

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE APELİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: IN VİTRO BİR ÇALIŞMA**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ferda KOYUNOĞLU

Enstitü No: 092110108

**Ana Bilim Dalı: Genel Biyoloji
Programı: Yüksek Lisans**

Danışman: Doç. Dr. Vahit KONAR

HAZİRAN 2012

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE APELİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: IN VİTRO BİR ÇALIŞMA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ferda KOYUNOĞLU
Enstitü No: 092110108**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 04.07.2012
Tezin Savunulduğu Tarih:19.07.2012**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vahit KONAR

**Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. A. Harun EVREN
Doç. Dr. Süleyman SANDAL**

HAZİRAN 2012

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE APELİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: IN VİTRO BİR ÇALIŞMA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ferda KOYUNOĞLU
Enstitü No: 092110108**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 04.07.2012
Tezin Savunulduğu Tarih: 19.07.2012**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vahit KONAR

**Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. A. Harun EVREN
Doç. Dr. Süleyman SANDAL**

HAZİRAN 2012

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezime maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimine,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini ile bana yol gösteren danışmanım Sayın Doç. Dr. Vahit KONAR başta olmak üzere bölümümüz tüm öğretim üyelerine, Üzerimde danışman hocam kadar emeği olan bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Süleyman SANDAL' a, Deneylerim sırasında desteğini ve bilgi birikimini esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanı Sayın Arş. Gör. Suat TEKİN' e, İstatistiksel Analizlerin yapılması aşamasında yardımını esirgemeyen Malatya Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Cemil ÇOLAK' a, Tezimin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yavuz ERDEN' e,

Bu zamana kadar hiçbir zaman desteğini esirgemeyen aileme ve özellikle sevgili anneme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar teşekkür ederim.

Ferda KOYUNOĞLU
ELAZIĞ - 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	IV
SUMMARY.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Apelin	1
1.1.1. Apelinin Biyokimyası.....	3
1.1.2. Apelin Reseptörü (APJ).....	4
1.1.3. Apelin ve APJ' nin Vücutta Dağılımı	5
1.1.4. Apelin 'in Etkileri	6
1.1.4.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi.....	6
1.1.4.2. Sıvı Elektrolit Dengesi Üzerine Etkisi	7
1.1.4.3. Gıda Alımı Üzerine Olan Etkisi.....	8
1.1.4.4. Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	8
1.2. Kanser.....	9
1.2.1. Kanser Nedir?	9
1.2.2. Kemoterapi (Kimyasal İlaç Tedavisi)	13
1.2.3. Radyoterapi (Radyoaktif Işın Tedavisi)	13
1.3. Meme Kanseri.....	14
1.3.1. Meme Kanserinde Üreme ve Hormonal Faktörler	16
1.3.2. Östrojen Replasman Tedavisi	17
2. MATERYAL VE METOT.....	19
2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	19
2.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	19
2.1.3. Deneyde Kullanılan Çözeltiler.....	20
2.1.3.1. Medium'un Hazırlanması	20
2.1.3.2. Hücre Dondurma Mediumu Hazırlanması.....	21

	<u>Sayfa No</u>
2.1.3.3. MTT Solüsyonunun Hazırlanması	21
2.1.3.4. %70'lik ETOH Hazırlanması.....	21
2.2. Hücre Kültürü	22
2.2.1. Hücrelerin Gelişimi	22
2.2.2. Hücre Kültür Ortamı	22
2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	22
2.2.4. Hücrelerin Dondurulması	23
2.2.5. Hücrelerin Çözülmesi.....	24
2.2.6. Hücrelerin Sayımı	24
2.2.7. Hücrelerin Platelere Ekimi	24
2.2.8. Test Ajanlarının Kültür Ortamına Eklenmesi.....	25
2.2.9. MTT Assay	27
3. BULGULAR.....	29
3.1. Apelin-13 Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	29
3.2. 1 nM E2 İle 24 Saat İnkübasyon'dan Sonra Hücre Canlılığına Apelin-13 Etkisi	30
3.3. 10 nM E2 İle 24 Saat İnkübasyon'dan Sonra Hücre Canlılığına Apelin-13 Etkisi	31
3.4. 100 nM E2 İle 24 Saat İnkübasyon' dan Sonra Hücre Canlılığına Apelin-13 Etkisi	32
3.5. 1 nM'lık Estradiol ve Apelin-13'ün Eş Zamanlı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	34
3.6. 10 nM'lık Estradiol ve Apelin-13'ün Eş Zamanlı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	35
3.7. Estradiol 100 nM ve Apelin-13'ün Eş Zamanlı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	36
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	38
KAYNAKÇA.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	48

ÖZET

Apelin, G protein kenetli orfan apelin reseptörünün (APJ) endojen ligantıdır. Apelin' in hipotalamusta özellikle arkuat, supraoptik ve paraventriküler nükleus gibi hipotalamik alanlarda dağılım göstermesi testislerde, prostat dokusunda, meme dokusunda APJ'nin bulunması üreme sistemi üzerinde, apelinin etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir. Apelinin etkileri bulunduğu forma göre değişiklik gösterir. Apelin' in yapısındaki 13 amino asit dizilimi tüm formlarında değişmez olduğundan, temel apelin yapısı apelin-13 olarak kabul edilmektedir.

Çalışmada östrojen duyarlı meme kanseri hücre hattına (MCF-7) ilk aşamada, Apelin-13' ün 0.1, 1 ve 10 nM' lik konsantrasyonları, östrojen hormonunun 1, 10, 100 nM' luk konsantrasyonları uygulandı. Apelin' in 1 ve 10 nM olan dozları ile östrojen hormonunun 1, 10, 100 nM' lik dozları eş zamanlı olarak kültüre uygulanarak 24 saat süreyle inkübe edildiler ve [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid] (MTT) yöntemi ile bu maddelerin etkinlikleri belirlendi.

MCF-7 hücre hattına uygulanan apelin-13'ün hücre canlılığını azalttığı, östrojenin ise hücre canlılığını arttırdığı tespit edildi ($p<0.05$).

Bu sonuçlar, MCF-7 hücrelerinde östrojen reseptör pozitif olduğundan proliferatif etkinin östrojen reseptör kaynaklı olduğunu akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apelin, MCF-7, Kanser, MTT assay, Hücre Kültürü

SUMMARY

The investigation of the effects of apelin on MCF-7 human breast cancer cell line: An *in vitro* study

Apelin is the endogenous ligand for the G-protein-coupled APJ receptor. That Apelin has been found in hypothalamic fields such as the periventricular nucleus and supraoptic nucleus of the hypothalamus and that it is seen in testicle, prostate and mammary cells suggest that apelin may be influential on productive system. Apelin varies depending on the forms on which it is influential. 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 nM concentrations of Apelin-13 and 1, 10, 100 nM concentrations of estrogen are applied into the line of estrogen sensitive breast cancer cell (MCF-7). Apellin 0.1, 1 and 10 nM and estrogen hormone 1, 10, 100 nM 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 are estrogen receptor positive MCF-7 cells, is induced suggests that proliferative effects of estrogen receptor.

Key words: Apelin, MCF-7, Cancer, MTT assay, Cell culture

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Apelinin moleküler yapısı.....	3
Şekil 2: Apelin sentezi	4
Şekil 3: Kanseri gelişim süreci.....	10
Şekil 4: Kanseri hücre ile normal hücre arasındaki fark	12
Şekil 5: Kemoterapinin hücrelere etkisi	13
Şekil 6: Hücrelerin ekimi.....	25
Şekil 7: 96 well plate	26
Şekil 8: Apelin-13 uygulanmasından sonra kontrol ve ETOH grubunda hücre canlılığında meydana gelen (Ort ± SH) değişiklikler	29
Şekil 9: 24 saat 1 nM estradiol uygulamasından sonra uygulanan apelin-13'ün 1 ve 10 nM'lık dozu verildiğinde hücre canlılığında meydana gelen (Ort ± SH) değişiklikler	30
Şekil 10: 24 saat 10 nM estradiol uygulamasından sonra uygulanan apelin-13'ün 1 ve 10 nM'lık dozu verildiğinde hücre canlılığında meydana gelen (Ort ± SH) değişiklikler	31
Şekil 11: 24 saat 100 nM estradiol uygulamasından sonra uygulanan apelin-13'ün 1 ve 10 nM'lık dozunun hücre canlılığındaki (Ort ± SH) değişiklikler	32
Şekil 12: Estradiol 1 nM ve apelin-13'ün 0.1, 1 ve 10 nM uygulanmasının hücre canlılığındaki (Ort ± SH) değişiklikler	34
Şekil 13: Estradiol 10 nM ve apelin-13'ün 0.1, 1 ve 10 nM uygulanmasının hücre canlılığındaki (Ort ± SH) değişiklikler	35
Şekil 14: Estradiol 100 nM ve Apelin-13'ün 0.1 nM uygulanmasının hücre canlılığındaki (Ort ± SH) değişiklikler	36

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Apelin ve APJ'nin karakteristik özellikleri	2
Tablo 2: Deneyde kullanılan kimyasal maddeler	20
Tablo 3: Deneyde kullanılan sarf malzemeler	21
Tablo 4: Apelin'in 3 farklı dozu (0.1,1 ve 10 nM) ve E2 konsantrasyonlarının (1,10 ve 100 nM) hücre canlılığına olan etkisinin karşılaştırılması	33
Tablo 5: Östrojenin 3 farklı konsantrasyonu (24h) (1,10 ve 100 nM) ve apelin-13'ün 2 farklı dozunun (1 ve 10 nM) hücre canlılığına olan etkisinin karşılaştırılması ..	37

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

aa	: Aminoasit
ACE2	: Anjiotensin 1-dönüştürücü enzim 2
ADH	: Antidiüretik hormon
APJ	: Apelin reseptörü
AT1R	: Anjiyotensin II tip 1
MSS	: Merkezi sinir sistemi
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ELISA	: Enzyme-linked immuno sorbent assay
ETOH	: Etil alkol
FBS	: Fetal bovine serum
icv	: İntraserebroventriküler
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
MCF-7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	: Fosfat tampon tuz

1.GİRİŞ

1.1. Apelin

1993 yılında, AT1R (anjiyotensin 2 tip 1) reseptörü geniyle benzer dizilime sahip bir gen keşfedildi [1]. G protein kenetli orfan reseptör (APJ) olarak adlandırılan bu yeni reseptör, anjiyotensin reseptörüyle benzerliğine rağmen, anjiyotensin 2 tarafından aktive edilmemektedir. Bu G protein kenetli reseptör 1998’de Tatemoto ve ark. apelin olarak adlandırılan endojen ligandı tanımlayana kadar orfan reseptör olarak kaldı [2] [Tablo 1]

Apelin, APJ’ ye ait mRNA (mesajcı ribonükleik asit) beyin, hipotalamus, vasküler endotel, kalp, akciğer ve böbrekte fazla miktarda bulunmaktadır [3]. Bunların etkileşimi bu dokulardaki patofizyolojik etkilerle ilişkilidir [4]. İnsanda bulunan APJ geni ile alakalı genler ilk olarak sıçan, fare, maymun, inek, zebra, [5] balık ve kurbağa da tanımlanmıştır [2].

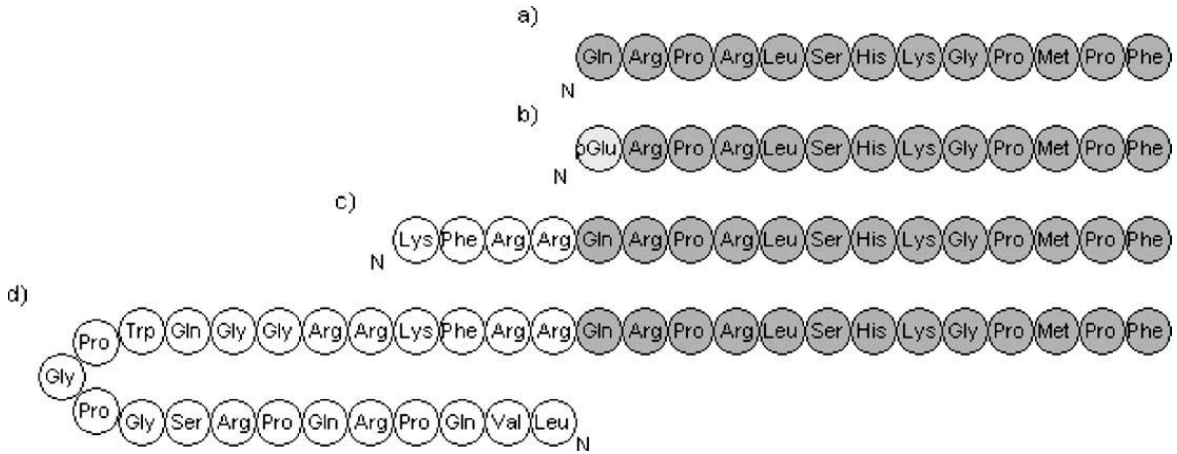
Apelin en önemli etkilerini, kardiyovasküler sistem üzerinden göstermektedir. Düz kas hücrelerinde, direkt etki ile vazokonstriksiyon ve pozitif inotropik etki oluşturmaktadır. Diğer taraftan, endotel hücrelerinden nitrik oksit üretimini artırarak oluşturduğu vazodilatasyon sonucu kan basıncını düşürmektedir [2]. Bu nedenle ilk çalışmalar kardiyovasküler sistem üzerinde yoğunlaşmıştır.

Tablo 1: Apelin ve APJ'nin Karakteristik Özellikleri [19]

	APJ	APELİN
Sinonimleri	AT1R	APJ endojen ligand
Moleküler sınıf	7 transmembran kenetlenmiş G prote reseptör	Peptid ligand
Aynı yönlü etki	-	Özelliğe sahip değil
Zıt yönlü etki	(Ala13) apelin-13 (fonksiyonel antagonist)	Özelliğe sahip değil
aa sayısı	380	77
Moleküler ağırlığı (Da)	42,660	8569
mRNA boyutu (bp)	1143	234
Kromozom Lokusu	11q12.1	X25-26.3
Türlerdeki gen tanımlanması	Homo sapiens (SwissProt P35414) Rattus norvegicus (SwissProt Q9JHG3) Mus musculus (SwissProt Q9WV08) Macaca mulata (SwissProt O97666) Danio rerio (EMBL AW460831) Xenopus laevis (SwissProt P79960)	Homo sapiens (SwissProt Q9ULZ1) Rattus norvegicus (SwissProt Q9R0R3) Mus musculus (SwissProt Q9R0R4) Bos taurus (SwissProt Q9TUI9) Macaca mulata (EMBL BV 209065)

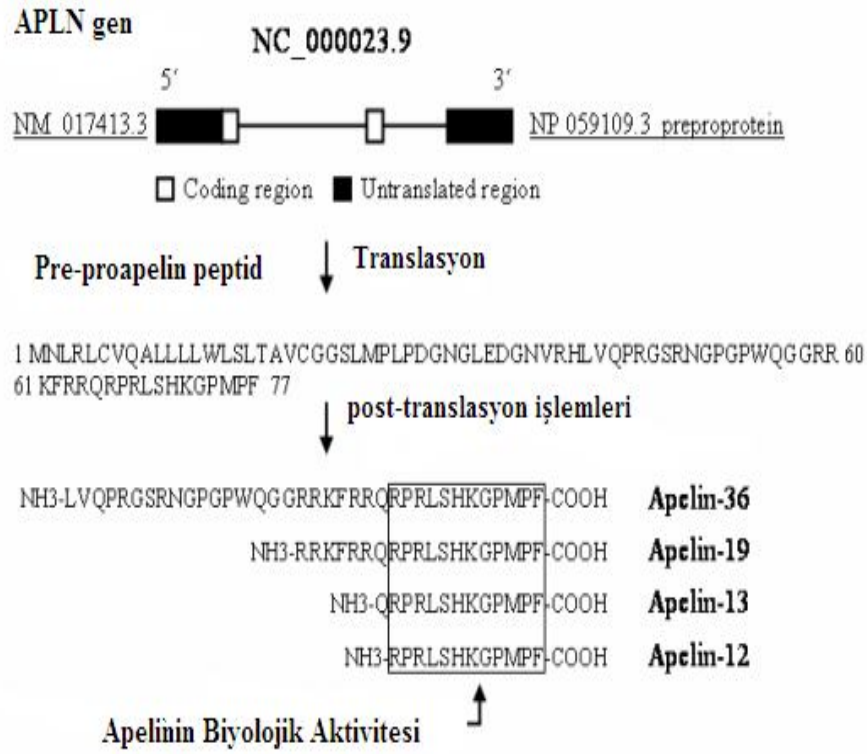
1.1.1. Apelinin Biyokimyası

Apelin, 77 aminoasit (aa) içeren bir pre-propeptid şeklinde sentezlenmektedir. Değişik segmentlerinden parçalanarak apelin-13, apelin-17 ve apelin-36 gibi, aminoasit sayıları farklı, apelin formlarına dönüşmektedir. İlk 13 aminoasitin tüm apelin formlarında aynı olması nedeniyle, temel apelin yapısı apelin-13 olarak bilinmektedir [Şekil 1].



Şekil 1: Apelinin moleküler yapısı (a) Apelin-13, (b) p[Glu] apelin-13, (c) Apelin-17, (d) Apelin-36

Apelinin biyolojik açıdan aktif kısmı, N-terminal piroglutamat kısmıdır. Apelin-13, N-terminal piroglutamat ünitesi bulundurmaktadır. Bu nedenle, biyolojik aktivitesi diğer türlerine göre daha yüksektir. Apelin-36, aktif olan bu kısmı içermediğinden, biyolojik aktivitesini kısmi olarak gösterebilmektedir [3,6] [Şekil 2].



Şekil 2: Apelin sentezi [7]

1.1.2. Apelin Reseptörü (APJ)

APJ, ağırlıklı olarak kalp ve akciğerlerde görülmekle birlikte vücudun birçok dokusunda bulunduğu gösterilmiştir. Farklı dokularda henüz fonksiyonları tam olarak anlayamamıştır. Düz kas üzerine doğrudan etki ederek vazokonstriksiyon ve pozitif inotropi yaptığı, endotele bağımlı olarak da vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir. Kalp kasılmasının en güçlü uyarıcılarından biridir. Pozitif inotropik tedavi için iyi bir tedavi alternatifi olması yönünde çalışmalar devam etmektedir [4,8].

Adipoz endokrin, sıvı elektrolit dengesi, susama hissinin düzenlenmesi ve immün yanıtta da rol aldığı düşünülmektedir [4,8].

1.1.3. Apelin ve APJ' nin Vücutta Dağılımı

APJ reseptörünün insanlardaki ve farelerdeki dağılımına bakıldığında özellikle kalp ve akciğer gibi periferik dokularının yanında ve merkezi alanlarda da dağılım gösterdiği tespit edilmiştir [3]. APJ ekspresyonuna, genellikle sıçanların perifer dokularında rastlanmıştır [9]. Sıçanların böbrek, hipofiz bezi ve iskelet kasında vücudun diğer dokularına nazaran daha düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir [10].

İnsanlarda ise APJ'ye ait mRNA; karaciğer, mide, pankreas, vasküler endotelial ve düz kas hücreleri, plasenta, adipoz doku, akciğerler, kalp, timus, prostat, testis, ovaryum, dalak, barsaklar ve beyin olmak üzere birçok merkezi ve perifer dokularda bulunmuştur [10–15]. Ayrıca büyük kan damarlarında otoradyografi yöntemiyle apelin'in bulunduğu bölümlerin varlığı belirlenmiştir [16].

Apelin doku dağılımını belirleyen bazı çalışmalar ise yetişkin farelerin dokularında yürütülmüştür. Bu çalışmalara göre birçok dokunun içinde pre-propeptidin varlığı gözlemlenmiştir. [10, 12, 13, 17, 18] İnsanlarda, mRNA pre-proapelin merkezi sinir sistemin 'de (MSS), plasentada, meme bezinde, akciğerde, kalpte, böbrekte fazlaca bulunmaktadır. [4]

Bir immünoenzim denemesinde, insandaki devinimsel apelinin konsantrasyonu hesaplanarak 3 ve 4 ng/mL arasında bir değer bulunmuştur [14]. Hesaplanan bu değer diğer devinimsel hormonlarla karşılaştırıldığında düşük bir konsantrasyona sahip olduğu görüldü. Bu değer apelinin endotelial çözümü öneren endotelium türevli vazodilatörlerle karşılaştırıldı. Sonuç olarak Karboksipeptidaz ACE2 (anjiyotensin 1-dönüştürücü enzim 2), apelinin peptidlerden C –uç birimli felalanin' in en etkili çatlağında apelinin bu bozulma rolünü oynadığı düşünülmektedir [3].

Bu korelasyonlar, ACE 2 renin-anjiyotensin aldosteron sisteminde yer aldığı için kardiyovasküler düzendeki apelinin daha uyumlu olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, bu enzimin başlama noktası, gelecekte, kardiyovasküler patolojide iyileştirici bir amaç olarak kullanılabilir.

1.1.4. Apelin ‘in Etkileri

1.1.4.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Apelinin en önemli etkilerini, özellikle kardiyovasküler sistem üzerinden göstermektedir [6]. APJ’ ye ait mRNA’nın sıçan kalbinde yüksek oranda bulunduğu rapor edilmişti [9]

Sıçanlara intravenöz (iv) olarak uygulanan apelin çok kısa bir sürede ortalama arteriyel basınçta bir düşüşe yol açmaktadır [7, 12]. Belirlenen bu düşüş apelin-36 için yaklaşık %5, apelin-12 için ise %25 düzeyindedir. Gelişen hipotansiyon anestezi yapılmamış hayvanlarda kalp atış hızında hafif bir artışa yol açmaktadır. Apelin ile gerginliği artan kalbin hızlı atması baroreseptör refleksin etkisi ile ortaya çıkan sempatik sinir sisteminin stimülasyonu yoluyla olmaktadır [20]. *In vivo* çalışmalarda, apelinin kalsiyum antagonistlerinden, hidralazinden, isoprenalinden ve nitrogliserinden çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Apelin kan basıncını periferik venleri genişletip, ön yükü biraz daha azaltarak düşürmektedir [21].

Apelinin hipotansif etkisi endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) yardımıyla olmaktadır. Bu hipotansif etki farelerde ve sıçanlarda nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan L-nitro arjinin metil ester yardımı ile elimine olmuştur. Bunun yanı sıra apelin de NO metabolitlerinin plazma düzeyini arttırmaktadır. Fare endotel kültürlerinde apelinin endotel kaynaklı nitrik oksit sentetaz enziminin fosforilasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [22].

Literatürdeki çalışmalarda apelin-13’ün zarar görmüş ven endotelinde en az endotelin kadar etkili bir şekilde kan akımının azaldığı tespit edilmiştir [16]. Bundan dolayı apelinin sağlam olan endotel dokusunda NO bağımlı damar genişlemesi yaparken, hasarlı olan endotelden bağımsız bir şekilde, direkt düz kas hücreleri üzerinden kan akımını azalttığı sonucu ortaya çıkmıştır. APJ reseptörü bulunmayan transjenik farelerde bazal tansiyon değerleri ve kalp hızı diğerlerindeki gibi normal olduğu görülürken, apelin-13 transjenik olmayan farelerde tansiyonu düşürüp APJ reseptörü olmayan farelerde ise tansiyon düşürücü etkisi olmadığı anlaşılmıştır [22]. Bu verilere dayanarak APJ reseptörlerinin apelinin hipotansif etkisine yardımcı bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca

APJ reseptörü olmayan farelerde apelinin endotel kaynaklı nitrik oksit sentetaz fosforilasyon etkisinin de ortadan kalktığı ve farelerin anjiotensin-II'nin minimal dozlara karşı bile duyarlı olduğu tespit edilmiştir [23].

1.1.4.2. Sıvı Elektrolit Dengesi Üzerine Etkisi

Hipotalamusun paraventriküler nükleus (PVN) ve supraoptik nükleusları (SON) sıvı elektrolit dengesinin fizyolojik düzeninde önemli bir rol oynamaktadır [3]. Oksitosin üretmesinin dışında süt salgısında ve rahime ait kontraktilitide yer alan peptid hormonu ve bu iki hipotalamik nükleus içinde yer alan nöronlar aynı zamanda antidiüretik hormon (ADH) üretmektedir [24].

Hipotalamusun SON ve PVN nöronları sıvı dengesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir Merkezi sinir sisteminden salınan apelin, ADH ve başka mediyatörler yoluyla da çevre dokuları ve böbreği etkilemektedir. PVN ve SON'de bulunan APJ sinyal yayarak diüretik etkilerini ADH baskılanması üzerinden göstermektedir [25,26]. Raux ve ark'larının yaptığı çalışmada 24 saat sudan yoksun bırakılan farelerde intraserebroventriküler (icv) apelin-13 enjeksiyonundan 30 dakika sonra farelerde su alımında artış saptanmıştır [25]. Raux ve ark'lari apelin-13'ün sıvı elektrolit dengesini düzenleyici fonksiyonlarını belirlemiştir. [25]. Sıçanlara intraperitoneal [12] ve icv apelin-13 enjeksiyonu [27] sonrasında ilk 60 dakika aşırı bir su tüketimi olduğu bildirilmiştir.

Intraperitoneal (ip) olarak, apelinin farklı etkilerinin olduğu ilk 60 dakikadaki salğıdan anlaşıldığı üzere farelerde su tüketiminde bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir [12]. Son zamanlarda farelerde yapılan araştırmalarda, apelin-13'ün icv' den sonraki ilk 60 dakika içerisinde su girdisinde artma meydana geldiği gözlenmiştir [27].

1.1.4.3. Gıda Alımı Üzerine Olan Etkisi

Apelin mRNA' sının insan ve fare yağ doku hücrelerinde tespit edilmiştir. Beyaz adipoz dokudan sentezlenen apelin kahverengi adipoz dokudan oluşana göre daha fazla açıklığa kavuşturulmuştur [28].

Apelinin gıda alımı üzerine olan etkilerini özetleyen önemli bazı çalışmalar mevcuttur. Apelinin iv olarak uygulanması besin alımını etkilemezken, santral uygulanmasının besin alımında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir [29, 30].

Taheri ve ark. yaptığı çalışmada ise lateral ventriküle 30 nmol icv apelin-13 enjeksiyonu sonrası, 24 saatlik zaman periyodunda gıda alımında anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir [31]. Sunter ve ark. iv olarak 10 nmol apelin-13 enjeksiyonu sonrasında hem açlığa maruz bırakılan hemde normal beslenmesine devam eden sıçanlarda 24 saatlik zaman periyodunda gıda alımında herhangi bir değişiklik olmadığını rapor [29]. Higuchi ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada farelere 14 gün boyunca ip 0.1 µmol/kg/gün apelin enjeksiyonunun, gıda alımında herhangi bir değişiklik meydana getirmediği görülmüştür [32].

1.1.4.4. Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Habata ve ark. [18], sıçan ovaryum dokusunda apelin ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı grup, sıçan meme dokusunda gebelik ve laktasyon döneminde apelin ekspresyonunda ciddi artışlar olduğunu rapor etmişlerdir [18]. Daha sonraki bir çalışmada ise Hosoya ve ark. [9], sıçan over ve uterus dokusunda yaygın olarak APJ reseptörlerinin ekspresyonunu ortaya koymuşlardır. Sığır ovaryum teka tabakasında apelin sentezinin varlığı belirlenmiş, granüloza hücrelerinde de APJ gösterilmiştir [33].

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, fetüs ve plasenta da apelinin yüksek konsantrasyonlarda bulunması, apelinin intrauterin büyümede rolü olabileceğini düşündürmektedir [29].

1.2. Kanser

1.2.1.Kanser Nedir?

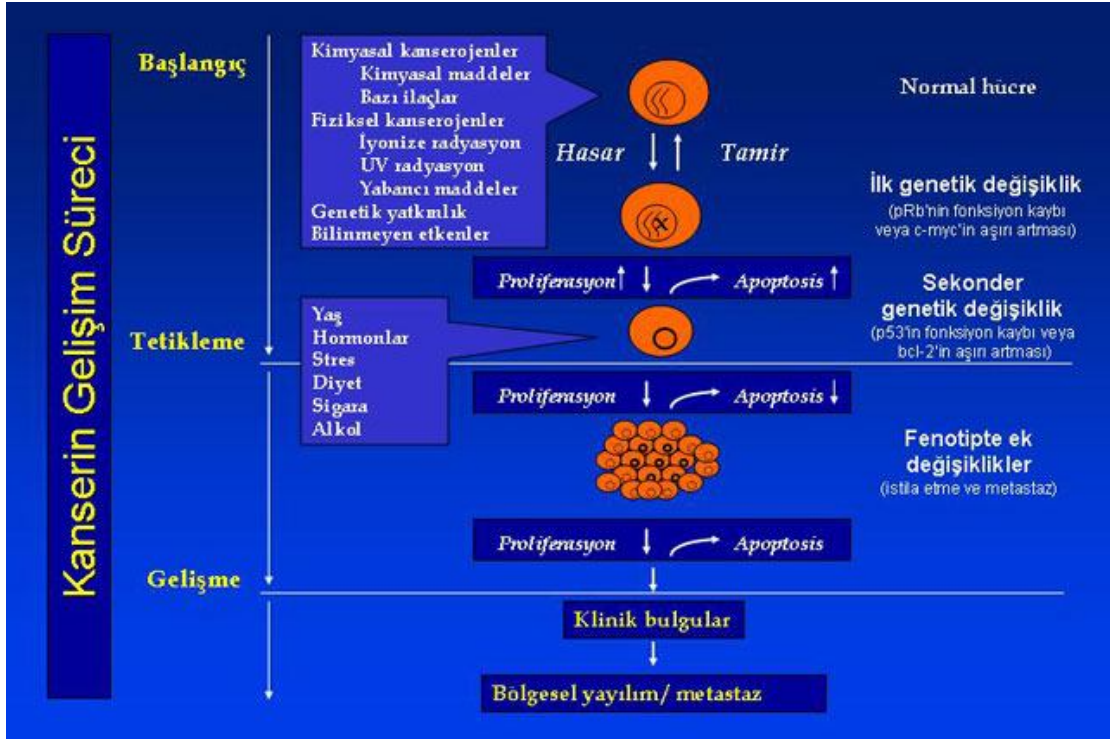
Vücuttaki dokulardan birine ait bir veya birkaç hücrenin normal özelliklerinin dışında bir değişim göstermesi ve kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen ve genellikle tümör (kitle) meydana gelmesine sebep olan, çağımızın en önemli hastalıklarından biridir.

Vücudumuzun çeşitli doku ve organlarında meydana gelebilen tümörler veya urlar iki türdür;

- İyi huylu (selim) urlar,
- Kötü huylu (habis) urlar. [34]

Kanser hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına “metastaz” adı verilir [Şekil 3].

Tümör vücudun başka bölgelerine yayılmış olsa da orijinal olarak olduğu organın adı ile anılır. Tüm tümörler kanser değildir. Kanser olmayan tümörler metastaz yapmaz ve çok nadir görülen istisnalar dışında yaşamsal tehlike oluşturmazlar [35].



Şekil 3: Kanser gelişim süreci [36].

Günümüzde kesin teşhis ve tedavi imkânları oldukça arttığından, erken teşhis hastanın hayatını kurtarmaktadır. Fakat erken teşhis, hastaların çoğu defa ihmalleri yüzünden erken yapılamamakta, dolayısıyla da kanser, ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır [34]. Gelişmiş ülkelerde ve yurdumuzda kanserden olan ölümler ikinci sırayı almaktadır [37]. Gerçekte ise, bu oran daha fazladır. Çünkü kanserden olan ölümlerin birçoğu istatistik kayıtlara geçmemekte bir kısmı ise kanser ölümü olarak gösterilmemektedir. Modern teşhis ve tedavi metotlarının gelişmesine rağmen İngiltere’de bütün ölümlerin % 20’si kansere bağlıdır [34].

Kanserin genetik bir hastalık olduğu düşüncesi gün geçtikçe artmaktadır. Normal vücut hücreleri sistemli bir şekilde büyür, bölünür ve ölür. Hayatımızın ilk yıllarından yetişkin oluncaya dek normal hücreler daha hızlı bölünür. Yetişkinliğe ulaşılmasının ardından, pek çok dokuda hücreler yalnızca ölen hücreleri yenilemek ve yaralanmaları gidermek amacı ile bölünmeye devam eder.

Normal şartlar altında, eğer yeni hücreler gerekmiyorsa her hücrenin içinde bulunan bazı mekanizmalar hücreye bölünmesini durdurmasını söyler [35]. Yeni çalışmalar kanserleşmenin hemen her zaman tek bir hücrede başladığını ortaya koymuştur. Monoklonal immün globülin yapan lenfoit doku tümörleri, kromozom işaretleri ve enzim işaretleri ile yapılan çalışmalar organizmadaki bütün tümör hücrelerinin kanserleşmiş tek bir hücreden geliştiği izlenimini vermektedir.

Kanser olmayan, normal genlere protoonkogen gen denir. Onların değişimlerini sağlayan bilinçsiz yapılan diyet veya genetik faktörlerdir. Bu durum gösterir ki kanser, hemofili (kan pıhtılaşma yetersizliği) veya kistik fibrozisde olduğu gibi genetik değildir. Ayrıca kanserde genetik faktörlerin önemi deneysel ve klinik gözlemlerle belirlenmiştir. Mesela meme, mide, kolon (kalın barsak), prostat, akciğer kanserlerinin yakın akrabalar arasında görülme riski, akraba olmayanlara göre üç defa daha fazladır.

İnsan kanserlerinde dış tesirlerin de rol oynayabileceği bilinmektedir. Kansere yol açtığı düşünülen bu faktörleri üç ana grupta toplamak mümkündür:

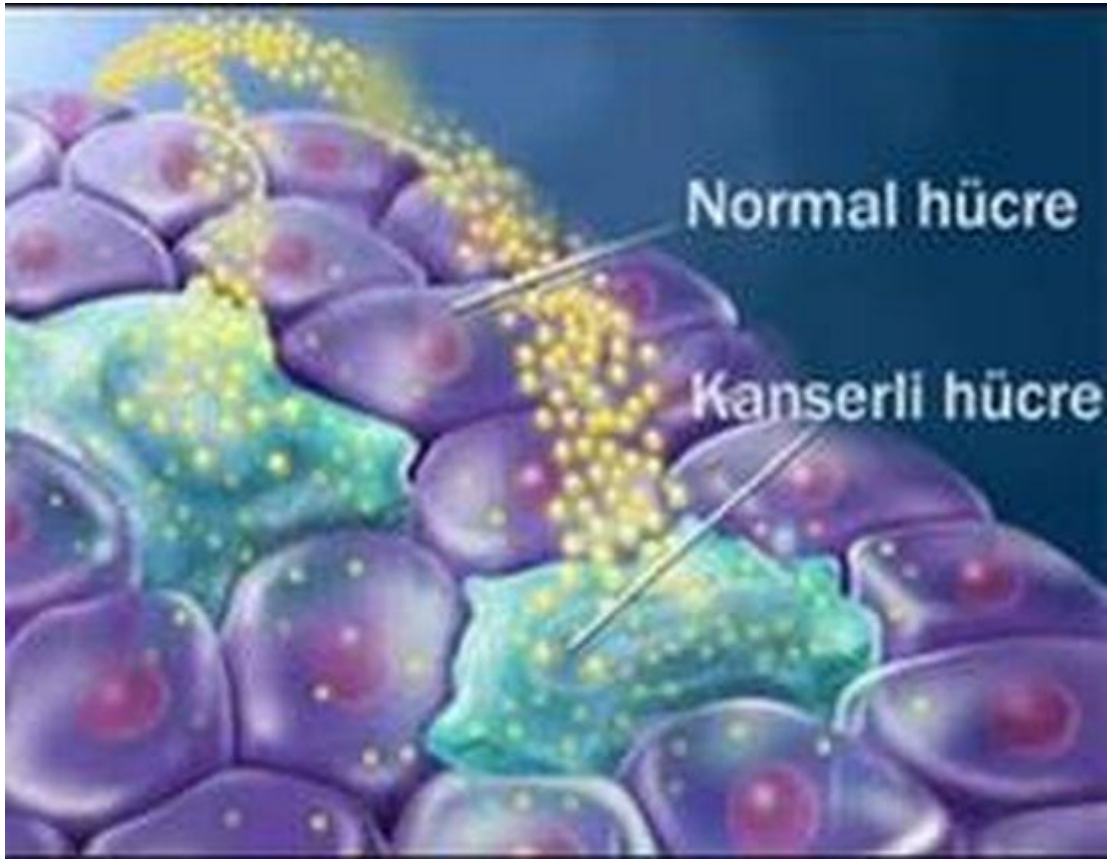
- ✓ Kimyasal ajanlar,
- ✓ Virüsler ve
- ✓ Radyasyon

Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların da başka tür kanserlere sebep olduğundan söz edilmektedir. Yapılan son araştırmalara göre Bazı hormonların kanserle ilişkisinin olduğu ileri sürülmektedir. İçinde sentetik östrojen (kadınlık hormonu) bulunan doğum kontrol hapları ile rahim ve meme kanserleri arasındaki ilişki ve testosteron (erkeklik hormonu) ile prostat kanseri arasındaki ilişki bu duruma örnek olarak verilebilir. Alkol ve sigaranın da kanserin meydana gelişinde rolleri olduğu kabul edilmektedir. Alkol kullananlarda mide ve karaciğer kanseri riski daha fazla görülmektedir.

Virüslerle yapılan incelemelerde, bozuk genlerin görünüşü genlerin kanserde rol aldığına göstergesi olarak kabul edilmektedir. Virüslerin, tamamına yakın kısmı genetik materyalden yapıldığı için, kanser araştırmalarında kullanılırlar. Bazı alışkanlıkların kansere yol açtığı bilinmektedir. Örneğin, çocuğunu emzirmeyen kadınlarda meme kanseri, emzirenlere oranla çok daha fazladır.

Kanserlerin ortaya çıkmasında sürekli mekanik, fiziki ve iltihabi tahrişler ve güneş ışığına aşırı ve devamlı maruz kalınmasının rolü büyüktür. Bütün bu sebeplerin yanında aşırı zayıflamada kanseri tetikleyebilmektedir.

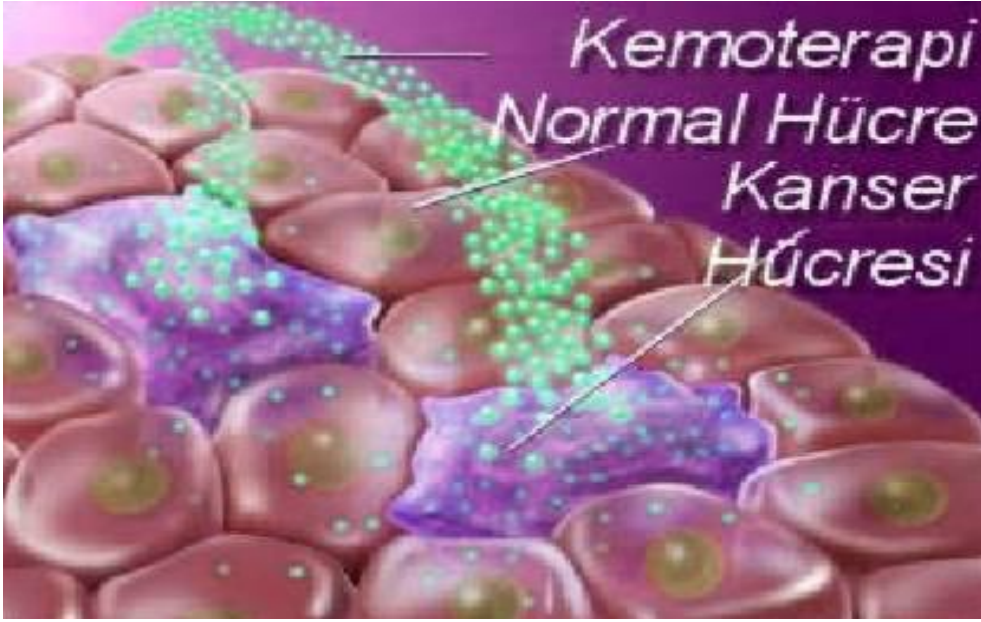
Kanser hücresi, normal hücelere benzememektedir. Kanser, normal hücre çoğalmasını kontrol eden faktörlerin denetimi dışındadır. Normalde vücudun bütün parazitleri vücut yabancı madde olarak algılayıp dışarı atmaya çalışırken kanserli hücreyi yabancı olarak benimseyememektedir [34] [Şekil 4].



Şekil 4: Kanserli hücre ile normal arasındaki fark [38]

1.2.2. Kemoterapi (Kimyasal İlaç Tedavisi)

Kemoterapi, normal hücrelere olası en az zararı vererek, kanserli hücreleri öldürebilen bir ilaç tedavisi yöntemidir. Kemoterapi kanserli hücrelerin çoğalmasını engeller. Kemoterapi bazen kanser için ilk uygulanan tedavi yöntemidir. Bununla beraber, kemoterapi genellikle diğer tedavilerden sonra uygulanmaktadır. Kemoterapi bazı durumlarda ameliyat sonrasında bazı durumlarda ise uygulanan ilk tedavidir. [39] [Şekil 5]



Şekil 5: Kemoterapinin hücelere etkisi [40]

1.2.3. Radyoterapi (Radyoaktif Işın Tedavisi)

Radyoterapi ışınla tedavi yöntemidir. Radyasyon bir tür enerji olup, kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebilir. Radyoterapi ayrıca, normal hücreleri de etkileyebilir, ancak bu hücreler daha sonra iyileşebilir. Radyoterapi, vücudun içinden veya dışından olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Dıştan tedavide, radyasyon bir makineden doğrudan kanserli organa ve çevresindeki dokuya yönlendirilir. İçten tedavide ise, içine radyoaktif madde konulan kapsüller (tüpler) kişinin vücut boşluğuna, tümörün üzerine ya da çevresine yerleştirilir. Radyoterapi kişiyi radyoaktif hale getirmez ve tedavi ağrısızdır. Işınlardan sıcak değildir [39].

1.3. Meme Kanseri

Artan sayısı ve etkisiyle dünya ekonomisini oldukça yüksek bir oranda etkileyen kanser son yıllarda en büyük sorunlardan biri haline gelmiştir. Pek çok çeşidiyle hayati tehdit unsuru olan bu hastalık insan hücrelerinin sadece fiziksel fonksiyonunu değil aynı zamanda kişinin hayat standardını da önemli ölçüde etkilemekte ve insan ömrünün daha kısa olmasına sebep olmaktadır [41].

Meme, rahim ağzı, rahim ve yumurtalık kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen kanser tipleridir [42]. Tüm yaşamları boyunca; her 2 kadından biri herhangi bir meme hastalığı için doktora başvurmakta; her 4 kadından birine meme biyopsisi yapılmakta ve her 9 kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır. Çeşitli ülkelerde görülme sıklıkları arasında 4–5 kat farklılık izlense de dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen ve ölüm oranı en fazla olan kanser türlerinden biridir.

Meme kanseri meme dokusu hücrelerinin kontrolsüz olarak büyüyüp, çoğalmasıdır ve meme hücrelerinin büyümesinden ve sağlıklı kalmasından görevli olan büyüme faktörü genlerindeki mutasyonlar, anormal değişimler sonucu ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri genelde süt bezlerinde veya sütün, süt bezinden meme uçlarına taşıyan kanalda ortaya çıkmaya baslar. Kanserli hücreler, sağlıklı meme dokusundan yayılarak koltuk altından lenf bezlerine ulaşarak buradan bütün vücuda yayılabilir [41].

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda 184.000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Hawaii, Kaliforniya, Kanada yılda yüz binde 80–90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüz binde 12–15 arasındadır. 1970'ten bu yana Japonya, Singapur ve Çin'de ekonomideki batı tarzı gelişim ve doğurganlığın batıya benzemesi nedeniyle meme kanseri görülme oranındaki fark giderek azalmaktadır. Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzey ülkelerden güneye ve batı ülkelerinden doğuya doğru gittikçe azalmaktadır. Görülme sıklığında en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır [43].

Türkiye’de 1999 yılında 8.879 olan meme kanserli kadın sayısı, 2003 yılında 12.772’ye yükselmiştir. Ayrıca ülkemizde tüm kanserlerin %24,1’ini meme kanserlerinin oluşturduğu belirtilmektedir [44]. Sağlık bilimlerinde ki ilerlemelere [45], erken tanı yöntemlerinin gelişmesine [45, 46] toplumun bu konuda duyarlılığının artmasına [47, 48] karşın, meme kanseri yaşamı tehdit etmeye devam etmektedir. Bu tehdidin azaltılmasında atılacak adımlardan birisinin de her toplumun kendi içinde meme kanseri risklerini ortaya koyması, risk gruplarını belirlemesi ve tarama programlarını yaygınlaştırmasıdır. Çünkü meme kanserinde tek bir etiyolojik faktörden söz etmek mümkün değildir. Ayrıca doğurganlık yaşı ve çocuk sayısı, beslenme alışkanlığı, sosyoekonomik durum, yaşam tarzı ve çevresel etkenlerin önemi de göz ardı edilmemelidir [44].

Diyetle yağ ve kolesterol alımı da diğer etkenler kadar önemlidir. Kişi başına düşen yağ tüketimi ile meme kanseri arasında direkt korelasyon bulunmuştur. Bu ilişki postmenopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara oranla daha kuvvetlidir. Postmenopozal obesitede ve kronik alkol kullananlarda da risk artar. Radyasyon, meme kanserinde de risk faktörüdür [35].

Meme kanserinde en iyi tanımlanmış olan risk faktörlerinin basında yaş gelmektedir. Meme kanseri insidansı 30 yaşına kadar oldukça düşükken (25/100.000), sonrasında 80 yaşına kadar düzenli bir artış gösterir ve 80 yaşında 500/100.000’lere kadar çıkar. 65 yaşın üstündeki kadınlarda, 65 yaşın altındaki kadınlarla kıyaslandığında meme kanseri için görece risk 5,8 kat daha fazladır [49]. Türkiye’de de yine benzer sonuçlar bildirilmiş ve meme kanserli vakaların sadece %5’i 35 yaş altında görüldüğü belirtilmiştir [50].

1.3.1. Meme Kanseriinde Üreme Ve Hormonal Faktörler

Uzun süreli olarak ve yüksek düzeyde endojen östrojene maruz kalınması meme kanseri riskini artırmaktadır. 17 β -estradiol'un de östrojen-sorumlu meme tümör hücrelerinde çoğalmayı uyardığı ve apoptozu engellediği bilinmektedir [51]. Östrojen alt tiplerinin üretimi menars, gebelik ve premenopoz dönemlerinde yumurtalıktan sağlanmaktadır. Menopoz sonrasında östrojen kaynağı adrenal bezden üretilen dehidroepiandrosteron (DHEA) daha sonra periferik yağ dokusunda östrodiol ve östrona dönüştürülmektedir.

Meme kanseri ile ilişkili başta gelen önemli faktörler menars yaşı, ilk doğum yapılan yaşı, menopoz yaşı, doğum sayısı ve emzirmedir [52-54]. Erken menarşın meme kanseri gelişiminde bir risk etmeni olduğu gösterilmiştir [54, 55]. Genel olarak menarşın geciktiği her yıl meme kanseri riskinin %20 azaldığı kabul edilmektedir [56]. Fakat meme kanseri riski yönünden menstruasyonun başlama yaşı yanında ilk düzenli menstruasyon yaşı da önemlidir [57]. Menarşı takiben düzenli menstruasyonların 1 yıl içinde başlaması, düzenli menstruasyonları 1 yıldan geç başlayanlara göre riski iki katına çıkartmaktadır. Menarşı erken (12 yaş veya öncesinde) başlayan ve kısa sürede düzenli menstrüel dönemlere geçen kişilerde kanser riskinin menarşı geç başlayan (13 yaş veya üzerinde) ve uzun süre düzensiz menstrüel dönemleri olan kişilere göre 4 kat fazla olduğu kabul edilmektedir [55, 57]. Bu gözlemler düzenli yumurtlama dönemlerinin kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığını düşündürmektedir. Düzenli yumurtlama dönemlerine sahip bir kadında luteal fazda östrojen düzeyi anovulatuvar dönemlere sahip bir kadındakinden daha yüksek olacağından, düzenli yumurtlama dönemlerinin sayısının artması östrojene (ve progesterona) maruz kalmayı arttıracaktır. Yine menarşı geç başlayan kadınlarda anovulatuvar dönemlerin erken menarşlı kadınlara göre daha fazla olacağı ve dolayısıyla östrojene maruz kalmanın azalacağı gösterilmiştir [58].

Meme kanseri riski ile menopoz yaşı arasında da bir ilişki mevcuttur. 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski, 55 yaşından sonra menopoza girenlere göre yüzde elli azalmaktadır. Ortalama olarak menopozun her bir yıllık gecikmesi meme kanseri riskini %3 arttırmaktadır [59].

Hamileliğin ve ilk hamilelik yaşının meme kanseri riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hiç doğum yapmamış kadınlarda kanser riski, doğum yapmış kadınlara göre daha fazladır. İlk doğumunu 30 yaşından sonra yapan bir kadında kanser riski, ilk doğumunu 20 yaşından önce yapan bir kadına göre 4 kat fazladır. Hiç doğurmamış kadınlarda ise, 20 yaş öncesinde doğum yapanlara göre risk 2 kat fazladır. 30 yaşından sonra doğum yapanlardaki kanser riski de hiç doğum yapmamış kadınlardakine göre daha fazladır. Bu durum 30 yaşından sonra yapılan doğumların, meme kanseri oluşumundaki koruyucu etkisini kaybettiğini göstermektedir [60].

Doğum sayısının artmasının meme kanseri üzerindeki etkisi araştırıldığında küçük de olsa koruyucu bir etkinin olduğu gösterilmiştir. Doğum sayısına ilaveten doğumlar arasında geçen sürenin kısa oluşu da daha düşük riskle ilişkili bulunmuştur [60]. Uzun süren laktasyonlar toplam yumurtlama dönemi sayısını azaltarak meme kanseri için koruyucu bir etki yaratmaktadır [61].

1.3.2. Östrojen Replasman Tedavisi

Menopoz sonrası ortaya çıkan değişiklikleri önlemek amacıyla östrojenler dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Menopoza giren kadınlarda en çok kullanılan hormon tedavisi konjuge östrojen (0,625 mg/gün, 25 gün boyunca) olup, buna 14 ve 25. günlerde medroksiprogesteron asetatın (10 mg/gün) da eklenmesi şeklindedir. Yapılan çalışmalar sonucunda 5 yıl veya daha uzun süre hormon replasman tedavisi gören (konjuge östrojen kullanan) menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir [30].

Menopoz sonrası hormon kullanıp bıraktıktan sonra 5 yıl ve daha uzun süre geçen kadınlarda ise hormon kullanma süresi ne olursa olsun herhangi bir risk artışı saptanmamıştır. Menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda dışardan verilen östrojenin meme kanseri oluşturma riski ile endojen östrojenin meme kanseri oluşturma riskini karşılaştıran çalışmalar da yapılmıştır.

Sonuçta konjuge östrojen kullanımının meme kanseri riskini endojen östrojenlerin 2 katı kadar arttırdığı gözlenmiştir. Bazı kadınların konjuge östrojenlerin karsinojenik etkilerine daha duyarlı olabileceği gösterilmiştir. Konjuge östrojen kullanımı ile ilişkili olarak meme kanseri risk artışının en fazla ailesinde meme kanseri hastalığı olan kadınlarda olduğu özellikle belirtilmiştir.

Menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda kullanılan östrojenin meme kanseri riskini arttırıcı etkisi yanında; yine bu kadınlarda östrojenin osteoporozu ve kardiyovasküler hastalıkları anlamlı bir şekilde önlediği de unutulmamalıdır [62].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

2.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- ELISA Cihazı (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Bio-Rad, ABD)
- Santrifüj (Heraeus, ALMANYA)
- Vorteks (Jeiotech, KORE)
- Hava Akışlı Kabin (Nüve MN 120 , TÜRKİYE)
- İnkübatör (37 °C %5 CO₂'li) (Nuaire, ABD)
- Sıvı Azot Tankı (B 2009, FRANSA)
- Sıcak su tankı (Elektro-mag, TÜRKİYE)
- Vakum pompası (Rocker 300, TAYVAN)
- Mikroskop (XDS-1B, TÜRKİYE)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyde kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2’ de gösterilmiştir.

Tablo 2: Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	ÜLKE
ETOH (etil alkol)	Necm Kimya	TÜRKİYE
17β-estra diol	Alfa aesar	-
MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]	Sigma	ABD
FBS (fetal bovine serum)	Sigma	ABD
DMSO(dimetil sülfoksit)	Carlo Erba	FRANSA
PBS (Fosfat Tamponlu Tuz)	MP Biomedical	AVRUPA
Tripsin	Sigma	ABD
RPMI-1640 medium Azot Gazı (N2)	Sigma	ABD

2.1.3. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

2.1.3.1. Medium’un Hazırlanması

RPMI-1640 Medium ticari olarak satın alındı ve içerisine %10 FBS ve % 0.1 oranında pencilin streptomycin eklendi. Hazırlanan medium 0.20 µm’ lik filtreden süzülerek kullanıma uygun hale getirildi.

2.1.3.2. Hücre Dondurma Mediumu Hazırlanması

Dondurma mediumu için gerekli olan, %45 FBS, %45 Medium ve %10 DMSO falkon tüpüne içerisine bırakılarak 1 ml dondurma mediumu hazırlandı.

2.1.3.3. MTT Solüsyonunun Hazırlanması

MTT ışıktan etkilenen bir madde olduğundan dolayı karanlık ortamda 50 mg MTT tartıldı. 10 ml PBS ile vorteks yardımı ile karıştırılarak çözünmesi sağlandı. 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı. Hazırlanan MTT solüsyonu +4 °C de karanlık ortamda saklandı.

2.1.3.4. %70'lik ETOH Hazırlanması

70 ml saf etanole 30 ml steril deyonize su eklenerek hazırlandı.

2.1.4. Deneyde Kullanılan Sarf Malzemeler

Deneyde kullanılan sarf malzeme listesi tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Deneyde kullanılan sarf malzemeler

MALZEME ADI	ÜRETİCİ FİRMA	ÜLKE
5–10–25 ml pipet	Costar	ABD
25–75 cm ² flask	TPP	İSVİÇRE
Cryo vial tüp	TPP	İSVİÇRE
96 well plate	TPP	İSVİÇRE
15–50 ml falcon tüpü	Citotest	ÇİN
Cam pastör pipet	Isolab	ALMANYA

2.2. Hücre Kültürü

2.2.1. Hücrelerin Gelişimi

MCF-7 hücreleri Ankara Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünden herhangi bir ücret alınmadan temin edildi. Deneyimiz İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Araştırmalar Laboratuvarında yapıldı. Hücrelerin her gün mikroskop altında gelişimleri incelendi. Konfluent olana kadar 3 günde bir laminar akımlı kabin içerisinde steril şartlarda besiyeri değiştirildi. Konfluent olduğunda üremelerine bağlı olarak pasajlandı. Bir kısmı çalışmayı güvence altına amacıyla -196 °C sıvı azot tankında donduruldu.

2.2.2. Hücre Kültür Ortamı

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin *in vitro* ortamda yaşayıp, çoğalabilmeleri için suni ortamlar ve gerekli besiyeri maddeleri sağlanmalıdır. Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir [63]. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Çalışmamızda besiyeri ortamı olarak RPMI-1640 medium kullanıldı. İçerisine % 10 FBS ve % 0,1 pencilin streptomycin eklendi.

Çalışmamızda model olarak MCF-7 hücreleri kullanıldı. Hücreler hazırlanan besiyeri ile beslendi. %5 CO₂'li inkübatörde, 37 °C'de ve % 95 nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirilerek hücrelerin gelişimi konfluent olana kadar izlendi.

2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent olduğunda hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için tripsin solüsyonu kullanıldı. Her 25 cm² 'lik flask için 2 ml tripsin eklendi. Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalıştığı için 4-5 dakika inkübatörde bekletildi. Böylece hücrelerin daha çabuk yüzeyden kaldırılması sağlanmış oldu. Tripsin hücre kültür ortamında uzun süre kaldığında hücrelere zarar vermeye başlar. Bu yüzden hücrelerin üzerine eklenen tripsin etkisini azaltmak için medium eklenerek seyreltme işlemi yapıldı.

Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hemen ortamdan alınması gerekmektedir. Çünkü tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlamaktadır [63].

Hücreler falcon tüpüne alınarak 1800 rpm’de 3 dk santrifüj edilip hücrelerin dibe çökmesi sağlandı. Üst kısımda bulunan süpernatant atıldı. Hücrelerin sayımı yapıldı ve 25 cm²’lik flaska 500.000 hücre ekildi. Diğer taraftan 25 cm² ‘lik flasklar içerisine 7 ml olmak üzere besi yeri bırakıldı.

Hazırlanan hücrelerin sayımı yapılarak hücre ihtiyacına göre yoğunluk belirlendikten sonra flasklara ekimi yapıldı. Flasklar %5 CO²’li inkübatörde, 37 °C’de ve % 95 nemli ortama kaldırıldı. Ekimden bir gün sonra hücreler mikroskop altında incelenerek flask yüzeyine yapışmayan hücrelerin atılması amacıyla besiyeri değiştirildi. Deney için yeterli hücre sayısına ulaşana kadar bu işlem devam ettirildi.

2.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Flask içerisinde bulunan besiyeri vakum pompası yardımıyla çekilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler besiyerinden iyice arındırılmak için PBS ile dikkatlice yıkandı. PBS’de yine vakum pompası yardımıyla çekilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine tripsin konularak inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. Tripsin, miktarının en az 2 katı kadar medium eklenerek hücrelerin birbirinden ayrılmaları ve kültür ortamında homojen dağılması için tritasyon işlemi yapıldı. Süspansiyon falcon tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1800 rpm ‘da 3 dk santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. % 45 FBS, % 45 Medium ve %10 DMSO’ dan (1 ml için) oluşan dondurma mediumu hazırlandı (1 ml için). Hücre sayımı yapılarak her tüp için 3.000.000 hücre olacak şekilde ayırma işlemi yapıldı. Cryo vial dondurma tüpleri içerisine her tüpe 1 ml dondurma mediumu içinde 3 milyon hücre donduruldu. Tüpler ilk önce 24 saat -20 °C’de bekletildi aşamalı şekilde dondurma işlemi gerçekleştirmek amacıyla ikinci 24 saatte -80 °C’ye alınarak derin dondurucuya bırakıldı. 24 saat sonrasında -80 °C ‘de bulunan cryo vial tüpler alınarak -196 °C sıvı azot tankına transfer edildi.

2.2.5. Hücrelerin Çözülmesi

-196 °C sıvı azot tankında bulunan hücreler oda ısısında bekletilerek hücrelerin çözülmesi sağlandı. Diğer tarafta 25 cm²'lik flask içerisinde bulunan hücrelere en az 3 ml olmak üzere besiyeri bırakıldı. Oda sıcaklığına ulaşan hücreler üzerine bir miktar medium konularak flask içine alındı. Hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatöre bırakıldı. 24 saat sonunda mediumu değiştirilerek mikroskop altında incelendi. Konfluent olana kadar haftada 2 gün besiyerleri değiştirildi. Konfluent olduğunda pasajlama işlemi yapıldı

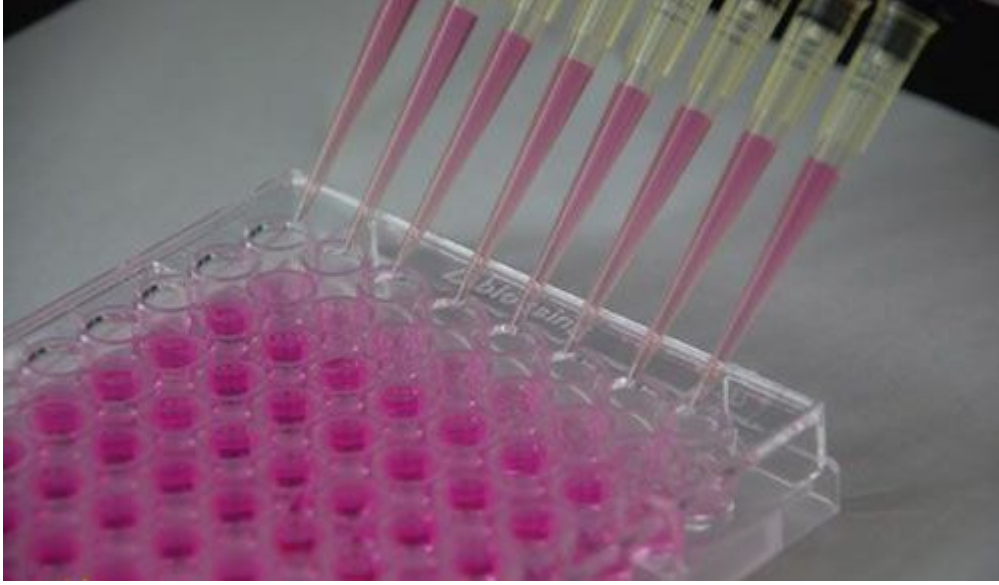
2.2.6. Hücrelerin Sayımı

Flask yüzeyinden ayırdığımız hücrelerin tritasyonları yapıldıktan sonra hemositometre yardımıyla sayımları yapıldı.

Hemositometre üzerine tritasyonu yapılan hücrelerden bir miktar bırakılarak mikroskop altında sayımı gerçekleştirildi. Çıkan rakam 4'e bölünerek ortalama bir değer bulundu. Bu değer 10⁴ ile çarpıldı. Bulunan bu değer 1 ml içerisindeki yaklaşık hücre sayısını temsil etmektedir. Falcon tüpü içerisinde kaç ml besiyeri var ise çıkan rakam ile çarpılarak ortalama hücre sayısı bulundu. Her plate için 1.500.000 hücre gelecek şekilde hücreler farklı falcon tüplerine alındı. Üzerlerine besiyeri eklenerek homojen ortamın sağlanması amacıyla tritasyon işlemi yapıldı. Her kuyucuk içerisinde 15.000 hücre olacak platelere ekimi yapıldı.

2.2.7. Hücrelerin Platelere Ekimi

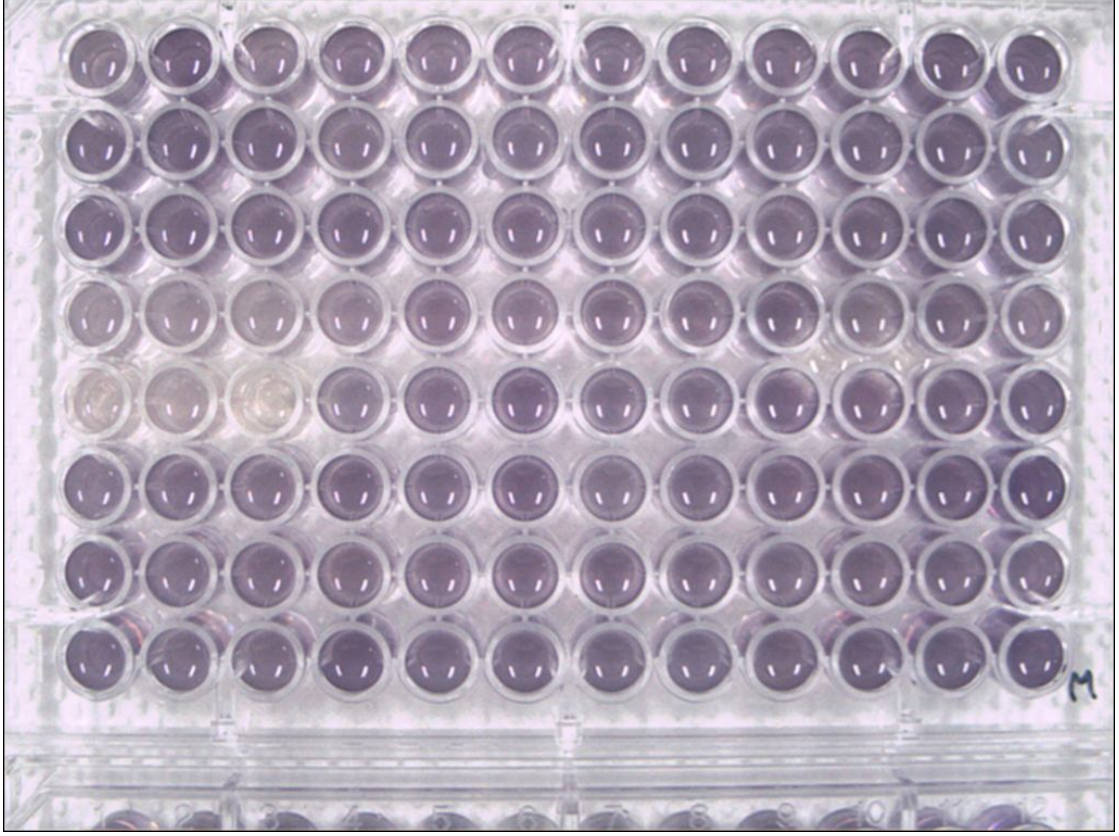
96 kuyucuklu platelere her kuyucuğa 15.000 hücre gelecek şekilde tekrarlayıcı pipet yardımıyla hücrelerin platelere ekim işlemi gerçekleştirildi (Her kuyucuk için 100 µl) [Şekil 6]. Ekilen hücrelerin plate yüzeyine yapışması için 24 saat süre ile CO²'li inkübatörde bekletildi. MTT assay için kullanacağımız hücreler deneye hazır hale getirildi [Şekil 7].



Şekil 6: Hücrelerin ekimi

2.2.8. Test Ajanlarının Kültür Ortamına Eklenmesi

- 1.Grup:** Apelin 0,1–1–10 nM'lık konsantrasyonları
- 2.Grup:** E2 1–10–100 nM'lık dozları
- 3.Grup:** E2 1 nM'lık dozu (24 saat) + apelin 1–10 nM'lık dozu
- 4.Grup:** E2 10 nM'lık dozu (24 saat) + apelin 1–10 nM'lık dozu
- 5.Grup:** E2 100 nM'lık dozu (24 saat) + apelin 1–10 nM'lık dozu
- 6.Grup:** E2 1 nM'lık dozu + apelin 0,1–1–10 nM'lık dozu
- 7.Grup:** E2 10 nM'lık dozu + apelin 0,1–1–10 nM'lık dozu
- 8.Grup:** E2 100 nM'lık dozu + apelin 0,1–1–10 nM'lık dozu



Şekil 7: 96 well plate

24 saat inkübasyon için inkübatöre bırakılan platelere ektiğimiz hücrelerin kullandığı medium vakum pompası yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler üzerine Apelin-13'ün 0,1–1–10 nM konsatrasyonları ve estradiol'ün 1–10–100 nM konsatrasyonları belirli deney düzeneği çerçevesinde eklendi. Hücreler well platelere ekildiğinde eş zamanlı olarak estradiol eklenerek 24 saat inkübasyon için inkübatöre bırakıldı. 24 saat sonrasında estradiol eklenen platelerde dâhil olmak üzere medium vakum pompası yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Üzerine apelin eklenerek apelinin estradiol ile indüklenen hücrelerin gelişimini ne yönde etkilediğini gözlemlemek için tekrar inkübasyon için 24 saat inkübatöre bırakıldı.

2.2.9. MTT Assay

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT assay [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid] yöntemi ile belirlendi [30]. 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 edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yasayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir [30, 32]. Yöntemde 50 mg MTT boyası 10 ml hacimde PBS içinde karanlık ortamda çözülerek 5mg/ml’lik MTT solüsyonu hazırlandı. Solüsyon 0.22 µm’lik filtre ile süzülerek sterilizasyonu gerçekleştirildi.

Maddelerin eklenmesinin ardından inkübasyon için inkübatöre bırakılan plateler alınarak maddeler vakum pompası yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Platelere her kuyucuğa 50µl olacak şekilde tekrarlayıcı pipet yardımıyla MTT solüsyonu eklenerek inkübasyon için 3 saat süreyle inkübatöre konuldu. 3 saat sonunda eklenen MTT ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra üzerine her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde DMSO eklenerek hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 550 nm dalga boyunda okutuldu [64]. Kontrol kuyucukları okutularak 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. Bu MTT denemeleri farklı günlerde tekrarlanarak maddelerin MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin olup olmadığı tespit edildi.

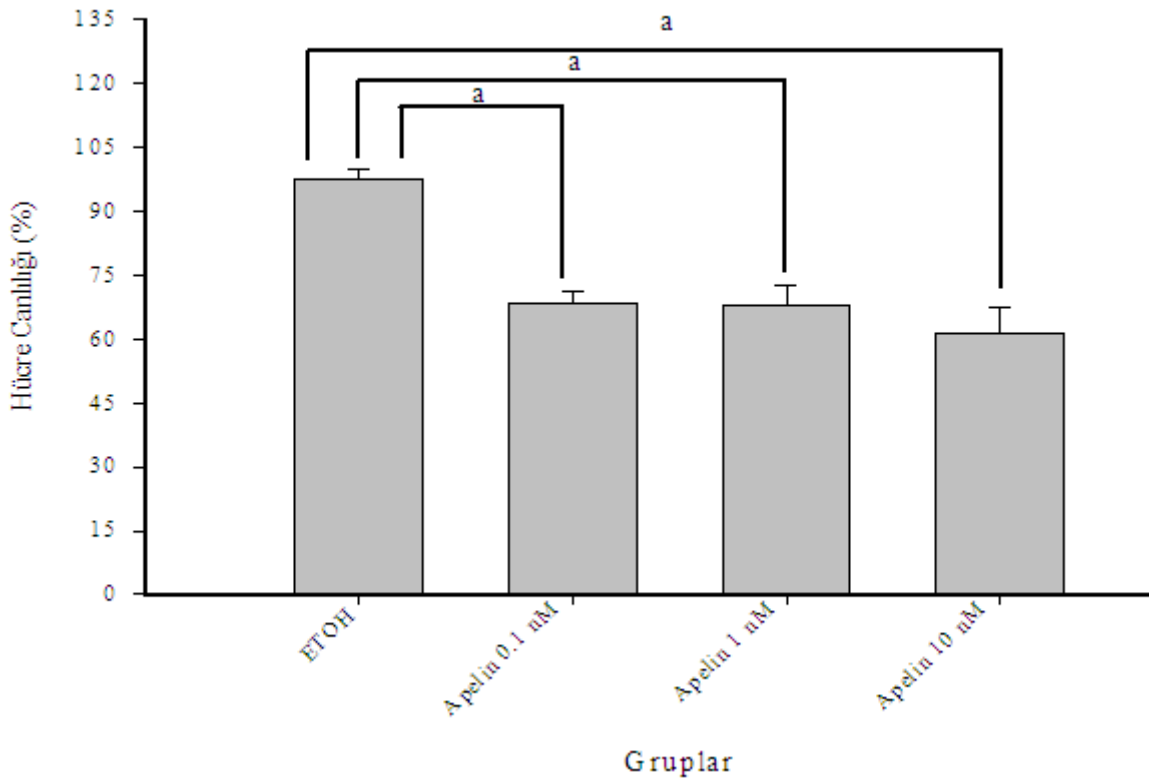
2.2.10. İstatistiksel Analiz

Grupların normal dağılıma uygunluğu KOLMOGOROV SMİRNOV 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.

3. BULGULAR

3.1. Apelin-13 Uygulanmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

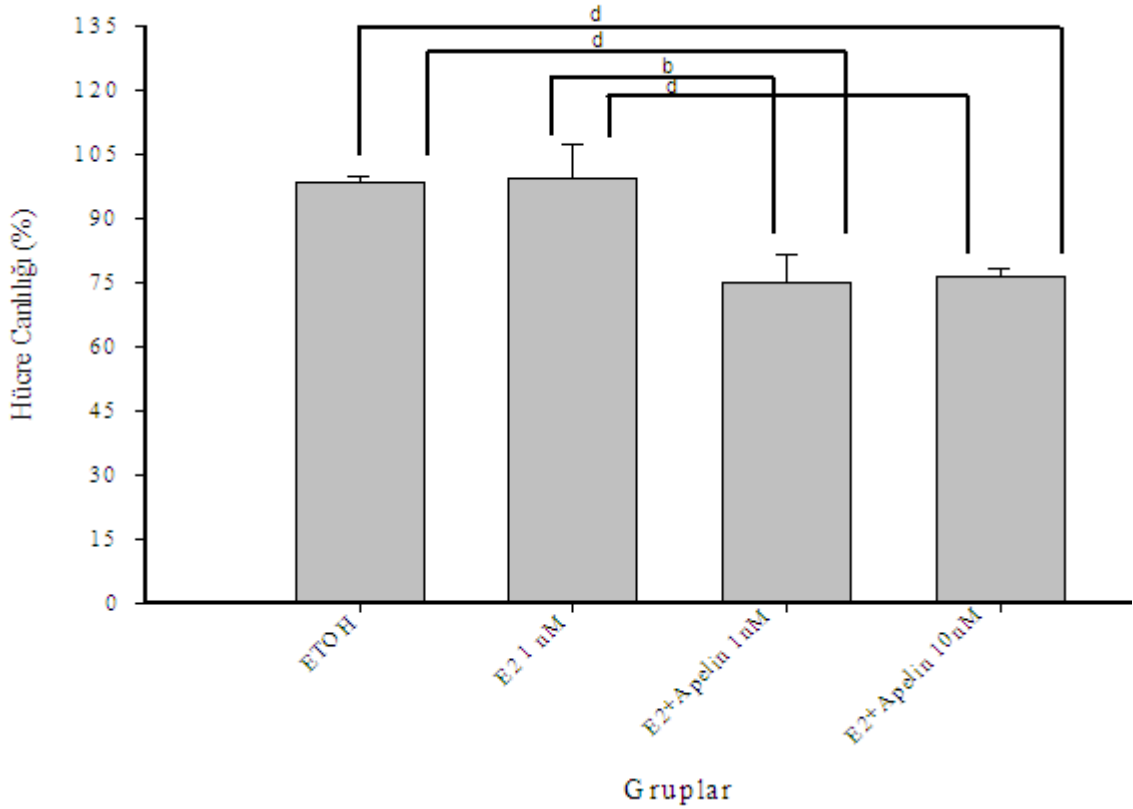
Apelin-13'ün 0.1–1 ve 10 nM'lık dozları ve çözücü uygulanması sonrasında hücre canlılığı üzerinde etkileri Şekil 8 'de gösterildi. Uygulanan 3 farklı apelin dozu kontrol grubu ile kıyaslandığında iki grup arasında istatistiksel olarak hücre canlılığında anlamlı azalmalara sebep olmuştur ($p < 0.001$).



Şekil 8: Apelin-13 uygulanmasından sonra kontrol ve ETOH grubunda hücre canlılığında meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (^a $p < 0.001$; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

3.2. 1 nM E2 İle 24 Saat İnkübasyon' dan Sonra Hücre Canlılığına Apelin-13 Etkisi

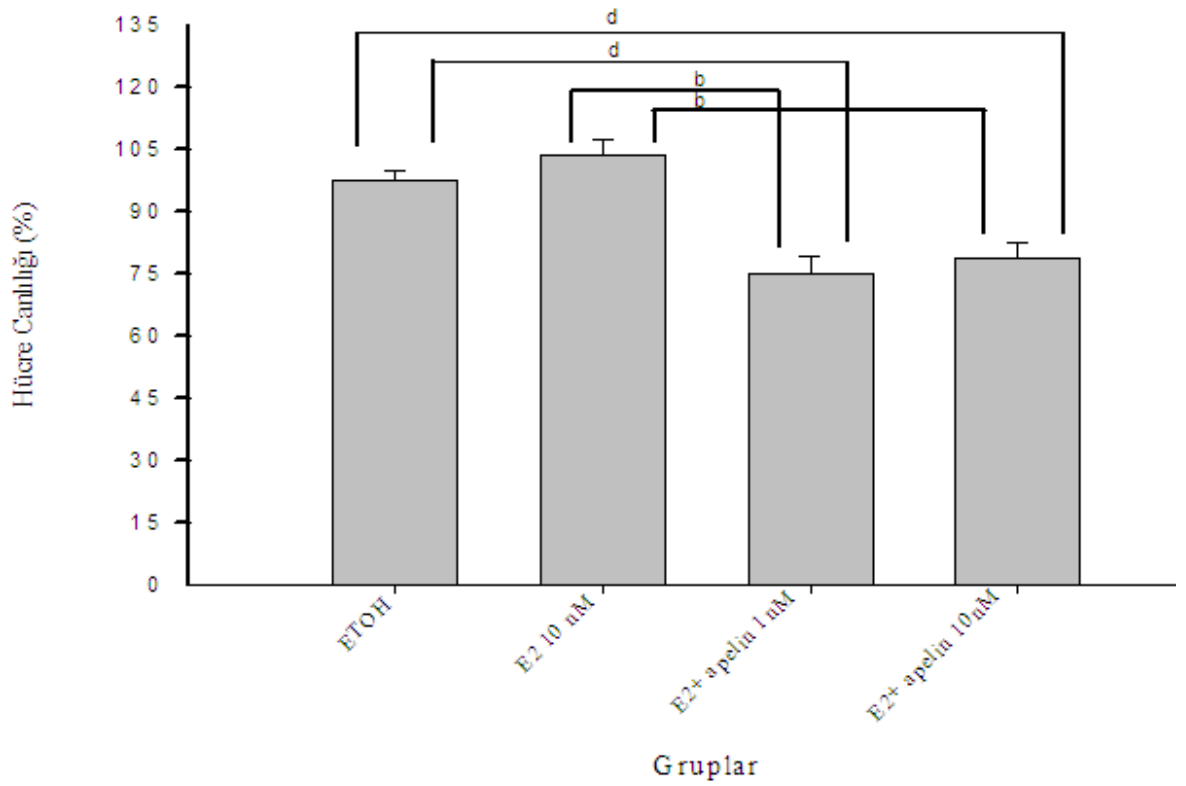
E2'nin 1 nM'lık dozunun uygulanmasından 24 saat sonra apelin-13'ün farklı 2 dozunun (1–10 nM) hücreler üzerine uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 9'da gösterildi. Hücrelere 1 nM'lık estradiol uygulanmasından 24 saat sonra apelin-13 uygulaması yapıldı. Yapılan analizde estradiol ve apelin-13'ün (1 ve 10 nM) konsantrasyonları çözücü grup ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. (^bp<0.005, ^dp<0.05)



Şekil 9: 24 saat 1 nM estradiol uygulamasından sonra uygulanan apelin-13'ün 1 ve 10 nM'lık dozu verildiğinde hücre canlılığında meydana gelen (Ort_± SH) değişiklikler (^bp<0.005, ^dp<0.05; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

3.3. 10 nM E2 İle 24 Saat İnkübasyon’ dan Sonra Hücre Canlılığına Apelin-13 Etkisi

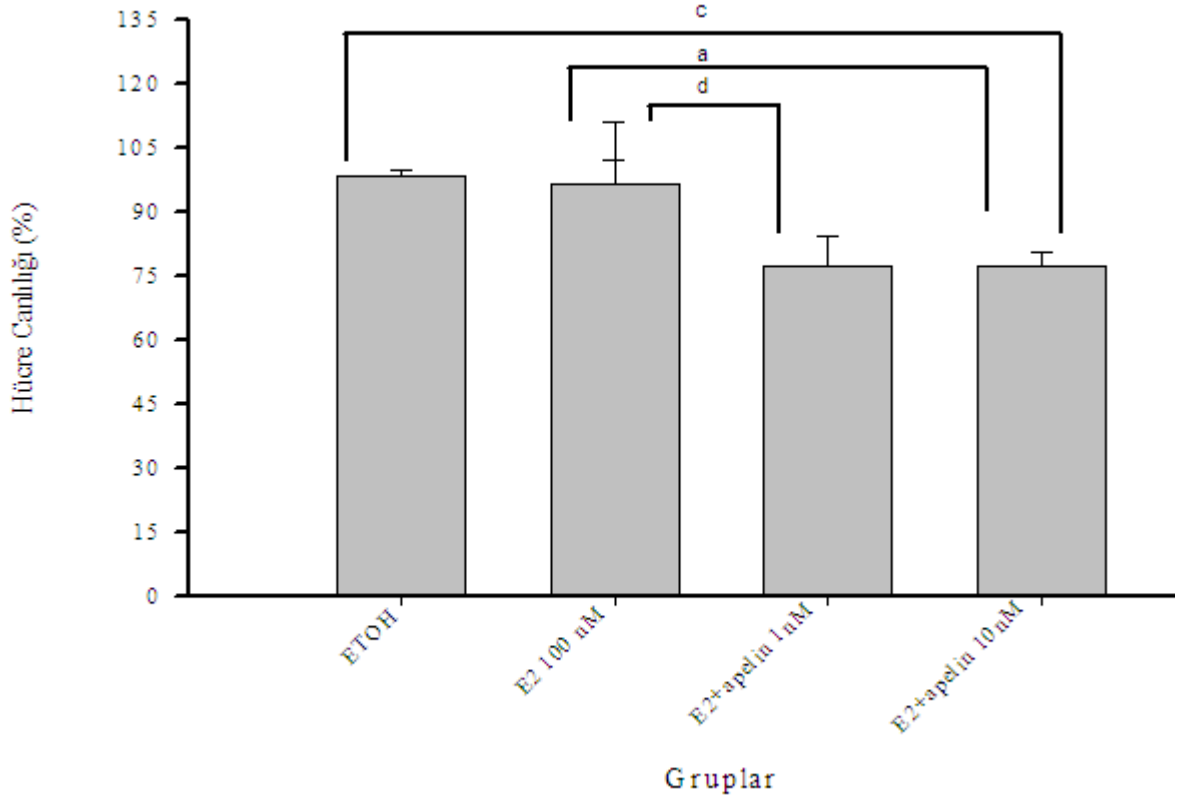
Estradiol’ün 10 nM’ lık dozunun hücelere uygulanmasından 24 saat sonra apelin-13 (1–10 nM) uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 10’ da gösterildi. Çözücü ile E2 + apelin-13’ün 1 ve 10 nM’ lık konsantrasyonu karşılaştırıldığında, E2 + apelin-13 uygulamasının hücre canlılığını azalttığı belirlendi ($p<0.05$, $p<0.005$).



Şekil 10: 24 saat 10 nM estradiol uygulamasından sonra uygulanan apelin-13’ün 1 ve 10 nM’ lık dozu verildiğinde hücre canlılığında meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ($^b p<0.005$; $^d p<0.05$); TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

3.4. 100 nM E2 İle 24 Saat İnkübasyon’ dan Sonra Hücre Canlılığına Apelin-13 Etkisi

Estradiol’ ün 100 nM’ ün dozunun uygulanmasından 24 saat sonra 2 farklı apelin-13 dozunun (1–10 nM) hücrelere uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 11’de gösterildi. Yapılan analizde çözücü grup ile apelin-13’ün 1 nM’ lık dozu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlam taşımadığı görüldü. Estradiol ile E2+apelin 13 (1 ve 10 nM) grupları kıyaslandığında ise hücre canlılığında anlamlı düzeyde azalma görüldü (^dp<0.05; ^ap<0.001, ^cp<0.01).



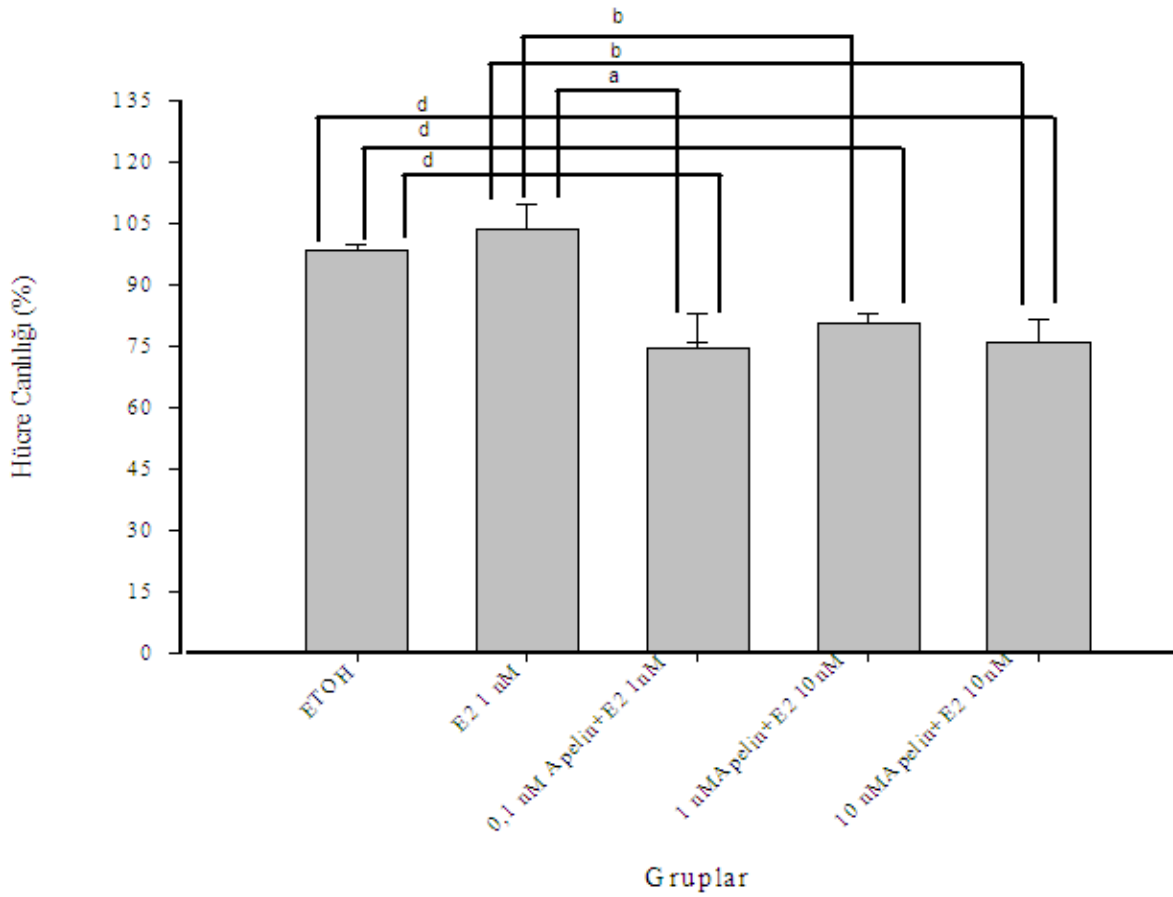
Şekil 11: 24 saat 100 nM estradiol uygulamasından sonra uygulanan apelin-13’ün 1 ve 10 nM’ lık dozunun hücre canlılığındaki (Ort ± SH) değişiklikler (^dp<0.05; ^ap<0.001; ^cp<0.01; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

Tablo 4: Apelin' in 3 farklı dozu (0.1,1 ve 10 nM) ve e2 konsantrasyonlarının (1,10 ve 100 nM) hücre canlılığına olan etkisinin karşılaştırılması

Grup	0.1 nM	1 nM	1 0 nM
Kontrol	100 ± 2,617	100 ± 2,617	100 ± 2,617
1 nM E2+Apelin	79.46 ± 5,025	79.66 ± 5,187	77.48 ± 5,769
10 nM E2+Apelin	79.83 ± 4,268	82.81 ± 4,855	77.89 ± 5,479
100 nM E2+Apelin	86.34 ± 5,335	80.72 ± 6,025	75.80 ± 5,674

3.5. 1nM' lık Estradiol ve Apelin-13'ün Eş Zamanlı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

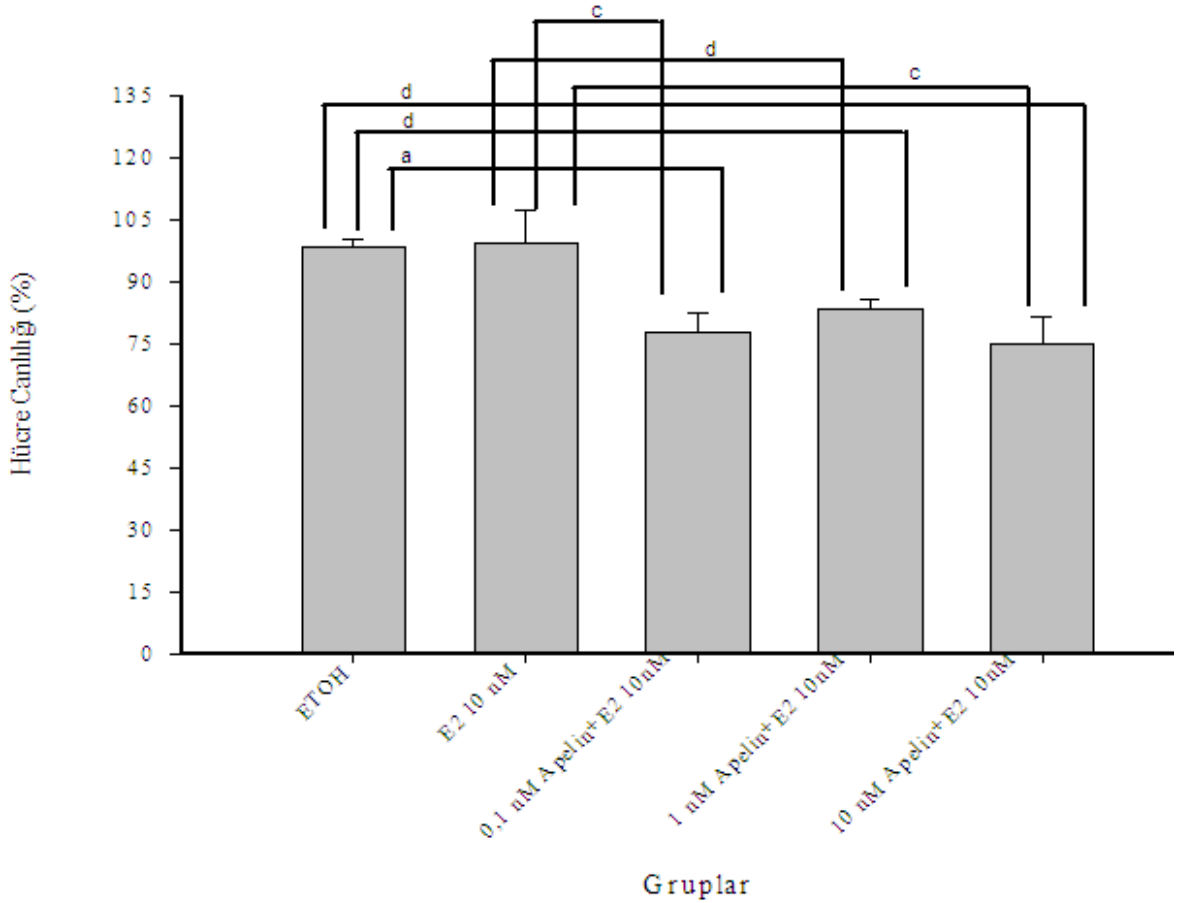
Apelin-13'ün 0,1, 1 ve 10 nM' lık dozları ve estradiolün 1 nM' lık dozunun eş zamanlı uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 12 'de gösterildi. Hücrelere 1 nM' lık estradiol ve apelin-13'ün 3 dozu da eş zamanlı olarak uygulanıp inkübasyon için inkübatöre bırakıldı. Ancak MCF-7 hücrelerine uygulanan apelin-13'ün 0.1, 1 ve 10 nM' lık konsatrasyonlarında hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlemlendi. (^ap<0.001, ^dp<0.05)



Şekil 12: Estradiol 1nM ve apelin-13'ün 0.1, 1 ve 10 nM uygulanmasının hücre canlılığındaki (Ort ± SH) değişiklikler (^ap<0.00; ^dp<0.05; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

3.6. 10 nM' lık Estradiol ve Apelin-13'ün Eş Zamanlı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

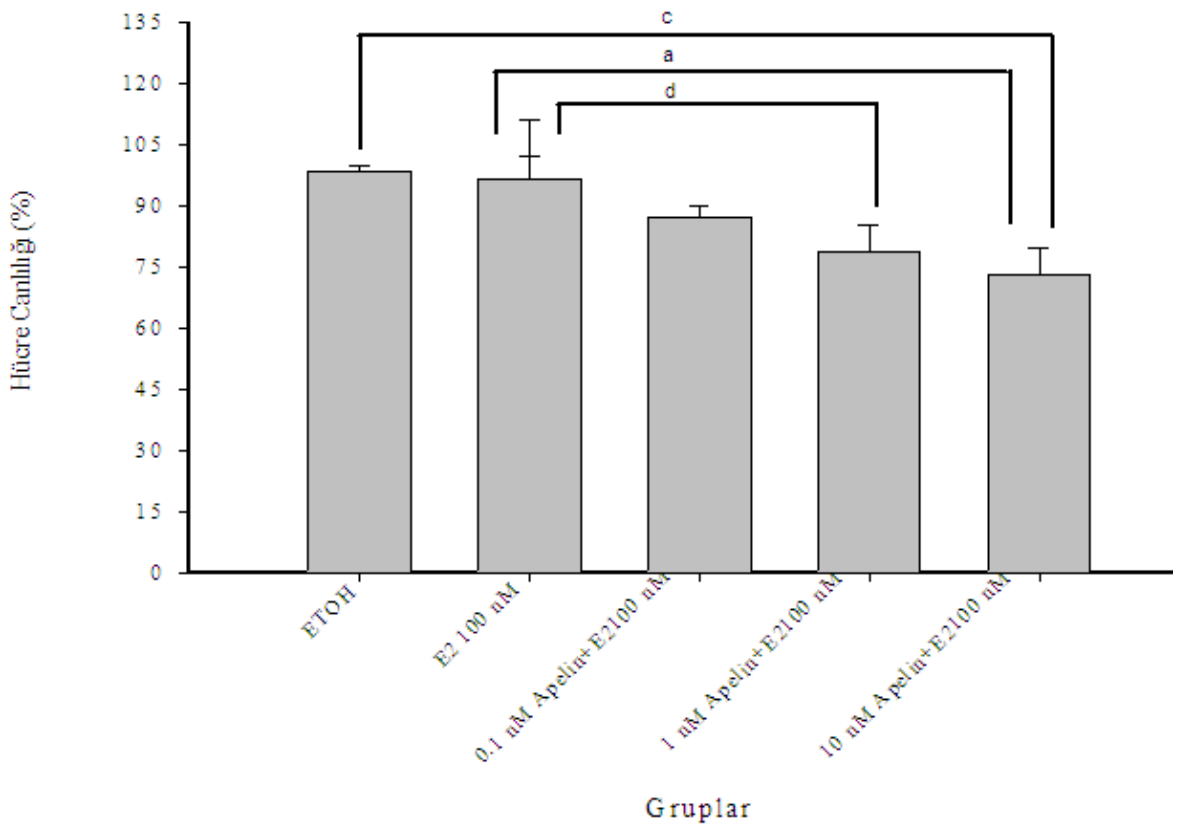
Apelin-13'ün 3 farklı dozunun (0,1–1 ve 10 nM) ve Estradiol'ün eş zamanlı uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 13 'de gösterildi. Hücrelere 10 nM' lık estradiol ve apelin-13'ün 3 dozu da eş zamanlı olarak uygulandı. MCF-7 hücrelerine uygulanan apelin-13'ün 3 farklı konsatrasyonunun (0.1–1 ve 10 nM) çözücü grup ve eş zamanlı uygulanan E2 grubu kıyaslaması yapıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya sebep olduğu görüldü.



Şekil 13: Estradiol 10 nM ve apelin-13'ün 0.1,1 ve 10 nM doz uygulanmasının hücre canlılığındaki (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (^ap<0.001; ^cp<0.01; TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

3.7. Estradiol 100 nM ve Apelin-13'ün Eş Zamanlı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Apelin-13'ün 0,1-1 ve 10 nM olan dozları ile Estradiol'ün eş zamanlı uygulanmasının ardından hücre canlılığı değişimi Şekil 14' de gösterildi. Hücrelere 100 nM' lık estradiol ve apelin-13'ün 3 dozu da eş zamanlı olarak uygulandı. 0.1 nM Apelin-13 uygulanan grupta hücre canlılığında bir azalma görüldü. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çözücü ile 1 nM apelin uygulanan grup kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya sebep olmadığı görüldü. 10 nM apelin-13 verilen grup çözücü ve estradiol 100 nM konsatrasyonunun verildiği grup ile kıyaslandığında ise hücre canlılığında anlamlı bir şekilde azalma meydana geldiği görüldü.



Şekil 14: Estradiol 100 nM ve apelin-13' ün 0.1 nM doz uygulanmasının hücre canlılığındaki (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (TAMHANE Post Hoc Turkey HSD)

Tablo 5: Östrojenin 3 farklı konsatrasyonu (24h) (1,10 ve 100 nM) ve Apelin-13'ün 2 farklı dozunun (1 ve 10 nM) hücre canlılığına olan etkisinin karşılaştırılması

Grup	1 nM	10 nM
Kontrol	100 ± 2,617	100 ± 2,617
1 nM E2 (24h)+Apelin	77,92 ± 5,505	75,90 ± 4,788
10 nM E2 (24h)+Apelin	74,84 ± 5,930	78,92 ± 5,588
100 nM E2 (24h)+Apelin	80,20 ± 5,684	76,96 ± 5,570

4.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Meme kanseri, kadınlar arasında yaygın görülmekte ve kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanseri, semptomlarını göstermeden metastaz yapabilir [65]. Bu gözlemler, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Apelin, son zamanlarda keşfedilen yeni G-protein kenetli peptit yapıda endojen bir ligandır ve G protein kenetli orfan reseptörlerine (APJ) bağlanarak etkilerini ortaya koyar [2, 66, 67]. Reseptörleri, hipotalamusun supraoptik nükleus (SON) ve paraventriküler nükleusları (PVN) da dahil olmak üzere beyindeki birçok alanda geniş biçimde eksprese edilmektedirler [10]. Ayrıca ince barsak, dalak, adipoz doku, meme dokusu, testis ve timus gibi periferik dokularda da apelin mRNA'sı tespit edilmiştir [68, 18]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda tüm apelin türevleri içerisinde biyolojik olarak en aktif olan formun apelin-13 olduğu ortaya konulmuştur [66, 9]. Habata ve ark. [18] sıçan ovaryum dokusunda apelin ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı grup sıçan meme dokusunda gebelik ve laktasyon döneminde apelin ekspresyonunda belirgin bir artış olduğunu belirlenmişlerdir [18].

Bir başka çalışmada da apelinin sadece sığır ve sıçan süt örneklerinde değil, insan sütünde de bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir [9, 69, 70]. Deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada meme dokusunda ölçülen apelin seviyesinin plazma apelin konsantrasyonundan daha yüksek olduğu, hormon seviyesinin doğum ve laktasyon döneminde ise artmadığı bildirilmiştir [69].

Bir başka çalışmada ise hem apelin seviyesinin hem de apelin mRNA ekspresyonunun doğum ve laktasyonda önemli miktarda arttığı tespit edilmiştir [18, 9]. Apelin mRNA'sının, Hs 578T insan meme kanseri hücre kültürlerinde yüksek seviyelerde eksprese edildiği ortaya konulmuştur [70]. Aynı grubun yaptığı immunohistokimyasal bir çalışmada, malin duktal ve lobüler tümör hücrelerinde de apelin mRNA ekspresyonunun devam ettiğini rapor etmişlerdir [71]. Bu durum insan meme kanseri hücreleri üzerinde apelinin önemli etkilere sahip olabileceğini akıllara getirmektedir.

Çalışmamızda, meme kanseri hücrelerine farklı dozlarda (0,1–1 ve 10 nM) apelin–13 uygulaması yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerin canlılık oranlarında meydana gelen % değişimler incelendi. Sonuç olarak, kontrol grubuna kıyasla apelin–13 uygulanan MCF–7 hücrelerinde canlılığın azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).

Meme kanserlerinin gelişmesinde hormonların rolü olduğu ve hormonların etkisi olmadan meme kanseri olmayacağı bildirilmektedir [72,73]. Hastalığın ortaya çıkmasında östrojenler önemli bir role sahiptir [72]. Bundan dolayı kadınlarda meme kanseri erkeklere oranla 100 kat daha sık görülmektedir [74]. Devam eden tümör progresyonları için de östrojenler, bütün meme kanserlerinde östrojen reseptör (ER) ispatlanabildiği ve meme karsinomundaki ilerleme östrojen-bağımlı olduğu için büyük bir anlam ifade etmektedir [75, 76]. Bu özel anlam ise ER antagonistleri ile yapılan terapilerde başarı olarak yansımaktadır [77]. ER pozitif meme kanseri hücrelerinde östrojen ER’yi aktive ederek hücre siklusundaki G1-fazı kısaltıp hücrenin daha sık şekilde bölünmesine neden olur. ER antagonisti olan tamoxifen, ER’yi bloke ederek östrojen-bağımlı hücre büyümesini durdurur [79].

Çalışmamızda, meme kanseri hücrelerine farklı dozlarda (1,10 ve 100 nM) östrojen uygulaması yapıldı ve 24 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerin canlılık oranlarında meydana gelen % değişimler incelendi. Kontrol grubuna kıyasla östrojen uygulanan gruplarda MCF-7 hücre canlılığının arttığı tespit edildi ($p<0.05$). MCF–7 hücrelerinin androjen reseptör pozitif olduğu bilinmektedir [78]. Östrojen uygulamasında MCF–7 hücrelerinde görülen proliferatif etkinin androjen reseptör kaynaklı olduğun akla gelmektedir. Meme kanserlerinin ortalama %95’i primer bir östrojen-bağımlı büyüme göstermektedir [80].

Kanser ve apelin ilişkisinin araştırıldığı çalışmalar hem sayısal olarak yetersizdir hem de bu çalışmalar genellikle deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bizim çalışmamız insan meme kanseri hücreleri üzerine yapılmış ilk çalışma olduğundan ayrı bir önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, MCF-7 hücrelerine *in vitro* ortamda apelin-13 konsantrasyonlarının uygulanmasının ardından hücre canlılığında meydana gelen azalma, apelin hormonunun tedavi yöntemlerinde alternatif olarak kullanılabileceğini akla getirmektedir.

KAYNAKÇA

1. O'Dowd BF, Chan A, George SR, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136: 355–60.
2. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251 (2): 471–476.
3. Klein MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept.* 2005; 126 (3): 233–40.
4. Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF. Apelin: a novel neurohumoral modulator of the cardiovascular system. Pathophysiologic importance and potential use as a therapeutic target. *Rev Port Cardiol* 2005; ch24: 1263-1276.
5. Sarah L, Maguire J, Pitkin J, et al. Apelin Receptor Nomenclature, Distribution, Pharmacology, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 331–342.
6. Malyszko JS, Kozminski P, Mysliwiec M. Apelin and cardiac function in hemodialyzed patients: possible relations? *Am J Nephrol* 2006; 26: 121–126.
7. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept.* 2001; 99 (2–3): 87–92.
8. Chen MM, Ashley EA, Deng DX, et al. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003; 108: 1432-1439.
9. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000; 275: 21061–7.
10. O'Carroll AM, Lolait SJ, Palkovits M, et al. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1492(1): 72–80.

11. Leprêtre N, Mironneau J. Alpha 2-adrenoceptors activate dihydropyridine-sensitive calcium channels via Gi-proteins and protein kinase C in rat portal vein myocytes. *Pflugers Arch* 1994; 429(2): 253–61.
12. Lee D.K, Cheng R, Fan T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem* 2000; 74: 34–41.
13. Medhurst AD, Davis RP, Ellis C, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003; 84 (5): 1162–72.
14. Devic E, Audigier Y, Bodin S, et al. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev* 1999; 84: 199–203.
15. Edinger AL, Choe W, Faulds D, et al. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for foldes ghuman immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1998; 72: 7934–7940.
16. Katugampola SD, Davenport AP, Maguire JJ, et al. [(125)I]-(Pyr(1)) Apelin–13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol* 2001; 132 (6): 1255–60.
17. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1538 (2–3): 162–71.
18. Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1452 (1): 25–35.
19. Kleinz, MJ., Davenport, A.P. (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 107 (2), 198–211.
20. Alan G. Japp, Nicholas L. Cruden, David A.B. Amer, Vivienne K.Y. Li, Ewan B. Goudie, Neil R. Johnston, Sushma Sharma, Ilene Neilson, David J. Webb, Ian L. Megson, Andrew D. Flapan, and David E. Newby Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 908–913.

21. Cheng X, Cheng XS, Pang CC, Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 470: 171–75.
22. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279: 26274–79.
23. Kagiya S, Fukuhara M, Matsumura K, Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept* 2005; 125: 55–9
24. Lee, C. R., Watkins, M. L., Patterson, J. H., Gattis, W., O'Connor, M. C., Gheorghiade, M., et al. (2003). Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. *Am Heart J* 146(1), 9– 18.
25. Reaux, A., Mota, N.D., Skultetyova, I., Lenkei, Z., Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C. (2001). Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.*, 77 (4), 1085-1096.
26. O'Carroll AM, Lolait SJ.Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli.2003 Jul;15(7):661-6.
27. Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillo, W., et al. (2002). The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291(5), 1208– 1212
28. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764–1771.
29. Malamitsi-Puchner, A., Gourgiotis, D., Boutsikou, M., Baka, S., Hassiakos, D., Briana, DD. (2007). Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *Acta Paediatrica*, 96 (12), 1751–1754.
30. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89: 271–277.
31. Wang, G., Kundu, R., Han, S., Qi, X., Englander, EW., Quertermous, T., Greeley, GH. (2009). Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul. Pept.*, 158 (1-3), 32–39.

32. Horakova K, Sovcikova A, Seemannova Z, et al. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:650–664.
33. Shimizu, T, Kosaka, N, Murayama, C, Tetsuka, M, Miyamoto, A. (2009). Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation. *Anim Reprod Sci.* 116, 28-37.
34. URL-1, <http://kanser.nedir.com/#ixzz1vVqkpmn8>, (21.05.2012)
35. F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg. 2008: 22 (6): 377 – 384
36. URL-2, http://www.saglikpaneli.com/content.asp?content_id=2057&connection_id=21&connection_table=1&content_type=1
37. Harris JR, Morrow M, Banadonna G. Cancer of the breast. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1993:1264-1332.
38. URL-3 <http://www.kanseroloji.com/wp-content/uploads/2009/10/kanser1.jpg>
39. URL4, <http://www.kanserdesifresi.com/Kanser-Tedavisi/Kemoterapi.php>, (21.05.2012)
40. URL-5, http://www.kanseroloji.com/wpcontent/uploads/2009/10/kanser1.jpg&w=550&h=427&ei=_o_zT_ejDIT6sga1o6jABQ&zoom=1&iact=rc&dur=610&sig=110505179972821765635&page=1&tbnh=119&tbnw=142&start=0&ndsp=15&ved=1t:429,r:0,s:0,i:135&tx=112&ty=12
41. Kılınç D, Sağlıklı ve tedavi almamış meme kanseri hastası kadınların saç, tırnak ve serum örneklerinde biyolojik açıdan önemli bazı eser element düzeylerinin karşılaştırmalı analizi 2011
42. Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human female cancer cell lines. 2012 Jun 20
43. Topuz E, Aydın A, Dinçer M. Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitapevi, 2003.

44. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, organlara göre kanser sıklığının dağılımı ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser, [http:// www. saglik. gov.tr](http://www.saglik.gov.tr). 2001,05.02.2012
45. Weber ES. Questions & answers about breast cancer diagnosis. *AJN*1997; 97:34-38.
46. Vogel V. Assessing risk of breast cancer. *Postgraduate Medicine* 1999; 105:63-69.
47. Mincey BA. Genetics and the management in women at high risk for breast cancer. *Oncologist* 2003; 8(5): 466-473.
48. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Ellis Kahn MJ. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II.BRCA1 and BRCA2. *JAMA* 1997; 277:997-1003.
49. S.Eva Singletary, 2003. Rating the risk factors for breast cancer, *Annals Surgery*. Apr; 237(4): 474-82.
50. Ozmen V., Ozcinar B., Karanlık H., Cabioglu N., Tükenmez M., Disci R., Özmen T., Igci A., Müslümanoğlu M., Keçer M., Soran A., 2009. Breast cancer risk factors in Turkish women. *World Journal of Surgical Oncology*. 7: 37 doi: 10.1186/ 1477-7819-7-37.
51. F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.2010: 24 (3): 157 – 161
52. Parkin DM, Bray F, Ferlay J. (2005) Global Cancer Statistics. *Cancer J Clinic CA* 2002;55:74-108.
53. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer.*Epidemiol Rev* 1993;15:36-47.
54. MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, et al. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982;30:427-31.
55. Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, Rosario I, Gray GE. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *Br J Cancer* 1981; 43(1): 72-76.
56. Henderson BE, Pick MC, Casagrande JT. Breast cancer and the oestrogen window hypothesis. *Lancet* 1981; 2: 263-267.
57. Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Kralio MD, Pike MC. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* 1985; 56 (5): 1206- 1208.

58. MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, Andersen AP, Aoki K, Cole P ve ark. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982; 29 (1): 13-20.
59. Brinto LA, Hoover R, Fraumeni JF Jr. Reproductive factors in the etiology of breast cancer. *Br J Cancer* 1983; 47 (6): 757-762.
60. Eweretz M, Duffy SW, Adami HO, Kvåle G, Lund E, Meirik O ve ark. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 1990; 46 (4): 597–603.
61. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW ve ark. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330 (2): 81–87.
62. Meme kanserli hastalarda LOT1 geninin araştırılması [Investigation of LOT1 gene in breast cancer] / Seda Ekizoğlu
63. Arat S, TAŞ A, ÇETİNKAYA G. Hücre Kültürü Uygulamalı Kursu, TÜRKHAYGEN-1 PROJESİ 2008
64. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.
65. Yaramış A, İnsan Meme Kanseri MCF7 Hücre Dizisinde Fumagillinin Antikanserojenik Etkilerinin Araştırılması; 2011
66. Hinuma, S., Onda, H., Fujino, M. (1999). The quest for novel bioactive peptides utilizing orphan seven-transmembrane-domain receptors. *J. Mol. Med.* 77, 495–504.
67. Todisco, A., Campbell, V., Dickinson, C.J., DelVallem, J., Yamada, T. (1994). Molecular basis for somatostatin action: inhibition of c-fos expression and AP-1 binding. *Am. J. Physiol.* 267, G245–G253.
68. Edinger, A.L., Hoffman, T.L., Sharron, M., Lee, B., Yi, Y., Choe, W., Kolson, D.L., Mitrovic, B., Zhou, Y., Faulds, D., Collman, R.G., Hesselgesser, J., Horuk, R., Doms, R.W. (1998). An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus, *J. Virol.* 72, 7934–7940.

69. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001). Molecular properties of apelin: Tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1538**(2–3), 162–171.
70. Wang, G., Anini, Y., Wei, W., Qi, X., Carroll, AM., Mochizuki, T., Wang, HQ., Hellmich, MR., Englander, EW., Greeley, GH. (2004). Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology*, *145* (3), 1342–1348.
71. Englander EW, Greeley GH Jr (2006) Characterization of the 5'-regulatory regions of the rat and human apelin genes and regulation of breast apelin by USF. *FASEB J* 20:2639–2641.
72. Meites J. 1972, Relation of Prolactin and Estrogene to mammary tumorigenesis in the rat. *J. Nat. Cancer Inst.* 48,1217-24.
73. Cuzick J. and Wang OY., 1986. The Prévention of breast cancer. *The Lancet*, 1:83-86.
74. Santen RJ., Boyd NF., Chlebowski RT., Cummings S. , Cuzick J., Dowsett M., Easton D., Forbes JF., Key T., Hankinson S. E., Howell A. , and Ingle J., 2007. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr. Relat Cancer*, 14, 169-187.
75. Henderson BE., Ross R., and Bernstein L., 1988. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.*, 48, 246-253.
76. Carlstrom K., 1984. Influence of intratumoral estradiol biosynthesis on estrogen receptors. *Recent Results Cancer Res.*, 91, 145-149.
77. Duffy MJ., 2005. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin. Chem.*, 51, 494-503
78. Reinhard Hackenberg, Inga Turgetto, Angelika Filmer, Klaus-Dieter Schulz..Estrogen and androgen receptor mediated stimulation and inhibition of proliferation by androst-5-ene-3 β ,17 β -diol in human mammary cancer cells, November 1993, Pages 597–603
79. Osborne CK., 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 339, 1609-1618.
80. Suzuki T., Miki Y., Nakamura Y., Moriya T., Ito K., Ohuchi N., and Sasano H., 2005. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr. Relat Cancer*, 12, 701-720.

ÖZGEÇMİŞ

21.06.1985 yılında Malatya’ da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Malatya’da tamamladım. 2003 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü’ndeki eğitimimi ise 2008 yılında tamamladım.2009 yılında yerleştiğim Fırat Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesinde Tezsiz Yüksek Lisans Programından 2010 yılında mezun oldum. Yine 2010 yılında Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım.