

Araştırma Makalesi

İnsan Meme Kanseri Hücre Serileri (MCF-7) Üzerine Apelin-13'ün Etkilerinin Araştırılması: *In Vitro* Bir Çalışma*The Investigation of The Effects of Apelin on Human Breast Cancer Cell Lines (MCF-7): An In Vitro Study*Ferda KOYUNO¹, Suat TEK², Vahit KONAR¹, Süleyman SANDAL²¹Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Elazığ²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Malatya**Özet**

Apelin, G protein kenetli orfan apelin reseptörünün (APJ) endojen ligantıdır. Apelinin hipotalamusta özellikle arkuat, supraoptik ve paraventricüler nükleus gibi hipotalamik alanlarda da bulunması, testis, prostat ve meme dokusunda APJ'nin bulunması, üreme sistemi üzerinde apelinin önemli fizyolojik etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir. Apelinin yapısındaki 13 amino asit dizilimi tüm formlarında değişmezdir, temel apelin yapısı apelin-13 olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada ilk olarak, östrojen duyarlı insan meme kanseri hücre hattına (MCF-7), apelin-13'ün 0.1, 1 ve 10 nM'lık konsantrasyonları, östrojen hormonunun 1, 10, 100 nM'lık konsantrasyonları uygulandı. Daha sonra apelinin, 1 ve 10 nM olan dozları ile östrojen hormonunun 1, 10, 100 nM'lık dozları eş zamanlı olarak kültüre uygulandı ve 24 saat inkübe edildi. Bu maddelerin MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkileri, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ile belirlendi. Sonuçlar, % hücre canlılığı olarak belirlendi. MCF-7 hücre hattına uygulanan apelin-13'ün hücre canlılığını azalttığı (p<0.05), östrojenin ise hücre canlılığını arttırdığı tespit edildi (p>0.05). Apelin-13'ün, MCF-7 hücre serilerinde canlılığı azaltması (östrojen indüklemeli gruplarda dahil) proliferatif etkinin östrojen reseptör kaynaklı olduğunu ve apelin-13'ün anti-kanserojenik bir ajan olarak kullanılabilirliğini akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: MTT assay, apelin, APJ, MCF-7, hücre kültürü**Abstract**

Apelin is the endogenous ligand for the G-protein-coupled APJ receptor. Apelin has been found in hypothalamic fields such as the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the hypothalamus and it is seen in testicle, prostate and mammary tissues. Therefore apelin may be influential on reproductive system. Apelin shows the distribution in the hypothalamus, especially the arcuate, supraoptic nucleus and such as paraventricular hypothalamic areas. Presence of APJ in the testicles, the prostate tissue, breast tissue, suggests that apelin may have important physiological effects on the reproductive system. As the sequence of 13 amino acids in apelin can not be changed, the basic apelin structure is accepted as apelin-13. In the study, firstly, 0.1, 1 and 10 μ M concentrations of apelin-13 and 1, 10, 100 μ M concentrations of estrogen were applied into the line of estrogen sensitive breast cancer cell (MCF-7). Apelin 0.1, 1 and 10 μ M and estrogen hormone 1, 10, 100 μ M were simultaneously cultured and incubated for 24 hours and their effectiveness were detected by means of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). It has been detected that apelin-13 applied into MCF-7 line decreases the cell liveliness, and estrogen increases cell liveliness (p<0.05). These results suggest that the proliferative effect on MCF-7 is estrogen receptor oriented because estrogen hormone is estrogen receptor positive. Apelin-13 to reduce the viability of MCF-7 cell lines (including estrogen-induced groups) suggests that proliferative effect is induced estrogen receptor and apelin-13 can be used as an anti-carcinogenic agent.

Key words: MTT assay, apelin, APJ, MCF-7, cell culture**Giriş**

Meme kanseri, kadınlar arasında yaygın görülmekte ve kanser nedeni ölümlerin başında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, kadınlarda görülen kanser türleri içinde en yaygın olanının meme kanseri olduğu rapor edilmiştir (1). Hastalığın yaygın olarak görülmesi ve ölüme sonuçlanması nedeniyle bu hastalığın tedavisine yönelik araştırmalar halen güncelliğini korumakta ve giderek artmaktadır.

Meme kanserlerinin ortaya çıkması ve gelişmesinde başta östrojen (E_2) olmak üzere bazı hormonların rol oynadığı ve hormonların etkisi olmadan, meme kanseri olmayacağı bildirilmektedir (2, 3). Bundan dolayı kadınlarda meme kanseri erkeklere oranla 100 kat daha sık görülmektedir (4).

Obezitenin meme kanserinde bir risk faktörü olduğu ve diyetle başlıya alınmasının kanser gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (5). 1998 yılında Tatamoto ve ark. tarafından keşfedilen apelin, adipoz doku

alesinin yeni bir üyesidir (6) ve etkilerini APJ reseptörlerine bağlanarak ortaya koyar (6-8). İlk olarak sıçır mide dokusundan izole edilmiş olan apelin (6, 7), 77 aminoasitlik diziyeye sahip bir preproapelin prekürsöründen türemiştir ve farklı dokularda da iki apelin formu bulunmaktadır (apelin-10, 13, 16 ve 36 gibi) (9, 10). Yapılan *in vitro* çalışmalarda tüm apelin türevleri içerisinde biyolojik olarak en aktif olan formun apelin-13 olduğu ortaya konulmuştur (6, 9). Habata ve ark. sıçır meme dokusunda gebelik ve laktasyon döneminde apelin ekspresyonunda belirgin bir artış olduğunu belirlemiştir (11). Yapılan çalışmalarda, apelinin sadece sıçır ve sıçır süt örneklerinde değil, insan sütünde de bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir (9, 10, 12). Apelin mRNA'sının, Hs 578T insan meme kanseri hücre kültürlerinde yüksek seviyelerde ekspresyon edildiği ortaya konulmuştur (13). Ayrıca malin duktal ve lobüler tümör hücrelerinde de apelin mRNA ekspresyonunun devam ettiği gösterilmiştir (14). Tüm bu

bulgular, meme kanseri gelişiminde apelinin önemli etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bu sürecin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu çalışmada, apelin-13 ve E₂ hormonlarının *in vitro* olarak, MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem

Kimyasallar

Apelin-13 (Cayman), 17 β -östrodiol (Alfa aesar), Newborn calf serum (FCS) ve penisilin-streptomisin (Biological Industries, İsrail), NaCl, NaOH, dimetil sülfoksit (DMSO) ve HCl (Merck, Almanya) satın alındı. Kullanılan diğer kimyasallar ve medyumlar, Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) sağlandı. Deneylerin tüm safhalarında bi-distile su kullanıldı. Test edilecek apelin-13, medyuma çözülerek 0.1, 1 ve 10 nM'lik konsantrasyonları, 17 β -östrodiol ise etil alkolde (ETOH) çözülerek 1, 10, 100 nM'lik konsantrasyonları deneyde kullanılmak üzere hazırlandı. Stok çözeltiler deney süresince +4°C'de muhafaza edildi.

Hücre kültürü

MCF-7 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden (Ankara) temin edildi. Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Araştırmalar Laboratuvarında yapıldı. Tüm hücreler 25 cm² kültür flaklarında, RPMI-1640 medyum (içerisine %10 FCS, 100U/ml penisilin ve 0.1mg/ml streptomisin ilave edilerek hazırlanan) ile beslendiler. Karbondioksitli inkübatörde (%5 CO₂+%95 O₂; Nuair Co, Plymouth, MN, ABD), 37°C'de ve nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirildi. Hücreler konfluent olduğunda, tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flaklardan söküldü ve 96 kuyucuklu plaklara aktarılarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid (MTT) assay analizlerinde kullanıldı.

Test ajanları ile muamele

Test ajanları ile muamele edilmeden önce hücrelerin canlılık oranları (trypan blue exclusion yöntemi ile) belirlendi. Canlılık oranının %90'ın altında olduğu durumlarda deneylere başlanmadı. Test edilecek apelin-13 hormonunun 0.1, 1 ve 10 nM'lik, E₂ hormonunun 1, 10, 100 nM dozları ve aynı miktarlarda çözücü (ETOH) hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara ilave edildi ve karbondioksit inkübatöründe 24 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

MTT Assay

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin de belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT assay ile belirlendi. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve spektrofotometrik olarak belirlenen densite, ya da hücre sayısı ile ilişkilendirilir (15, 16). Steril PBS içerisinde

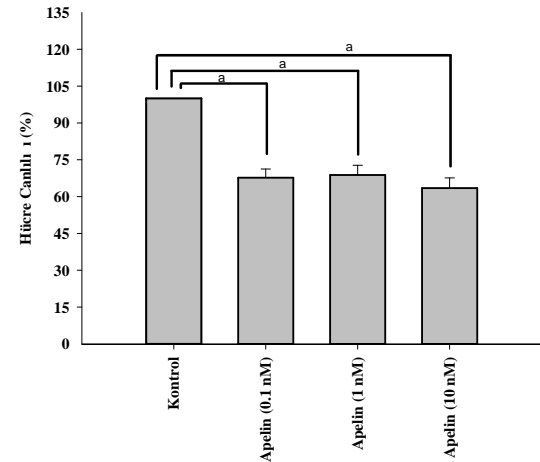
hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. Inkübatörde 3 saat bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri, ELISA plate okuyucuda (Synergy HT ABD) 550 nm dalga boyunda okutuldu (17). Kontrol kuyucukları okutulularak, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Çözücü ve ajan uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi. MTT denemeleri farklı günlerde en az on kez tekrar edildi.

statistiksel Analiz

Grupların normal dağılıma uygunluğu, Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Varyansların homojenliği, Levene testi ile analiz edildi. Tek yönlü varyans analizi sonrası varyansların homojen olmadığı gözlemlendi ve çoklu karşılaştırmalar için TAMHANE T2 testi kullanıldı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

Bulgular

MCF-7 hücreleri, 24 saat süreyle apelin-13'ün farklı konsantrasyonları ile (0.1, 1 ve 10 nM) inkübe edildikten sonra hücrelerin canlılık oranlarında meydana gelen değişimler belirlenip sonuçlar ekil 1'de gösterilmiştir.

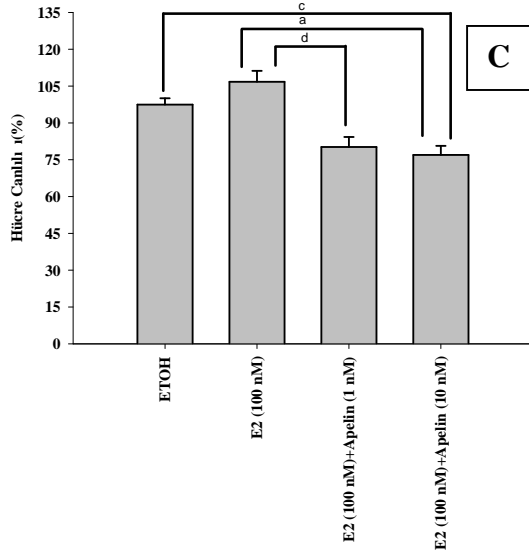
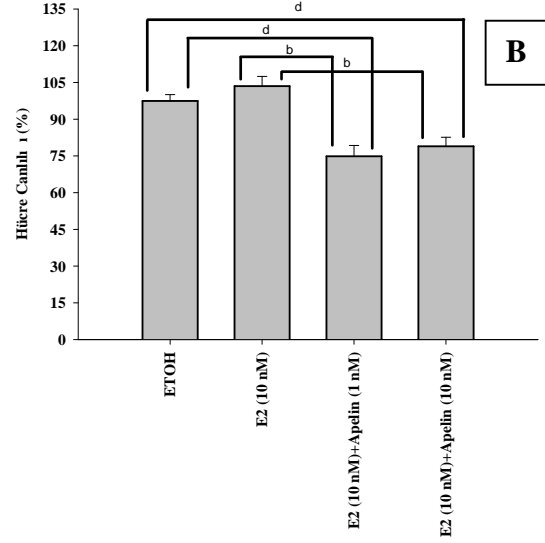
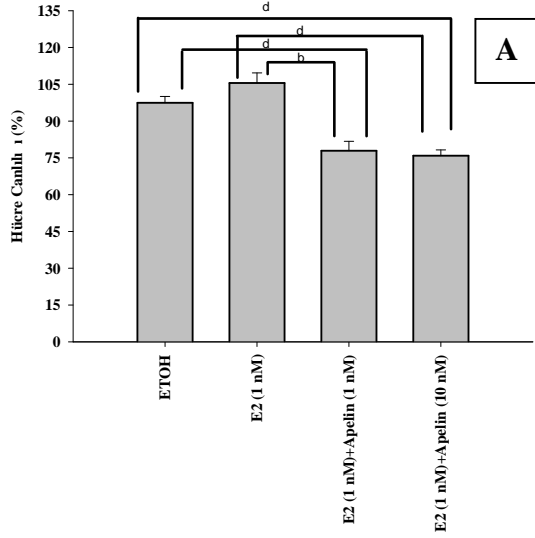


ekil 1. Apelin-13 uygulanmasından sonra hücre canlılığında meydana gelen (Ort \pm SH) değişiklikler (^ap<0.001; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD).

Uygulanan apelin-13'ün, tüm konsantrasyonları hücre canlılığında önemli azalmalara sebep oldu (p<0.001).

E₂ hormonunun tüm dozları, (1, 10, 100 nM) 24 saat süreyle hücre hattına uygulandı ve bu süre sonunda, E₂'ye ek olarak apelin-13'ün iki farklı dozu (1-10 nM) ilave edildi. Hücrelerin % canlılık oranları ekil 2A, B, C'de gösterilmiştir.

E₂'nin tüm dozlarının (1, 10, 100 nM) tek başına uygulandığı hücrelerin % canlılık miktarında artış oldu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (p>0.05). E₂ ile inkübe edilen hücrelere inkübasyon sonrası uygulanan apelin-13'ün, her iki dozunun da hücre canlılığında anlamlı azalmalar meydana getirdiği tespit edildi (^ap<0.001, ^bp<0.005, ^cp<0.01, ^dp<0.05).



ekil 2. 1 nM (A) 10 nM (B) ve 100 nM (C) E₂ uygulamasından 24 saat sonra uygulanan apelin-13'ün (1 ve 10 nM) hücre canlılığına meydana getirdiği etkiler (Ort±SH) de gösterilmiştir (*p<0.001; ^bp<0.005; ^cp<0.01; ^dp<0.05; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

Hücre hattına 1, 10 ve 100 nM E₂ ile eş zamanlı 0.1, 1 ve 10 nM apelin-13 ilave edilerek yapılan deneylerde hücre % canlılık miktarları ekil 3A, B, C'de gösterilmiştir.

Apelin-13 ve E₂'nin eş zamanlı uygulanması sonrasında hücre canlılığında meydana gelen azalmanın, 24 saat E₂ uygulaması sonrasında elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Tartışma

Kanser, son yıllarda en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiş ve kadınlarda en sık görülen kanser kaynaklı ölüm nedenlerinin meme kanseri olduğu rapor edilmiştir (18).

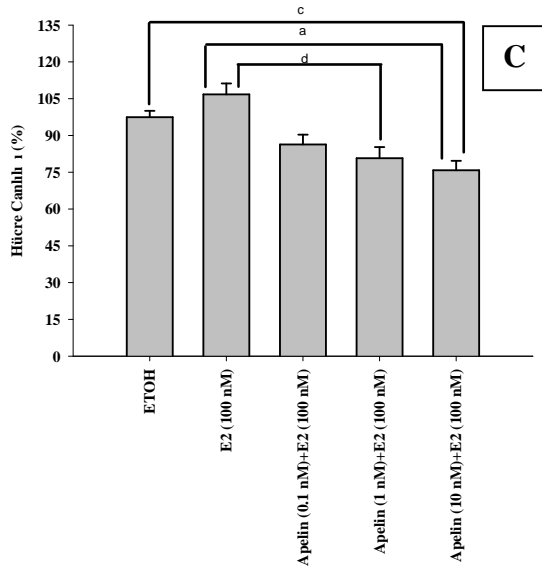
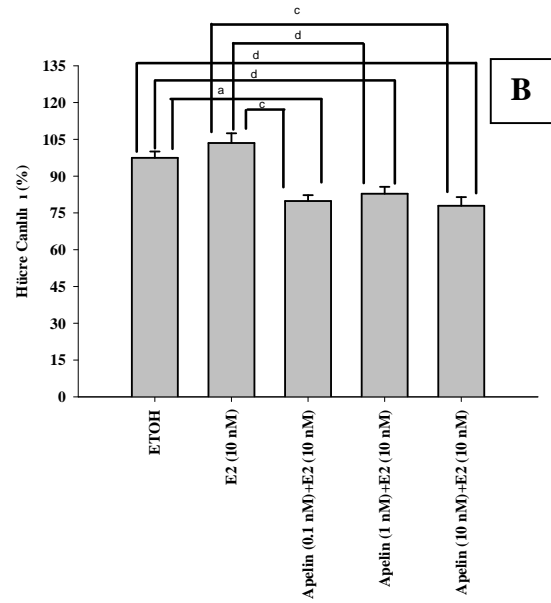
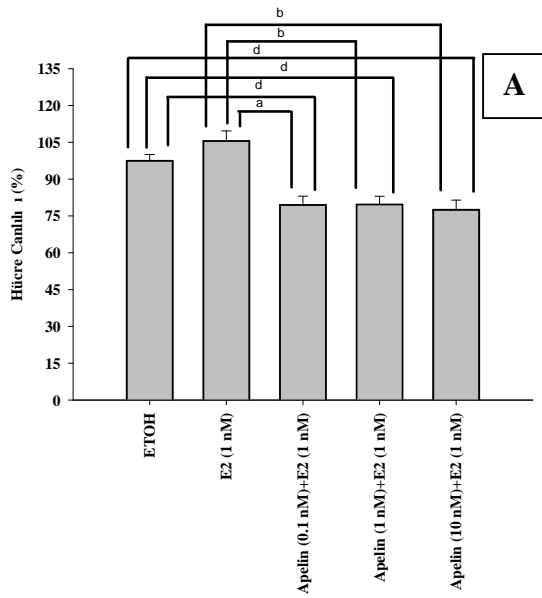
Meme kanserlerinin ortaya çıkması ve gelişmesinde başta E₂ olmak üzere bazı hormonların rolü olduğu ve hormonların etkisi olmadan meme kanseri olmayacağı bildirilmektedir (2, 3). 17- β -östradiolün östrojen reseptörü (ER) pozitif meme tümör hücrelerinde çoğalmayı uyarır ve apoptozu engellediği bilinmektedir (19). Meme kanserindeki ilerlemenin, E₂ bağımlı olduğu

başka çalışmalarda da gösterilmiştir (20, 21). ER pozitif meme kanseri hücrelerinde, östrojen ER'yi aktive ederek hücre siklusundaki G1 fazı kısaltıp hücrenin daha sık şekilde bölünmesine neden olduğu ayrıca rapor edilmiştir (22). Bizim çalışmamızda E₂ hormonunun 1, 10, 100 nM'lik konsantrasyonları, MCF-7 hücre hattına uygulandı ve % hücre canlılığını mevcut çalışmalara benzer şekilde kısmen arttı tespit edildi. Bu bulgu, hastalığın patofizyolojisinde E₂ hormonu ve reseptörü için sunulan olası rollerini daha güçlü kılmaktadır.

Yağ dokunun, aktif endokrin organ gibi, birçok hormon ve sitokin salgıladığı bilinmektedir (23-25). Yağ dokusu kitlesindeki artışın, meme kanserinde bir risk faktörü olduğu (5) ve yüksek kalorili diyetlerin kanser etiolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (26). Obezitenin bazı kanser formlarıyla olan ilişkisi uzun zamandır bilindiğinden (27), adipositokinlerin kanserojen olarak obezite ile kanser arasında bir bağlantısının olup olmadığını tespit edilmeye çalışılmakta ve araştırmalar bu yönde ilerlemektedir (28). Mevcut literatürde, yağ dokusu

kaynaklı bazı hormonların insan meme kanseri ile ili kisini açıklayan çalı malar bulunmaktadır. Özellikle adiponektin ve leptinin meme kanseri ile ba lantısı rapor edilmi tir (29-31). Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalı mada, ya doku kaynaklı bir hormon olan visfatinin, MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan denemelerde doz ba ımlı olarak hücre canlılı ını arttı ı gösterilmi tir (32). Somasundar ve ark. tarafından yapılan çalı mayla leptin hormonun MCF-7 hücre serilerinde canlılı ı etkilemedi i rapor edilmi tir (33). Catalano ve ark.'nın yaptı ı çalı mada, MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde leptinin aromataz aktivitesini indükledi i, E₂ sentezini arttırdı ı ve E₂ ba ımlı meme kanseri progresyonuna neden oldu u gösterilmi tir (34). Bir ba ka çalı mada ise, adiposit ili kili kompleman protein 30 (Acrp 30)'un doz ba ımlı olarak MCF-7 hücre canlılı ını azalttı ı gösterilmi tir (35). Bu

bulgular, ya doku ile meme kanseri arasındaki sinyalleri giderek güçlü kılmakta ve ya dokunun bir ba ka hormonu olan apelinin, meme kanserindeki olası rollerine dikkatleri çekmektedir. Apelin hormonu ve kanser arasındaki ili kiyi gösteren çalı maların sayısı oldukça azdır. Berta ve ark. insan akci er kanser hücresi (NSCLC) üzerinde apelin uygulamasının etkilerini, hem *in vitro* hemde *in vivo* olarak ara tırmı lardır. Sonuç olarak *in vitro* apelin uygulamasının hücre canlılı ını etkilemedi i, *in vivo* çalı mada ise apelinin anjiyogenezi uyararak tümör hücresinin geli imini arttırdı ı gösterilmi tir (36). Heo ve ark. insan dil kanseri hücreleri üzerinde yapımı oldukları bir ba ka çalı mada, apelinin hücre canlılı ını arttırdı ını rapor etmi lerdir (37). Bizim çalı mamızda apelin-13'ün, 0.1, 1, 10 nM'lik konsantrasyonlarının MCF-7 hücre canlılı ı üzerine olası etkileri ara tıldı.



ekil 3. 1 nM (A), 10 nM (B) ve 100 nM (C) E₂ ile apelin-13'ün (0.1, 1 ve 10 nM) e zamanlı uygulanmasının hücre canlılı ında meydana getirdi i (Ort±SH) de i iklikler (^ap<0.001; ^bp<0.005; ^cp<0.01; ^dp<0.05; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

Çalı mada kullanılan apelin-13'ün, tüm konsantrasyonlarının % hücre canlılı ını azalttı ı tespit edildi. Mevcut literatürdeki *in vitro* çalı maların sonuçları ile çalı mamızın bulguları çeli mektedir. Bu farklılı ın, çalı malarda kullanılan kanser hücreleri ve

sahip oldukları reseptör çe itlerinin farklı olmasının yanı sıra, kullanılan apelin formlarının aynı biyolojik aktiviteye sahip olmamasından kaynaklandı ını dü ündürmektedir. Ayrıca *in vivo* çalı malarda apelinin do rudan de il, vasküler anjiyogenezi arttırarak dolaylı

bir mekanizmayla tümör gelişimini arttırdı 1 bildirilmiştir. Bu durum peptidin *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda yapılan deneylerde farklı etkiler ortaya koyabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda sitotoksik etkinin ER duyarlı MCF-7 hücrelerinde ortaya çıkması, etkinin ER aracılı bir mekanizma ile olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, apelin-13'ün E₂ indüklemeli gruplarda dahil olmak üzere, MCF-7 hücre serilerinde canlılığı azaltması peptidin anti-kanserojenik bir ajan olarak kullanılabilirliğini akla getirmektedir. Apelin-13 ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi açıklayan herhangi bir literatür bilgisi mevcut olmayıp, çalışmamız bu alanda yapılmış ilk ara tırma olma özelliğindedir. Çalışmada kullanılan kanser hücrelerinin insana özgü olması, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların önemini arttırmaktadır. Bu maddelerin, *in vivo* deneylerde nasıl sonuçlar vereceğini, sıklıklı dokular üzerine etkilerinin neler olacağını araştırılması oldukça önemlidir. Mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için, hem *in vitro* hem de *in vivo* farklı kapsamlı çalışmalarla ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu proje Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP Proje No: FF11.36) tarafından desteklenmiştir. MCF-7 hücrelerinin temini konusunda yardımlarını esirgemeyen Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. WHO, *Dünya Kanseri Raporu 2008*, ed. P. Boyle, B. Levin 2008, Lyon.
2. Meites J. Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48(4): 1217-24.
3. Cuzick J, Wang DY, Bulbrook RD. The prevention of breast cancer. *Lancet* 1986; 1(8472): 83-6.
4. Santen RJ, Boyd NF, Chlebowski RT, Cummings S, Cuzick J, Dowsett M, Easton D, Forbes JF, Key T, Hankinson SE, Howell A, Ingle J. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14(2): 169-87.
5. Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(1): 271-9.
6. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 251(2): 471-476.
7. Hinuma S, Onda H, Fujino M. The quest for novel bioactive peptides utilizing orphan seven-transmembrane-domain receptors. *J Mol Med (Berl)* 1999; 77(6): 495-504.

8. Todisco A, Campbell V, Dickinson CJ, DelValle J, Yamada T. Molecular basis for somatostatin action: inhibition of c-fos expression and AP-1 binding. *Am J Physiol* 1994; 267(2 Pt 1): G245-53.
9. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000; 275(28): 21061-7.
10. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538(2-3): 162-71.
11. Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1999; 1452(1): 25-35.
12. Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, O'Carroll A-M, Mochizuki T, Wang H-Q, Hellmich MR, Englander EW, Greeley GH. Apelin, a New Enteric Peptide: Localization in the Gastrointestinal Tract, Ontogeny, and Stimulation of Gastric Cell Proliferation and of Cholecystokinin Secretion. *Endocrinology* 2004; 145(3): 1342-1348.
13. Wang G, Qi X, Wei W, Englander EW, Greeley GH, Jr. Characterization of the 5'-regulatory regions of the rat and human apelin genes and regulation of breast apelin by USF. *FASEB J* 2006; 20(14): 2639-41.
14. Wang Z, Greeley GH, Jr., Qiu S. Immunohistochemical localization of apelin in human normal breast and breast carcinoma. *J Mol Histol* 2008; 39(1): 121-4.
15. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 1986; 89(2): 271-277.
16. Horakova K, Sovcikova A, Seemannova Z, Syrova D, Busanyova K, Drobna Z, Ferencik M. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(6): 650-64.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
18. Ray A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *J Biosci* 2012; 37(2): 289-94.
19. Yaşar Ü, Altuntaş A. Meme Tümörlü Köpeklerde Serum 17- β -estradiol Kolesterol ve Trigliserid Düzeylerinin Klinik Önemi. *F.Ü.Sa. Bil.Vet.Derg.* 2010; 24(3): 157-161.
20. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a Cause of Human Cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Research* 1988; 48(2): 246-253.

21. Carlstrom K. Influence of intratumoral estradiol biosynthesis on estrogen receptors. *Recent Results Cancer Res* 1984; 91: 145-9.
22. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339(22): 1609-18.
23. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3(5): 705-13.
24. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009; 54(9): 1847-56.
25. Liu Y, Song CY, Wu SS, Liang QH, Yuan LQ, Liao EY. Novel adipokines and bone metabolism. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 895045.
26. Popkin BM. Understanding global nutrition dynamics as a step towards controlling cancer incidence. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(1): 61-7.
27. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372(6505): 425-32.
28. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 2006; 207(1): 12-22.
29. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, Papadiamantis Y, Markopoulos C, Spanos E, Chrousos G, Trichopoulos D. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(3): 1102-7.
30. Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Noguchi S. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2003; 9(15): 5699-704.
31. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *European Journal of Endocrinology* 2002; 147(2): 173-180.
32. Kim JG, Kim EO, Jeong BR, Min YJ, Park JW, Kim ES, Namgoong IS, Kim YI, Lee BJ. Visfatin stimulates proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cells* 2010; 30(4): 341-5.
33. Somasundar P, Yu AK, Vona-Davis L, McFadden DW. Differential effects of leptin on cancer in vitro. *J Surg Res* 2003; 113(1): 50-5.
34. Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML, Ando S. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; 279(19): 19908-15.
35. Grossmann ME, Nkhata KJ, Mizuno NK, Ray A, Cleary MP. Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling. *Br J Cancer* 2008; 98(2): 370-9.
36. Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol* 2010; 5(8): 1120-9.
37. Heo K, Kim YH, Sung HJ, Li HY, Yoo CW, Kim JY, Park JY, Lee UL, Nam BH, Kim EO, Kim SY, Lee SH, Park JB, Choi SW. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology* 2012; 48(6): 500-506.

leti im
Suat TEK N
nönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD, Malatya
suat.tekin@inonu.edu.tr