

**PROGESTERON VE D VİTAMİNİNİN KARACİĞER KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melek Naz AKKUŞ
211503105

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Danışman: Doç. Dr. Yaprak DÖNMEZ ÇAKIL

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Eylül, 2023

PROGESTERON VE D VİTAMİNİNİN KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melek Naz AKKUŞ

211503105

ORCID: 0009-0001-3032-3498

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Doç. Dr. Yaprak Dönmez Çakıl

İstanbul

T.C. Maltepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eylül, 2023



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.



ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.



TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca her konuda bana destek olan, engin bilgilerini ve tecrübesini benden esirgemeyen, çalışma süreci boyunca her soruma sabırla cevap veren ve tecrübe kazanmam için bütün çalışmalarda yanımda olan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Yaprak DÖNMEZ ÇAKIL'a verdiği destekten ve emekten dolayı teşekkür ederim.

Çalışma sürecimde takıldığım, anlamadığım her konuda desteğini benden esirgemeyen, deney sürecinde maddi ve manevi destek sunan, tez sürecinde fikir ve önerilerini esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa Erinç SİTAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini sunan değerli hocam Prof. Dr. Mehmet CİNCİK'a teşekkür ederim.

Deney sürecim boyunca tüm desteklerini sunan, yardımlarını esirgemeyen Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi (MÜKKAM) ekibine teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her alanında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olarak beni destekleyen ve sevgisiyle güç veren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Melek Naz AKKUŞ

Eylül, 2023

ÖZET

PROGESTERON VE D VİTAMİNİNİN KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melek Naz Akkuş

Yüksek Lisans Tezi

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Doç. Dr. Yaprak Dönmez Çakıl

Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2023

Amaç: Kolestaz, karaciğer hastalıklarının en yaygın semptomlarından birisidir. Progesteronun, gebelik sürecinde kullanılmasının kolestaz riskini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda, insan kolestaz örnekleri ile ilgili genlerin ifadesinde benzerlik gösterdiği bildirilmiş olan HepG2 hücre hattı model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, progesteronun HepG2 hücre proliferasyonu ve karaciğer enzim düzeylerine etkilerini belirlemek, ayrıca D vitamininin progesteron muamelesinin sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri engellemede rolü var mıdır incelemektir. **Yöntem:** Progesteron ve D vitamini tek başına veya birlikte uygulandıktan sonra HepG2 hücre canlılığı ve karaciğer enzimleri alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrogenazın (LDH) düzeyleri saptanmıştır. **Bulgular:** Hücrelere uygulanan progesteron dozlarından sadece 1mM ve 2 mM uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Ek olarak, 1mM ve 2mM progesteron uygulaması AST ve LDH değerlerini anlamlı olarak düşürmüştür. D3 vitamininin 0,008 µM ve 166,667 µM dozları aralığında HepG2 hücrelerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, D3 vitamini uygulanmış hücrelerde ALT, AST ve LDH değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Progesteronun tek uygulandığı hücrelerle, progesteron ve D vitamininin birlikte uygulandığı hücreler arasında hücre canlılığı ve karaciğer enzim düzeyleri benzer bulunmuştur. **Sonuç:** Kullanılan doz ve inkübasyon sürelerinde D vitamininin progesteron muamelesinin sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri engellemede rolü olmadığı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Progesteron, D vitamini, HepG2, hepatosellüler karsinom

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PROGESTERONE AND VITAMIN D ON LIVER CANCER CELLS

Melek Naz Akkuş

Master Thesis

Interdisciplinary Clinical Embryology Department

Clinical Embryology Master's Program With Thesis

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yaprak Dönmez Çakıl

Maltepe University Graduate School, 2023

Aim: Cholestasis is a common symptom of liver diseases. Various studies demonstrate that the use of progesterone during pregnancy increases the risk of cholestasis. In our study, the HepG2 cell line, which has been reported to show a gene expression profile similar to that of human in vivo cholestasis, was used as a model. The aim of this study was to determine the effects of progesterone on HepG2 cell proliferation and liver enzyme levels and to examine whether vitamin D has a role in preventing the possible cytotoxic effects of progesterone treatment. **Method:** HepG2 cell viability and levels of liver enzymes ALT, AST, and LDH were determined after progesterone and vitamin D administration alone or together. **Results:** 1mM and 2mM progesterone treatments led to a significant decrease in cell viability compared to the untreated control cells. In addition, 1mM and 2mM progesterone administration significantly decreased AST and LDH values. Vitamin D3 did not have a cytotoxic effect on HepG2 cells in the range of 0.008 μ M and 166.667 μ M. In addition, no significant difference was observed in ALT, AST, and LDH values in cells treated with vitamin D3 alone. Cell viability and liver enzyme levels were found to be similar between cells, that were treated with progesterone alone or in combination with vitamin D. **Conclusion:** Vitamin D does not have a role in preventing possible cytotoxic effects that may be caused by progesterone treatment at the doses and incubation times used.

Keywords: Progesterone, vitamin D, HepG2, hepatocellular carcinoma

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ	1
1.1. Problem	1
1.2. Amaç	2
1.3. Önem	3
1.4. Varsayımlar	3
1.5. Sınırlıklar.....	3
1.6. Tanımlar	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Progesteron.....	5
2.2. D Vitamini.....	5
2.3. Karaciğer	7
2.4. Karaciğer Kanseri.....	8
2.5. Safra Oluşumu.....	10
2.6. Kolestaz.....	11
2.6.1. Progresif familial intrahepatik kolestaz	12

2.6.2.	Gebeliğin intrahepatik kolestazı (Intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)	14
2.6.3.	İlacı bağlı kolestaz (Drug-induced cholestasis)	15
2.7.	Proģesteron ile ICP Arasındaki İlişki.....	16
2.8.	D Vitamini ile ICP Arasındaki İlişki.....	18
2.9.	HepG2 Hücresel Hattı	19
3.	YÖNTEM	22
3.1.	Araştırma Modeli	22
3.2.	Evren ve Örneklem	22
3.3.	Veriler ve Toplanması.....	22
3.3.1.	Kullanılan kimyasallar ve cihazlar	22
3.3.2.	Kullanılan ilaçlar.....	23
3.3.3.	Hücresel hattı ve kültür koşulları	23
3.3.4.	Hücresel pasajlanması.....	25
3.3.5.	Hücresel dondurulması	25
3.3.6.	Hücresel çözülmesi	26
3.3.7.	Trypan mavisi ile hücre sayımı ve hücre canlılığının belirlenmesi	26
3.3.8.	İlaç eklenmesi	27
3.3.9.	HepG2 hücre canlılığının CCK-8 ile tespiti	29
3.3.10.	Biyokimyasal testler.....	30
3.4.	Verilerin Çözümlemesi ve Yorumlanması.....	31
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1.	Bulgular.....	32

4.1.1.	Progesteronun HepG2 hücrelerinde proliferasyona etkisi	32
4.1.2.	Progesteronun HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi	33
4.1.3.	D vitamininin HepG2 hücrelerinde proliferasyona etkisi	34
4.1.4.	D vitamini ve progesteronun HepG2 hücre canlılığına etkileri	35
4.1.5.	Karaciğer fonksiyon testleri	38
4.1.5.1.	ALT değerleri	38
4.1.5.2.	AST değerleri	39
4.1.5.3.	LDH değerleri	41
4.2.	Tartışma	43
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR		50
ÖZGEÇMİŞ		72

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Deney gruplarının birbirleriyle kıyaslanması sonucu elde edilen P değerleri.	37
Tablo 2. Belirtilen grupların AST değerlerinin kıyaslanması sonucunda oluşan P değerleri.....	40
Tablo 3. Belirtilen grupların AST değerlerinin kıyaslanması sonucunda oluşan P değerleri.....	42



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Ergosterolün ergokalsiferole ve 7-dehidrokolesterolün kolekalsiferole çevrilmeleri.	6
Şekil 2. D vitaminin biyosentezi.....	7
Şekil 3. PFIC: Tipler, ilgili genler ve taşıma kusurları (BA: safra asidi; PC: fosfatidilkolin).	13
Şekil 4. PFIC olgu tiplerinin özellikleri (AFP: Alfa fetoprotein, OR: Otozomal resesif, ATP: Antiapoptotik)..	14
Şekil 5. Hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (10X).	20
Şekil 6. Hem in vivo kolestazda hem de kolestatik bileşiklere maruz kalan HepG2 hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilen genler.	21
Şekil 7. Thoma lamı.....	27
Şekil 8. Progesteronun HepG2 hücrelerinde etkisi için kullanılan dozlar (DP: Depo Provera).....	28
Şekil 9. Progesteron ve D3 vitamininin ayrı olarak veya birlikte etkilerini görmek amacıyla oluşturulmuş plaka (DP: Depo Provera).	29
Şekil 10. Biyokimyasal testler için kullanılan dozlar (DP: Depo Provera).	31
Şekil 11. İlaç uygulanmamış (kontrol) veya 24 saat boyunca farklı dozlarda medroksiprogesteron asetat uygulanmış HepG2 hücrelerinde proliferasyon (%).	32
Şekil 12. HepG2 hücrelerine farklı dozlarda uygulanan progesteron sonucu hücrelerin 24 saat sonraki 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).....	33
Şekil 13. Artan konsantrasyonlarda progesteron uygulanmış HepG2 hücrelerinde hücre sayısı (10 ⁶ /mL). Kontrol grubuyla kıyasla gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **P<0,01.	34
Şekil 14. İlaç uygulanmamış (kontrol) veya farklı dozlarda Vitamin D3 ile 24 saat muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin proliferasyonu (%). Kontrol grubuyla kıyasla gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova kullanılarak analiz edilmiştir. P>0,05.....	35

Şekil 15. Belirtilen dozlarda 24 saat progesteron ve/veya vitamin D3 uygulamaları sonrası HepG2 hücrelerinin 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: Vitamin D3).....	36
Şekil 16. Vitamin D3 ve/veya progesteron uygulanmış HepG2 hücrelerinde hücre sayıları ($10^5/\text{mL}$). Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **P<0,01, ***P<0,001 ve ****P<0,0001. ns=anlamli değil.	37
Şekil 17. HepG2 hücrelerinde ALT düzeylerinin progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası karşılaştırılması. Gruplar arası farklar, tek yönlü Anova kullanılarak analiz edilmiştir P>0,05.	39
Şekil 18. HepG2 hücrelerinde AST düzeylerinin progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası karşılaştırılması. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **P<0,01, ***P<0,001. ns=anlamli değil.	40
Şekil 19. HepG2 hücrelerinde LDH düzeylerinin progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası karşılaştırılması. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. *P<0,05, **P<0,01. ns=anlamli değil.	42

KISALTMALAR

ICP	: İntrahepatik Gebelik Kolestazı
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
HepG2	: İnsan Hepatosellüler Karsinomu
BA	: Safra Asidi
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ALP	: Alkalen Fosfataz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
GGT	: Gama-Glutamil Transferaz
DILI	: İlaça Bağlı Karaciğer Hasarı
CCK-8	: Hücre Sayım Kiti-8
VDR	: D Vitamini Reseptörü
BSEP	: Safra Tuzu Eksport Pompası
MDR3	: Çoklu İlaç Direnç Proteini 3
UDCA	: Ursodeoksikolik asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Bovin Serum

MPA	: Medroksiprogesteron Asetat
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
CCA	: Kolanjiyokarsinom
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCV	: Hepatit C Virüsü
NAFLD	: Non Alkolik Karaciğer Yağlanması
PFIC	: Progresif Familyal İntrahepatik Kolestaz
CCL₄	: Karbon Tetraklorür
PGRMC1	: Progesteron Reseptörü Membran Bileşeni 1
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
CsA	: Siklosporin A
EE	: Etinil Östradiol
CPZ	: Klorpromazin

GİRİŞ

1.1. Problem

Progesteron, overlerde granüloza luteal hücreleri tarafından salgılanan bir steroid hormondur. Ovulasyon, üreme, meme bezi büyümesi ve hamileliğin sürdürülmesi progesteronun ana işlevleridir. Progesteronun birincil hedef dokuları endometrium, meme ve merkezi sinir sistemidir. Karaciğerde, progesteron östradiole inaktive edilir ve glukuronik asit ile kombinasyon halinde idrarla atılır (Garg vd., 2017; Singhal vd., 2016).

Kolestaz en basit ifadeyle safra yapımının ve akımının azalması olarak tanımlanır. Kolestazın klinik belirtileri, normalde safrayla atılan maddelerin yani bilirubin, safra asitleri ve kolesterol birikmesi nedeniyle ortaya çıkar. Bilirubinin birikmesi sarılığa ve koyu renkli idrara yol açar. Safra asitlerinin birikmesi kaşıntı ile ilişkilidir ve kolesterol birikimi hiperkolesterolemi ve ksantomlara neden olur (Karrer ve Bensard, 2000). Genellikle hasta başka bir hastalık için tetkik edilirken ya da rutin kontrollerde alkalen fosfataz (ALP) ve serum gama glutamil transpeptidaz (GGT) düzeyinde artış fark edilmesi ile tespit edilir (Heathcote, 2007).

İlaça bağlı karaciğer hasarı (drug-induced liver injury, DILI) kadınlarda genellikle erkeklerden daha ciddi seyretmektedir (Toyoda vd., 2012). Ayrıca, progesteronun kadınlarda DILI'yi indüklediği bildirilmiştir (Choudhary vd., 2017). Ek olarak, vajinal progesteron düzeyi ile gebeliğin intrahepatik kolestazı (Intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP) arasında anlamlı bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Tsur vd., 2023). ICP, gebeliğin ikinci yarısında vücutta yaygın kaşıntı ile ortaya çıkan bir karaciğer hastalığıdır. Gebeliğe bağlı en görülen karaciğer patolojisidir. ICP'ye artmış karaciğer enzimleri, safra asidi düzeyleri ve artan fetal riskler eşlik eder (Williamson ve Geenes, 2014) Preterm doğumu önlemek için uzun süreli günlük vajinal progesteron tedavisi alan gebe kadınlar artmış ICP riski altındadır (Zipori vd., 2020).

Patofizyolojisinde gebelikte artan östrojenin safra asitlerinin atılımını engellemesi rol oynar. Çoğul gebeliklerde daha sık gözlenmektedir. Bu nedenle artan östrojen hormon düzeyinin etiyolojisinde önemli olabileceği düşünülmektedir (Kinci vd., 2021). ICP'yi

progesteronun tetiklediğine dair bazı çalışmalar mevcuttur (Estiú vd., 2015; Kinci vd., 2021; Tsur vd., 2023; Zipori vd., 2020).

D vitamini, kemik ve kalsiyum homeostazisinin korunmasında önemli rol oynayan bir steroid hormondur (Saponaro vd., 2020). D vitamini ile ICP'nin ilişkili olduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur (Celik vd., 2022; Gençosmanoğlu Türkmen vd., 2018; Wikström Shemer ve Marschall, 2010). Ayrıca, D vitamini eksikliği kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (Gocek ve Studzinski, 2009; Pazdiora vd., 2011; Y. Zhang vd., 2021).

Karaciğer kanseri hücre hattı olan HepG2 bu çalışmada progesteron ve D vitamininin hücre proliferasyonu ve karaciğer enzim düzeylerine etkilerini inceleyebileceğimiz bir model olarak kullanılmıştır.

1.2. Amaç

ICP, gebelikte en sık görülen karaciğer hastalığıdır. Patofizyolojisinde gebelikte artan östrojenin safra asitlerinin atılımını engellemesi rol oynar. Çoğul gebeliklerde daha sık izlenmektedir. Bu nedenle etiyolojide artan östrojen hormon düzeylerinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Östrojen hormonu indirekt olarak plazma membran akışkanlığını bozarak kolestaza sebep olabilir (Kinci vd., 2021). Ayrıca ICP'yi progesteronun tetiklediğine de dair bazı çalışmalar mevcuttur (Estiú vd., 2015; Kinci vd., 2021; Tsur vd., 2023; Zipori vd., 2020). Erken gebelikte takviye olarak verilen progesteron hormonunun da aynı östrojen gibi kolestazı tetiklediği düşünülmektedir (Kinci vd., 2021).

HepG2 hücre hattı ile in vivo kolestaz örneklerinde ilgili genlerin ifadesi korelasyon göstermektedir (Van den Hof vd., 2017). Bu nedenle, çalışmamızda HepG2 hücre hattı model olarak kullanılmıştır.

Kolestaz, siroz ile sonuçlanabilen hepatotoksisite, kaşıntı, fetal büyüme geriliği ve vitamin malabsorpsiyonuna yol açar. Kolestaz tanılı hastalarda D vitamini eksikliği, D vitamini emilimini bozan intraluminal safra asidi eksikliği ile ilişkilidir. Ayrıca, şiddetli karaciğer yetmezliği olan bazı hastalarda, D vitamininin 25-hidroksivitamin D'ye (25-OHD) hepatik dönüşümü de bozulmuştur (Chongthavornvasana vd., 2023). Daha önce yapılan çalışmalarda, ICP tanısı almış hastalarda kontrol grubuna oranla D vitamini

anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Celik vd., 2022; Gençosmanoğlu Türkmen vd., 2018; Wikström Shemer ve Marschall, 2010).

Yapılan çalışmalar, özellikle gebeliğin erken döneminde maternal D vitamini düzeyi ile gebelik komplikasyonları, fetal gelişim, kemik gelişimi ve bağışıklık sisteminin olgunlaşması arasındaki ilişkiyi vurgulamaktadır (Dror, 2011).

Bu bağlamda bu çalışmanın amacı, model olarak kullanılacak olan HepG2 hücrelerinde;

- (i) Progesteronun hücre proliferasyonu ve karaciğer enzim düzeylerine etkilerini belirlemek
- (ii) D vitamininin progesteron muamelesinin sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri engellemede rolü var mıdır incelemektir.

1.3. Önem

Gebelik sürecinde kadınlarda progesteron hormon değerlerinin artması sonucu bazı çalışmalarda kolestaza yol açabildiği gözlenmiştir (Estiú vd., 2015; Kinci vd., 2021; Tsur vd., 2023; Zipori vd., 2020). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda D vitamini eksikliği ve ICP'nin ilişkili olabileceği bulunmuştur (Celik vd., 2022; Gençosmanoğlu Türkmen vd., 2018; Wikström Shemer ve Marschall, 2010). Literatürde progesteron ve D vitamini ile kolestaz arasındaki ilişkiyle ilgili kısıtlı sayıda yayın bulunmaktadır. Bu sebeple çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

1.4. Varsayımlar

Bir insan hepatoblastoma türevli hücre dizisi olan HepG2 hücreleri ile insan in vivo kolestaz örnekleri arasında ilgili genlerin ifadesi korelasyon göstermektedir (Van den Hof vd., 2017). Bu nedenle, HepG2 hücrelerinin çalışmamızda in vitro kolestaz modeli olarak kullanılabileceği varsayılmıştır.

1.5. Sınırlıklar

Çalışmamızın in vitro bir çalışma olması çalışmamızın sınırlılığıdır.

1.6. Tanımlar

HepG2 Hücre Hattı: İnsan hepatoma hücre hatları arasında, HepG2 hücreleri en iyi karakterize edilendir.

Hücre Kültürü: Hücrelerin vücudun dışında özel koşullarda ve kontrollü şartlar altında büyütülmesidir. Hücre kültürü çalışmalarında hücreler laboratuvarında steril şartlarda büyütülmektedir.

Kolestaz: Gebelik dışı durumlarda da meydana gelebilen, safra akışındaki aksamaları tanımlamak için kullanılan sağlık problemlerinin genel adıdır. Karaciğer hastalıklarının en yaygın semptomlarından biridir.

İn vitro fertilizasyon (IVF): Bir yumurtanın sperm tarafından, vücut dışında suni olarak döllenmesi sürecidir. IVF, infertilite tedavisinde diğer yardımcı üreme yöntemleri başarısız olduğunda kullanılan önemli bir tedavi yöntemidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Progesteron

Luteal faz, ovulasyon ve menstrüasyon dönemi arasında geçen süredir. Bu süre yaklaşık 14 gün sürmektedir. Luteal faz, progesteron üretimini sağlayan korpus luteum oluşumu ile karakterizedir (Selam ve Topçuoğlu, 2004). Progesteron, korpus luteum ve ardından plasenta tarafından üretilen steroid yapıda bir hormondur (Romero ve Stanczyk, 2013). Progesteron, genellikle “gebelik hormonu” olarak bilinen bir hormondur (Şekerden vd., 2005). Endometriyumu embriyonun tutunması için ve gebelik için hazırlar, endometriyumda sekretuar değişiklikleri başlatır ve erken gebeliği destekler. Bunun yanında uterin kasları gevşetir ve maternal immün yanıtı düzenleyip fetal rejeksiyona engel olur (Miranda vd., 2006).

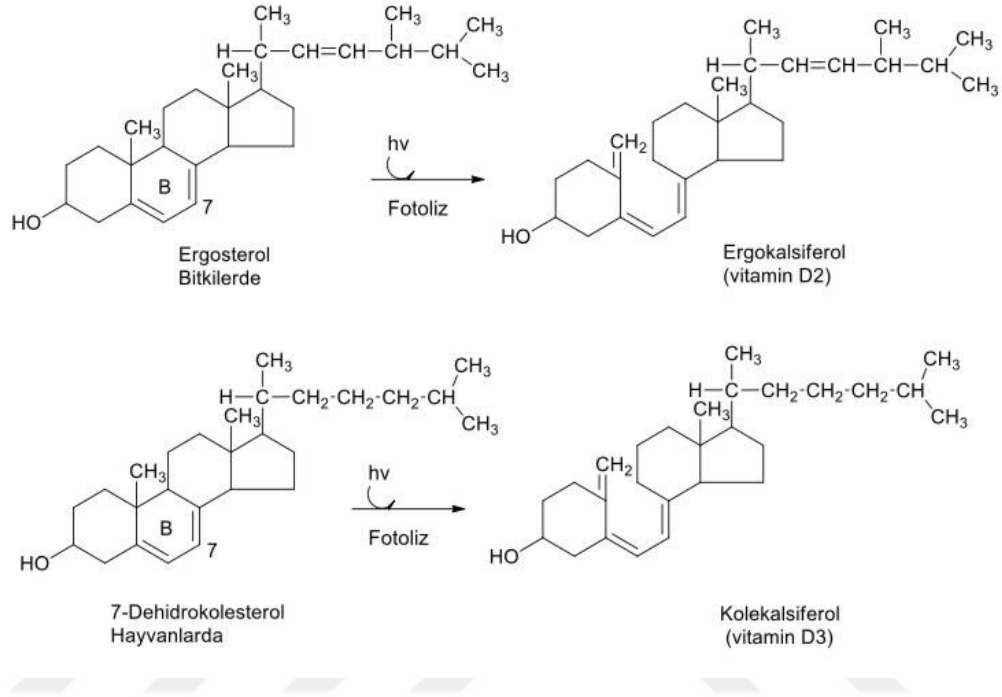
Abortus riski, sık gözlenen bir gebelik komplikasyonudur. İlk trimesterdeki gebelerin yaklaşık %15-20’sinde gözlenmektedir (Yağbasan vd., 2020). Abortus riski tanısı alan gebelerde, progesteron kullanımı gebelik kayıplarını azaltmaktadır (Daya, 2009; Duan vd., 2010; Palagiano vd., 2004; Qureshi, 2009).

İn vitro fertilizasyon (IVF) sonrası luteal destek olarak progesteron kullanımı implantasyon ve gebelik oranlarını arttırmaktadır. Bu nedenle progesteron kullanımı rutin uygulamalar arasına girmiştir (Yılmaz vd., 2008).

2.2. D Vitamini

Vitaminler vücudumuzda çeşitli biyokimyasal işlevler için önemlidirler. D vitamini, hormonlara benzer fonksiyonlara sahip bir grup steroldur. Yağda çözünen vitaminler grubunda araştırılmaktadır. D vitamini kalsiferoller olarak da adlandırılmaktadır (Akkoyun vd., 2014). D vitamini etkisi gösteren yaklaşık on farklı bileşik bilinmektedir. Bu bileşikler arasında kimyasal ve biyolojik yönden en önemlileri kolekalsiferol (D3 vitamini) ve ergokalsiferol (D2 vitamini)’dür (Pludowski vd., 2018) (Şekil 1). Kolekalsiferol 290-315 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınların etkisiyle deride, 7-dehidrokolesterol’den yapılır ve bu endojen üretim D vitamininin temel kaynağıdır.

Kolekalsiferol doğal bir D vitamini'dir. Ergokalsiferol bitkisel kaynaklı olup en çok maya ve mantarlarda bulunan ergosterolün mor ötesi ışınlarla maruz kalmasıyla oluşur. Ancak doğada pek fazla bulunmaz (Holick, 2005).

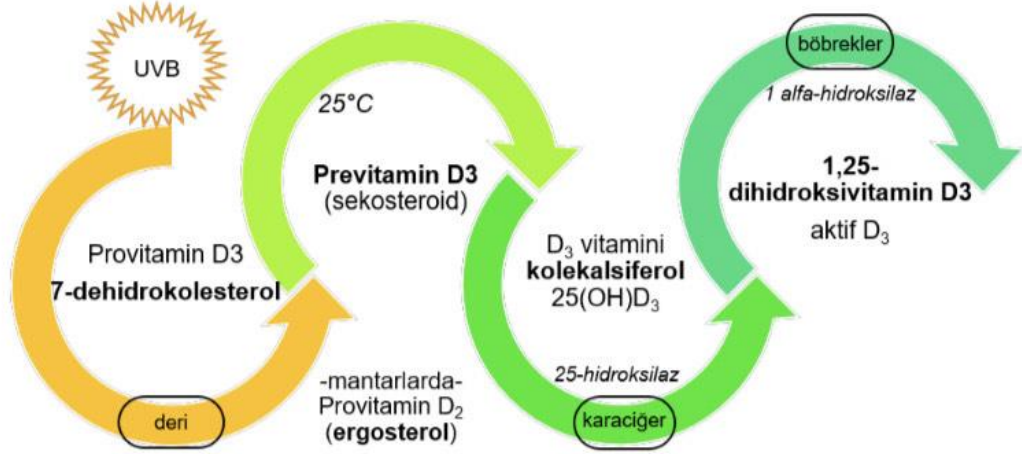


Şekil 1. Ergosterolün ergokalsiferole ve 7-dehidrokolesterolün kolekalsiferole çevrilmeleri (Akkoyun vd., 2014).

Cilt pigmentasyonu ve yaşam tarzı dahil olmak üzere çeşitli faktörler D vitamini oluşumunu sınırlayarak D vitamini eksikliğine neden olabilir (Adelani vd., 2021). D vitamini organizmada sınırlı olarak üretilmektedir. Güneşten gelen ultraviyole B ışınları en güçlü D vitamini kaynağını oluşturmaktadır. D vitamininin ihtiyaç duyulmanın altında yada üzerinde olması bazı sorunlar meydana getirebilmektedir (Terli vd., 2019). D vitamini eksikliği, enfeksiyon hastalıkları, bazı otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, dermatolojik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, infertilite, bazı kanser türleri ve metabolik hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (Balci ve Toktaş, 2021).

D vitamininin 1,25-dihidroksivitamin D3 steroid hormonuna veya D vitamininin aktif formuna (kalsitriol) metabolize olduğu anlaşılmıştır (Çobanoğlu, 2020). D vitamini, 25. karbonun 48 saat içinde karaciğerdeki mikrozomal 25-hidroksilaz enzimi ile

hidroksillenmesiyle kararlı bir öncü olan 25 hidroksivitamin D₃'e dönüşür. 25(OH)D₃ daha sonra 1-alfa hidroksilaz enzimi ile böbrekteki renal proksimal tübüllerde aktif formu olan 1,25 dihidroksivitamin D₃'e dönüştürülür (Şekil 2). Bu D vitamini aktivasyonundaki son adımdır (Henry, 2011).



Şekil 2. D vitaminin biyosentezi (Çobanoğlu, 2020).

2.3. Karaciğer

Karaciğer insan vücudundaki en büyük bezdir ve ortalama 1500 gr ağırlığındadır. Karaciğere kan temini hepatik arter (%20-40) ve portal venden (%60-80) gelir. Kan portal vene akar (Jiang vd., 2018). Hepatositler, karaciğerdeki toplam hücre popülasyonunun sadece yaklaşık üçte ikisini oluşturur (Racanelli ve Rehmann, 2006). Safra kanalı epitel hücreleri (kolanjiyositler), karaciğerde en bol bulunan ikinci epitel popülasyonudur ve safra kanallarının lümenini kaplayan hücreler olarak daha geleneksel bir epitel işlevine sahiptir (Trefts vd., 2017). Karaciğer, toksinlerin uzaklaştırılması, protein üretimi ve metabolik homeostazın sürdürülmesi için kritik olan bir organdır (Cheng vd., 2021). Karaciğerde çok sayıda fizyolojik süreç meydana gelmektedir. Bunlar makro besin metabolizması, kan hacmi düzenlemesi, bağışıklık sistemi desteği, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, lipid ve kolesterol homeostazı ve mevcut birçok ilaç dahil olmak üzere ksenobiyotik bileşiklerin parçalanmasını içerir. Makro besinlerin işlenmesi, parçalanması ve metabolizması, yukarıda belirtilen süreçleri yürütmek için

gereken enerjiyi sağlar ve bu nedenle karaciğerin en kritik işlevleri arasındadır (Trefts vd., 2017). Karaciğerin bu işlevleri, hepatositler ve safra epitel hücreleri tarafından gerçekleştirilir (Stanger, 2015). Yetersiz safra drenajı, hatalı detoksifikasyon veya plazma proteinlerinin sentezindeki bozukluklar karaciğer hastalığının klinik belirtilerine yol açmaktadır.

Karaciğer fonksiyon testleri tipik olarak; alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalın fosfataz (ALP), gama-glutamil transferaz (GGT), serum bilirubin, toplam protein ve albümin seviyelerinin belirlenmesini içermektedir. Bu testler karaciğer hastalıklarının tanısında, seyrini ve prognozunu belirlemede gereklidir. ALT ve AST'deki artışların, ALP ve bilirubindeki artışlarla orantısızlığı, hepatoselüler hastalığı gösterir. ALP, GGT ve bilirubindeki, ALT ve AST ile orantısız artışlar, kolestatik bir modeli karakterize eder (Lala vd., 2023).

2.4. Karaciğer Kanseri

Karaciğer tümörleri 3 bölümden oluşmaktadır. Primer benign, primer malign ve sekonder (metastatik) tümörlerdir. Lenf nodundan sonra metastazların en sık görüldüğü organ karaciğerdir. Otopsi raporlarında karaciğer metastazının kansere bağlı ölümlerin % 25-50'sinden sorumlu olduğu görülmektedir (Varolüneş vd., 1997).

Karaciğerin malign tümörleri primer veya sekonder olabilir. Bunlar asemptomatiktir ve çoğu karaciğer fonksiyonu normaldir. Karaciğerde en yaygın görülen iki malign primer tümörü hepatosellüler karsinom (HCC) ve kolanjiyokarsinomdur (CCA). HCC; CCA'dan on kat daha yaygın olup, dünya çapında en yaygın görülen malign primer neoplazmalar arasında bulunmaktadır (He ve Tang, 2020).

Karaciğer kanseri, dünya çapında en çok teşhis edilen altıncı kanser ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedeni haline gelmiştir (J. Feng vd., 2020). Ne yazık ki, karaciğer kanseri insidansı küresel olarak artmaktadır. Primer hepatik malignitelerin kötü prognozu göz önüne alındığında, primer karaciğer kanseri mortalitesi de artarak 2012'de 745.000 ölüme ulaşmış ve tüm kanser ölümlerinin %9.1'ini oluşturmuştur (Salem vd., 2010).

Yüksek mortalite oranı, geç tanı ve tanısal ve prognostik biyobelirteçlerin sınırlı doğruluğundan kaynaklanmaktadır. Karaciğer, toksinlerin temizlenmesini düzenleyen, glikoz, lipid ve amino asit alımını dengeleyen, tüm vücut metabolizmasını yöneten ve metabolik homeostazı koruyan önemli bir düzenleyicidir. Tümör başlangıcı ve ilerlemesine sıklıkla metabolik yolların yeniden düzenlenmesi eşlik eder ve bu da metabolizmanın düzensizliğine yol açmaktadır (Satriano vd., 2019).

HCC, primer karaciğer kanserinin en yaygın şeklidir ve tüm primer hepatik malignitelerin %90'ını oluşturur. HCC, karaciğer parankimi içeren hepatositlerden köken alır ve vakaların %80'inde karaciğer sirozundan önce gelir. HCC önemli bir uluslararası sağlık sorununu temsil etmektedir. Bununla birlikte, sirozun çeşitli etiyolojilerinin prevalansındaki geniş değişkenliğin bir sonucu olarak, HCC insidansı dünya çapında eşit olmayan bir şekilde dağılmıştır (Grandhi vd., 2016).

Kronik Hepatit B (HBV), Hepatit C Virüsü (HCV), alkolik siroz, obezite, diyabet ve non alkolik karaciğer yağlanması (NAFLD) HCC'ye yol açan risk faktörleri arasındadır (He ve Tang, 2020). HCC insidansı etiyolojiye, etnik kökene, cinsiyete, yaşa ve coğrafi bölgeye göre değişir, fibrozun varlığı bu risklerin her biri arasında ortak bir bağlantıdır. HCC riski, başlangıçtaki inflamatuvar hasarın ortadan kaldırılmasıyla azaltılabilir ancak artan kanıtlar, kalıcı fibrozun karsinojenik risk yarattığını göstermektedir (Carloni vd., 2014). Alkol, HCC gelişimi ile ilişkili bilinen en eski kimyasal karsinojenlerden biridir ve dünya çapında HCC'nin üçüncü en yaygın nedeni olarak kabul edilir. Karaciğer hastalığı riski, yaşam boyu tüketilen alkol miktarı ile ilişkilidir (Balogh vd., 2016; Ghouri vd., 2017). Amerika Birleşik Devletleri'nde günde >60 g etanol tüketen hastalarda karaciğer kanseri riski 2 ila 4 kat artmaktadır (Balogh vd., 2016).

HCC'de hormon tedavisine sürekli bir ilgi olmuştur. Hem klinik gözlemler hem de laboratuvar araştırmaları, seks hormonlarının HCC patolojisine etkisi olduğunu, erkek baskınlığını ve seks hormonu reseptörlerinin değişmiş durumda olduğunu öne sürmüştür. HCC tedavisinde hormon benzeri ajanlar ile yeni terapötik yaklaşımlar denenmiştir. Progesteron ve RU486 gibi glukokortikoid antagonistleri, insan hepatoma hücre hatlarında a-fetoprotein ekspresyonunu baskılar (K. Zhang ve Chow, 2004).

Karaciğer kanseri erkeklerde kadınlardan çok daha yaygındır. Gelişmekte olan ülkelerde, erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Torre vd., 2015). Karaciğer kanserinin çoğu (%83) daha az gelişmiş ülkelerde meydana geldiği gözlenmektedir. En yüksek oranda Asya ve Afrika'da gözlemlendiği ifade edilmektedir (Ferlay vd., 2015). Karaciğer kanseri insidansı ile ilgili veriler dünya çapında farklılık göstermektedir. Örneğin Asya ve Pasifik Adaları'nda karaciğer kanseri insidansı son 15 yılda değişmemiş veya azalma eğilimindedir (Petrick vd., 2016). Kore'de ise karaciğer kanseri insidansının 1999-2014 yılları arasında artış gösterdiği ifade edilmektedir (Jung vd., 2017).

2.5. Safra Oluşumu

Safra, uzun zincirli yağ asitlerinin ve yağda çözünen vitaminlerin ince bağırsaktan emilimine aracılık etmek için gerekli olan, karaciğer tarafından üretilen bir emülsifiye edicidir (Pollock ve Minuk, 2017).

Safra asidinin ilk tanımı, 1848'de kolik asit keşfedildiğinde yapılmıştır. 1900'lerin başındaki takip eden çalışmalar öküz, kaz, ayı ve kemirgenlerden sırasıyla litokolik asit, kenodeoksikolik asit, ursodeoksikolik asit (UDCA) ve murikolik asit içeren ek safra asitleri tanımlanmıştır (de Aguiar Vallim vd., 2013). İnsan hepatositleri tarafından günde yaklaşık bir litre safra üretilir. Safra asitleri, safranın organik bileşeninin yaklaşık %50'sini oluşturur. İnsanlarda üretilen birincil safra asitleri kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. Birincil safra asitleri gastrointestinal sisteme girdiğinde, kimyasal olarak farklı 50'den fazla ikincil safra asidi üretilir (Winston ve Theriot, 2020).

Safra asitleri, kolesterol katabolizmasının son ürünleridir. Hepatik safra asidi sentezi, insanlarda günlük kolesterol döngüsünün önemli bir bölümünü oluşturur. Safra asitlerinin biliyer sekresyonu, safra akışını oluşturur ve lipidlerin, lipofilik metabolitlerin ve ksenobiyotiklerin hepatobiliyer sekresyonunu kolaylaştırır (Li ve Chiang, 2014). Safra akışı bozulduğunda, hepatositlerde ve serumda safra asidi konsantrasyonları artar (Pollock ve Minuk, 2017).

2.6. Kolestaz

Safranın salgılanması normalde hepatositler ve kolanjiyositlerdeki bir dizi membran taşıma sisteminin işlevine ve safra oluşumundan sorumlu birimlerin yapısal ve işlevsel bütünlüğüne bağlıdır (Trauner vd., 1998). Kolestaz, azalmış veya bozulmuş safra akışı için kullanılan terimdir (Langedijk vd., 2021). Kolestaz, karaciğer hastalıklarının en yaygın klinik semptomlarından biridir (Zou vd., 2021).

Kolestaz intrahepatik veya ekstrahepatik olarak sınıflandırılabilir (Langedijk vd., 2021). İntrahepatik kolestaz, hepatoselüler bozuklukların bir sonucu olarak veya intrahepatik safra kanallarının tıkanmasına bağlı olarak ortaya çıkabilir. Ekstrahepatik kolestaz, karaciğer dışındaki safra kanallarının tıkanmasından kaynaklanır (Popović vd., 2015). İntrahepatik nedenler içerisinde özellikle yenidoğan döneminde metabolik bozukluklar ve kolestatik sendromlar ön planda yer alırken metabolik nedenlerin bir kısmı geç çocukluk döneminde de bulgu verebilir. Ekstrahepatik nedenler arasında ise yenidoğan döneminde biliyer atrezi ön plandayken daha büyük çocuklarda safra taşları sıktır (Feldman ve Sokol, 2019). Kronik kolestatik hastalıklar, intra ve ekstrahepatik safra kanallarını etkileyen primer ve sekonder sklerozan kolanjit dışında çoğunlukla intrahepatiktir (Jüngst vd., 2013).

Enfeksiyonlar, endokrinopatiler, iskemi, toksinler ve ilaçlar her yaş grubunda sık görülen kolestaz nedenleridir (Feldman ve Sokol, 2019). Kolestazın, çeşitli karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Ma vd., 2020).

Kolestaz, hepatositlerden kolanjiyositlere ve safra kanallarına safra taşınmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin mutasyonlarından da kaynaklanabilir ve bu da safra asidinin karaciğerde tutulmasına neden olur (Petrescu ve DeMorrow, 2021). Klinik olarak kolestaz, safra bileşenlerinin kanda tutulmasına yol açar. Safranin iki ana bileşeni bilirubin ve safra asitleridir. Biyokimyasal olarak kolestaz, çoğunlukla ALP değerinin yükselmesi ile belgindir (Shah ve John, 2023).

Konjuge bilirubin düzeyi kolestazın pratik bir belirtecidir (Fawaz vd., 2017). Genel olarak serum total bilirubin düzeyi 5 mg/dL'nin altındaysa konjuge bilirubin düzeyinin 1 mg/dL'nin üzerinde olması, total bilirubin düzeyi 5 mg/dL'nin üzerindeyse konjuge bilirubinin totalin %20'sinden fazla olması kolestaz olarak kabul edilir (Götze vd.,

2015). Kolestaz akut veya kronik (>6 ay) olarak kendini gösterir. Kolestazın erken biyokimyasal belirteçleri, artmış ALP, GGT ve konjuge hiperbilirubinemi içerir (Popović vd., 2015).

Kolestaz, önemli morbidite ve mortalite ile ilişkisi nedeniyle klinik olarak anlamlı bir antitedir (Haber vd., 2008). Oksidatif stres, inflamatuvar hasar ve immünitede meydana gelen değişiklikler dahil olmak üzere çok çeşitli faktörlerin kolestaza neden olabileceği düşünülmektedir (Ma vd., 2020). Hastalar etkili tedavi almazsa, kolestaz karaciğer fibrozu, siroz ve nihayetinde karaciğer nakli gerektiren karaciğer yetmezliğine dönüşebilir. Tanı için öykü, klinik bulgular, laboratuvar tetkikleri, görüntüleme yöntemleri yanında karaciğer biyopsisi ve genetik testler kullanılmaktadır. Günümüzde sadece UDCA, obetikolik asit ve bezafibrat FDA onaylı ilaçlardır (Zou vd., 2021).

Klinik olarak, çok çeşitli karaciğer bozuklukları, tek gen mutasyonları veya ilaca bağlı hasardan kaynaklanan moleküler bozuklukları, konjenital malformasyonlara bağlı safra yollarındaki yapısal değişiklikleri veya esas olarak biliyer epiteli hedef alan otoreaktif hasarı kapsayan bir kolestatik fenotip ifade eder (Mariotti vd., 2019).

2.6.1. Progresif familial intrahepatik kolestaz

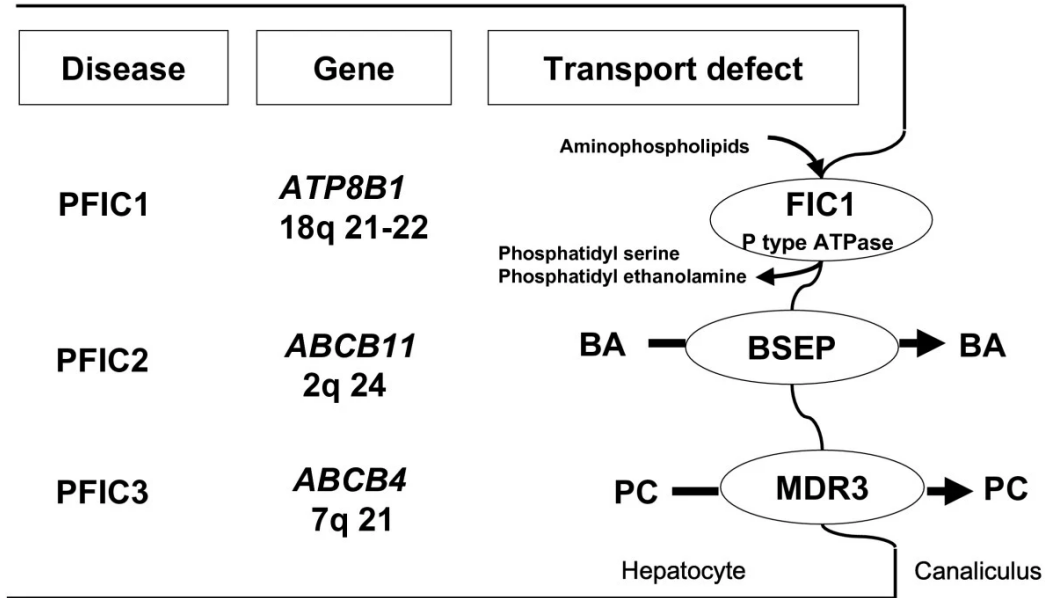
Progresif Familial İntrahepatik Kolestaz (PFIC) ilk kez Clayton vd. tarafından 1965 yılında “Byler hastalığı” olarak tanımlanmış, otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (Clayton vd., 1969). PFIC, hızla ilerleyen ve sonunda karaciğer yetmezliği ile sonuçlanan, kaşıntı ve malabsorpsiyon ile erken başlangıçlı kolestaz (genellikle bebeklik döneminde) ile karakterize, otozomal resesif kalıtılan, heterojen bir karaciğer hastalığı grubudur. PFIC, çocukların yaşamlarının yanı sıra ebeveynleri ve aileleri üzerinde de kötü bir etkiye sahiptir. Ne yazık ki, ameliyat veya karaciğer nakli olmadan, PFIC'lı hastaların sadece %50'si 10 yaşına kadar hayatta kalır ve neredeyse hiçbiri 20 yaşına kadar hayatta kalamaz (Jones-Hughes vd., 2021).

Günümüzde 3 tipi tanımlanmıştır (Şekil 3). PFIC tip 1; ATP8B1 geni [ATPase Phospholipid Transporting 8B1 (FIC1)], PFIC tip 2; ABCB11 geni [safra tuzu eksport pompası (BSEP)] ve PFIC tip 3; ABCB4 geni [Çoklu İlaç Direnç Proteini 3 (MDR 3)] mutasyonu sonucu oluşmaktadır (Jankowska ve Socha, 2012). Üç genin de safra oluşumu

sağlayan hepatosellüler transport sistem genleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Clayton vd., 1969). PFIC fenotipli hastaların %30'unda bu hastalıkla ilgili mutasyon saptanamadığından, PFIC fenotipine benzeyen başka hastalıkların tespit edilmesi olasıdır (Morotti vd., 2011).

Tüm PFIC türleri, hepatositten kanaliküllere safra salgılanmasındaki bozukluklardan kaynaklanır, ancak, her PFIC alt tipi için farklı özellikler gözlenir ve erken başlangıçlı siroz ve hepatik hücreli karsinom dahil olmak üzere hastalığın şiddeti geniş ölçüde değişir (Şekil 4). En yaygın PFIC formlarına (PFIC1 ve PFIC2) sahip hastalar genellikle yaşamın ilk aylarında sarılık ve şiddetli kaşıntı ile başvururlar (Srivastava, 2014). Serum GGT aktivitesi PFIC1 ve PFIC2 hastalarında normaldir ancak PFIC3 hastalarında yüksektir (Davitt-Spraul vd., 2009).

Safrayla atılan ilaçların kan ve karaciğer dokusu seviyeleri, PFIC genlerindeki mutasyonların varlığından etkilenerek ilaca bağlı kolestaz oluşmasına neden olabilir. PFIC genlerindeki mutasyonlar karaciğer kanseri riskini artırabilir (Vitale vd., 2019).



Şekil 3. PFIC: Tipler, ilgili genler ve taşıma kusurları (BA: safra asidi; PC: fosfatidilkolin) (Davitt-Spraul vd., 2009).

	PFIC1	PFIC2	PFIC3
Geçiş	OR	OR	OR
Kaşıntı	Ciddi	Çok ciddi	Orta
Serum GGT	Normal	Normal	Yüksek
Serum ALT	Orta derecede yüksek	>5x normal	Hafif yüksek
Serum AFP	Normal	Yüksek	Normal
Karaciğer histolojisi	Kanaliküler kolestazis, hafif lobüler fibrozis	Kanaliküler kolestazis, hafif lobüler fibrozis, dev hücreli hepatit	Biliyer siroz
Serum primer safra asit konsantrasyonu	Çok yüksek	Çok yüksek	Yüksek
Safra içeriği	Düşük primer safra asit içeriği	Çok düşük primer safra asit içeriği	Düşük fosfolipid konsantrasyonu
Kromozom lokus	18q21-22	2q24	7q21
Gen/Protein	ATP8B1/FIC 1	ABCB11/BSEP	ABCB4/MDR 3
Hepatosit yeri	Kanaliküler membran	Kanaliküler membran	Kanaliküler membran
Ekprese olduğu diğer ana yerler	Kolanjiosit, bağırsak, pankreas	-	-
Ekstrahepatik semptomlar	İshal, pankreatit, işitme kaybı, kısa boy	-	-
Fonksiyonel defekt	ATP bağımlı aminofosfolipid flippaz	Safraya ATP bağımlı safra asit transportu	ATP bağımlı fosfatidil kolin floppaz

Şekil 4. PFIC olgu tiplerinin özellikleri (AFP: Alfa fetoprotein, OR: Otozomal resesif, ATP: Antiapoptotik). Tablo (Tümgör, 2016) yayınından alıntılanmıştır.

2.6.2. Gebeliğin intrahepatik kolestazı (Intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)

ICP, gebeliğe özgü bir karaciğer hastalığıdır (Xiao vd., 2021). Kaşıntı ve yüksek safra asidi düzeyleri ile kendini gösteren yaygın bir gebelik hastalığıdır (Smith ve Rood, 2020). Fetüs için artan preterm doğum riski, mekonyum lekeli amniyotik sıvı, solunum sıkıntısı ve ani intrauterin fetal ölüm dahil olmak üzere çeşitli olumsuz sonuçlara neden olur. Genetik, hormonal, immünolojik ve çevresel faktörlerin ICP'nin patogenezinde katkıda bulunduğu ve östrojen-safra asidi ekseninin baskın bir rol oynadığı düşünülmektedir (Xiao vd., 2021). ICP etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Tanı, tedavi ve ilgili

olumsuz sonuçlarla ilgili verilerin yetersizliği nedeniyle yönetimi zordur (Smith ve Rood, 2020). ICP genellikle geri dönüşümlü ve iyi huylu seyri ile karakterizedir (Jurk vd., 2021). Genellikle gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterinde gelişir. Klinik belirtiler doğumdan sonra hızla düzelir; ancak sonraki gebeliklerde tekrarlama riski yüksektir (Piechota ve Jelski, 2020).

BSEP, hepatositlerde konjuge safra tuzlarının salgılanması için en önemli taşıma proteinlerinden biridir (Van den Hof vd., 2017). ICP, östrojen ve progesteron metabolitleri ile bağlantılıdır. Bu metabolitlerin dolaylı bir mekanizma ile BSEP işlevini bozduğu gösterilmiştir (Pauli-Magnus vd., 2010).

Birkaç çalışmada, IVF ile spontan gebelikler karşılaştırıldığında, IVF grubunda hem tekli hem de çoğul gebeliklerde, daha yüksek ICP prevalansı saptanmıştır (Alemdaroğlu vd., 2021; C. Feng vd., 2018).

ICP; kaşıntı, açlık serum safra asidi seviyelerinin yükselmesi ($>10 \mu\text{mol/L}$) ve postpartum 2 ila 3 hafta içinde belirti ve semptomların kendiliğinden düzelmesi ile karakterize edilir (Beuers ve Pusch, 2006).

ICP insidansı 10.000 gebelikte 10 ila 100 vaka arasındadır, ancak güçlü bir etnik geçmişi vardır. Özellikle, Şili popülasyonunda gebeliklerin %16'sında ICP gelişir ve Araucan Kızılderili alt popülasyonunda bu oran %28'e kadar çıkar (Elferink, 2003).

Glantz ve ark., yaptıkları çalışma sonucunda UDCA'nın ICP'li kadınlarda ALT ve bilirubini azalttığını ancak safra asitlerini veya kaşıntıyı azaltmadığını göstermiştir (Glantz vd., 2005).

2.6.3. İlaça bağlı kolestaz (Drug-induced cholestasis)

İlaça bağlı karaciğer hasarı (DILI), batı dünyasında akut karaciğer yetmezliğinin en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir. DILI tahmin edilebilir veya tahmin edilemez (idiyosentratik) olarak sınıflandırılır. İdiosenkratik DILI, gözlemlenen karaciğer testlerinin modeline göre hepatoselüler, kolestatik veya karışık olarak sınıflandırılabilir (Katarey ve Verma, 2016).

Karaciğer, ilaçların, ksenobiyotiklerin ve çevresel toksinlerin seçici alımından, metabolizmasından ve atılımından sorumlu olan merkezi organdır. Bu temel fonksiyon, karaciğeri ilaç toksisitesine yatkın hale getirir ve ilaç geliştirme sırasında farmasötik ajanların başarısızlığının birincil nedenidir (Padda vd., 2011).

İlaça bağlı kolestaz, yüksek morbidite ve mortalitenin eşlik ettiği karaciğer hastalığı türüdür. Hepatobiliyer pompaların kolestaz patolojisindeki rolüne dair kanıtlar sürekli artmaktadır. İlaç keşfinin ilk aşamalarında kimyasal ajanların bu taşıyıcılarla etkileşimlerinin tanınması, düşük kolestaz potansiyeline sahip yeni ilaç adaylarının geliştirilmesine yardımcı olabilir (Jazaeri vd., 2021). Safra asitlerinin intrahepatik birikimi, ilaca bağlı kolestaz ile ilişkili karakteristik bir olguyu temsil eder (Chatterjee ve Annaert, 2018). Genetik ve metabolik bozukluklar, bulaşıcı hastalıklar, immünojenler ve ilaçlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler kolestazı tetikleyebilir. İlaça bağlı kolestaz, mekanik olarak karmaşık bir süreçtir. İlaç taşıyıcıları üzerindeki etkiler, çeşitli hepatoselüler değişiklikler ve değişen safra kanalı dinamikleri dahil olmak üzere ilaca bağlı kolestazı tetikleyen en az üç faktör tanımlanmıştır (Gijbels vd., 2019).

Klinik açıdan bakıldığında, kolestatik DILI geniş bir klinik bulgu alanı oluşturur ve tanısal açıdan bir zorluk oluşturabilir. Çoğunlukla ilaca bağlı kolestaz ile ilişkili ilaç sınıfları, anti-enfeksiyöz, anti-diyabetik, anti-inflamatuar, kardiyovasküler ajanlar, steroidler ve diğer çeşitli ilaçlardır (Fernández-Murga vd., 2018).

Biyokimyasal testler (karaciğer fonksiyon testleri) tipik olarak ilaca bağlı kolestazı tanımlamak için kullanılır (K. Yang vd., 2013).

2.7. Progesteron ile ICP Arasındaki İlişki

Progesteron, menstrual döngünün, üremenin ve steroid hormon biyosentezinin önemli bir bileşenidir. Progesteron hem endokrin hem de immünolojik etkileri nedeniyle gebeliğin sadece oluşması için değil, aynı zamanda sürdürülmesi için de çok önemlidir. Progesteron, yardımcı üreme sikluslarında luteal faz desteği için en iyi seçenek gibi görünmektedir ve sentetik progesteron kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (Nagy vd., 2021).

Gebelikte sık görülen bir karaciğer hastalığı olan ICP, preterm doğum, fetal distres ve ölü doğum gibi obstetrik komplikasyonlara yol açabilir. ICP patogenezi, gebelik sırasında seks hormonlarının etkileriyle ilişkilendirilmiştir ve son yıllarda birbirini izleyen araştırmalar, progesteron türevlerinin rolünü ortaya koymuştur (Reyes, 2016).

Sülfatlanmış progesteron metabolitleri hamileliğin üçüncü trimesterinde artar ve ICP tanısı almış hastalarda ise daha da yükseldiği gösterilmiştir. Progesteron sülfatların genel konsantrasyonları, komplikasyonsuz bir gebelikte 1 ila 10 $\mu\text{mol/L}$ arasında değişir ve ICP'de yaklaşık 40 $\mu\text{mol/L}$ 'ye yükselir (Abu-Hayyeh ve Williamson, 2015).

1970 yılında Sjövall ve Sjövall İsveç'te ICP tanısı konmuş hastaların serum ve idrarında normal gebeliklerin aksine progesteronun sülfatlanmış metabolitlerinin arttığını bildirmişlerdir (Sjövall ve Sjövall, 1970).

Steroid sülfatlar ve disülfatlar, ağırlıklı olarak ICP tanısı alan hastalarda artan progesteron metabolitleridir. Bu hastalara UDCA verilmesi sadece safra asitlerinin seviyelerini düşürmekle kalmamış, aynı zamanda steroid disülfatların seviyelerini de düşürmüş ve kaşıntıyı iyileştirmiştir (Glantz vd., 2008; Imam vd., 2012). Erken doğumun önlenmesi için uzun süreli vajinal progesteron preparatları ile tedavi edilen gebe kadınlar, ICP geliştirme riski altındadır (Zipori vd., 2020).

ICP, plazma progesteron düzeylerinin en yüksek olduğu gebeliğin üçüncü trimesterinde zirve yapar. Ayrıca ikiz gebelikler, tekil gebeliklere göre daha yüksek progesteron seviyeleri ile karakterize edilir ve daha yüksek bir kolestaz sıklığına sahiptir (Tsur vd., 2023).

Tsur ve ark., spontan preterm doğum riskini azaltmak için uygulanan eksojen progesteronların kolestaz riskini artırabileceğini varsaymışlardır. Bu varsayım sonucunda erken doğumun önlenmesi için vajinal progesteron veya intramüsküler 17 α -hidroksiprogesteron kaproat ile tedavi edilen hastalarda kolestaz sıklığı araştırılmıştır. Çalışmaya 2010-2014 yılları arasında gerçekleşen canlı tekil 870,599 doğum dahil edilmiştir, hastalara ikinci ve üçüncü trimester progesteron uygulaması yapılmıştır. Eksik verisi olan veya yalnızca 1. trimesterde reçete edilen progesteron tedavisi almış hastalar hariç tutulmuştur. ICP, UDCA reçetelerine göre

belirlenmiştir. İkinci ve üçüncü trimesterde vajinal progesteron tedavisi alan hastalarda kolestaz sıklığı referans grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Buna karşılık, 17 α -hidroksiprogesteron kaproat ile kolestaz arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tsur vd., 2023).

Shi ve ark., ICP'nin fetal sıçanların pulmoner morfolojik değişiklikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 20 gebe sıçan rastgele olacak şekilde ICP ve kontrol grubuna ayrılmıştır. ICP grubuna 5 gün boyunca 17 α -etinil östradiol ve progesteron deri altından enjekte edilmiştir. Daha sonrasında ALT, AST ve toplam safra asidi değerleri ölçülmüştür. ALT, AST ve toplam safra asidi değerleri kontrole göre ICP'li sıçanlarda artış göstermiştir. Araştırma sonunda, östrojen ve progesteron hormonu kombinasyonu ile ICP'li sıçan modeli oluşturulabileceği sonucuna varmışlardır (Shi ve Qi, 2010).

2.8. D Vitamini ile ICP Arasındaki İlişki

Kalsiyum ve kemik homeostazının düzenlenmesindeki rolü biliniyor olsa da son zamanlarda D vitamininin anti-inflamatuar ve anti-fibrotik özelliklere sahip olduğu ve hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı giderek daha fazla kabul görmektedir. Bu etkiler, kronik karaciğer hastalığının birçok nedeninin patogenezi ve tedavisi ile ilgilidir (Kitson ve Roberts, 2012).

Birçok çalışma, maternal D vitamini eksikliği ile artan preeklampsi, gestasyonel diabetes mellitus, preterm doğum ve intrauterin gelişim geriliği arasındaki ilişkiyi göstermiştir (S.-W. Chang ve Lee, 2019).

Hipovitaminoz D'nin artan NAFLD riski ile ilişkili olduğu ve bu hastaların %10'unda hepatik fibroz sonrası siroz ile sonuçlandığı bilinmektedir (Leung, 2019).

D vitamini takviyeleri veya D vitamini ile güçlendirilmiş yiyecekler, insanlarda D vitamini eksikliğini önlemek veya bununla mücadele etmek için etkili stratejilerdir (Baur vd., 2019). İnsan verileri, 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) düzeyinin D3 vitamini takviyesi sonrası, D2 vitamini takviyesine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Baur vd., 2020).

Bununla birlikte, çok sayıda çalışma belirli bir D vitamini dozuna yanıt olarak D vitamini durumunun iyileşmesinde bireyler arasında güçlü bir varyasyon olduğunu göstermiştir (Goncalves vd., 2015; Lehmann vd., 2016). D vitamini takviyesinden sonra D vitamini durumundaki varyasyonun yaklaşık %50'sinin bilinmeyen faktörlerden oluştuğu ileri sürülmektedir (Sawada vd., 2000)

ICP'nin genetik, endokrin ve çevresel katkıları olan karmaşık bir etiyolojisi vardır. Çevresel faktörler olarak, coğrafi bölgeler, bölgelere göre değişen iklim ve beslenme şartları sayılabilir. Kış mevsiminde ve soğuk iklimli yerlerde daha sık olduğu gösterilmiştir (D. Güleç ve Sevil, 2013; Uygur ve Ersoy, 2015).

Bu hastalıkta değişken bir coğrafi prevalans da gözlenmiştir. Bu, farklı ırklardan gelen kadınlardaki genetik çeşitlilikle açıklanabilir veya örneğin D vitamini, selenyum eksikliği gibi değişen çevresel faktörlerin sonucu olabilir (Dixon vd., 2022).

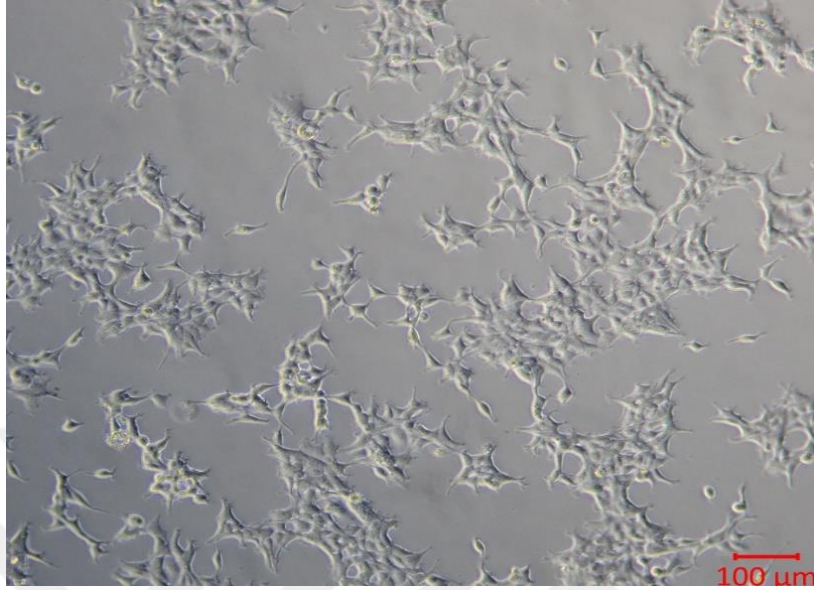
Bazı araştırmacılar, serum D vitamini düzeyi ile ICP arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışmalar sonucu D vitamin düzeyini ICP tanısı almış gebelerde normal gebelere göre anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır (Celik vd., 2022; Gençosmanoğlu Türkmen vd., 2018; Wikström Shemer ve Marschall, 2010).

2.9. HepG2 Hücre Hattı

Hepatoma hücrelerinin erişilebilirlik, kullanım kolaylığı, yüksek proliferatif kapasite ve fenotipik stabilite açısından çok sayıda avantajı vardır (Kitano vd., 2022). Günümüzde yaklaşık 40 farklı hepatik tümör hücre dizisi vardır, ancak en sık kullanılanlar çeşitli tümörlerden elde edilen HepaRG, Huh7, SK-Hep-1, Hep3B ve HepG2 hücre dizileridir.

Belirtilen hücreler arasında, HepG2 hücre dizisi (Şekil 5), bilimsel araştırmalardaki geniş uygulama alanı nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Karaciğer kanserinden türetilen hücre dizileri olan HepG2 hücreleri, insan hepatositleri modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tanaka-Yachi vd., 2022). HepG2 hücreleri, ilaç toksisite değerlendirmeleri, biyoyapay karaciğer sistemlerinin oluşturulması ve hepatit B virüsü enfeksiyon modelleri gibi çeşitli hepatik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kitano vd., 2022). Hepatik hücre dizileri arasında HepG2 hücreleri, hepatositlerin temel

özelliklerini sergileyen ilk hücrelerdir. Bu hücre dizisi 1975 yılında izole edilmiş ve HCC (veya hepatoma) olarak tanımlanmıştır (Arzumanian vd., 2021).



Şekil 5. Hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (10X).

Costantini ve ark., yaptığı çalışmada HepG2 hücreleri (HCC modeli olarak) ve normal hepatosit hücreleri ile ilişkili gen ekspresyon profillerini mikroarray teknolojisi ile karşılaştırmıştır. Genlerin hiyerarşik küme analizi, hepatositlere kıyasla 2646 genin HepG2 hücrelerinde önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini, buna karşılık 3586 genin önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini göstermiştir (Costantini vd., 2013). Williams ve Olefsky, HepG2 hücre hattının insülin direnci patogenezi ve hipoglisemik ilaçların in vitro mekanizmasını incelemek için iyi bir hücre modeli olduğunu göstermişlerdir (Williams ve Olefsky, 1990).

Van den Hof ve ark., yaptığı çalışmada, bilinen kolestatik ilaçların (siklosporin A / CsA), klorpromazin /CPZ ve etinil östradiol /EE) in vitro olarak primer insan hepatositleri, primer fare hepatositleri ve HepG2 hücre dizisinde indüklediği gen ekspresyon profilini insan kolestaz örnekleri ile karşılaştırmayı amaçlamıştır. İnsan kolestaz örnekleri, kolestaz tanısı konmuş hastaların karaciğer biyopsisinden elde edilmiştir. Bunların arasında, yalnızca HepG2 hücrelerindeki ifade edilen genlerin, in vivo kolestaz örneklerinde ifade edilen genlerle örtüştüğü gözlenmiştir (Van den Hof vd., 2017) (Şekil

6). Bu nedenle, çalışmamızda HepG2 hücrelerinin in vitro kolestatik modeli olarak kullanılabileceği varsayılmıştır.

Direction	Entrezgene ID	Gene Symbol	Gene description	GO term
Up-regulated	440	ASNS	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	Response to amino acid
	586	BCAT1	Branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic	Cell proliferation
	4131	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	Negative regulation of intracellular transport
	6286	S100P	S100 calcium binding protein P	Calcium-dependent protein binding
	6809	STX3	Syntaxin 3	Intracellular protein transport; Vesicle-mediated transport
	10797	MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP + dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	Folic acid-containing compound biosynthetic process
	23433	RHOQ	Ras homologue family member Q	Negative regulation of establishment of protein localization to plasma membrane
	23643	LY96	Lymphocyte antigen 96	Cell surface receptor signaling pathway; Endosome membrane
	55062	WIPI1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	Endoplasmic reticulum unfolded protein response
	57016	AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	Steroid metabolic process; Lysosome
	57761	TRIB3	Tribbles pseudokinase 3	Negative regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity; Response to endoplasmic reticulum stress
	84662	GLIS2	GLIS family zinc finger 2	Negative regulation of transcription, DNA-templated; Cell differentiation
Down-regulated	79622	SNRNP25	Small nuclear ribonucleoprotein 25 kDa (U11/U12)	mRNA processing

Şekil 6. Hem in vivo kolestatik hem de kolestatik bileşiklere maruz kalan HepG2 hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilen genler (Van den Hof vd., 2017).

3. YÖNTEM

Bu bölümde, araştırma modeli, evren ve örneklem, veriler ve toplanması, verilerin çözümlenmesi ve yorumlanması kısmına yer verilmiştir.

3.1. Araştırma Modeli

Bu yüksek lisans tez çalışması bir deneysel araştırmadır ve değişkenler arasındaki ilişkiler ile ilgilenmiştir. Araştırmanın amacına uygun olarak progesteron ve D vitamininin HepG2 hücre proliferasyonu ve karaciğer enzim düzeylerine etkileri incelenmiştir.

3.2. Evren ve Örneklem

Yapılan araştırmada HepG2 hücre hattı ile çalışılmıştır. Herhangi bir muamele görmeyen hücrelerimiz kontrol grubu olarak varsayılmıştır.

Deney gruplarını progesteron ve/veya D vitamini uygulanan HepG2 hücreleri oluşturmuştur. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla kıyaslanmıştır.

3.3. Veriler ve Toplanması

3.3.1. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

- Faz-Kontrast Mikroskopu (Zeiss, Almanya)
- -80 dondurucu (Panasonic, Japonya)
- Sıvı azot tankı
- İnkübatör (Panasonic, Japonya)
- +4 buzdolabı
- Elisa Reader (BioTek Synergy H1, Japonya)
- Vortex

- Trypsin-EDTA (Capricorn, Almanya)
- DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Capricorn, Almanya)
- DMSO (Biomatik, Kanada)
- FBS (Gibco, ABD)
- PBS
- Trypan Blue Stain (0.4%) (Gibco, ABD)
- Penisilin\streptomisin (100x) (Gibco, ABD)

3.3.2. Kullanılan ilaçlar

- DEPO-PROVERA 150 mg/ml (Pfizer, ABD):
- Etkin madde: Medroksiprogesteron asetat (MPA) 150 mg/ml
- Yardımcı maddeler: Polietilen glikol 3350, polisorbitat 80, sodyum klorür, metilparaben (E218), propilparaben (E216), enjeksiyonluk su
- DEPO-PROVERA uzun etkili doğum kontrol yöntemidir. Bu ilaç MPA içerir, 'Progestojenler' isimli ilaç grubunun bir üyesidir. Doğal bir hormona, adet döngüsünün ikinci yarısında yumurtalıklarda üretilen progesterona benzerdir
- DEVİT-3 50.000 I.U./ 15 ml (Deva, Türkiye):
- Etkin madde: Her 15 ml'lik damla 1,25 mg (50.000 I.U.) vitamin D3 içermektedir.
- Yardımcı maddeler: Bütilhidroksianisol, ayçiçek yağı

3.3.3. Hücre hattı ve kültür koşulları

Hücre kültürü, hücrelerin doğal ortamları dışında kontrollü şartlar altında büyütülmeleridir. Ayrıca hücre kültürü, canlı hayvan testlerine alternatif olacak potansiyele sahiptir. Yetiştirilecek hücre tipine bağlı olarak besi yeri gereksinimleri değişmektedir (Duruel vd., 2021).

Hücre kültürü laboratuvarında yapay bir çoğalma ortamında hücresel büyümeyi desteklemek amacıyla bazı cihazlar kullanılmaktadır. Hücrelerin büyüme ortamında; besi yerinin türü, serum kaynağı, CO₂, nem, ozmolarite ve pH hücreler için önemli parametrelerdendir. Hücre kültürü ilaç geliştirilmesi, aşı çalışmaları ve in vitro sitotoksiste çalışmalarında kullanılmaktadır (Ihlamur vd., 2022).

Hücre kültürü ortamları, hücresel büyümeyi desteklemek için belirlenmiş bileşenlerin ve besinlerin birleşiminden oluşmaktadır. Bu büyüme ortamı besi yeri olarak da adlandırılmaktadır. Hücre kültüründe genel olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) ve RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) gibi besi yeri kullanılmaktadır (Ackermann ve Tardito, 2019). Hücre kültürü ortamında amino asitler, vitaminler, karbonhidratlar, inorganik tuzlar, tamponlama sistemleri, hormonlar, serum ve antibiyotikler gibi bileşenler bulunmaktadır (Segeritz ve Vallier, 2017).

İnsan ya da hayvandan alınan dokulardan elde edilmiş kültür, primer kültür olarak adlandırılmaktadır. Primer kültür hücreleri genelde heterojen tiptedir yani birden fazla hücre çeşidini içerebilmektedir. Pasajlama sonrası elde edilen kültür ise alt kültür olarak adlandırılmaktadır. Alt kültür ile elde edilen hücreler alındıkları dokunun yapısal özelliklerini ve farklılaşma yeteneğini zaman içerisinde yitirmektedirler (Koçaklı vd., 2015).

Çalışmaya başlamadan önce laminar kabin ve içerisine bırakılan tüm malzemeler %70'lik etanol ile temizlenmiştir. DMEM, %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin karışımı ile besi yeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besi yeri steril olan 50 mL'lik falkon tüpe alınarak +4 °C'de saklanmıştır. Çalışma yapılacağı zaman önceden ısıtılmış 37 °C'deki su banyosunda ısıtılmıştır. HepG2 hücreleri T-25 filtre kapaklı kültür kaplarında hazırlanan besi yeri ortamında muhafaza edilmiştir. Hücreler 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

3.3.4. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler ilk olarak faz-kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Ortalama %70-80 konfluent olan hücreler pasajlanmıştır. Kültür kabında bulunan besi yeri steril pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA serum varlığında inaktive olduğundan dolayı serum kalıntılarını uzaklaştırmak için 1-2 mL PBS kültür kabına aktarılmıştır. Pastör pipetiyle kültür kabının içindeki sıvı çekildikten sonra 1 mL Tripsin-EDTA eklenmiştir. Kültür kabı hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 4-5 dakika 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Tripsin-EDTA sayesinde kültür kabına yapışan hücreler birbirinden ayrılır. Hücrelerin ayrılmasından dolayı kültür kabında bulanık bir sıvı oluşur. İnkübatörden çıkardığımız hücrelerin üzerine 3 mL besi yeri koyulmuştur. Kültür kabında ortalama 4,5 mL besi yeri olmuştur. 1,5 mL kültür kabında kalacak şekilde dondurulmak üzere 3 mL hücre alınmıştır. Kalan 1,5 mL hücreye ise 3,5 mL besi yeri ekleyerek 37 °C ve %5 CO₂ ortamlı inkübatöre kaldırılmıştır.

3.3.5. Hücrelerin dondurulması

Kültür kabında bulunan besi yeri steril pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. 1-2 mL PBS kültür kabına aktarılmıştır. Pastör pipetiyle kültür kabının içindeki sıvı çekildikten sonra 1 mL Tripsin-EDTA eklenmiştir. Kültür kabı hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 4-5 dakika 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Tripsin-EDTA sayesinde kültür kabına yapışan hücreler birbirinden ayrılmıştır. Dondurulacak hücreler falkon tüpe alınmış, hücreler PBS ile yıkanmış ve 400 g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant çekilmiştir. Daha önce hazırladığımız dondurma solüsyonu pelletin üzerine eklenmiştir. Pipet yardımıyla homojenizasyonu sağlanmıştır ve hücrelere zarar vermeden kriyoviyale (dondurma tüpü) aktarılmıştır. Hücreler -80' de 1 gün bekletildikten sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Dondurma solüsyonu hazırlama: %90 DMEM ve %10 FBS içeren besi yerinden 9,5 mL alınarak, 0,5 ml DMSO eklenerek hazırlanmıştır.

*Dondurma solüsyonuna antibiyotik eklenmemektedir.

3.3.6. Hücrelerin çözülmesi

Sıvı azot tankında saklanan hücreler çözündürülmek için çıkarılmıştır. Sıvı azottan çıkarılan kriyoviyale 37 °C’de sıcak su banyosunda içerisindeki hücreler sıvılaşıana kadar tutulmuştur. Hücreler pastör pipet yardımıyla 15mL’lik falkon tüpe alınmıştır. 4 dakika 400 g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış, pellet üzerine daha önceden hazırlanmış olan besi yeri eklenmiştir. T25’lik kültür kabına hücreler aktarılmıştır. Kültür kabı üzerine hücre hattı, tarih, pasaj sayısı ve deney sahibinin adı yazılmıştır. Yapılacak çalışmada kullanılmak üzere 37 °C ve %5 CO₂ ortamlı inkübatöre kaldırılmıştır.

3.3.7. Trypan mavisi ile hücre sayımı ve hücre canlılığının belirlenmesi

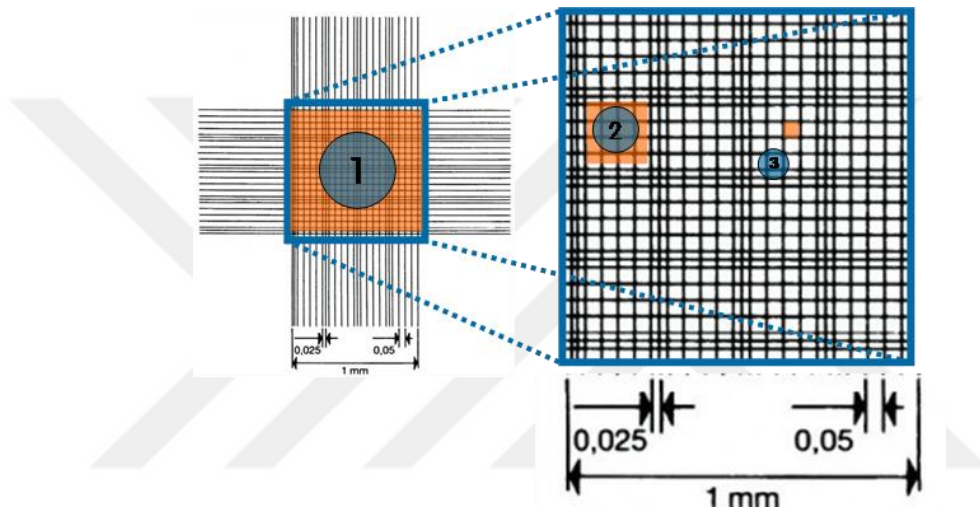
Trypan mavisi bir azo boyasıdır. Hücre sitotoksitesinin belirlenmesi için en sık kullanılan boyalardandır. Trypan mavisi canlı hücrelerin zarlarından geçemez çünkü canlı hücrelerin zarları bütündür ve yapısı bozulmamıştır. Ancak, ölü hücrelerin zarlarından geçebilir ve hücreyi boyayabilir. Trypan mavisi boyası ile ölü hücreleri boyayabilmek için hücrelerin önce tripsinize edilerek süspansiyon hale getirilmesi gerekmektedir. Hücrelerin steril pipet yardımı ile süspansiyonun içinde homojen dağılım göstermesi sağlanır. Takiben, hücre kültüründen alınan bir miktar hücre trypan mavisi ile karıştırılır. Bu esnada boyayı içine alan hücreler ölü, almayan hücreler ise canlı kabul edilir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

Faz-kontrast mikroskopunda incelediğimiz hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında besi yeri atılmıştır. 2 mL PBS kültür kabına aktarılmıştır. Kültür kabındaki sıvı geri çekildikten sonra 1 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiştir. Hücrelerin ayrışması için kültür kabı 37 °C ve %5 CO₂ ortamında 4-5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan kültür kabına besi yeri eklenip pipetaj yapılmıştır. Kültür kabındaki hücreler 15 mL’lik falkon tüpe aktarılmıştır. Kültür kabında kalan hücrelere besi yeri eklenip inkübatöre koyulmuştur. Falkon tüpteki hücrelerden 200 µL endorf tüpe aktarılmıştır. 90 µL hücre 10 µL Trypan mavisi boya (Gibco) eklenmiştir. Thoma lamına 10 µL hücre koyulmuştur. Hücreler yoğun olduğundan dolayı 5 kare sayıp ortalaması alınmıştır. Sayım sırasında hücre zarından boya geçmeyen canlı hücreler parlak görünürken, boyayı içine çeken ölü hücreler ise maviye boyanmıştır. Hazırlanan süspansiyon içerisindeki

hücrelerin sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır (2 numaralı alan için, Şekil 7):

$$\text{Hücre Sayısı/mL} = (\text{Hücre Sayısı} \div \text{Sayılan Kare Sayısı}) \times (10 \div 9) \times 250.000$$

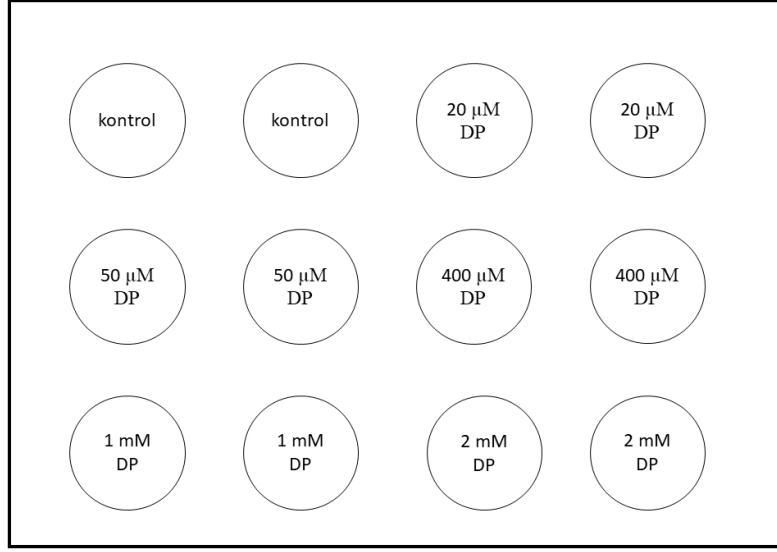
Yapılacak olan çalışmaya göre, eşit hücre sayıcı olacak şekilde hücreler 6, 12 veya 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir.



Şekil 7. Thoma lamı (Lermi, 2018).

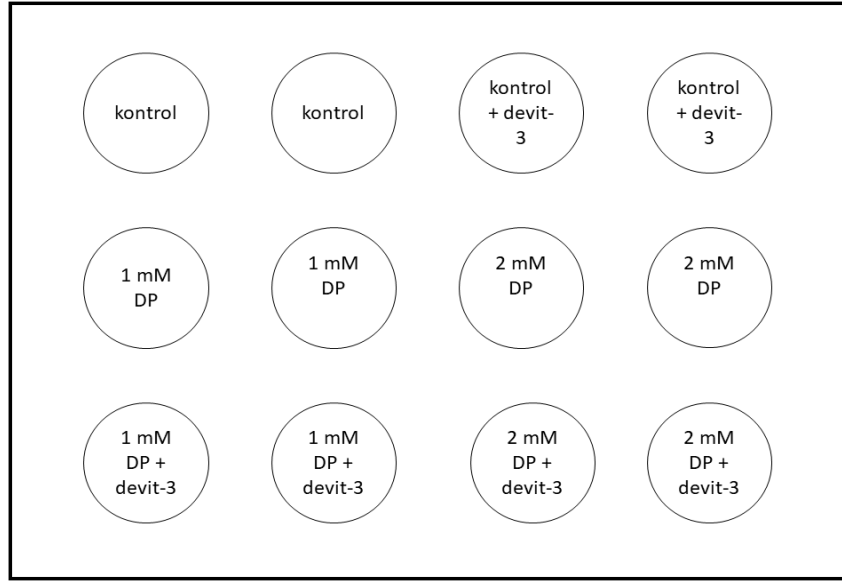
3.3.8. İlaç eklenmesi

Progesteronun, HepG2 hücrelerinde proliferasyona etkisini görebilmek için yapılan hücre sayımından sonra 150.000 hücre/1mL besi yeri eşit miktarda 12 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. İlaç muamelesi öncesi hücreler 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda hücre ekili plaka inkübatörden çıkarılmıştır. Progesteron olarak MPA etkin maddeli Depo Provera Şekil 8’de gösterildiği üzere 20 µM, 50 µM, 400 µM, 1 mM, 2mM dozlarda olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. 20 µM, 50 µM ve 400 µM dozları dilüe edilerek elde edilirken, 1 mM ve 2mM dozları stoktan (388 mM) elde edilmiştir. Kontrol grubu ile kullanılan dozları karşılaştırmak amaçlı iki kuyucuğa ilaç eklenmemiştir. Çalışma üç kere tekrar edilmiştir. İlaçlı plaka hücre proliferasyonu için 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.



Şekil 8. Progesteronun HepG2 hücrelerinde etkisi için kullanılan dozlar (DP: Depo Provera).

D vitamininin progesteron ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için, yapılan hücre sayımından sonra 150.000 hücre/1mL besi yeri eşit miktarda 12 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelere ilaç eklenmeden önce kültür kabı 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kültür kabı inkübatörden çıkarılmıştır. Progesteron ekli hücreler ile progesteron ve D vitamini ekli hücreleri karşılaştırmak için ayrı kuyucuklar oluşturulmuştur (Şekil 9). D vitamini olarak D3 vitamini etkin maddeli Devit-3 ilacı kullanılmıştır. Dört kuyucuğa 1 mM Depo Provera eklenmiştir ve D vitamini etkisini görebilmek için kuyucukların yarısına 2,5 µM Devit-3 eklenmiştir. Aynı işlem 2 mM Depo Provera için de yapılmıştır. Ayrıca kontrol grubu oluşturabilmek için iki kuyucuğa ilaç eklenmemiştir. D vitamininin HepG2 hücrelerinde tek başına etkisini görebilmek için de iki kuyucuğa sadece 2,5 µM Devit-3 eklenmiştir. 12 kuyucuklu plaka hücre sayımı için 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücrelerin faz-kontrast mikroskopta sayımı yapılmıştır.



Şekil 9. Progesteron ve D3 vitamininin ayrı olarak veya birlikte etkilerini görmek amacıyla oluşturulmuş plaka (DP: Depo Provera).

3.3.9. HepG2 hücre canlılığının CCK-8 ile tespiti

CCK8 metodu: Hücre Sayım Kiti-8 (CCK-8), suda yüksek oranda çözünür tetrazolyum tuzu-WST-8 kullanarak [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu], bir elektron aracısının mevcudiyetinde indirgeme üzerine suda çözünür bir formazan boyası üretir. CCK-8, hücre proliferasyonu ve sitotoksosite deneylerinde canlı hücre sayısının belirlenmesi için hassas kolorimetrik analizlere izin verir. WST-8, hücrelerde dehidrojenazlar tarafından indirgenerek doku kültürü ortamında çözünen turuncu renkli bir ürün (formazan) verir. Dehidrojenazların hücrelerde oluşturduğu formazan boya miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. WST-8 tarafından üretilen ürün (formazan) suda çözünür, organik çözücüler veya izotoplar gerekmez. Ve formazan istikrarlı ve güvenlidir. CCK-8 kullanan tespit hassasiyeti, MTT, XTT, MTS veya WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzları kullanan analizlerden daha yüksektir (Abbkine, t.y.).

Sitotoksosite testi için 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra hücreler 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara eşit oranda ekilmiştir. Hücreler ilaç eklenmesi öncesi 24 saat inkübe edilmiştir. Karşılaştırma amaçlı bazı

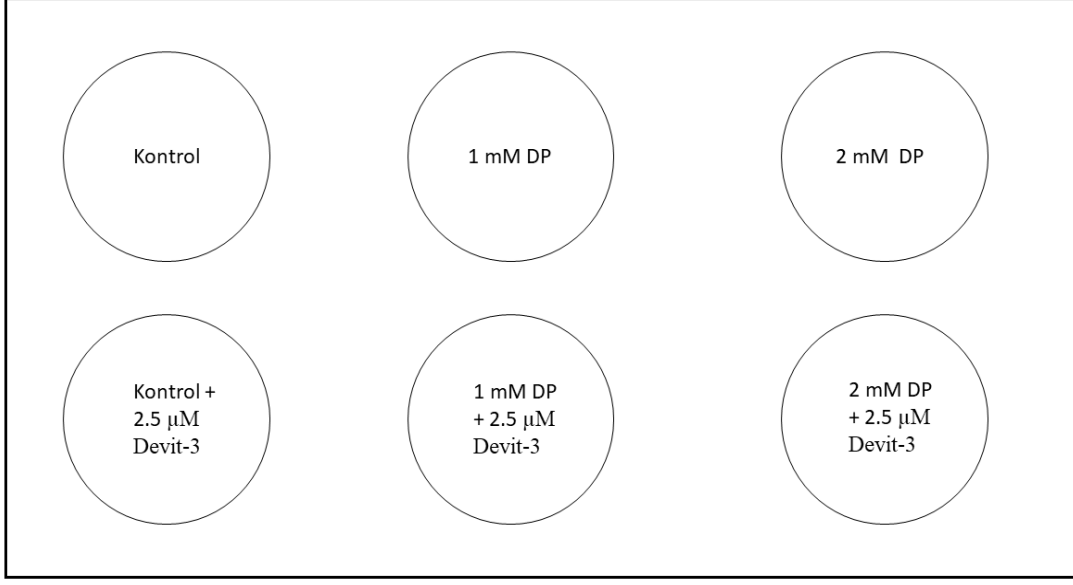
kuyucuklara sadece besi yeri eklenmiştir. İlacın ışıma derecesini anlayabilmek için bazı kuyucuklara ise sadece karşılıklı gelen dozlarda ilaç eklenmiştir. D vitamini 1\3 oranında dilüe edilerek sırasıyla kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler CCK-8 eklenmek üzere 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

İlaç verilen hücreler 24 saat sonra inkübatörden çıkarılmıştır. Kuyucuklarda bulunan süspansiyon miktarının 1/10'u kadar yani her bir kuyucuğa 10 µL olacak şekilde CCK-8 eklenmiştir. 3-4 saat inkübatörde beklettikten sonra Elisa Reader (BioTek Synergy H1) ile sonuçlar okunmuştur.

3.3.10. Biyokimyasal testler

Karaciğer fonksiyon testleri, sıklıkla yapılan tetkikler arasında yer almaktadır. Karaciğer pek çok fonksiyonu bir arada yürüten metabolik bir organdır. Organın ana yapısını oluşturan hepatositler karbonhidrat, lipid, protein metabolizmasını düzenlemenin yanı sıra, pek çok ilaç ve kimyasal maddenin metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Kantar, 2017).

Biyokimyasal testler için 6 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra her kuyucuğa eşit miktarda 5×10^5 hücre/2mL ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Ertesi gün kuyucuklara 2,5 µM Devit-3 ve 1 mM veya 2 mM Depo Provera Şekil 10'da gösterildiği şekilde eklenmiştir. İlaçların etkisini görmek için hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri ayrı ayrı falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüpler karıştırılmaması için etiketlenmiştir. Plakada kalan hücelere tripsin eklenmiş ve inkübatörde 1-2 dakika bekletilmiştir. Tripsin sonrasında plaka yüzeyinden ayrılan hücelere her kuyucuğa 500 µL olacak şekilde besi yeri eklenmiştir. Kuyucuklardaki hücreler daha önce kullandığımız falkon tüplere eklenmiştir. Dondur-çöz yöntemi kullanılmıştır. Sıvı nitrojende dondurulmuş hücreler 37 °C olan su banyosunda çözülmüştür. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Hücreler son olarak 400 g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatantlar ayrı falkon tüplerine alınmıştır, hücre pelletleri atılmıştır. Süpernatantlar karaciğer fonksiyon testleri olan ALT, AST ve Laktat dehidrogenaz (LDH) değerlerinin ölçülmesi için Düzen Laboratuvarı'na (İstanbul) gönderilmiştir.



Şekil 10. Biyokimyasal testler için kullanılan dozlar (DP: Depo Provera).

3.4. Verilerin Çözümlemesi ve Yorumlanması

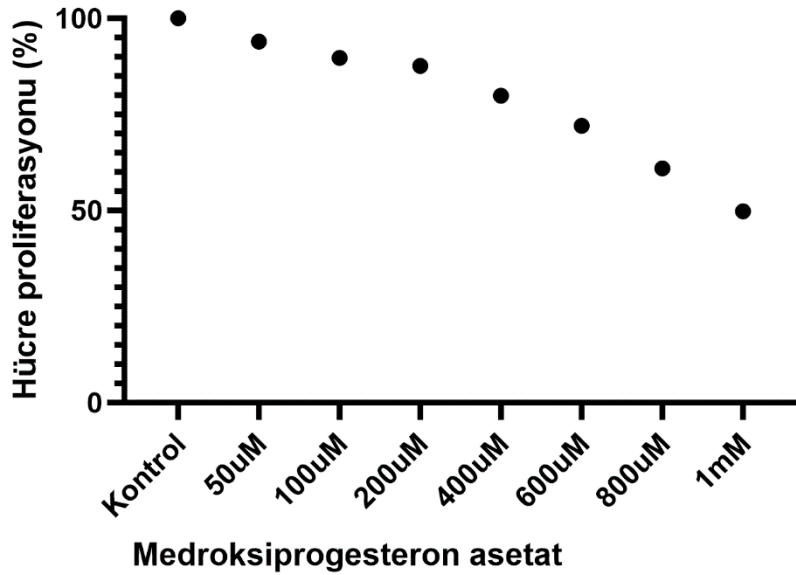
Her deney üç kere tekrar edilmiştir ve bunlar bağımsız tekrarlardır. Verilerin grafikler haline getirilmesi ve tüm istatistiksel analizler için GraphPad Prism 10.0 yazılımı kullanılmıştır. Değişkenlerin Shapiro-Wilk-W testi ile normal dağılım gösterdiğinin saptanması üzerine gruplar arasında bir fark olup olmadığı tek yönlü Anova testi ile, gruplar arasındaki farklılıklar ise post hoc Tukey testi ile belirlenmiştir (Büyüköztürk, 1997).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Progesteronun HepG2 hücrelerinde proliferasyona etkisi

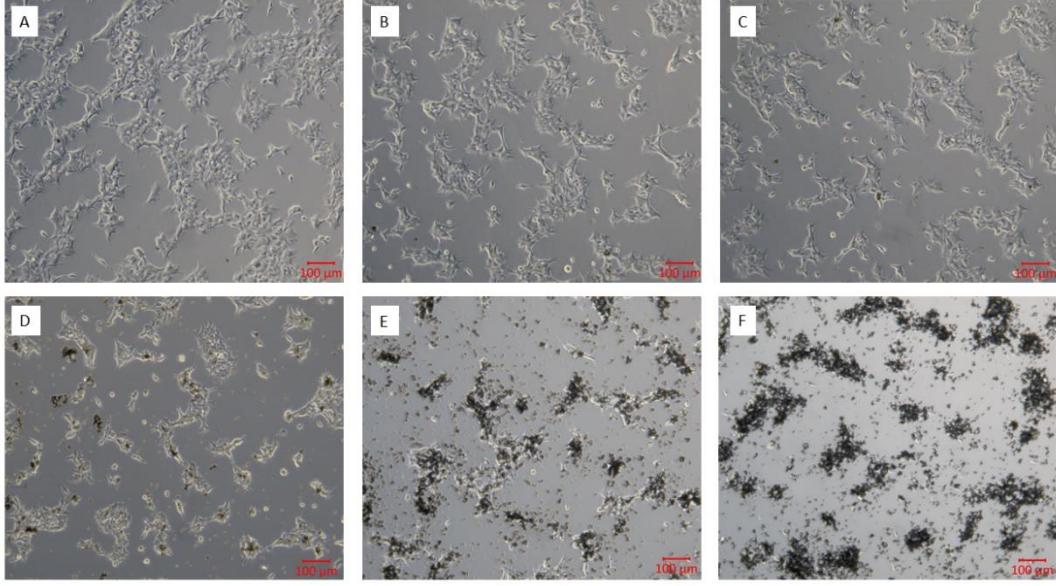
Progesteronun, proliferasyona etkisini görebilmek için MPA etken maddeli Depo Provera kullanılmıştır. HepG2 hücreleri 24 saat boyunca 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M, 800 μ M ve 1 mM dozlarında ilaca maruz bırakılmıştır. İlacın kendi ışımасыnı görebilmek için bir satıra sadece karşılık gelen dozlarda ilaç eklenmiştir. CCK-8 eklendikten sonra 450 nm’de Elisa Reader cihazında sonuçlar elde edilmiştir. 450 nm’de ilacın kendi ışımасы da gözlemlendiğinden dolayı ortalamalardan ilaç ışımасы çıkarılarak sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 11’de görüldüğü gibi, progesteronun hücre proliferasyonunu doz bağımlı azalttığı bulunmuştur. Ancak, ilacın kendi ışımасыndan dolayı hücre sayımı ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 11. İlaç uygulanmamış (kontrol) veya 24 saat boyunca farklı dozlarda medroksiprogesteron asetat uygulanmış HepG2 hücrelerinde proliferasyon (%).

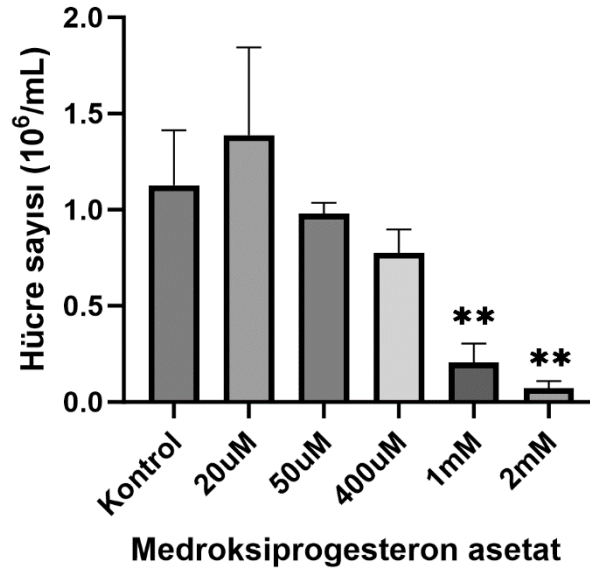
4.1.2. Progesteronun HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

HepG2 hücreleri, 20 μ M, 50 μ M, 400 μ M, 1 mM veya 2mM Depo Provera ile muamele edilmiş ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir (10X) ve artan progesteron maruziyeti ile hücre canlılığında azalma gözlemlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. HepG2 hücrelerine farklı dozlarda uygulanan progesteron sonucu hücrelerin 24 saat sonraki faz-kontrast mikroskobu görüntüleri (10X) (A. Kontrol B. 20 μ M DP C. 50 μ M DP D. 400 μ M DP E. 1mM DP F. 2 mM DP) (DP: Depo Provera).

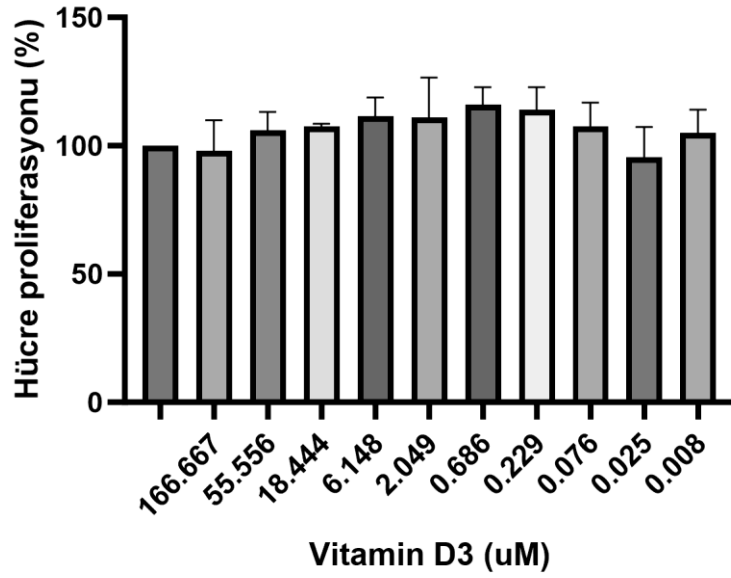
Hücre sayımı sonucunda MPA etken maddesinin doza bağımlı şekilde hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere yol açtığı bulunmuştur ($p < 0,0001$). 20 μ M, 50 μ M ve 400 μ M Depo Provera dozları ile kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,7369$, $p=0,9640$ ve $p=0,4594$). 1 mM ve 2 mM Depo Provera uygulanmış HepG2 hücrelerinde, herhangi bir ilaç muamelesi yapılmayan kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla $p=0,0038$ ve $p=0,0012$) (Şekil 13).



Şekil 13. Artan konsantrasyonlarda progesteron uygulanmış HepG2 hücrelerinde hücre sayısı (10⁶/mL). Kontrol grubuyla kıyasla gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **P<0,01.

4.1.3. D vitamininin HepG2 hücrelerinde proliferasyona etkisi

D vitamininin HepG2 hücreleri üzerinde proliferasyona etkisini incelemek için D3 vitamini etkin maddeli Devit-3 takviyesi kullanılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca 1/3 dilüsyon ile azalan dozda D3 vitaminine maruz bırakılmıştır. 24 saat sonunda hücrelere CCK-8 eklenmiş ve 450 nm’de Elisa Reader cihazında ölçüm yapılmıştır. Deney üç tekrar şeklinde yapılmıştır. Kontrol grubunda hücre canlılığı %100 varsayılmıştır. Belirlenen dozlarda D3 vitaminine maruz bırakılan HepG2 hücrelerinin canlılık oranları kontrol grubuna göre GraphPad 10.0 kullanılarak değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda D3 vitamininin HepG2 hücrelerinde proliferasyona anlamlı bir etkisi bulunmamıştır (p=0,1954) (Şekil 14).



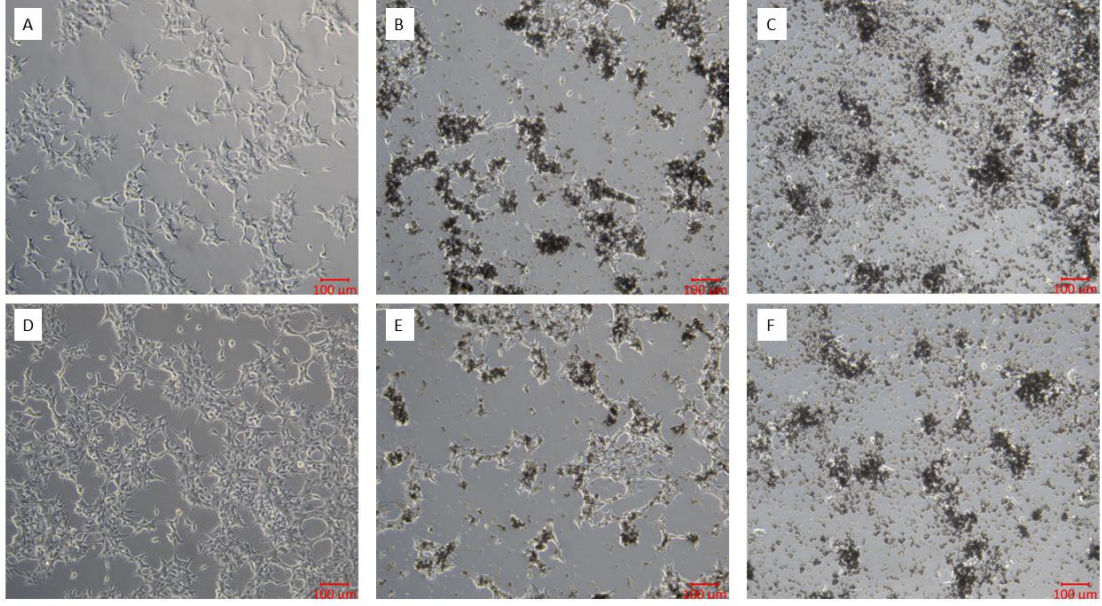
Şekil 14. İlaç uygulanmamış (kontrol) veya farklı dozlarda Vitamin D3 ile 24 saat muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin proliferasyonu (%). Kontrol grubuyla kıyasla gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova kullanılarak analiz edilmiştir. $P>0,05$.

4.1.4. D vitamini ve progesteronun HepG2 hücre canlılığına etkileri

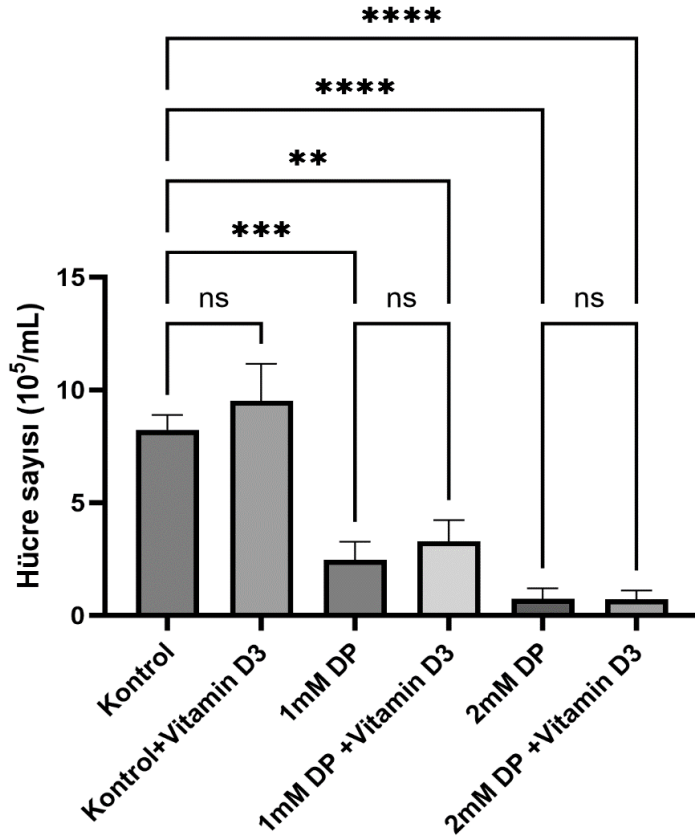
Progesteronun ve D vitamininin tek başına veya birlikte uygulandığında HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkilerine bakmak amaçlanmıştır. D vitamininin, progesteronun hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiyi engellemede rolü olup olmadığı incelenmiştir. HepG2 hücrelerine 1 mM veya 2 mM Depo Provera ve/veya 2,5 μ M Devit-3 Şekil 9’da gösterildiği üzere eklenmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, faz-kontrast mikroskopunda gözlemlendiğinde, sadece 2,5 μ M vitamin D3 eklenmiş olan HepG2 hücrelerinin, kontrol grubuna benzer şekilde iğsi formda yüzeyde düz bir tabaka şeklinde yayıldığı görülmüştür. Mikroskopta vitamin D3 eklenen grupta hücre yoğunluğu daha fazla olarak değerlendirilmiş olmasına rağmen, yapılan hücre sayımı sonrası bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,5632$), (Şekil 15A, D, Şekil 16, Tablo 1). Benzer şekilde, 1 mM Depo Provera uygulanmış gruba kıyasla 1 mM Depo Provera ve 2,5 μ M vitamin D3 eklenmiş grupta da daha fazla hücre yoğunluğu gözlenmiştir. Ancak, hücre sayıları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p=0,9465$) (Şekil 15 B, E, Şekil 16, Tablo 1). 2 mM Depo Provera eklenmiş HepG2 hücreleri ise 2,5 μ M vitamin D3 yokluğunda ya da varlığında benzer olarak değerlendirilmiştir. İki grupta da hücrelerin iğsi formlarını

kaybedip, küçüldüğü, parçalandığı ve yüzeyden ayrıldığı göze çarpmaktadır (Şekil 15 C ve F). Hücre sayıları karşılaştırıldığında da bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,9999$) (Şekil 16, Tablo 1).

Şekil 15. Belirtilen dozlarda 24 saat progesteron ve/veya vitamin D3 uygulamaları sonrası HepG2 hücrelerinin 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: Vitamin D3).



Şekil 16. Vitamin D3 ve/veya progesteron uygulanmış HepG2 hücrelerinde hücre sayıları (10⁵/mL). Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **P<0,01, ***P<0,001 ve ****P<0,0001. ns=anlamalı değil.

Tablo 1. Deney gruplarının birbirleriyle kıyaslanması sonucu elde edilen P değerleri.

Dozların Karşılaştırılması	P Değeri	
Kontrol vs. Kontrol+Vitamin D3	0,5632	ns
Kontrol vs. 1mM DP	0,0005	***
Kontrol vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,0016	**
Kontrol vs. 2mM DP	<0,0001	****
Kontrol vs. 2mM DP +Vitamin D3	<0,0001	****
Kontrol+Vitamin D3 vs. 1mM DP	<0,0001	****
Kontrol+Vitamin D3 vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,0003	***
Kontrol+Vitamin D3 vs. 2mM DP	<0,0001	****
Kontrol+Vitamin D3 vs. 2mM DP +Vitamin D3	<0,0001	****
1mM DP vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,9465	ns

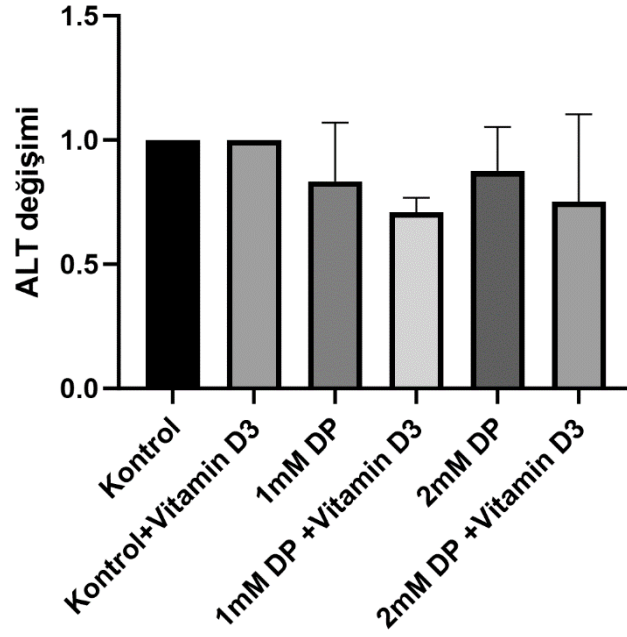
1mM DP vs. 2mM DP	0,3799	ns
1mM DP vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,3721	ns
1mM DP +Vitamin D3 vs. 2mM DP	0,1022	ns
1mM DP +Vitamin D3 vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,0996	ns
2mM DP vs. 2mM DP +Vitamin D3	>0,9999	ns

4.1.5. Karaciğer fonksiyon testleri

Progesteronun ve D vitamininin HepG2 hücrelerinde ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri üzerindeki etkisine bakmak amaçlanmıştır. 6 kuyucuklu plakaya 5×10^5 hücre/2mL hücre ekimi yapılmıştır ve hücreler ilaç eklenmesi için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelere 1 mM veya 2 mM Depo Provera ve/veya 2,5 μ M Devit-3 Şekil 10'da gösterildiği üzere eklenmiştir. Hücreler 24 saat boyunca ilaçla muamele edilmiştir. D vitamininin etkisini incelemek için kontrol ile kontrol + 2,5 μ M vitamin D3, 1 mM Depo Provera ile 1 mM Depo Provera + 2,5 μ M vitamin D3 ve 2 mM Depo Provera ile 2 mM Depo Provera + 2,5 μ M vitamin D3 gruplarının ALT, AST ve LDH değerleri kıyaslanmıştır. Çalışma üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

4.1.5.1. ALT değerleri

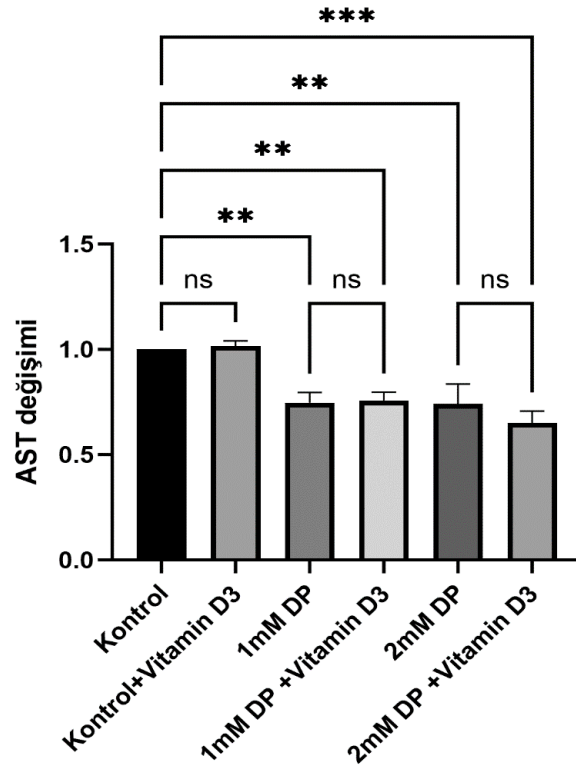
Tek yönlü Anova testi ile gruplar arası karşılaştırma yapılmış ve ALT değerlerinde D vitamini uygulanan ve uygulanmayan hücreler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.4398$) (Şekil 17).



Şekil 17. HepG2 hücrelerinde ALT düzeylerinin progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası karşılaştırılması. Gruplar arası farklar, tek yönlü Anova kullanılarak analiz edilmiştir $P>0,05$.

4.1.5.2. AST değerleri

HepG2 hücrelerine progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları yapılmıştır. AST değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0002$) (Şekil 18). 1mM ve 2mM Depo Provera uygulamaları kontrol grubuna kıyasla AST değerlerini anlamlı olarak azaltmıştır (sırasıyla $p=0,0035$ ve $p=0,0029$) (Tablo 2). D vitaminin Depo Provera uygulaması yapılmayan HepG2 hücrelerinde AST seviyesini değıştirmedeği saptanmıştır ($p=0,9993$) (Tablo 2). Ek olarak, 1 veya 2mM Depo Provera uygulanan hücrelerde D vitaminin AST enzim düzeyine bir etkisi olmadığı bulunmuştur (1mM DP ve 1mM DP +Vitamin D3 grupları kıyaslandığında $p>0,9999$; 2mM DP ve 2mM DP +Vitamin D3 grupları kıyaslandığında $p=0,5303$) (Tablo 2).



Şekil 18. HepG2 hücrelerinde AST düzeylerinin progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası karşılaştırılması. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **P<0,01, ***P<0,001. ns=anlamalı değil.

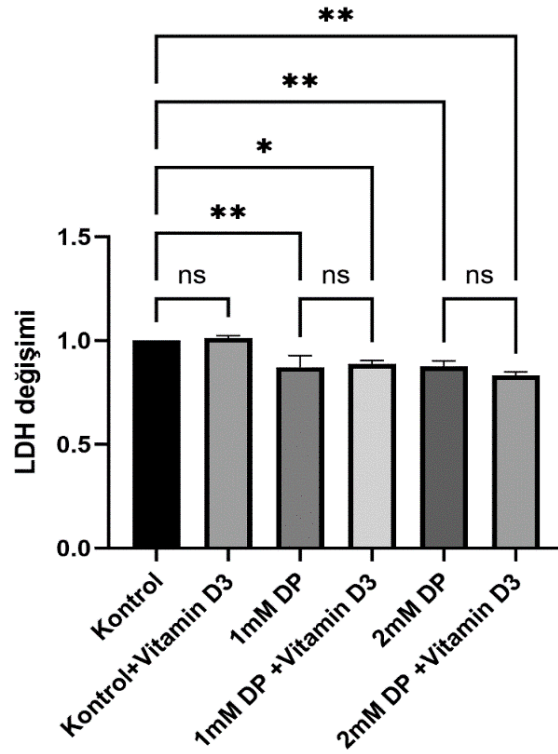
Tablo 2. Belirtilen grupların AST değerlerinin kıyaslanması sonucunda oluşan P değerleri.

Dozların Karşılaştırılması	P Değeri	
Kontrol vs. Kontrol+Vitamin D3	0,9993	ns
Kontrol vs. 1mM DP	0,0035	**
Kontrol vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,0096	**
Kontrol vs. 2mM DP	0,0029	**
Kontrol vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,0008	***
Kontrol+Vitamin D3 vs. 1mM DP	0,0048	**
Kontrol+Vitamin D3 vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,0111	*
Kontrol+Vitamin D3 vs. 2mM DP	0,0041	**

Kontrol+Vitamin D3 vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,001	**
1mM DP vs. 1mM DP +Vitamin D3	>0,9999	ns
1mM DP vs. 2mM DP	>0,9999	ns
1mM DP vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,4651	ns
1mM DP +Vitamin D3 vs. 2mM DP	0,9993	ns
1mM DP +Vitamin D3 vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,455	ns
2mM DP vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,5303	ns

4.1.5.3. LDH değerleri

Çalışmada kullanılan biyokimyasal testlerden biri de LDH testidir. Hücrelere 1 mM veya 2mM Depo Provera ve/veya 2,5 μ M Devit-3 olacak şekilde Şekil 10' gösterildiği üzere eklenmiştir. Tek yönlü Anova analizi sonucunda gruplar arasında LDH değerlerinde anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,0005$) (Şekil 19). 1mM ve 2mM Depo Provera uygulamaları kontrol grubuna kıyasla LDH değerlerini anlamlı olarak azaltmıştır (sırasıyla $p=0,0054$ ve $p=0,0069$) (Şekil 19 ve Tablo 3). D vitaminin tek başına uygulandığında HepG2 hücrelerinde LDH değerlerini değiştirmedeği görülmüştür ($p=0,9965$) (Şekil 19 ve Tablo 3). Ayrıca, Depo Provera ve D vitamini beraber uygulandığında, sadece Depo Provera uygulanan hücrelere göre benzer LDH seviyeleri saptanmıştır (1mM DP ve 1mM DP +Vitamin D3 grupları kıyaslandığında $p=0,9910$; 2mM DP ve 2mM DP +Vitamin D3 grupları kıyaslandığında $p=0,6390$) (Tablo 3).



Şekil 19. HepG2 hücrelerinde LDH düzeylerinin progesteron ve/veya D vitamini uygulamaları sonrası karşılaştırılması. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. *P<0,05, **P<0,01. ns=anlamlı değil.

Tablo 3. Belirtilen grupların AST değerlerinin kıyaslanması sonucunda oluşan P değerleri.

Dozların Karşılaştırılması	P Değeri	
Kontrol vs. Kontrol+Vitamin D3	0,9965	ns
Kontrol vs. 1mM DP	0,0054	**
Kontrol vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,0243	*
Kontrol vs. 2mM DP	0,0069	**
Kontrol vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,0019	**
Kontrol+Vitamin D3 vs. 1mM DP	0,006	**
Kontrol+Vitamin D3 vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,0221	*
Kontrol+Vitamin D3 vs. 2mM DP	0,0075	**
Kontrol+Vitamin D3 vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,0021	**
1mM DP vs. 1mM DP +Vitamin D3	0,991	ns

1mM DP vs. 2mM DP	>0,9999	ns
1mM DP vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,7284	ns
1mM DP +Vitamin D3 vs. 2mM DP	0,9982	ns
1mM DP +Vitamin D3 vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,5133	ns
2mM DP vs. 2mM DP +Vitamin D3	0,639	ns

4.2. Tartışma

Yapılan çalışmada, HepG2 hücre hattı model olarak kullanılmıştır. Giriş kısmında belirtildiği üzere, literatürdeki çalışmalar incelenmiş ve bunların ışığında a) progesteronun hücre proliferasyonu ve karaciğer enzim düzeylerine etkilerini belirlemek, b) D vitamininin progesteron muamelesinin sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri engellemede rolü var mıdır incelemek hedeflenmiştir:

HepG2 hücrelerine azalan konsantrasyonlarda Depo Provera uygulanıp, CCK8 sitotoksisite testi ölçüleri yapıldığında, Depo Provera'nın ölçümün yapıldığı 450nm'de ışıma gösterdiği saptanmış ve bunun üzerine Trypan mavisi ile hücre sayımı yapılmasına karar verilmiştir. 20 μ M, 50 μ M, 400 μ M, 1mM ve 2 mM MPA etkin maddeli Depo Provera uygulamaları yapılmış ve 1mM ile 2 mM Depo Provera dozlarının kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalma sağladığı bulunmuştur. Kullandığımız diğer dozların kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığına bir etkisi bulunmamıştır.

Yapılan sitotoksisite testi sonucunda, D3 vitamininin 0,008 μ M ve 166,667 μ M dozları aralığında HepG2 hücrelerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. 2,5 μ M çalışmamızda kullanmak üzere seçilmiştir. HepG2 hücrelerine 1mM veya 2 mM Depo Provera, 2,5 μ M D3 vitamini yokluğunda veya varlığında uygulanmıştır. Yalnızca progesteron uygulanan gruplarla, progesteron ve D3 vitamininin birlikte uygulandığı gruplar arasında HepG2 hücre canlılığı karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Depo Provera uygulamaları karaciğer enzimleri AST ve LDH değerlerinde anlamlı bir düşüşe yol açmıştır. Değerlerin azalmasının sebebinin, kullanılan dozların hücre canlılığını azaltmasından dolayı bu enzimleri sentezleyecek yeterli hücre olmaması olduğu düşünülmektedir.

D vitamininin tek başına HepG2 hücrelerinde ALT, AST ve LDH değerlerini değiştirmedeği görülmüş, ayrıca Depo Provera ile birlikte uygulandığında da bu enzim seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuş, dolayısıyla kullanılan doz ve inkübasyon sürelerinde D vitamininin progesteron muamelesinin sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri engellemede rolü olmadığı düşünülmüştür.

Bu yıl yapılan bir çalışmada, spontan preterm doğum riskini azaltmak için uygulanan eksojen progestojenlerin kolestaz riskini artırabileceğini varsayılmıştır. Bu varsayım sonucunda preterm doğumun önlenmesi için vajinal progesteron veya intramüsküler 17 α -hidroksiprogesteron kaproat ile tedavi edilen hastalarda kolestaz sıklığı araştırılmıştır. İkinci ve üçüncü trimesterde vajinal progesteron tedavisi alan hastalarda kolestaz sıklığı referans grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Buna karşılık, 17 α -hidroksiprogesteron kaproat ile kolestaz arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tsur vd., 2023). Bununla birlikte, literatürde progesteronun ICP'yi tetiklediğine dair ek çalışmalar mevcuttur (Estiú vd., 2015; Kinci vd., 2021; Tsur vd., 2023; Zipori vd., 2020).

Yapılan bir çalışmada, HepG2 hücrelerinin epirubisin ve/veya progesteron ile muamele edilmesi sonucu sitotoksik ve apoptotik değişikliklerin gözlenmesi amaçlanmıştır. 50 μ M progesteron ve 0,1 μ g/mL epirubisinin HepG2 hücrelerine 48 saat boyunca muamele edilmesi sonucu sitotoksikite ve apoptoz artmıştır (W.-T. Chang vd., 2010). Yaptığımız çalışma ile benzer olarak HepG2 hücrelerine 50 μ M progesteron uygulanmıştır. Ancak, çalışmamızdan farklı olarak 50 μ M progesteronun sitotoksisiteyi arttırmış olmasının sebebinin progesteronun farklı formunun kullanılmış olması ya da farklı inkübasyon süreçleri olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde çalışmamıza benzer olarak, farklı hücre hatlarında progesteronun doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Progesteronun NCI-H295R (insan adrenokortikal karsinoma hücre hattı) hücre hattında hücre canlılığına ve apoptoza etkisi araştırılmıştır. Progesteronun doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir (Fragni vd., 2019). Benzer bir çalışmada, over karsinomu primer hücre kültürü progesteron ile muamele edilmiştir. Progesteron muamele sonucu hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Pedernera vd., 2019).

Geçtiğimiz yıllarda yapılan bir çalışmada, menopozun sonraki her yılı için HCC riskini %24 artırdığını göstermiş olup, kadın seks hormonlarının HCC riski veya gelişimi ile ilişkili olabileceğini savunmuştur (Mucci vd., 2001). Bununla birlikte, epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan çalışmaları androjenin uyarıcı etkilerinden ve östrojenin koruyucu etkilerinden kaynaklanabilecek şekilde, erkeklerin kadınlardan daha yüksek HCC insidansına sahip olduğunu ileri sürmüştür (Yeh ve Chen, 2010). Ek olarak yapılan bir çalışmada HCC dokusundaki progesteron seviyeleri, tümör olmayan karaciğer dokusundakinden önemli ölçüde daha düşük çıkmıştır (Tsai vd., 2018).

Progesteron reseptörü membran bileşeni 1 (PGRMC1) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), çeşitli kanserlerde yüksek oranda ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada PGRMC1 ve EGFR seviyelerinin her ikisinin de HCC hastalarının hayatta kalmasıyla ters orantılı olduğu bulunmuştur. Çalışma, PGRMC1'in EGFR aracılı inflamatuvar yanıtları düzenleyerek HCC gelişimini etkilediğini göstermiştir (Lee vd., 2021)

Yapılan bir başka çalışmada, kadmiyum ve/veya progesteron uygulamaları yapılan sıçanlarda karaciğer enzim düzeyleri incelenmiştir. Kadmiyum muamelesi sonucu ALT, AST ve ALP değerlerinde kontrole kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Kadmiyum ile birlikte progesteron uygulanması sonucunda ise bu değerlerin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Alese vd., 2021).

Kalsiyum ve fosfor metabolizmasının düzenlenmesindeki rolü ile bilinen D vitamini, yağda eriyen yaygın vitaminlerden biridir. D vitamini eksikliği küresel bir sağlık sorunudur (Du vd., 2023).

Fare veya insan genomunun yaklaşık %3'ünün D vitamini endokrin sistemi tarafından düzenlendiğine dair kanıtlarla birlikte, D vitamini reseptörü (VDR) için daha yaygın bir işlev olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, hepatositlerin düşük seviyelerde VDR ifade etmesi sebebiyle karaciğerdeki rolü uzun süre göz ardı edilmiştir. VDR mRNA ve proteini, insan hepatositlerinde ve HepG2 hücrelerinde ifade edilmektedir. VDR ifadesindeki değişiklikler, çok sayıda hastalıkta önemli bir yer almaktadır. D vitamininin karaciğer üzerinde anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bozic vd., 2016).

D vitamini insülin direncini, obeziteyi, kanser ve kardiyovasküler hastalıkları önlemede önemli bir rol oynar (Gholamalizadeh vd., 2020). Kronik karaciğer hastalığı ve siroz tanısı konulmuş hastalarda D vitamini eksikliğinin yaygın olduğu bildirilmiştir (Eitah vd., 2023). Yang vd., yaptıkları meta-analiz sonucu, ciddi D vitamini eksikliğinin, siroz tanısı konulmuş hastalarda artan mortalite riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (F. Yang vd., 2019). D3 vitamin takviyesinin yararlı etkileri, klinik araştırmalarda ve kronik karaciğer hastalığının kemirgen modellerinde bildirilmiştir (Goto vd., 2022).

Literatürde D vitamini ve kanser ile ilgili olarak çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. İlk olarak Colston vd., D vitamininin tümör büyümesi üzerindeki engelleyici etkilerini, 1,25(OH)₂D₃ uygulamasının melanom hücrelerinde hücre proliferasyonunda doza bağlı bir azalmaya neden olduğunu saptayarak bildirmiştir (Colston vd., 1981). Geçtiğimiz senelerde 6357 katılımcıdan veri sağlanarak yapılan prospektif bir çalışmada, en yüksek D vitamini konsantrasyonuna sahip olarak gruplandırılan hastalarda, en düşük D vitamini konsantrasyonuna sahip olarak gruplandırılan hastalara kıyasla %47 daha düşük karaciğer kanseri riski bulunmuştur. Böylece, D vitamini ile karaciğer kanseri riski arasında dolaylı olarak anlamlı bir doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu meta-analizden elde edilen sonuçlar, D vitamini seviyeleri ile karaciğer kanseri riski arasında ters bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir (Y. Zhang vd., 2021).

D vitamininin sadece karaciğer hücrelerinde değil, farklı kanser hücrelerinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Pazdiora vd., farklı kanser türlerine sahip 170 hastada (28 prostat kanseri, 43 meme kanseri, 49 kolorektal kanser ve 50 akciğer kanseri hastası) serum D vitamini değerlerini sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulmuştur (Pazdiora vd., 2011). Farklı bir çalışmada ise, D vitamininin meme kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Gocek ve Studzinski, 2009). Farklı bir çalışmada, MCF-7 hücre hattına salinomisin ve/veya D3 vitamini uygulanmıştır. Hücrelere 24, 48 ve 72 saat farklı dozlarda uygulamalar yapılmıştır. Salinomisin ve D3 vitamini birlikte uygulandığında, hücre canlılığının zamana ve doza bağlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Marques vd., 2022).

Ancak, tam aksine, Zhang vd., over kanseri hücrelerinde D vitamininin apoptozu engelleyebileceğini bildirmiştir (X. Zhang vd., 2005). Karbon tetraklorür (CCl₄), in

vitro/in vivo modellerde karaciğer toksisitesini tetiklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, melatonin ve D vitamininin HepG2 ve Hep3B hepatoma hücre hatlarında CCl₄ kaynaklı sitotoksosite üzerindeki koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. CCl₄ maruziyeti sırasında melatonin veya D vitamini uygulaması, karaciğer hücrelerini CCl₄ kaynaklı hepatotoksisteden korumuştur (Özerkan vd., 2015).

Dolayısıyla, D vitamininin kanser hücrelerinde etkisi tam olarak bilinmemektedir. Aşağıda da bahsedileceği üzere D vitamininin kanser riskine ya da kanser hücrelerine bir etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur.

Yeni Zelanda'da yapılan randomize klinik bir çalışmada, plasebo ve D3 vitamini ile çalışılmıştır. Gruplar kıyaslandığında, D3 vitamini takviyesinin kanser insidansına veya kanser ölümlerine bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Scragg vd., 2018). Yapılan benzer bir çalışmada, D vitamininin kanser hücrelerinde ve kardiyovasküler hastalıklarda bir etkisi olmadığı bulunmuştur (Tice vd., 2020). Çalışmamıza benzer olarak yapılan bir hücre kültürü çalışmasında da D vitamininin ilaç formu (çalışmamızda kullanılan ilaç ile aynı) ve aktif formu kullanılmıştır. HepG2 hücrelerine uygulanan D vitamininin ilaç formunun 24, 48 ve 72 saat muamele sonucunda çalışmamız ile benzer olarak hücre proliferasyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere yol açmadığı gösterilmiştir (Öner vd., 2020)

Geçtiğimiz yıl yapılan bir çalışmada, farelerde hepatokarsinogenez sürecini başlatmak için dietilnitrozamin ve tiyoasetamid kimyasalları kullanılmıştır. Belli sayıda hayvana D3 vitamini enjekte edilmiştir. Sonuçlarda ise takviye almayan farelerin karaciğerleri siroza benzer histopatolojik bulgular gösterirken, D3 vitamini enjekte edilmiş farelerde sağlıklı karaciğer gözlenmiştir. Her iki grupta da ALT seviyeleri ölçüldüğünde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Goto vd., 2022). Yaptığımız çalışmada da D vitamininin HepG2 hücrelerinde karaciğer enzim değerlerine bir etkisi gözlenmemiştir ve yapılan çalışma sonucumuzu destekler niteliktedir.

Yapılan bir başka çalışmada, sağlıklı denekler ile HCV ve HCV-HCC hastaları kıyaslanmıştır. HCV grubunda, serum AST ve ALT seviyeleri, sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde, HCV-HCC grubunda da serum AST ve ALT seviyeleri sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. HCV ve HCV-HCC hastalarında bu enzim seviyeleri

arasında anlamlı fark bulunmamıştır. HCV ve HCV-HCC hastalarında, Vitamin D2/D3 ve reseptörlerinin ortalama konsantrasyon seviyeleri ise, sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur, bu çalışma da D vitamininin karaciğer üzerindeki olumlu etkilerini göstermektedir (Abdel-Mohsen vd., 2018).

Yapılan başka bir çalışmada, kadın üreme sisteminde D vitamininin progesteron benzeri aktivite gösterdiği savunulmaktadır. D vitamini gebeliğin erken evrelerinde progesterona benzer şekilde endometriyumun gebeliğe hazırlanmasında katkıda bulunmuştur. Ayrıca, implantasyon sürecini ve gebeliğin seyrini desteklediği ve progesteron ile önemli bir etki sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir (Gianni, 2018).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, HepG2 hücrelerine uygulanan 1mM ve 2mM Depo Provera hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Aynı dozlar, karaciğer enzimleri AST ve LDH değerlerini de kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşürmüştür.

Farklı dozlarda D3 vitamini tek başına uygulandığında HepG2 hücrelerinde sitotoksik bir etki bulunmamıştır. Ancak, D vitamini birlikte uygulandığında Depo Provera'nın yol açtığı sitotoksiteyi de engellememiştir. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda, sadece D3 vitamini uygulanmış hücrelerde ALT, AST ve LDH değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Dahası D vitamini Depo Provera ile birlikte uygulandığında da bu enzim seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuş, dolayısıyla kullanılan doz ve inkübasyon sürelerinde D vitamininin progesteron muamelesinin sebep olabileceği olası sitotoksik etkileri engellemede rolü olmadığı düşünülmüştür. Daha detaylı incelemeler yapılabilmesi için, farklı dozlarda D vitamini ve/veya progesteron kullanılması ve farklı inkübasyon sürelerinde çalışmalar gereklidir.

KAYNAKLAR

- Abbkine. Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Retrieved August 30, 2023, from <https://www.abbkine.com/product/cell-counting-kit-8-cck-8-cta1020/>. (t.y.).
- Abdel-Mohsen, M. A., El-Braky, A. A.-A., Ghazal, A. A. E.-R., ve Shamseya, M. M. (2018). Autophagy, apoptosis, vitamin D, and vitamin D receptor in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Medicine*, 97(12), e0172. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010172>
- Abu-Hayyeh, S., ve Williamson, C. (2015). Progesterone metabolites as farnesoid X receptor inhibitors. *Digestive Diseases*, 33(3), 300-306. <https://doi.org/10.1159/000371565>
- Ackermann, T., ve Tardito, S. (2019). Cell culture medium formulation and its implications in cancer metabolism. *Trends in Cancer*, 5(6), 329-332. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.05.004>
- Adelani, I. B., Rotimi, O. A., Maduagwu, E. N., ve Rotimi, S. O. (2021). Vitamin D: Possible therapeutic roles in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.642653>
- Akkoyun, H. T., Bayramoğlu, M., Ekin, S., ve Çelebi, F. (2014). D vitamini ve metabolizma için önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 9(3). <https://doi.org/10.17094/avbd.05043>
- Alemdaroğlu, S., Yılmaz Baran, Ş., Durdağ, G. D., Yuksel Şimşek, S., Yetkinel, S., Alkaş Yağınç, D., vd. (2021). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Are in vitro fertilization pregnancies at risk? *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 34(15), 2548-2553. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1765331>

- Alese, M. O., Bamisi, O. D., ve Alese, O. O. (2021). Progesterone modulates cadmium-induced oxidative stress and inflammation in hepatic tissues of Wistar rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 14(10), 1048-1055.
- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., ve Poverennaya, E. V. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- Balci, C., ve Toktaş, N. (2021). D vitamini sentezi, metabolizması ve sağlık üzerine etkileri. *Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1), Article 1.
- Balogh, J., David W. Victor, I. I. I., Asham, E. H., Burroughs, S. G., Boktour, M., Saharia, A., vd. (2016). Hepatocellular carcinoma: A review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 3, 41-53. <https://doi.org/10.2147/JHC.S61146>
- Baur, A. C., Brandsch, C., Steinmetz, B., Schutkowski, A., Wensch-Dorendorf, M., ve Stangl, G. I. (2020). Differential effects of vitamin D3 vs vitamin D2 on cellular uptake, tissue distribution and activation of vitamin D in mice and cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 204, 105768. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105768>
- Baur, A. C., Kühn, J., Brandsch, C., Hirche, F., ve Stangl, G. I. (2019). Intake of ergosterol increases the vitamin D concentrations in serum and liver of mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 194, 105435. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105435>
- Beuers, U., ve Puhl, T. (2006). Intrahepatic cholestasis of pregnancy—A heterogeneous group of pregnancy-related disorders? *Hepatology*, 43(4), 647-649. <https://doi.org/10.1002/hep.21156>

- Bozic, M., Guzmán, C., Benet, M., Sánchez-Campos, S., García-Monzón, C., Gari, E., vd. (2016). Hepatocyte vitamin D receptor regulates lipid metabolism and mediates experimental diet-induced steatosis. *Journal of Hepatology*, 65(4), 748-757. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.031>
- Büyüköztürk, Ş. (1997). İki faktörlü varyans analizi. *Ankara University Journal of Faculty of Educational Sciences (JFES)*, 30(1), Article 1. https://doi.org/10.1501/Egifak_00000000272
- Carloni, V., Luong, T. V., ve Rombouts, K. (2014). Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: More complicated than ever. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 34(6), 834-843. <https://doi.org/10.1111/liv.12465>
- Celik, S., Golbasi, H., Gulucu, S., Guclu, M., Caliskan, C. S., Celik, S., vd. (2022). Role of Vitamin B12 and Vitamin D levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy and correlation with total bile acid. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 42(6), 1847-1852. <https://doi.org/10.1080/01443615.2022.2042797>
- Chang, S.-W., ve Lee, H.-C. (2019). Vitamin D and health—The missing vitamin in humans. *Pediatrics & Neonatology*, 60(3), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2019.04.007>
- Chang, W.-T., Lin, H.-L., Chang, K.-L., Ker, C.-G., Huang, M.-C., Chen, J.-S., vd. (2010). Progesterone increases epirubicin's apoptotic effects in HepG2 cells by S phase cell cycle arrest. *Hepato-Gastroenterology*, 57(97), 107-113.
- Chatterjee, S., ve Annaert, P. (2018). Drug-induced cholestasis: mechanisms, models, and markers. *Current Drug Metabolism*, 19(10), 808-818. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180427165035>

- Cheng, M. L., Nakib, D., Perciani, C. T., ve MacParland, S. A. (2021). The immune niche of the liver. *Clinical Science*, 135(20), 2445-2466. <https://doi.org/10.1042/CS20190654>
- Chongthavornvasana, S., Lertudomphonwanit, C., Mahachoklertwattana, P., ve Korwutthikulrangsri, M. (2023). Determination of optimal vitamin D dosage in children with cholestasis. *BMC Pediatrics*, 23(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s12887-023-04113-y>
- Choudhary, N. S., Bodh, V., Chaudhari, S., Saraf, N., ve Saigal, S. (2017). Norethisterone related drug induced liver injury: A series of 3 cases. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 7(3), 266-268. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2017.01.001>
- Clayton, R. J., Iber, F. L., Ruebner, B. H., ve McKusick, V. A. (1969). Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred. *American Journal of Diseases of Children* (1960), 117(1), 112-124.
- Colston, K., Colston, M. J., ve Feldman, D. (1981). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: The presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology*, 108(3), 1083-1086. <https://doi.org/10.1210/endo-108-3-1083>
- Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., ve Colonna, G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, 518(2), 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>
- Çobanoğlu, G. (2020). D vitamininin biyolojisi ve doğal kaynakları. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(Ek (Suppl.) 1), 380-391. <https://doi.org/10.29048/makufebd.778498>

- Davit-Spraul, A., Gonzales, E., Baussan, C., ve Jacquemin, E. (2009). Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-1>
- Daya, S. (2009). Luteal support: Progestogens for pregnancy protection. *Maturitas*, 65 Suppl 1, S29-34. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.09.012>
- de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J., ve Edwards, P. A. (2013). Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism*, 17(5), 657-669. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>
- Dixon, P. H., Levine, A. P., Cebola, I., Chan, M. M. Y., Amin, A. S., Aich, A., vd. (2022). GWAS meta-analysis of intrahepatic cholestasis of pregnancy implicates multiple hepatic genes and regulatory elements. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29931-z>
- Dror, D. K. (2011). Vitamin D status during pregnancy: Maternal, fetal, and postnatal outcomes. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 23(6), 422. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32834cb791>
- Du, T., Xiang, L., Zhang, J., Yang, C., Zhao, W., Li, J., vd. (2023). Vitamin D improves hepatic steatosis in NAFLD via regulation of fatty acid uptake and β -oxidation. *Frontiers in Endocrinology*, 14. 10 Ağustos 2023 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1138078>
- Duan, L., Yan, D., Zeng, W., Yang, X., ve Wei, Q. (2010). Effect of progesterone treatment due to threatened abortion in early pregnancy for obstetric and perinatal outcomes. *Early Human Development*, 86(1), 41-43. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2009.12.007>
- Duruel, H. E. E., Çağan, N. S., Işık, S., ve Esin, F. (2021). Hücre kültürlerine genel bakış.

- Eitah, H. E., Attia, H. N., Soliman, A. A. F., Gamal el Din, A. A., Mahmoud, K., Sayed, R. H., vd. (2023). Vitamin D ameliorates diethylnitrosamine-induced liver preneoplasia: A pivotal role of CYP3A4/CYP2E1 via DPP-4 enzyme inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 458, 116324. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116324>
- Elferink, R. O. (2003). Cholestasis. *Gut*, 52(suppl 2), ii42-ii48. https://doi.org/10.1136/gut.52.suppl_2.ii42
- Erkekoğlu, P., ve Baydar, T. (2021). Güncel in vitro sitotoksosite testleri. 41(1).
- Estiú, M. C., Monte, M. J., Rivas, L., Moirón, M., Gomez-Rodriguez, L., Rodriguez-Bravo, T., vd. (2015). Effect of ursodeoxycholic acid treatment on the altered progesterone and bile acid homeostasis in the mother-placenta-foetus trio during cholestasis of pregnancy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 79(2), 316-329. <https://doi.org/10.1111/bcp.12480>
- Fawaz, R., Baumann, U., Ekong, U., Fischler, B., Hadzic, N., Mack, C. L., vd. (2017). Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: Joint recommendations of the north american society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition and the european society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(1), 154-168. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001334>
- Feldman, A. G., ve Sokol, R. J. (2019). Neonatal cholestasis: Emerging molecular diagnostics and potential novel therapeutics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(6), 346-360. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0132-z>
- Feng, C., Li, W.-J., He, R.-H., Sun, X.-W., Wang, G., ve Wang, L.-Q. (2018). Impacts of different methods of conception on the perinatal outcome of intrahepatic

- cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22387-6>
- Feng, J., Li, J., Wu, L., Yu, Q., Ji, J., Wu, J., vd. (2020). Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 39(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01629-4>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., vd. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fernández-Murga, M. L., Petrov, P. D., Conde, I., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., ve Jover, R. (2018). Advances in drug-induced cholestasis: Clinical perspectives, potential mechanisms and in vitro systems. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 196-212. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.017>
- Fragni, M., Fiorentini, C., Rossini, E., Fisogni, S., Vezzoli, S., Bonini, S. A., vd. (2019). In vitro antitumor activity of progesterone in human adrenocortical carcinoma. *Endocrine*, 63(3), 592-601. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1795-x>
- Garg, D., Ng, S. S. M., Baig, K. M., Driggers, P., ve Segars, J. (2017). Progesterone-mediated non-classical signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(9), 656-668. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.006>
- Gençosmanoğlu Türkmen, G., Vural Yilmaz, Z., Dağlar, K., Kara, Ö., Sanhal, C. Y., Yücel, A., vd. (2018). Low serum vitamin D level is associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(9), 1712-1718. <https://doi.org/10.1111/jog.13693>

- Gholamalizadeh, M., Jarrahi, A. M., Akbari, M. E., Bourbour, F., Mokhtari, Z., Salahshornezhad, S., vd. (2020). Association between FTO gene polymorphisms and breast cancer: The role of estrogen. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 15(2), 115-121. <https://doi.org/10.1080/17446651.2020.1730176>
- Ghouri, Y. A., Mian, I., ve Rowe, J. H. (2017). Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis*, 16, 1. https://doi.org/10.4103/jcar.JCar_9_16
- Gianni. (2018). Vitamin D: A steroid hormone with progesterone-like activity. *European Review*. 05 Mayıs 2023 <https://www.europeanreview.org/article/14845>
- Gijbels, E., Vilas-Boas, V., Deferm, N., Devisscher, L., Jaeschke, H., Annaert, P., vd. (2019). Mechanisms and in vitro models of drug-induced cholestasis. *Archives of Toxicology*, 93(5), 1169-1186. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02437-2>
- Glantz, A., Marschall, H.-U., Lammert, F., ve Mattsson, L.-Å. (2005). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: A randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology*, 42(6), 1399-1405. <https://doi.org/10.1002/hep.20952>
- Glantz, A., Reilly, S.-J., Benthin, L., Lammert, F., Mattsson, L.-Å., ve Marschall, H.-U. (2008). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Amelioration of pruritus by UDCA is associated with decreased progesterone disulphates in urine. *Hepatology*, 47(2), 544-551. <https://doi.org/10.1002/hep.21987>
- Gocek, E., ve Studzinski, G. P. (2009). Vitamin D and differentiation in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(4), 190-209. <https://doi.org/10.1080/10408360902982128>

- Goncalves, A., Gontero, B., Nowicki, M., Margier, M., Masset, G., Amiot, M.-J., vd. (2015). Micellar lipid composition affects micelle interaction with class B scavenger receptor extracellular loops. *Journal of Lipid Research*, 56(6), 1123-1133. <https://doi.org/10.1194/jlr.M057612>
- Goto, R. L., Tablas, M. B., Prata, G. B., Espírito Santo, S. G., Fernandes, A. A. H., Cogliati, B., vd. (2022). Vitamin D3 supplementation alleviates chemically-induced cirrhosis-associated hepatocarcinogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 215, 106022. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.106022>
- Götze, T., Blessing, H., Grillhösl, C., Gerner, P., ve Hoerning, A. (2015). Neonatal cholestasis—differential diagnoses, current diagnostic procedures, and treatment. *Frontiers in Pediatrics*, 3, 43. <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00043>
- Grandhi, M. S., Kim, A. K., Ronnekleiv-Kelly, S. M., Kamel, I. R., Ghasebeh, M. A., ve Pawlik, T. M. (2016). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *Surgical Oncology*, 25(2), 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2016.03.002>
- Güleç, D., ve Sevil, Ü. (2013). Gebelik intrahepatik kolestazi ve hemşirelik bakımı. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 29(2), Article 2.
- Haber, B., Ferreira, C. T., Aw, M., Bezerra, J., Sturm, E., Thompson, R., vd. (2008). Cholestasis: Current issues and plan for the future. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47(2), 220. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318181b038>
- He, S., ve Tang, S. (2020). WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 132, 110851. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110851>

- Heathcote, E. J. (2007). Diagnosis and management of cholestatic liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 5(7), 776-782. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.05.008>
- Henry, H. L. (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 531-541. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.003>
- Holick, M. F. (2005). The vitamin D epidemic and its health consequences. *The Journal of Nutrition*, 135(11), 2739S-48S. <https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2739S>
- Ihlamur, M., Akgül, B., ve Abamor, E. Ş. (2022). Farklı hücre hatlarında besiyeri ve fbs'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17(1), 55-64. <https://doi.org/10.29233/sdufeffd.927126>
- Imam, M. H., Gossard, A. A., Sinakos, E., ve Lindor, K. D. (2012). Pathogenesis and management of pruritus in cholestatic liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(7), 1150-1158. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07109.x>
- Jankowska, I., ve Socha, P. (2012). Progressive familial intrahepatic cholestasis and inborn errors of bile acid synthesis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 36(3), 271-274. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2012.03.020>
- Jazaeri, F., Sheibani, M., Nezamoleslami, S., Moezi, L., ve Dehpour, A.-R. (2021). Current models for predicting drug-induced cholestasis: The role of hepatobiliary transport system. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.113362.14254>

- Jiang, K., Al-Diffhala, S., ve Centeno, B. A. (2018). Primary liver cancers-part 1: Histopathology, differential diagnoses, and risk stratification. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 25(1), 1073274817744625. <https://doi.org/10.1177/1073274817744625>
- Jones-Hughes, T., Campbell, J., ve Crathorne, L. (2021). Epidemiology and burden of progressive familial intrahepatic cholestasis: A systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01884-4>
- Jung, K.-W., Won, Y.-J., Oh, C.-M., Kong, H.-J., Lee, D. H., Lee, K. H., vd. (2017). Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2014. *Cancer Research and Treatment*, 49(2), 292-305. <https://doi.org/10.4143/crt.2017.118>
- Jurk, S. M., Kremer, A. E., ve Schleussner, E. (2021). Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 81(08), 940-947. <https://doi.org/10.1055/a-1522-5178>
- Jüngst, C., Berg, T., Cheng, J., Green, R. M., Jia, J., Mason, A. L., vd. (2013). Intrahepatic cholestasis in common chronic liver diseases. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(10), 1069-1083. <https://doi.org/10.1111/eci.12128>
- Kantar, D. F. U. (2017). Karaciğer fonksiyon testi yüksekliğine yaklaşım. *Klinik Tıp Bilimleri*, 5(2), Article 2.
- Karrer, F. M., ve Bensard, D. D. (2000). Neonatal cholestasis. *Seminars in Pediatric Surgery*, 9(4), 166-169. <https://doi.org/10.1053/spsu.2000.18847>
- Katarey, D., ve Verma, S. (2016). Drug-induced liver injury. *Clinical Medicine*, 16(Suppl 6), s104-s109. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s104>

- Kinci, M. F., Şehirli Kinci, Ö., ve Karakaş Paskal, E. (2021). Gebeliğin intrahepatik kolestazı. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi*, 8(2), 158-162.
<https://doi.org/10.47572/muskutd.716205>
- Kitano, H., Kawabe, Y., ve Kamihira, M. (2022). HepG2-Based designer cells with heat-inducible enhanced liver functions. *Cells*, 11(7), 1194.
<https://doi.org/10.3390/cells11071194>
- Kitson, M. T., ve Roberts, S. K. (2012). D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*, 57(4), 897-909.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.033>
- Koçaklı, Z., Akillioğlu, K., ve Doğan, A. (2015). Isolation and culture of vascular smooth muscle cells. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(3), Article 3.
<https://doi.org/10.17827/aktd.46809>
- Lala, V., Zubair, M., ve Minter, D. A. (2023). Liver function tests. *StatPearls Publishing*. 05 Temmuz 2023 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482489/>
- Langedijk, J. A. G. M., Beuers, U. H., ve Oude Elferink, R. P. J. (2021). Cholestasis-associated pruritus and its pruritogens. *Frontiers in Medicine*, 8, 639674.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.639674>
- Lee, S. R., Lee, J. G., Heo, J. H., Jo, S. L., Ryu, J., Kim, G., vd. (2021). Loss of PGRMC1 delays the progression of hepatocellular carcinoma via suppression of pro-inflammatory immune responses. *Cancers*, 13(10), Article 10.
<https://doi.org/10.3390/cancers13102438>
- Lehmann, U., Riedel, A., Hirche, F., Brandsch, C., Girndt, M., Ulrich, C., vd. (2016). Vitamin D3 supplementation: Response and predictors of vitamin D3 metabolites

- A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 35(2), 351-358.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.04.021>
- Lermi, D. A. (2018). Thoma lamı ile hücre sayımı.
- Leung, P. S. (2019). The modulatory action of vitamin D on the renin–angiotensin system and the determination of hepatic insulin resistance. *Molecules*, 24(13), Article 13.
<https://doi.org/10.3390/molecules24132479>
- Li, T., ve Chiang, J. Y. L. (2014). Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacological Reviews*, 66(4), 948-983.
<https://doi.org/10.1124/pr.113.008201>
- Ma, X., Jiang, Y., Zhang, W., Wang, J., Wang, R., Wang, L., vd. (2020). Natural products for the prevention and treatment of cholestasis: A review. *Phytotherapy Research: PTR*, 34(6), 1291-1309. <https://doi.org/10.1002/ptr.6621>
- Mariotti, V., Cadamuro, M., Spirli, C., Fiorotto, R., Strazzabosco, M., ve Fabris, L. (2019). Animal models of cholestasis: An update on inflammatory cholangiopathies. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 1865(5), 954-964. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.025>
- Marques, L. A., Semprebon, S. C., Biazi, B. I., Felicidade, I., Zanetti, T. A., Baranoski, A., vd. (2022). 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*, 452, 116178.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116178>
- Miranda, S., Litwin, S., Barrientos, G., Szereday, L., Chuluyan, E., Bartho, J. S., vd. (2006). Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(5), Article 5.

- Morotti, R. A., Suchy, F. J., ve Magid, M. S. (2011). Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) type 1, 2, and 3: A review of the liver pathology findings. *Seminars in Liver Disease*, 31(1), 3-10. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1272831>
- Mucci, L. A., Kuper, H. E., Tamimi, R., Ligiou, P., Spanos, E., ve Trichopoulos, D. (2001). Age at menarche and age at menopause in relation to hepatocellular carcinoma in women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 108(3), 291-294. [https://doi.org/10.1016/S0306-5456\(00\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0306-5456(00)00032-2)
- Nagy, B., Szekeres-Barthó, J., Kovács, G. L., Sulyok, E., Farkas, B., Várnagy, Á., vd. (2021). Key to life: Physiological role and clinical implications of progesterone. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/ijms222011039>
- Öner, Ç., İsan, H., Aktaş, R. G., ve Çolak, E. (2020). Vitamin D'nin hepatoselüler karsinom üzerindeki etkisi. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 42(3), Article 3. <https://doi.org/10.20515/otd.584749>
- Özerkan, D., Özsoy, N., ve Yılmaz, E. (2015). Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl₄ induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines. *Cytotechnology*, 67(6), 995-1002. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9738-8>
- Padda, M. S., Sanchez, M., Akhtar, A. J., ve Boyer, J. L. (2011). Drug-induced cholestasis. *Hepatology*, 53(4), 1377-1387. <https://doi.org/10.1002/hep.24229>
- Palagiano, A., Bulletti, C., Pace, M. C., DE Ziegler, D., Cicinelli, E., ve Izzo, A. (2004). Effects of vaginal progesterone on pain and uterine contractility in patients with threatened abortion before twelve weeks of pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034, 200-210. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.022>

- Pauli-Magnus, C., Meier, P. J., ve Stieger, B. (2010). Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Seminars in Liver Disease*, 30(02), 147-159. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253224>
- Pazdiora, P., Svobodova, S., Fuchsova, R., Kucera, R., Prazakova, M., Vrzalova, J., vd. (2011). Vitamin D in colorectal, breast, prostate and lung cancer: A pilot study. *Anticancer Research*, 31(10), 3619-3621.
- Pedernera, E., Gómora, M. J., Morales-Vásquez, F., Pérez-Montiel, D., ve Mendez, C. (2019). Progesterone reduces cell survival in primary cultures of endometrioid ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0486-4>
- Petrescu, A. D., ve DeMorrow, S. (2021). Farnesoid X receptor as target for therapies to treat cholestasis-induced liver injury. *Cells*, 10(8), 1846. <https://doi.org/10.3390/cells10081846>
- Petrack, J. L., Braunlin, M., Laversanne, M., Valery, P. C., Bray, F., ve McGlynn, K. A. (2016). International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978-2007. *International Journal of Cancer*, 139(7), 1534-1545. <https://doi.org/10.1002/ijc.30211>
- Piechota, J., ve Jelski, W. (2020). Intrahepatic cholestasis in pregnancy: Review of the literature. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jcm9051361>
- Pludowski, P., Holick, M. F., Grant, W. B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M. R., Haq, A., vd. (2018). Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.021>

- Pollock, G., ve Minuk, G. Y. (2017). Diagnostic considerations for cholestatic liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32(7), 1303-1309. <https://doi.org/10.1111/jgh.13738>
- Popović, B., Sutić, I., Skočibušić, N., Ljubotina, A., Diminić-Lisica, I., ve Bukmir, L. (2015). Cholestasis and inflammation of the pancreas in family medicine. *Acta Medica Croatica: Casopis Hrvatske Akademije Medicinskih Znanosti*, 69(4), 319-326.
- Qureshi, N. S. (2009). Treatment options for threatened miscarriage. *Maturitas*, 65 Suppl 1, S35-41. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.10.010>
- Racanelli, V., ve Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(2 Suppl 1), S54-62. <https://doi.org/10.1002/hep.21060>
- Reyes, H. (2016). Sulfated progesterone metabolites in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy: Another loop in the ascending spiral of medical knowledge. *Hepatology*, 63(4), 1080. <https://doi.org/10.1002/hep.28365>
- Romero, R., ve Stanczyk, F. Z. (2013). Progesterone is not the same as 17 α -hydroxyprogesterone caproate: Implications for obstetrical practice. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 208(6), 421-426. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.04.027>
- Salem, R., Lewandowski, R. J., Mulcahy, M. F., Riaz, A., Ryu, R. K., Ibrahim, S., vd. (2010). Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: A comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology*, 138(1), 52-64. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.006>

- Saponaro, F., Saba, A., ve Zucchi, R. (2020). An update on vitamin D metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>
- Satriano, L., Lewinska, M., Rodrigues, P. M., Banales, J. M., ve Andersen, J. B. (2019). Metabolic rearrangements in primary liver cancers: Cause and consequences. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(12), 748-766. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0217-8>
- Sawada, N., Sakaki, T., Ohta, M., ve Inouye, K. (2000). Metabolism of vitamin D3 by human CYP27A1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(3), 977-984. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3050>
- Scragg, R., Khaw, K.-T., Toop, L., Sluyter, J., Lawes, C. M. M., Waayer, D., vd. (2018). Monthly high-dose vitamin D supplementation and cancer risk: A post hoc analysis of the vitamin D assessment randomized clinical trial. *JAMA Oncology*, 4(11), e182178. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2178>
- Segeritz, C.-P., ve Vallier, L. (2017). Chapter 9 - Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (ss. 151-172). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Selam, B., ve Topçuoğlu, A. (2004). Luteal faz fizyolojisi ve overi stimule eden ajanlarla değişimi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(3), Article 3.
- Shah, R., ve John, S. (2023). Cholestatic jaundice. *StatPearls Publishing*. 13 Temmuz 2023 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482279/>
- Shi, Y., ve Qi, H. (2010). Effects of intrahepatic cholestasis on morphology of fetal lungs in pregnant rat. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 45(4), 283-286.

- Singhal, H., Greene, M. E., Tarulli, G., Zarnke, A. L., Bourgo, R. J., Laine, M., vd. (2016). Genomic agonism and phenotypic antagonism between estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Science Advances*, 2(6), e1501924. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501924>
- Sjövall, J., ve Sjövall, K. (1970). Steroid sulphates in plasma from pregnant women with pruritus and elevated plasma bile acid levels. *Annals of Clinical Research*, 2(4), 321-337.
- Smith, D. D., ve Rood, K. M. (2020). Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 63(1), 134. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000495>
- Srivastava, A. (2014). Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4(1), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2013.10.005>
- Stanger, B. Z. (2015). Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annual Review of Physiology*, 77, 179-200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170255>
- Şekerden, Ö., Köroğlu, M., ve Saban, E. (2005). Hatay ili anadolu mandalarında tohumlamadan sonra kan ve süt progesteron testi kullanılarak erken gebelik teşhis imkanları. *Journal of Agricultural Sciences*, 11(01), Article 01. https://doi.org/10.1501/Tarimbil_00000000494
- Tanaka-Yachi, R., Aizawa, K., Shimizu, K., Akutsu, H., ve Nakamura, K. (2022). DNMT1/PKR double knockdowned HepG2 (HepG2-DP) cells have high hepatic function and differentiation ability. *Scientific Reports*, 12(1), 21173. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25777-z>

- Terli, E. P., Mucuk, F., Uluçay, C., Kılıç, N. İ., Akkır, M., Atılğan, O., vd. (2019). D vitamini: Yapısı, sentezi ve çeşitli hastalıklardaki önemi.
- Tice, J. A., Halalau, A., ve Burke, H. (2020). Vitamin D does not prevent cancer or cardiovascular disease: The VITAL trial. *Journal of General Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11606-020-05648-x>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., ve Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Toyoda, Y., Endo, S., Tsuneyama, K., Miyashita, T., Yano, A., Fukami, T., vd. (2012). Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 126(1), 16-27. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr326>
- Trauner, M., Meier, P. J., ve Boyer, J. L. (1998). Molecular pathogenesis of cholestasis. *The New England Journal of Medicine*, 339(17), 1217-1227. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810223391707>
- Trefts, E., Gannon, M., ve Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology: CB*, 27(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Tsai, H.-W., Ho, C.-L., Cheng, S.-W., Lin, Y.-J., Chen, C.-C., Cheng, P.-N., vd. (2018). Progesterone receptor membrane component 1 as a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 24(10), 1152-1166. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i10.1152>
- Tsur, A., Leonard, S. A., Kan, P., Datoc, I. A., Girsen, A. I., Shaw, G. M., vd. (2023). Vaginal progesterone is associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *American Journal of Perinatology*. <https://doi.org/10.1055/a-2081-2573>

- Tümgör, G. (2016). Cholestasis and pruritus: Progressive familial intrahepatic cholestasis? *Güncel Pediatri*, 14(2), 88-95. <https://doi.org/10.4274/jcp.05706>
- Uygur, D., ve Ersoy, A. Ö. (2015). Gebeliğin intrahepatik kolestazı ve yönetimi. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 12(6), Article 6.
- Van den Hof, W. F. P. M., Coonen, M. L. J., van Herwijnen, M., Brauers, K., Jennen, D., Damink, S. W. M. O., vd. (2017). Validation of gene expression profiles from cholestatic hepatotoxicants in vitro against human in vivo cholestasis. *Toxicology in Vitro*, 44, 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.024>
- Varolgüneş, H., İnan, A., Kaptanoğlu, E., ve Demirci, S. (1997). Primer ve metastatik karaciğer tümörlerinde tedavi yöntemleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 50(4), Article 4. https://doi.org/10.1501/Tipfak_00000000608
- Vitale, G., Gitto, S., Vukotic, R., Raimondi, F., ve Andreone, P. (2019). Familial intrahepatic cholestasis: New and wide perspectives. *Digestive and Liver Disease*, 51(7), 922-933. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.04.013>
- Wikström Shemer, E., ve Marschall, H.-U. (2010). Decreased 1,25-dihydroxy vitamin D levels in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 89(11), 1420-1423. <https://doi.org/10.3109/00016349.2010.515665>
- Williams, J. F., ve Olefsky, J. M. (1990). Defective insulin receptor function in down-regulated HepG2 cells. *Endocrinology*, 127(4), 1706-1717. <https://doi.org/10.1210/endo-127-4-1706>
- Williamson, C., ve Geenes, V. (2014). Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 124(1), 120. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000346>

- Winston, J. A., ve Theriot, C. M. (2020). Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut Microbes*, 11(2), 158-171. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1674124>
- Xiao, J., Li, Z., Song, Y., Sun, Y., Shi, H., Chen, D., vd. (2021). Molecular pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2021, e6679322. <https://doi.org/10.1155/2021/6679322>
- Yağbasan, F., Işıkalın, M. M., ve Çolakoğlu, M. C. (2020). Erken gebelikte kullanılan vajinal, intramuskuler veya kombine progesteronun serum progesteron düzeylerine etkisinin karşılaştırılması. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(3), 487-491. <https://doi.org/10.35440/hutfd.761669>
- Yang, F., Ren, H., Gao, Y., Zhu, Y., ve Huang, W. (2019). The value of severe vitamin D deficiency in predicting the mortality risk of patients with liver cirrhosis: A meta-analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 43(6), 722-729. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.03.001>
- Yang, K., Köck, K., Sedykh, A., Tropsha, A., ve Brouwer, K. L. R. (2013). An updated review on drug-induced cholestasis: Mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(9), 3037-3057. <https://doi.org/10.1002/jps.23584>
- Yeh, S.-H., ve Chen, P.-J. (2010). Gender disparity of hepatocellular carcinoma: The roles of sex hormones. *Oncology*, 78(Suppl. 1), 172-179. <https://doi.org/10.1159/000315247>
- Yılmaz, E., Delikara, N., Çetinkaya, T., Yılmaz, S., ve Sofuoğlu, K. (2008). Yardımcı üreme tekniklerinde iki farklı luteal faz progesteron kullanımı karşılaştırılması. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 39(3), Article 3.

- Zhang, K., ve Chow, P. K. H. (2004). The effect of megestrol acetate on growth of HepG2 cells in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(15), 5226-5232. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0061>
- Zhang, X., Li, P., Bao, J., Nicosia, S. V., Wang, H., Enkemann, S. A., vd. (2005). Suppression of death receptor-mediated apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 revealed by microarray analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35458-35468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506648200>
- Zhang, Y., Jiang, X., Li, X., Găman, M.-A., Kord-Varkaneh, H., Rahmani, J., vd. (2021). Serum vitamin D levels and risk of liver cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Nutrition and Cancer*, 73(8), 1-9. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1797127>
- Zipori, Y., Bachar, G., Farago, N., Lauterbach, R., Weissman, A., Beloosesky, R., vd. (2020). Vaginal progesterone treatment for the prevention of preterm birth and intrahepatic cholestasis of pregnancy: A case-control study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 253, 117-120. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.08.043>
- Zou, M., Wang, A., Wei, J., Cai, H., Yu, Z., Zhang, L., vd. (2021). An insight into the mechanism and molecular basis of dysfunctional immune response involved in cholestasis. *International Immunopharmacology*, 92, 107328. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107328>

ÖZGEÇMİŞ

Melek Naz AKKUŞ

Eğitim

Derece	Yıl	Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı
--------	-----	---

Yüksek Lisans	2021-2023	Maltepe Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
---------------	-----------	---

Lisans	2016-2020	Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
--------	-----------	---

Alınan Burs ve Ödüller (Varsa)

Yıl	Burs/Ödül
2016-2020	Eğitim Bursu
2021-2023	Eğitim Bursu
2023	Bilimsel Araştırma Projesi

