensed under CC BY-NC 4.0.

## Effect of Vitamin D Against Progesterone-induced Effects on HepG2 Liver Cancer Cell Viability and Liver Function Tests

### ABSTRACT

**Objective:** Progesterone is a signaling molecule synthesized by the adrenal glands and ovaries and is structurally the precursor of many different hormones. Vitamin D, unlike other vitamins, is a steroid hormone that can be synthesized endogenously as well as supplied exogenously. Vitamin D deficiency is a matter of considerable controversy in the world of medicine. The objective of this study was to investigate the impact of progesterone on the proliferation and liver enzyme activities of HepG2 cells, as well as to assess the potential of vitamin D in mitigating the cytotoxic effects induced by progesterone.

**Material and Method:** Cytotoxicity studies were conducted on HepG2 hepatocellular cancer cells to determine the appropriate doses of progesterone and vitamin D when applied alone or in combination. The hormones were administered to the experiment and control groups, either alone or in combination at specific doses. Subsequently, HepG2 cell viability, morphology and liver enzyme activities were measured comparatively between the groups.

**Results:** The results indicated a decrease in cell viability in the cells treated with 1 mM and 2 mM progesterone when compared to the control group. In addition, AST and LDH activity values were significantly lower with 1 mM and 2mM progesterone. Vitamin D was found not to have a cytotoxic effect on HepG2 cells between doses of 0.008  $\mu$ M and 166.667  $\mu$ M. Therefore, a dose of 2.5  $\mu$ M was selected for further applications. No significant difference in ALT, AST, and LDH enzyme activity values was observed when only vitamin D was administered. Similar cell viability and enzyme activities were demonstrated when progesterone was administered alone or in combination with vitamin D.

**Conclusion:** At the doses and incubation periods used in the current study, vitamin D was found to be ineffective in preventing the cytotoxic effects caused by progesterone.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, HepG2, liver function tests, progesterone, Vitamin D.

### ÖZET

**Amaç:** Progesteron, adrenal bezler ve yumurtalıklar tarafından sentezlenen, yapısal olarak birçok farklı hormonun da öncüsü olan bir sinyal molekülüdür. D vitamini ise diğer vitaminlerden farklı olarak ekzojen alımın yanında endojen olarak da sentezlenebilen ancak eksiklik durumu güncel tıp dünyasında büyük tartışmalara neden olan steroid yapıda bir hormondur. Bu çalışmada amaç, progesteronun HepG2 hücre proliferasyonu ve karaciğer enzim aktivitelerine etkisini belirlemek, ayrıca D vitamininin progesteronun oluşturduğu sitotoksik etkileri engellemedeki rolünü incelemektir.

**Gereç ve Yöntem:** HepG2 hepatoselüler kanser hücre kültürü ortamına uygulanacak progesteron ve D vitamini dozlarının belirlenmesi için öncelikle her iki hormon için ayrı sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Ardından progesteron ve D vitamini, deney ve kontrol gruplarına tek başlarına veya birlikte belirli dozlarda uygulanmıştır. HepG2 hücre canlılığı, morfolojik özellikleri ve karaciğer enzim aktiviteleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Hücrelere uygulanan 1 mM ve 2 mM progesteron dozlarında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında azalma olduğu saptandı. Ek olarak, 1 mM ve 2 mM progesteron uygulananlarda AST ve LDH aktivite değerlerinde de anlamlı olarak düşüklük bulundu. D vitamininin 0,008  $\mu$ M ve 166,667  $\mu$ M dozları aralığında HepG2 hücrelerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı belirlendi ve 2,5  $\mu$ M dozda uygulandı. Yalnızca D vitamini uygulanan hücrelerde ALT, AST ve LDH enzim aktivite değerlerinde anlamlı bir farklılık görülmedi. Yalnızca progesteron uygulanan hücrelerle, progesteron+D vitamininin birlikte uygulandığı hücreler arasında hücre canlılığı ve karaciğer enzim düzeyleri benzerlik gösterdi.

**Sonuç:** Kullanılan doz ve inkübasyon sürelerinde D vitamininin progesteronun sebep olduğu sitotoksik etkileri engellemede etkili olmadığı düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** D vitamini, hepatoselüler karsinom, HepG2, karaciğer fonksiyon testleri, progesteron.

## Giriş

Progesteron, “gebelik hormonu” olarak bilinen ve ovaryumda yerleşim gösteren granüloza lutein hücreleri ve adrenal bezler tarafından sentezlenen bir cinsiyet hormonudur (1). Progesteron, ovülasyonu düzenleme yanında endometriyumun proliferatif aşamadan sekretuar aşamaya geçişini sağlayıp, blastosist implantasyonunu kolaylaştırır ve hamileliğin devamı için gereklidir (2). Progesteron steroidlerin bir öncüsü olmakla birlikte, karaciğerde östradiolün metabolize edilmesi gibi inaktif hale getirilip, glukuronik asitle konjuge edilir ve idrarla atılır (3,4). Birçok meta-analizde in vitro fertilizasyon (IVF) sonrası progesteron kullanımının canlı doğum oranlarını arttırdığı ayrıca düşük tehdidi nedeniyle progesteron tedavisi alan gebelerde preterm doğumu önlemede olumlu yönde etkili olduğu bildirilmiştir (5,6). Ancak, bunun yanında ikinci ve üçüncü trimesterde vajinal progesteron tedavisi alan kadınlarda gebeliğin intrahepatik kolestazi (ICP) görülme sıklığının üç kat arttığı da gösterilmiştir (7,8). Çoğul gebeliklerde daha da sık gözlenmesi, multiparlarda tekrarlayıcı nitelik göstermesi, bazı etnik gruplarda yoğunlaşması sebebiyle, artan hormon düzeylerinin veya bunların ara metabolitlerinin, ICP etiolojisinde önemli olduğu düşünülmektedir (9,10). Ek olarak, progesteronun kadınlarda ilaca bağlı karaciğer hasarını (Drug Induced Liver Injury, DILI) indüklediği de bilinmektedir (11). Etiyolojisinde seks hormonlarının etkili olduğu bilinen alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı (nonalcoholic fatty liver disease)’nin en şiddetli şekli olan nonalkolik steatohepatit hastalarında progesteron kullanımının hepatik lobüler inflamasyonu indüklediği de gösterilmiştir. Ayrıca, progesteronun tümörler için elverişli bir mikroçevre oluşumuna katkıda bulunarak karaciğer kanserine neden olabileceği düşünülmektedir (4).

D vitamini, diğer tüm vitaminlerden farklı olarak kalsiyum, magnezyum, fosfat gibi minerallerin barsaktan emilimi ile kemik ve kalsiyum homeostazisinin korunmasında büyük öneme sahip olan steroid yapıda bir hormondur (12,13). Bununla birlikte güncel literatürde D vitamininin antiinflamatuvar ve antifibrotik etkilerinin de olduğu, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Bu etkileri, kronik karaciğer hastalıklarının nedenleri ve tedavisi ile ilişkilendirilmiştir (14). D vitamini

seviyeleri, ICP tanısı almış gebelerde de araştırılmış ve normal gebelere göre daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür (15-17). Ek olarak, D vitamini eksikliğinin, onkolojik, nörolojik, kardiyovasküler ve otoimmün temelde birçok farklı hastalık ile ilişkisi gösterilmiştir. Bununla birlikte, D vitamininin potansiyel malignite önleyici, iyileştirici veya süreci yavaşlatıcı etkilerini değerlendiren çok sayıda çalışma yapılmış, ancak D vitamininin kanser hücrelerindeki etkisi ile ilgili net bir fikir birliği sağlanamamıştır (18,19).

Geçtiğimiz yıllarda yapılan bir çalışma, etinil östradiol gibi kolestaza sebep olduğu bilinen maddelerin HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde ilgili genlerin ifadesine olan etkilerini, insan kolestaz örneklerindeki gen ifadesi profili ile karşılaştırmış ve farklı şekilde ifade edilen genlerde benzerlik bulmuştur (20). Progesteronun karaciğer hasarına yol açtığı bilinmekle birlikte, D vitamini ve progesteronun kanser ile ilişkisini bir arada inceleyen güncel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, progesteronun HepG2 hücreleri proliferasyonu ve karaciğer enzim aktivitelerine etkisini belirlemeyi, bununla birlikte progesteronun bu hücrelerde sebep olabileceği sitotoksisteye karşı D vitamininin koruyucu rolü olup olmadığını araştırmayı amaçlamıştır. Bu doğrultuda, deney ve kontrol gruplarına progesteron ve D vitamini tek başlarına veya birlikte uygulanmış, HepG2 hücre canlılığı, morfolojik özellikleri ve karaciğer enzim aktivite düzeyleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Metod

### Hücre Kültürü

Çalışmamızda HepG2 hücre hattı (American Type Cell Culture, ATCC) kullanıldı. Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM, Capricorn, Almanya), % 10 fetal bovine serum (FBS, Gibco, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD) ile besiyeri hazırlandı. HepG2 hücreleri 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda (Panasonic, Japonya) inkübe edildi. Ortalama %70-80 konfluent hücreler pasajlandı.

### Progesteronun Eklenmesi ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

HepG2 hücreleri 12 kuyucuklu plakalara eşit miktarda (150.000 hücre/1mL) ekildi. Ertesi gün Depo-Provera (DP; etkin madde: Medroksiprogesteron asetat (MPA) 150 mg/mL; Pfizer, ABD) 20 µM, 50 µM,

400 µM, 1 mM, 2mM dozlarda kuyucuklara eklendi. İlaç eklenen plakalar hücre sayımı öncesi 24 saat 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübatörde tutuldu. 450 nm dalga boyunda DP ışınması gözlemlendiği için, HepG2 hücrelerinin canlılığı Tripan mavisi (0.4%; Gibco, ABD) ile boyanıp değerlendirildi (21). Kontrol gruplarının hücre canlılığı %100 varsayıldı.

#### *D vitamininin Eklenmesi ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi*

Öncelikle uygulanacak D vitamini dozunun belirlenmesi için hücre sayım kiti-8 (CCK-8) ile hücre canlılığı tespit edildi. Sitotoksikite deneyi için 96 kuyucuklu plaka kullanıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve ilaç eklenmeden önce 24 saat inkübe edildi. Karşılaştırma amacıyla bazı kuyucuklara sadece besiyeri eklendi. D vitamini (DEVİT-3, etkin madde: vitamin D3 50.000 I.U./ 15 mL; Deva, Türkiye) 0,008-166,667 µM doz aralığında HepG2 hücrelerine eklendi ve 24 saatin sonunda her kuyucuğa 10 µL CCK-8 eklendi. 3-4 saat inkübe edilen hücreler Elisa Reader (BioTek Synergy H1) ile 450 nm dalga boyunda okundu.

D vitamininin progesteron uygulanan HepG2 hücrelerine etkisini değerlendirmek için 1 mM veya 2 mM DP, 2,5 µM D vitamini ile birlikte hücre ortamlarına eklendi. 24 saat sonra hücre canlılığı Tripan mavisi ile değerlendirildi.

#### *Karaciğer Fonksiyon Testleri*

Çalışmamızda karaciğer fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi için 6 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Hücre sayımı sonrası her kuyucuğa eşit olacak şekilde 5x10<sup>5</sup> hücre/2 mL ekim yapıldı. Yirmi dört saat sonrasında kuyucuklara 1 mM veya 2 mM DP, 2,5 µM D vitamini ile birlikte eklendi. 24 saat sonrasında kuyucuklardaki hücreler ve besiyerleri alınıp falkon tüplere aktarıldı. Hücreler üç kere sıvı nitrojende dondurulup 37°C'de çözüldü ve 400 g'de 4 dk santrifüj edildi. Elde edilen hücre kültürü süpernatantlarından aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktiviteleri ölçümleri spektrofotometrik yöntemle otoanalizörde (Roche Cobas Integra 400) üreticinin tarif ettiği direktiflere göre yapıldı (22).

#### *İstatistik Analizler*

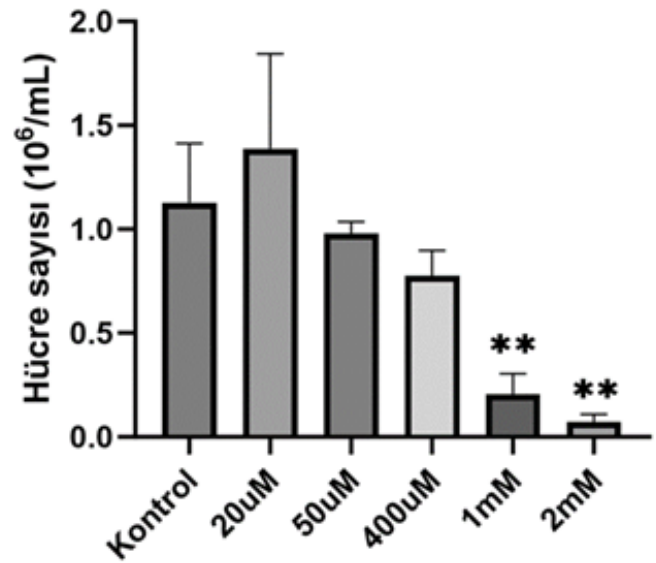
Verilerin tüm istatistiksel analizleri ve grafikler halinde gösterilmesi için GraphPad Prism 10.0 (San

Diego, CA, USA) yazılımı kullanıldı. Değişkenlerin normallik testleri için Shapiro-Wilk W testi uygulandı. Normal dağılım gösteren veriler arasında gruplar arası karşılaştırması tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### **Bulgular**

##### *Progesteronun HepG2 Hücre Canlılığına Etkisi*

HepG2 hücrelerine artan konsantrasyonlarda DP uygulandığında (20 µM, 50 µM, 400 µM, 1 mM ve 2 mM), 1 mM ile 2 mM DP uygulamalarının kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür (sırasıyla  $p=0.0038$  ve  $p=0.0012$ ; Şekil I). Kontrol grubu ile 20 µM, 50 µM ve 400 µM DP dozları kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0.7369$ ,  $p=0.9640$  ve  $p=0.4594$ ).



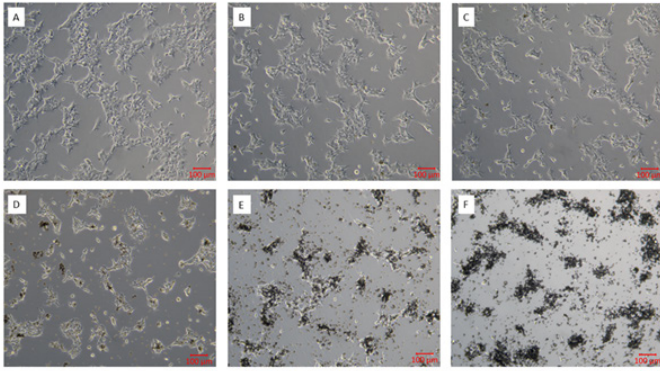
**Şekil I.** Kontrol grubu ve artan dozlarda DP uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre sayıları (10<sup>6</sup>/mL). \*\* $p < 0,01$ .

24 saat progesteron uygulamaları sonunda hücreler faz-kontrast mikroskobu ile görüntülendi (10X) ve artan progesteron maruziyeti ile hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil II).

##### *D Vitamininin HepG2 Hücre Proliferasyonuna Etkisi*

D vitamini dozlarının belirlenmesi için yapılan sitotoksikite testi sonucunda, 0,008-166,667 µM doz aralığında HepG2 hücrelerinde sitotoksik bir etki bulunmadı ( $p=0.1954$ ; Şekil III). Çalışmada kullanılacak D vitamini dozu 2,5 µM olarak belirlendi.

### Progesteron ve D vitamininin HepG2 Hücre Canlılığına Etkisi



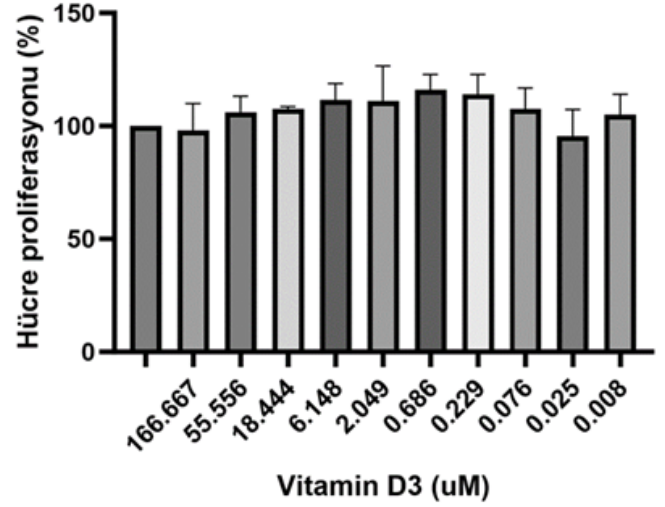
**Şekil II.** HepG2 hücrelerine artan dozlarda uygulanan progesteronun 24 saat sonra faz-kontrast mikroskobu görüntüleri (10X) (A. Kontrol, B. 20 µM DP, C. 50 µM DP, D. 400 µM DP, E. 1mM DP, F. 2 mM DP) (DP: Depo Provera).

Progesteronun HepG2 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin önlenmesinde D vitamininin olası etkileri araştırıldı. Yalnızca 2,5 µM vitamin D3 eklenen HepG2 hücrelerinin, kontrol grubuna benzer şekilde iğsi formda yüzeyde düz bir tabaka halinde yayıldığı görüldü (Şekil IV A-F). 1 mM DP uygulanan hücreler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre sayısında anlamlı bir azalma bulundu ( $p=0.0005$ ; Şekil IV G). Benzer şekilde 1 mM DP + 2,5 µM D vitamini eklenen grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısında anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p=0.0016$ ) (Şekil IV G). 1 mM DP ve 2,5 µM vitamin D3 birlikte uygulandığında, tek başına 1 mM DP uygulanmış gruba göre daha fazla hücre yoğunluğu gözlenmiş olmasına rağmen (Şekil IV B ve IV E), hücre sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.9465$ ). D vitamini, 2mM DP uygulanan grupta da hücre sayısında bir farka yol açmamıştır ( $p>0.999$ ). Her iki grupta hücreler benzer şekilde iğsi formlarını kaybetmiş ve yüzeyden ayrılmıştır (Şekil IV C ve IV F).

### Progesteron ve D vitamininin AST, ALT ve LDH Değerlerine Etkisi

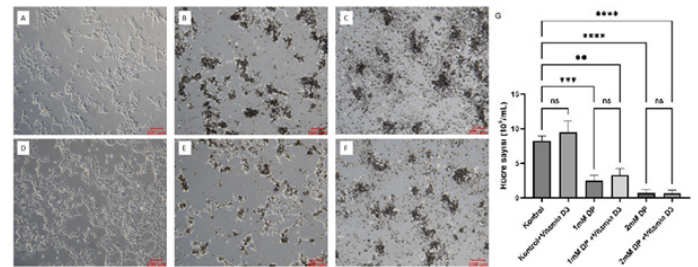
Yapılan gruplar arası karşılaştırmada AST değerleri arasında anlamlı fark bulundu ( $p=0.0002$ ). 1mM veya 2mM DP tek başına uygulanan grupların kontrol grubuna kıyasla AST değerleri anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0.0035$  ve  $p=0.0029$ ). Bununla birlikte 1 mM ve 2mM DP uygulanan hücrelerde D vitaminin AST düzeyine bir etkisi olmadığı görüldü (1mM DP

ve 1mM DP +Vitamin D3 grupları arasında  $p>0.999$ ; 2mM DP ve 2mM DP+Vitamin D3 grupları arasında  $p=0.5303$ ; Şekil V A).



**Şekil III.** Kontrol ile farklı dozlarda D vitamini uygulanan HepG2 hücrelerinin proliferasyonu (%).

ALT değerleri, D vitamini uygulanan ve uygulanmayan bütün gruplarda karşılaştırıldı ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0.4398$ ; Şekil V B).

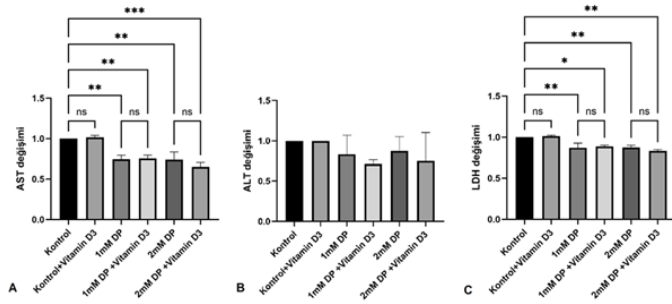


**Şekil IV.** Kontrol grubu ve progesteron/D vitamini uygulanan HepG2 hücre gruplarının faz-kontrast mikroskobu görüntüleri (A. Kontrol B. 1 mM DP C. 2 mM DP D. Kontrol+2,5 µM vit. D3 E. 1 mM DP+2,5 µM vit. D3 F. 2 mM DP+2,5 µM vit. D3) (DP: Depo Provera, vit. D3: D vitamini, G. Progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası HepG2 hücre sayıları (10<sup>5</sup>/mL). \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  ve \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns=anlamlılık yok).

LDH değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark bulundu ( $p=0.0005$ ). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, yalnızca 1 mM veya 2 mM DP uygulanan gruplarda LDH aktivite seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü (sırasıyla  $p=0.0054$  ve  $p=0.0069$ ; Şekil V C). DP uygulanan hücrelerde D vitaminin LDH aktivite düzeyine bir etkisi olmadığı görüldü (1 mM DP ve 1 mM DP + Vitamin D3 grupları

arasında  $p=0.9910$ ; 2 mM DP ve 2 mM DP + Vitamin D3 grupları arasında  $p=0.6390$ ).

Yalnızca D vitamini uygulanan hücrelerde AST, ALT ve LDH enzimleri aktivite değerleri kontrol grubu hücrelerinde elde edilen değerlere benzer bulundu.



**Şekil V.** A. Progesteron/D vitamini uygulanan gruplarda AST aktivite düzeylerinin karşılaştırılması. B. Progesteron/D vitamini uygulanan gruplarda ALT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması.  $p>0.05$ . C. Progesteron/D vitamini uygulanan gruplarda LDH aktivite düzeylerinin karşılaştırılması. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . ns=anlamlılık yok.

## Tartışma

Progesteronun kendisinin ya da ara metabolitlerinin, DILI ve ICP ile ilişki olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (8,9,11,23). Ayrıca dişi farelerde yapılan bir çalışmada, progesteronun inflamasyonu modüle ederek karaciğer hasarını şiddetlendirdiği bildirilmiştir (24). Son zamanlarda yapılan farklı çalışmalarda, preterm doğum riskini azaltmak için uygulanan progesteron takviyelerinin kolestaz riskini artırabileceği üzerinde durulmuştur (7,8,23).

Kalsiyum ve fosfor metabolizmasındaki önemi bilinen D vitamini yağda eriyen vitaminlerdendir ve eksikliği önemli bir küresel sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (25). D vitamininin karaciğer üzerinde antiinflamatuvar etkisi olduğu, kronik karaciğer hastalığı ve siroz hastalarında D vitamini eksikliğinin yaygın olduğu bildirilmiştir (26,27). Klinik araştırmalarda ve kronik karaciğer hastalığının hayvan modellerinde D vitamin takviyesinin yararlı etkileri bildirilmiştir (28). Ayrıca D vitamininin insülin direnci, obezite, kanser ve kardiyovasküler hastalıkları önlemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (29). Mevcut çalışmada HepG2 hücre hattı kullanılarak, progesteronun hücre canlılığı ve karaciğer enzim aktiviteleri düzeylerine etkisini belirlemek, bununla birlikte D vitamininin progesteron uygulamasının sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri önlemedeki etkinliğini incelemek

hedeflenmiştir. Kontrol grubuna göre yapılan kıyaslamalarda 1 mM ve 2 mM progesteron uygulanmış HepG2 hücrelerinin canlılığının azaldığı ve karaciğer enzimleri AST ve LDH aktivite değerlerinde düşüşe yol açtığı görülmüştür. Geçtiğimiz yıllarda yapılan bir çalışmada, benzer şekilde progesteronun NCI-H295R insan adrenokortikal karsinoma hücrelerinde ve over karsinomu primer hücrelerinde hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (30,31). HepG2 hücrelerinde epirubisin ve progesteron uygulaması sonucu sitotoksik ve apoptotik değişikliklerin gözlenmesi amaçlanan bir başka çalışmada, 50  $\mu\text{M}$  progesteron ve 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  epirubisin 48 saat inkübasyon sonrası sitotoksikite ve apoptozu arttığı görülmüştür (32). Diğer yandan, düşük doz progesteron (5 nM - 1  $\mu\text{M}$  aralığı) uygulanan insan over kanseri hücre hatlarında hücre canlılığında bir azalma bildirilmemiş, fakat hücre migrasyonunda anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Bu etkinin progesteron uygulaması sonrası bozulan hücre polaritesi sebebi ile gözlemlendiği düşünülmektedir (33). Progesteronun antitümör etkileri esas olarak MDA-MB-468 ve SKBR3 gibi meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiş ve apoptoz indüklenmesinin özellikle membran progesteron reseptörleri aracılığı ile olduğu bildirilmiştir (34). Benzer şekilde, pankreas adenokarsinom hücre hattında da progesteron uygulaması (1  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$ ) hücre proliferasyonunda azalmaya yol açmıştır ve membran progesteron reseptörleri aktivasyonunun bu etkiye aracılık edebileceği düşünülmektedir (35). Sistemik dolaşımda ılımlı artan karaciğer enzim aktivite düzeyleri öncelikle karaciğer hasarına işaret etmektedir. Mevcut çalışmada sitotoksik dozlarda uygulanan progesteronun karaciğer enzim düzeylerinde anlamlı olarak azalmaya yol açmasının sebebi olarak, progesteronun hücre canlılığını belirgin olarak azaltması ve sekonder aşamada enzimleri sentezleyecek yeterli fonksiyonel hepatosit olmadığı düşünülmektedir. Ancak, son yıllarda yapılan başka bir çalışmada, kadmiyum ve progesteron uygulanan sıçanlarda karaciğer enzim düzeyleri incelendiğinde, kadmiyum uygulamalarının ALT, AST ve ALP aktivite değerlerinde kontrole kıyasla anlamlı bir artışa sebep olduğu, kadmiyum ile progesteron birlikte uygulandığında bu değerlerin önemli ölçüde azaldığı, progesteronun oksidatif stresi azalttığı gözlenmiştir

(36).

D vitamininin tek başına uygulandığında HepG2 hücrelerinde sitotoksositeye yol açmadığı ve ALT, AST ve LDH aktivite değerlerini etkilemediği görülmüştür. Ayrıca DP ile birlikte uygulandığında da hücre canlılığı ve karaciğer enzim düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu veriler ışığında, kullanılan doz ve inkübasyon sürelerinde D vitamininin progesteronun sebep olduğu sitotoksik etkileri engellemede etkili olmadığı görülmüştür.

Bu sonuçlardan farklı olarak Gocek ve ark. yapmış olduğu çalışmada, D vitamininin meme, prostat ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (37). MCF-7 hücrelerine salinomisin ve/veya D3 vitamini uygulanan bir diğer çalışmada da kombinasyon uygulamasının hücre canlılığını zamana ve doza bağlı azalttığı gözlenmiştir (38). Zhang ve ark. çalışmasında da benzer şekilde over kanseri hücrelerinde D vitamininin apoptozu engellediği gösterilmiştir (39). Kısa bir süre önce yayınlanmış bir çalışmada da D vitamini uygulaması CD133+/CD44 + meme kanseri hücrelerinde SOX2 ve OCT4 kök hücre belirteçlerinin ifadesinde anlamlı bir azalma, daha düşük hücre proliferasyonu ve daha fazla apoptoz ile sonuçlanmıştır (40). Meme kanseri hücreleri ile gerçekleştirilen bir başka çalışma da benzer şekilde D vitamininin hücre canlılığını azalttığını ve bu etkiye esas olarak apoptozu ve hücre döngüsü tutulumunu indükleyerek sebep olduğunu göstermiştir (41). Diğer yandan, melatonin ve D vitamininin HepG2 ve Hep3B hücre hatlarında CCl4 kaynaklı sitotoksosite üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise melatoninin ve D vitamininin hücreleri CCl4 kaynaklı hepatotoksiteden koruduğu bildirilmiştir (42). D vitaminin, hem doğrudan neoplastik hücrelerin farklılaşmasını, çoğalmasını ve apoptozunu kontrol ederek hem de dolaylı olarak malign tümörlerin mikro çevresine ait immün hücreleri düzenleyerek kanser karşıtı etkilere sahip olduğu belirtilmektedir (43). Bununla birlikte verilen örneklerden farklı olarak D vitamininin kanser hücrelerine etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (44). Tüm bu tartışmalı sonuçlar nedeniyle D vitamininin kanser hücrelerindeki etkisi tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Sonuç olarak, progesteron uygulamaları HepG2 hücre canlılığı ve karaciğer enzimleri AST ve LDH aktivite değerlerinde anlamlı bir azalmaya yol

açmıştır. Farklı dozlarda D vitamini tek başına uygulandığında HepG2 hücrelerinde sitotoksik bir etki göstermemiş olmakla birlikte progesteronun neden olduğu sitotoksositeyi önlemede de başarı gösterememiştir. Kullanılan doz ve inkübasyon sürelerinde D vitamininin progesteronun sebep olduğu sitotoksik etkileri engellemede rolü olmadığı düşünülmekle birlikte, farklı dozlarda ve inkübasyon sürelerinde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Kaynaklar

1. Sundström-Poromaa I, Comasco E, Sumner R, Luders E. Progesterone – Friend or foe? *Frontiers in Neuroendocrinology* 2020;59:100856.
2. Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015;94(Suppl 161):8–16.
3. Manocha A, Kankra M, Singla P, Sharma A, Ahirwar AK, Bhargava S. Clinical significance of reproductive hormones. *Current Medicine Research and Practice* 2018;8(3):100–108.
4. Xu L, Yuan Y, Che Z, et al. The Hepatoprotective and Hepatotoxic Roles of Sex and Sex-Related Hormones. *Front Immunol* 2022;13:939631.
5. Van Der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, Metwally M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;7:CD009154.
6. Tetrushvili N, Domar A, Bashiri A. Prevention of Pregnancy Loss: Combining Progestogen Treatment and Psychological Support *JCM*. 2023;12(5):1827.
7. Tsur A, Leonard SA, Kan P, et al. Vaginal Progesterone Is Associated with Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Am J Perinatol* 2023;40(11):1158–1162.
8. Zipori Y, Bachar G, Farago N, et al. Vaginal progesterone treatment for the prevention of preterm birth and intrahepatic cholestasis of pregnancy: A case-control study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2020;253:117–120.
9. Kinci MF, Şehirli Kinci Ö, Karakaş Paskal E. Gebeliğin İntrahepatik Kolestazi. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi* 2021 Aug 31;8(2):158–162.
10. Yılmaz S, Üstün Y, Hızlı D, Deveer R. Gebeliğin İntrahepatik Kolestazi. *Gazi Med J*. 2012;(23):138–144.
11. Choudhary NS, Bodh V, Chaudhari S, Saraf N, Saigal S. Norethisterone Related Drug Induced Liver Injury: A Series of 3 Cases. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2017;7(3):266–268.
12. Giustina A, Lazaretti-Castro M, Martineau AR, Mason RS, Rosen CJ, Schoenmakers I. A view on vitamin D: a pleiotropic factor? *Nat Rev Endocrinol* 2024. doi: 10.1038/s41574-023-00942-0. Epub ahead of print. PMID: 38253860.
13. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. *IJMS* 2020;21(18):6573.
14. Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of Hepatology* 2012;57(4):897–909.
15. Celik S, Golbasi H, Gulucu S, et al. Role of Vitamin B12 and Vitamin D levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy and correlation with total bile acid. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2022;42(6):1847–1852.
16. Gençosmanoğlu Türkmen G, Vural Yılmaz Z, Dağlar K, et al. Low serum vitamin D level is associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J of Obstet and Gynaecol* 2018;44(9):1712–1718.
17. Wikström Shemer E, Marschall H. Decreased 1,25-dihydroxy vitamin D levels in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89(11):1420–1423.
18. Seraphin G, Rieger S, Hewison M, Capobianco E, Lisse TS. The impact of vitamin D on cancer: A mini review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2023;231:106308.
19. Young MRI, Xiong Y. Influence of vitamin D on cancer risk and treatment: Why the variability? *Trends Cancer Res* 2018;13:43–53.
20. Van Den Hof WFPM, Coonen MLJ, Van Herwijnen M, et al. Validation of gene expression profiles from cholestatic hepatotoxicants in vitro against human in vivo cholestasis. *Toxicology in Vitro* 2017;44:322–329.
21. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *CP in Immunology* [Internet]. 1997 Mar [cited 2024;21(1)]. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.ima03bs21>
22. Ozgur E, Guler G, Kismali G, Seyhan N. Mobile Phone Radiation Alters Proliferation of Hepatocarcinoma Cells. *Cell Biochem Biophys* 2014;70(2):983–991.
23. Estiú MC, Monte MJ, Rivas L, et al. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on the altered progesterone and bile acid homeostasis in the mother placenta foetus trio during cholestasis of pregnancy. *Brit J Clinical Pharma* 2015;79(2):316–329.
24. Toyoda Y, Endo S, Tsuneyama K, et al. Mechanism of Exacerbative Effect of Progesterone on Drug-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences* 2012;126(1):16–27.
25. Du T, Xiang L, Zhang J, et al. Vitamin D improves hepatic steatosis in NAFLD via regulation of fatty acid uptake and  $\beta$ -oxidation. *Front Endocrinol* 2023;14:1138078.
26. Bozic M, Guzmán C, Benet M, et al. Hepatocyte vitamin D receptor regulates lipid metabolism and mediates experimental diet-induced steatosis. *Journal of Hepatology* 2016;65(4):748–757.
27. Eitah HE, Attia HN, Soliman AAF, et al. Vitamin D ameliorates diethylnitrosamine-induced liver preneoplasia: A pivotal role of CYP3A4/CYP2E1 via DPP-4 enzyme inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2023;458:116324.
28. Goto RL, Tablas MB, Prata GB, et al. Vitamin D3 supplementation alleviates chemically-induced cirrhosis-associated hepatocarcinogenesis. *The Journal of Steroid*



Biochemistry and Molecular Biology 2022;215:106022.

29. Gholamalizadeh M, Jarrahi AM, Akbari ME, et al. Association between FTO gene polymorphisms and breast cancer: the role of estrogen. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2020;15(2):115-121.

30. Fragni M, Fiorentini C, Rossini E, et al. In vitro antitumor activity of progesterone in human adrenocortical carcinoma. *Endocrine* 2019;63(3):592-601.

31. Pedernera E, Gómora MJ, Morales-Vásquez F, Pérez-Montiel D, Mendez C. Progesterone reduces cell survival in primary cultures of endometrioid ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2019;12(1):15.

32. Chang WT, Lin HL, Chang KL, et al. Progesterone increases epirubicin's apoptotic effects in HepG2 cells by S phase cell cycle arrest. *Hepatogastroenterology* 2010;57(97):107-113.

33. Lima MA, Silva SV, Jaeger RG, Freitas VM. Progesterone decreases ovarian cancer cells migration and invasion. *Steroids* 2020;161:108680.

34. Dressing GE, Alyea R, Pang Y, Thomas P. Membrane Progesterone Receptors (mPRs) Mediate Progestin Induced Antimorbidity in Breast Cancer Cells and Are Expressed in Human Breast Tumors. *HORM CANC* 2012;3(3):101-112.

35. Goncharov AI, Maslakova AA, Polikarpova AV, et al. Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation— R elated genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2017 Jan;165:293-304.

36. Alese MO, Bamisi OD, Alese OO. Progesterone modulates cadmium-induced oxidative stress and inflammation in hepatic tissues of Wistar rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2021;14(10):1048-1055.

37. Gocek E, Studzinski GP. Vitamin D and differentiation in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2009;46(4):190-209.

38. Marques LA, Semprebón SC, Biazi BI, et al. Vitamin D3 and Salinomycin synergy in MCF-7 cells cause cell death via endoplasmic reticulum stress in monolayer and 3D cell culture. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2022;452:116178.

39. Zhang X, Li P, Bao J, et al. Suppression of Death Receptor-mediated Apoptosis by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Revealed by Microarray Analysis. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(42):35458-35468.

40. Zheng W, Peng W, Qian F, et al. Vitamin D suppresses CD133+/CD44 + cancer stem cell stemness by inhibiting NF-κB signaling and reducing NLRP3 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2024 Mar 8 [cited 2024 May 7]; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00280-024-04660-w>

41. Veeresh PKM, Basavaraju CG, Dallavalasa S, et al. Vitamin D3 Inhibits the Viability of Breast Cancer Cells In Vitro and Ehrlich Ascites Carcinomas in Mice by Promoting Apoptosis and Cell Cycle Arrest and by Impeding Tumor Angiogenesis. *Cancers* 2023;15(19):4833.

42. Özerkan D, Özsoy N, Yılmaz 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(6):995-1002.

43. Carlberg C, Velleuer E. Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochemical Pharmacology* 2022;196:114735.

44. Öner Ç, İsan H, Aktaş RG, Çolak E. Vitamin D'nin Hepatoselüler Karsinom Üzerindeki Etkisi. *Osmangazi Journal of Medicine* 2020;42(3):301-310.