

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOKANNABİNOİDLER VE RESEPTÖRLERİNİN İNSAN
HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİ VE KEMİK İLİĞİ
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDEKİ
VARLIĞI VE DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevil KÖSE

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

ANKARA

2017

**ENDOKANNABİNOİDLER VE RESEPTÖRLERİNİN İNSAN HEMATOPOETİK KÖK
HÜCRELERİ VE Kİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDEKİ VARLIĞI VE
DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI
SEVİL KÖSE**

Bu çalışma 31.03.2017 tarihinde jürimiz tarafından “Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *PROF. DR. FAHİRİYE DUYGU UÇKAN*
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Tez Danışmanı: *PROF. DR. PETEK KORKUSUZ*
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye: *PROF. DR. MEHMET UĞUR*
(ANKARA ÜNİVERSİTESİ)

Üye: *PROF. DR. HABİBE MELTEM ÖZGÜNER*
(YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ)

Üye: *YRD. DOÇ. FATİMA AERTS KAYA*
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

05 Mart 2017

Diclehan Orhan

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- Tezimin/Raporumun 01.01.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

30/03/2017

SEVİL KÖSE

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. PETEK KORKUSUZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

SEVİL KÖSE

TEŞEKKÜR

Sadece bilim alanında değil, hayatımın diğer tüm alanlarında da beni destekleyen, bilimselliği; insanlığı ve mütevazılığı ile hayatım boyunca örnek almaya devam edeceğim sayın hocam ve danışmanım Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'a; bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın yönlendirilmesi konusunda beni sonsuz destekleyen, iş disiplininin bilimsel etiğe kadar gerçek bir bilim insanı kimliğini kazandıran çok değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya; tez çalışmam öncesinde ve sırasında her zaman yanımda olan, her konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fatima AERTS-KAYA'ya; örneklerin elde edilmesinde büyük destek veren Doç. Dr. Barış KUŞKONMAZ, Doç. Dr. Fatma Visal OKUR ve Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER'e; tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve LC-ESI-MS/MS çalışmalarım için bana laboratuvarını açan değerli hocam Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya, Hücre kültürü ve qRT-PCR çalışmalarımda bana destek olan başta sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Zihni Ekim TAŞKIRAN, Doç. Dr. Belgin ALTUN, Yrd. Doç. Dr. Çağla Zübeyde KÖPRÜ ve Bio. Beren KARAOSMANOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (HÜBAP) kapsamında 013D04101005 nolu proje ile ve Türkiye bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 113S819 nolu TÜBİTAK1001 kapsamlı araştırma projesi tarafından desteklenmiştir. Bu kurumlara teşekkür ederim.

Anabilim Dalımızdaki hocalarım ve arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında sevgi, sabır ve güvenleriyle beni destekleyen değerli ailem annem, babam, sevgili eşim ile kızıma sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Köse, S. Endokannabinoidler ve Reseptörlerinin İnsan Hematopoetik Kök Hücreleri ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerindeki Varlığı ve Düzeyinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Hematopoetik kök hücre (HKH) nakli kemik iliği (Kİ) kanserleri ve yetmezliklerinin tedavisinde mobilizasyon ajanlar kullanılarak uygulanmaktadır. G-CSF temelli mobilizasyon rejimleri sağlıklı donör ve hastalarda başarısız olabilmektedir. Bu nedenle, yeni mobilizasyon ajanlarına ihtiyaç vardır. Endokannabinoidler kannabinoid reseptörleri (CB1, CB2) üzerinden beyinde ve periferde etki gösteren lipid yapılı endojen esrar ligandlarıdır. Bu tez kapsamında stresteki beta (β) adrenerjik sinir aşırımı aracılı migrasyona benzer şekilde, endokannabinoidlerin HKH'lerin Kİ'nden mobilizasyonunu uyaracağı varsayımında bulunduk. Bu amaçla, G-CSF tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış sağlıklı HKH nakil donörlerinin Kİ ve periferik kan (PK) ve MKH'lerinde; AEA ve 2-AG, CB1, CB2, β -AR'ler araştırılmıştır. Periferik kan kök hücrelerinin (PKKH) 2-AG, AEA, SDF-1, norepinefrin ve antagonistlerine, MKH'lere göçü *transvel* migrasyon sistemiyle analiz edilmiştir. MKH'lerin 2-AG ve AEA salgıladığı; bu maddelerin PK ve Kİ plazmalarında bulunduğu saptanmıştır. MKH'ler β -AR'leri eksprese etmekte; Kİ MNH'ler ve CD34⁺ hücreler CB1 ve CB2 reseptörlerini eksprese ederken ve MKH'ler etmemektedir. AEA ve 2-AG, CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden PKKH migrasyonunu arttırmaktadır. Sonuç olarak endokannabinoid sisteminin Kİ mikroçevresindeki varlığı ve HKH migrasyonunu arttırdığı ortaya konduğundan, endokannabinoidlerin klinikte G-CSF aracılı HKH mobilizasyonuna ek olarak iyi bir aday olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Endokannabinoid, hematopoetik kök hücre, mezenkimal kök hücre, beta adrenerjik reseptör, migrasyon

(*) Bu çalışma 113S819 nolu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ve 013D04101005 nolu Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi projesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Köse, S. The Effects of Endocannabinoids and Their Receptors on Human Bone Marrow Mesenchymal and Hematopoietic Stem Cells. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Stem Cell, Ankara, 2017.

Hematopoietic stem cell transplantation (HCST) cures malignancies and bone marrow (BM) failure syndromes after high-dose cyto-reductive therapy however G-CSF-based mobilization regimens have a failure rate among healthy donors and patients. For this reason, new mobilization agents are needed. Endocannabinoids (eCBs), are endogenous lipid mediators generated in the brain and periphery and activate the cannabinoid receptors (CB1, CB2). We assume that eCBs may act as mobilizers of HSCs from the BM under stress conditions similar to β -ARs. For this purpose, mononuclear cells (MNCs), CD34⁺ cells and mesenchymal stem cells (MSCs) from G-CSF treated and not treated healthy HSCT donor's BM, peripheral blood (PB) plasma and MSCs were analysed for AEA and 2-AG, CB1, CB2 and β -ARs. The HSCs and LPS stimulated and non-stimulated MSCs were assessed by transwell migration assay with the presence of norepinehrine, 2-AG and AEA. PB, BM cells and MSCs secrete AEA and 2-AG. BM MNCs and CD34⁺ cells, express CB1, CB2 and various β AR subtypes. The MNCs but not the MSCs expressed CB1 and CB2 receptors by qRT-PCR. AEA and 2-AG stimulated HSC mobilization. β -AR and eCB receptor antagonists blocked this mobilization effect. In conclusion, endocannabinoid system have been demonstrated on HSCs and MSCs of G-CSF treated and untreated healthy donors revealing that the eCBs are potential candidates for clinical use to enhance or facilitate G-CSF mediated HSC mobilization under stress conditions reflecting β -ARs.

Key Words: endocannabinoid, hematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell, beta adrenergic receptor, migration

(*) This work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) (Project number 113S819) and Scientific Research Coordination Unit of Hacettepe University (Project number 013D04101005).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kemik iliği mikroçevresi	6
2.2. Endokannabinoid sistemi	9
2.2.1. Endokannabinoidlerin ligandları	9
2.2.2. Endokannabinoidlerin reseptörleri	10
2.2.3. Endokannabinoidlerin sentez ve yıkımı	11
2.2.4. Endokannabinoidlerin etkileri	12
2.3. Kemik iliği ve endokannabinoidler	14
2.3.1. Endokannabinoidler ve hücre göçü	14
2.3.2. Endokannabinoidlerin kemik iliğindeki yerleşimi	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20

3.1. İş Paketi 1 (İP1): Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, üretilmesi ve karakterizasyonu	20
3.1.1. Hematopoetik kök hücre izolasyonu	21
3.1.2. Mezenkimal kök hücre kültürü ve karakterizasyonu	22
3.2. İş paketi 2 (İP2): Endokannabinoid (AEA, 2-AG) düzeylerinin LC/EPI/MS-MS yöntemi ile ölçümü	26
3.3. İş Paketi 3 (İP3): Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ve qRT-PCR yöntemi ile analizi	28
3.3.1. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri yöntemi ile analizi	28
3.3.2. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi	29
3.4. İş paketi 4 (İP4): Hematopoetik kök hücrelerin endokannabinoidlere migrasyonun incelenmesi	30
3.5. İş Paketi 5 (İP5): Hematopoetik kök hücrelerin antagonistler varlığında mezenkimal kök hücrelere doğru migrasyonunun incelenmesi	32
3.6. İş Paketi 6 (İP6): İstatistiksel analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, üretilmesi ve karakterizasyonu	34
4.1.1. Hematopoetik hücre izolasyonu	34
4.1.2. Mezenkimal kök hücre izolasyonu, çoğaltılması ve karakterizasyonu	34
4.2. Endokannabinoid (AEA ve 2-AG) düzeylerinin LC-ESI-MS/MS yöntemi ile ölçümü	37
4.3. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2	38

reseptörlerinin akım sitometri ve qRT-PCR yöntemi ile analizi	
4.3.1. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ile analizi	38
4.3.2 Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi	42
4.4. Hematopoetik kök hücrelerin endokannabinoidlere migrasyonunun incelenmesi	44
4.5. Hematopoetik kök hücrelerin antagonistler varlığında MKH'lere doğru migrasyonunun incelenmesi	49
5.TARTIŞMA	51
6.SONUÇ	61
7.KAYNAKLAR	62
8.EKLER	71
EK-1: İş paketi 2'e ait sonuçların ng/ml cinsinden verileri	71
EK-2: İş paketi 3'e ait sonuçların yüzde cinsinden verileri	72
EK-3: Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni	73
EK-4: Tez çalışması ile ilgili Bildiriler	74
9.ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER ve KISALTMALAR

2-AG	2-Araşidonilgliserol
AEA	Anandamid
ARS	Alizarin Red S
β-AR	Beta adrenerjik reseptör
CB	<i>Cannabinoid receptor</i>
CD34⁺	CD34 pozitif
CD34⁻	CD34 negatif
Cdna	<i>Complementer DNA</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DAGLα	<i>Diacylglycerol lipase alpha</i>
DAGLβ	<i>Diacylglycerol lipase beta</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
EPO	<i>Erythropoietin</i>
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPR55	<i>G protein-coupled receptor 55</i>
Kİ	Kemik iliği
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric</i>
LPS	Lipopolisakkarit
MAGL	<i>Monoacylglycerol lipase</i>
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HKH	Hematopoetik kök hücre
HPH	Hematopoetik fotoğrafla hücre
IL-3	<i>Interleukin-3</i>

ORO	<i>Oil red o</i>
PK	Periferik kan
PKKH	Periferik kan kök hücresi
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
MKH	Mezenkimal kök hücre
MNH	Mononükleer hücre
MSS	Merkezi sinir sistemi
NAPE-PLD	<i>N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D</i>
NIH	<i>U.S. National Institutes of Health</i>
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
1.1.	Çalışmanın şematik varsayımı	4
2.1.	Kemik iliği mikroçevresi	7
2.2.	Endokannabinoidlerden AEA ve 2-AG'nin yapım ve yıkım basamakları gösterilmiştir	11
3.1.	MACS yöntemi şematizasyonu	22
3.2.	AEA ve 2-AG'ye ait kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir	27
3.3.	Endokannabinoidler ve reseptör antagonistleri varlığında gerçekleştirilen HKH migrasyon deneyi protokolü şematize edilmiştir	32
4.1.	Örnek olarak verilen 5 donöre ait MKH kültürlerinin invertte ışık mikrograflarıdır; x10.	34
4.2.	Mezenkimal kök hücrelerde adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya ait mikrograflardır.	36
4.3.	G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış MKH'lerin akım sitometri tekniğiyle belirlenen yüzey belirteçleri ile yüzde işaretlenme oranlarına ait çubuk grafiğdir.	37
4.4.	G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlere ait MNH, CD34 ⁺ hücre ve MKH'lerin akım sitometrideki yüzde işaretlenme oranları görülmektedir.	41
4.5.	qRT-PCR ile deney ve kontrol gruplarına ait MNH'lerdeki adrenerjik reseptör (<i>ADRBI</i> , 2, 3) ve kannabinoid reseptör (<i>CNRI</i> ve 2) gen ifadesi analizi sonuçları görülmektedir.	43
4.6.	qRT-PCR ile deney ve kontrol gruplarına ait MKH'lerdeki adrenerjik reseptör (<i>ADRBI</i> , 2 ve 3) ifadesi analizi sonuçları görülmektedir.	44
4.7.	PKKH'ların akım sitometri yöntemi ile β 1, β 2, β 3-AR (a), CB1 ve CB2 reseptörleri (b) için işaretlenme yüzdeleri görülmektedir.	45
4.8.	Hematopoetik hücrelerin kemoatraktanlara (SDF-1 ve norepinefrin) ve onların inhibitörlerine (AMD3100 ve SR59230A) doğru göçleri sonucu elde edilen hücre sayımları gösterilmektedir.	46

4.9.	SDF-1, AEA ve CB1, CB2 antagonistlerine (AM281 ve AM630) doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir.	47
4.10.	SDF-1, 2-AG ve 2-AG ile birlikte CB reseptör antagonistlerine (AM281 ve AM630) doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir.	48
4.11.	LPS ile uyarılmış MKH'lere doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir.	49
4.12.	LPS ile uyarılmamış MKH'lere doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir.	50
5.1.	HKH migrasyon/mobilizasyonunda endocannabinoid sisteminin etkisi.	60



TABLULAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Endokannabinoidlerin genel etkileri	12
2.2.	Endokannabinoidlerin hücrel mekanizmaları	13
2.3.	Kemik iliği ile ilgili kannabinod çalışmaları	18
3.1.	Tez kapsamında çalışılan donörlere ait demografik veriler görülmektedir.	21
3.2.	Mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda kullanılan yüzey antijenlerine ait akım sitometri antikorları listelenmiştir.	25
3.3.	β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ile işaretlenmesinde kullanılan antikorlar listelenmiştir.	28
3.4.	Hematopetik kök hücrelerin endokannabinoidlere migrasyonun incelendiği deney sisteminde kullanılan maddeler.	31
4.1.	G-CSF uygulanan ve uygulanmayan donörlere ait hücrelerin osteojenik farklılaşma sonrası hücrelerin ortalama kalsiyum içerikleri ile adipojenik farklılaşma sonrası hücrelerin ortalama ORO boya miktarları gösterilmiştir.	36
4.2.	G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlerin Kİ, PK plazmalarına ve MKH süpernatantlarına ait AEA ve 2-AG miktarları (nmol/L) tabloda verilmiştir.	38

1. GİRİŞ

Kemik iliğinde (Kİ), hematopoetik kök hücrelerin (HKH) kendini yenileme ve farklılaşmalarının düzenlendiği, hücreler; hücrelerarası matriks ve çeşitli çözünmüş maddelerden oluşan mikroçevreye Kİ nişi adı verilmektedir (1). İlikte farklı niş bölgeleri tanımlanmıştır (2, 3). Nişteki işlev otonom sinir uyarımı, kan (hematopoez) ve kemik yapımının (osteogenez) eşgüdümlü çalışmasıyla sağlıklı olarak sürdürülür (4). Kİ mikroçevresindeki HKH ve mezenkimal kök hücreler (MKH); nişteki sempatik sinir uçlarının uyarımına sırasıyla **beta 2 ve beta 3 adrenerjik reseptörler (β_2 , β_3 -AR)** aracılığıyla yanıt verir (5, 6). Dinlenme koşullarında endosteal niş bölgesindeki HKH'ler asıl olarak osteoblastlara, damarlara yakın vasküler mikroçevrede endotel hücreleri ve retiküler hücrelere tutunur. Bu koşullarda HKH'ler, Kİ stromal hücrelerinden salınan *stromal derived factor* (SDF-1) miktarı ile ters orantılı olarak, sirkadiyen ritme göre osilasyonlarla çok düşük miktarlarda periferik kana verilir (7). Kanama ya da doku hasarı, lipopolisakkarit (LPS) aracılı inflamasyon sinyali, fiziksel egzersiz ve *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) uyarımı gibi stres durumlarında artmış kateşolamin salınımına bağlı olarak HKH'lerdeki β -AR ekspresyonu artar. Buna bağlı olarak Kİ nişine salınan SDF-1 düzeyleri düşerken *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4) düzeyleri yükselir (4, 8).

Kemik iliği HKH'lerinin periferik kana (PK) **mobilizasyonu** sürecinde osteoblastlar ve diğer stromal hücrelerden salınan G-CSF, HKH'lerin çoğalma ve farklılaşmasını uyarır. Diğer yandan egzojen olarak yüksek konsantrasyonda G-CSF verilmesi HKH'lerin ilikten migrasyonunu sağlar. Bu amaçla G-CSF klinikte HKH'lerin Kİ'den mobilizasyonu için en yaygın olarak kullanılan ilaçtır (3, 9, 10).

G-CSF U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından onaylanan az sayıda mobilizan ajandan biridir. Günümüzde uygulanan HKH nakillerinde G-CSF genellikle tek başına ve/veya kemoterapötikler veya CXCR4 antagonisti AMD3100 ile birlikte kullanılmaktadır (11, 12). G-CSF'in tek başına GM-CSF ve/veya kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanıldığı nakillerde mobilizasyonun

başarısı hastalığa; kişisel farklılıklara ve uygulanan mobilizasyon rejimine göre farklılık göstermektedir (13, 14). Mobilizasyondaki başarısızlık, hastalarda çeşitli morbidite ve mortalite oranları ile giden olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir (11, 12). Mobilizasyonda G-CSF'e göre daha etkili olması nedeniyle FDA onayı ile kullanıma giren AMD3100 temelli mobilizasyon ajanları ise pahalı oldukları için klinikte tercih edilmemektedir (12). HKH nakillerinde en önemli basamak olan mobilizasyon aşamasındaki başarısızlık, nakilden vazgeçme kararına kadar varan zorluklara neden olmaktadır (11). Bu nedenle yeni mobilizasyon ajanların araştırılarak klinik kullanım için denenmektedir (15-17).

Endokannabinoidler vücutta sentezlenip; spesifik etkilerini klasik kannabinoid reseptörleri (**CB1 ve CB2**) üzerinden gösteren ve kannabis (esrar) gibi davranan endojen esrar ligandlarıdır. Endokannabinoidler, doymamış yağ asidi yapısındadır ve en bilinen üyeleri **anandamid (AEA)** ve **2-açilgliserol'dür (2-AG)** (18). Endokannabinoidler ve reseptörleri, başta merkezi sinir sistemi (MSS) olmak üzere pek çok sistemde dağılım ve etki gösterir (18, 19). Endokannabinoid sistemi üyeleri, açlık kontrolü, ağrı algılama, motor fonksiyonlar, kemik metabolizması ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte, inflamatuvar hastalıklar ve tümörler gibi pek çok patolojik durumda rol almaktadır (20). Endokannabinoidler, germ hücreleri ve somatik hücrelerde çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptozis mekanizmalarında önemli görevler üstlenir (21-26).

Endokannabinoidlerin Kİ'ndeki dağılımı sınırlı sayıda çalışmada bildirilmiştir (21, 27-30). Kannabinoid reseptör ekspresyonu makrofaj, eritroid, B ve T lenfoid, mast hücre hatları (22), kemirgen Kİ HKH'leri ve MKH'lerinde saptanmıştır (28). Kannabinoid reseptör aracılı hücre migrasyonu ise kemirici kökenli myeloid lösemi hücrelerinde (21), fare mononükleer hücrelerinde (MNH) (24) ve endotel hücrelerinde (31) gösterilmiştir.

Vücutta yaygın olarak etki gösterdiği bilinen endokannabinoid sisteminin sitokin aracılı HKH migrasyonunda rol aldığı bilinmemekte, ancak bu medyatörlerin G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış insan Kİ örneklerindeki HKH migrasyonuna karşılaştırmalı etkisi ve bu etkinin sempatik sinir uyarımı ile olası ilişkisi bilinmemektedir. Varsayımımıza göre, endokannabinoidler Kİ mikroçevresinde

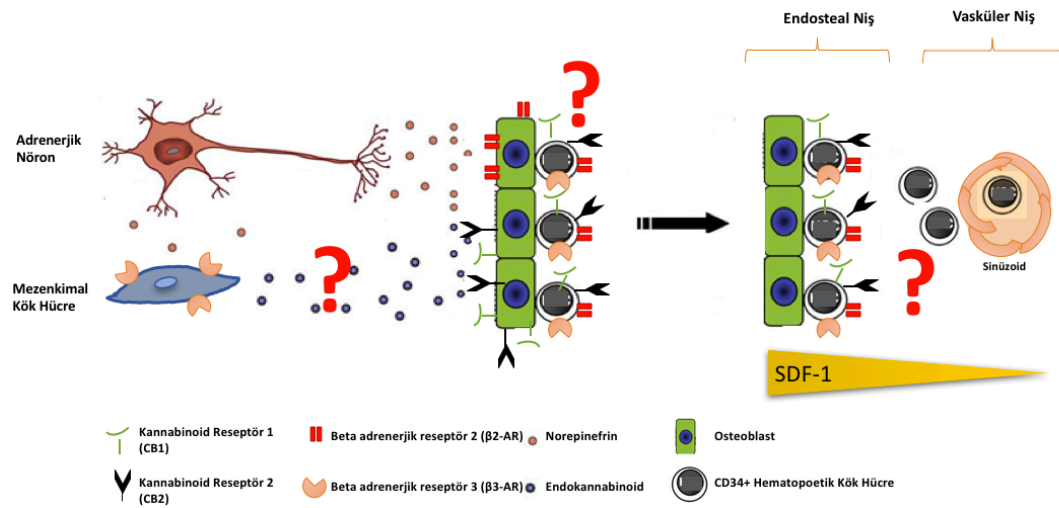
MKH üzerinden β adrenerjik nöral mekanizmalar ve G-CSF ile ilişkili olarak HKH migrasyonunu düzenleyebilir. Tez çalışması, bu **varsayımı** test etmek üzere gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı; vücutta yaygın olarak bulunan endokannabinoidlerden AEA ve 2-AG'nin G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış Kİ mikroçevrelerinde MKH'ler aracılığıyla HKH'ler üzerindeki reseptör aracılı migrasyon etkisini β adrenerjik uyarım ile ilişkili olarak karşılaştırmalı biçimde araştırmaktadır. **İkincil amaç;** mikroçevre koşullarında etkili olduğu belirlenen kannabinoid reseptör agonist/antagonistleri ve/veya β -AR agonist/antagonisti uygulanarak, insan HKH ile MKH'lerin aralarındaki etkileşimin doz bağımlı olarak düzenlenip düzenlenemeyeceğinin belirlenmesidir.

Bu doğrultuda aşağıdaki **araştırma soruları** yanıtlanmıştır:

1. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan insan Kİ ve periferik kan (PK) plazmalarında ve MKH'lerin süpernatantlarında endokannabinoid (AEA ve 2-AG) düzeyi ne kadardır?
2. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan insan Kİ HKH ve MKH'lerinde klasik kannabinoid (CB1 ve CB2) ve β -AR ekspresyon düzeyleri ne kadardır?
3. Egzojen olarak uygulanan endokannabinoid agonist-antagonistleri, β -AR agonist-antagonisti, Kİ HKH'lerdeki migrasyon yanıtını doz bağımlı olarak nasıl etkilemektedir?
4. İnsan Kİ mikroçevresinde MKH aracılı HKH migrasyonunda sempatik sinir uyarımına benzer şekilde, endokannabinoid reseptör-ligand etkileşiminin rolü nedir?

Tez kapsamında öne sürülen varsayım ve araştırma soruları Şekil 1.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. Çalışmanın şematik varsayımı. Kİ mikroçevresinde sempatik sinir uçlarının varlığı; bu sinir uçlarından norepinefrin salınarak β 2 ve β 3-AR'ler üzerinden HKH'lerin mobilizasyonunun arttırdığı bilinmektedir. β adrenerjik sinir aşırımı ile uyarılan mobilizasyon mekanizmasına benzer şekilde bu tez kapsamında; Kİ MKH'lerinden endokannabinoidlerden AEA ve 2-AG'nin salınıp salınmadığı, Kİ HKH'lerinde cannabinoid reseptörlerinden CB1 ve CB2 reseptörlerinin bulunup bulunmadığı ve AEA ve 2-AG'nin G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış Kİ mikroçevrelerinde MKH'ler aracılığıyla HKH'ler üzerindeki reseptör aracılı migrasyon etkisini artırıp artırmadığı stres koşullarında araştırılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında sayıları Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu iznine göre (Karar No: GO 13/170-17) belirlenmiş 10'ar adet G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörden elde edilmiş Kİ'lerine ait hücrelerde;

1. Endokannabinoid (AEA ve 2-AG) düzeyinin saptanması amacı ile; *Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric* (LC-ESI-MS/MS) yöntemi ile insan Kİ ve PK plazmasından ve MKH süpernatantından salınan endokannabinoidler kantitatif olarak ölçülmüştür.

2. Kannabinoid reseptör (CB1 ve CB2) ve β -AR ekspresyon düzeylerinin saptanması amacı ile; akım sitometri ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak, insan Kİ

kaynaklı mononükleer (MNH), CD34⁺ hücreler ve MKH'lerinde CB1, CB2 ve β 1, β 2, β 3-AR düzeyi ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3. HKH'lerdeki migrasyon yanıtının belirlenmesi için; *Transvel* migrasyon *assay* kullanılarak, periferik kan kök hücrelerine (PKKH) egzojen olarak uygulanan endokannabinoid agonist-antagonistleri, β -AR agonist-antagonistlerine karşı olan migrasyon yanıtı doz bağımlı olarak saptanmıştır.

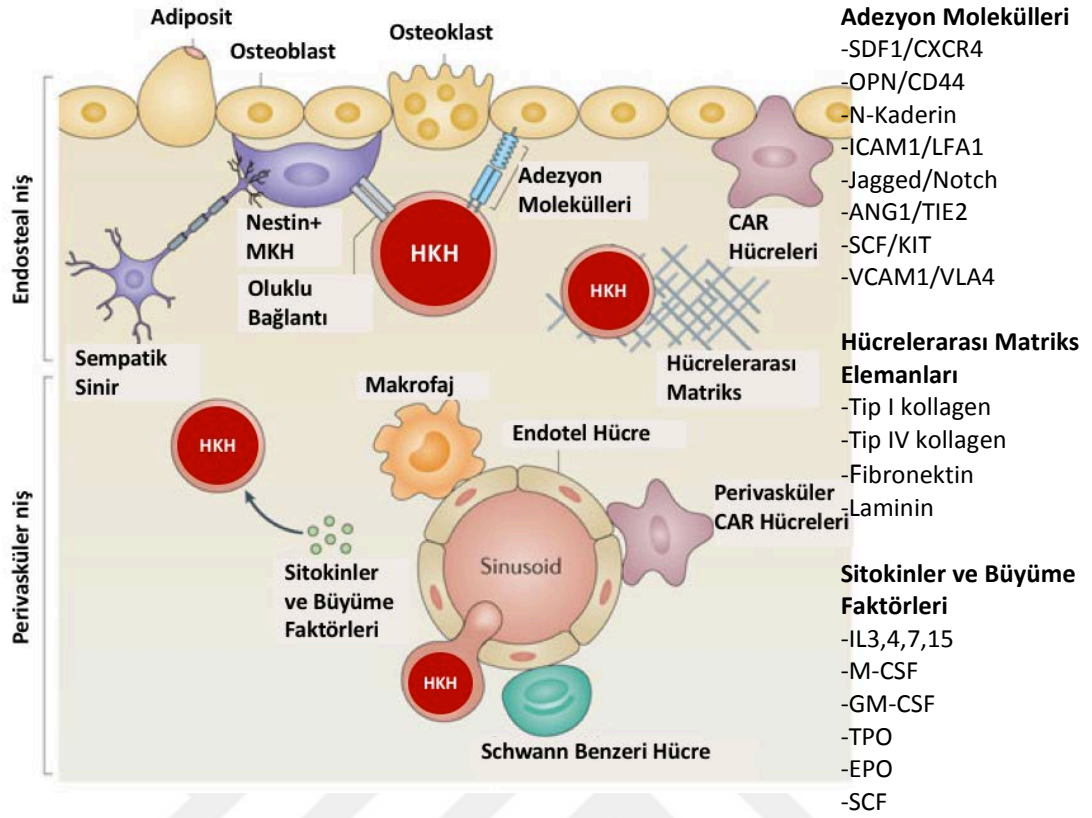
4. MKH aracılı olarak HKH'lerdeki migrasyon yanıtının belirlenmesi için; *Transvel* migrasyon *assay* kullanılarak, PKKH'lerin, egzojen olarak uygulanan endokannabinoid agonist-antagonistleri, β -AR agonist-antagonistleri varlığında, LPS ile uyarılmış ve uyarılmamış MKH'lere karşı olan migrasyon yanıtını saptanmıştır.

Klinikte otolog ve allojenik Kİ nakillerinde HKH mobilizasyon sorunlarını çözmek üzere, G-CSF'e alternatif yeni çözümler üzerinde çalışılmaktadır. CXCR4 antagonisti AMD3100, Amerika Birleşik Devletleri'nde *non-Hodgkin* lenfoma ve multipl miyeloma hastalarında kök hücre mobilizasyonu için G-CSF'e ek olarak kullanılmak üzere ruhsatlandırılmıştır (32). Tezin basıldığı Mart 2017 yılı www.clinicaltrials.gov kaynaklı verilere göre kannabinoid sistemi üyeleri pek çok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmak üzere 573 klinik çalışmada araştırılmaktadır. Endokannabinoid aracılı olarak düzenlenebilir hücrel proliferasyon, farklılaşma, migrasyon yanıtları, yakın gelecekte kannabinoid sistemi bileşenlerinin kök hücre migrasyon stratejilerinde klinik ürün olarak yer alabilme potansiyelini ve bu çalışmanın **yaygın etkisini** vurgulamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik iliği mikroçevresi

Kemik iliği mikroçevresi, HKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşmalarının düzenlendiği özelleşmiş bölgeleri içerir (1). Niş bölgelerinin, HKH'lerin dinlenme ve migrasyonunu gerçekleştirdiği alanlar olduğu varsayılmaktadır (33, 34). Bunlar (i) farklılaşma belirteçlerini eksprese eden, işlevsel olarak etkin olan ve Kİ'ndeki kan damarlarına yakın yerleşik HKH mikroçevresi olan **perivasküler niş**; (ii) farklılaşma belirteçleri taşımayan, sessiz konumdaki ve/veya kendi kendini yenileme özelliği taşıyan, yerleşim olarak kemiğin iç yüzeyini tercih eden HKH mikroçevresi olan **endosteal niş** olarak tanımlanır (35, 36). Bu bölgelerdeki Kİ trafiği; otonom sinir sistemi uyarımı, kan (hematopoez) ve kemik yapımının (osteogenez) eşgüdümlü çalışmasıyla sağlıklı olarak ilerler. Bu düzeni sağlayan üç sisteme beraberce beyin-kemik-kan üçlüsü de denir (4).



Şekil 2.1. Kemik iliği mikroçevresi. Kİ mikroçevresi HKH'lerin sessiz kaldığı, kendini yenilediği, çoğaldığı ve farklılaştığı; damarların, sinirlerin, kemik hücrelerinin, hematopoetik hücre alt popülasyonlarının ve hücrelerarası matrisin bulunduğu üç boyutlu karmaşık yapıda bir bölgedir. HKH'ler endosteuma yakın olarak (endosteal niş) sessizliklerini koruyabilir veya damarlara yakın olarak (perivasküler niş) farklılaşmaya yönlenebilir. (36) nolu referanstan modifiye edilerek kullanılmıştır. CAR hücreleri: *CXCL12-abundant reticular* hücreler, MKH: mezenkimal kök hücre.

Kemik iliği mikroçevresindeki HKH'ler (5, 6, 37) ve MKH'ler (38, 39); nişteki sempatik sinir uçlarının uyarımına aracılık etmek üzere sırasıyla $\beta 2$ ve $\beta 3$ -AR'leri bulundurmaktadır. HKH'ler, dinlenme koşullarında endosteal niş bölgesinde osteoblastlara, damarlara yakın vasküler mikroçevrede endotel hücreleri ve retiküler hücrelere tutunur. **SDF-1**, Kİ'nde özellikle nestin pozitif MKH ve *CXCL12-abundant reticular* hücrelerden (CAR hücreleri) salgılanan, protein yapısında, hematopoetik hücreler ve MKH için kemotaktik etkili bir kemokindir (40). HKH'ler kemik iliği

nişinde membrana bağlı SDF-1 düzeyi ile ters orantılı olarak, sirkadiyen ritme uyarak osilasyonlarla çok düşük miktarlarda PK'ya verilir. Kanama ya da doku hasarı, LPS aracılı inflamasyon sinyali (41), fiziksel egzersiz (4-6, 37) ve G-CSF uyarımı (37) gibi stres durumlarında, sempatik hiperaktivite ile sinir uçlarından artmış kateşolamin salınımına bağlı olarak HKH'lerdeki β -AR ekspresyonu artar. Buna bağlı olarak Kİ'nde membrana bağlı SDF-1 düzeyi düşerken CXCR4 düzeyi yükselir (37). Aynı süreçte osteoklastlardan proteolitik enzim salgısı uyarılır (42). Sonuç olarak HKH'ler organizmayı savunmak ya da doku rejenerasyonunu uyarmak amacıyla perifere **mobilize** olur (4, 8).

Kemik iliği hücrelerinde β -AR dağılımı sınırlı sayıda çalışmada gösterilmiştir (5, 6, 37, 43-45). β 2-AR akım sitometri ve konfokal mikroskopi ile fare Kİ HKH'lerinde (Lin⁻, Sca⁺, CD117⁺) saptanmıştır (43). β -AR antagonistleri ile yapılan fonksiyonel çalışma, β 2 ve β 3-AR aktivasyonu ile sıçan hematopoetik progenitor hücrelerinin (HPH) (44), ve fare HKH ve HPH'lerinin migrasyonunu arttırdığını göstermiştir (5). Diğer bir çalışmada, egzojen olarak uygulanan norepinefrinin β 2-AR üzerinden insan CD34⁺ HPH'lerin çoğalmasını ve migrasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (6). Fare Kİ MKH'lerinde β 2 ve β 3-AR aktivasyonunun SDF-1'i azalttığı ve farelerde G-CSF aracılı HPH migrasyonunu düzenlediği bilinmektedir (37). Kİ mikroçevresindeki SDF-1 seviyesi HKH'lerin PK mobilizasyonu için indikatördür (45).

G-CSF myeloid hücrelerden proteazların salınarak adezyon moleküllerinin, hücre dışı matris elemanlarının, kemokinlerin Kİ mikroçevresinden ve reseptörlerinden kopmasına neden olmaktadır. Böylece Kİ HKH'lerinin PK'a mobilizasyonu sürecinde HKH'lerin çoğalma ve farklılaşmasını uyarak önemli rol alırlar. Diğer yandan egzojen olarak yüksek konsantrasyonda G-CSF verilmesi HKH'lerin ilikten migrasyonunu sağlar. Bu amaçla G-CSF klinikte HKH'lerin Kİ'nden migrasyonu için en yaygın ve etkili olarak kullanılan, *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) tarafından onaylanan bir mobilizan ilaçtır (3, 9, 10). Günümüz uygulanan HKH nakillerinde G-CSF tek başına GM-CSF ve/veya kemoterapötikler veya CXCR4 antagonisti AMD3100 ile birlikte kullanılmaktadır (11, 12). G-CSF'in tek başına veya kombine edilerek kullanıldığı nakillerde başarı hastalığa; kişisel

farklılıklara ve uygulanan mobilizasyon rejimine göre değişiklik göstermektedir (11, 12). 2012 verilerine göre G-CSF ve kemoterapötikler birlikte kullanıldıklarında multipl miyelomada %5; lenfomalarda %35'lere varan mobilizasyon başarısızlıkları görülebilmektedir (11). AMD3100 temelli mobilizasyon rejimleri ise pahalı oldukları için klinikte öncelikli protokollerde yer almamaktadır (12). HKH nakillerinde en önemli basamak olan mobilizasyon aşamasındaki başarısızlık, nakilden aferez yapılan gün sayısında artışa; fazla maddi kaynak kullanımına; tekrarlayan mobilizasyon prosedürlerine; invazif olarak Kİ toplanmasına ve nakilden vazgeçilmesine neden olmaktadır (12). Az sayıda kök hücre toplanması ise, greft kayıplarına; engreftmanın gecikmesine; kanama ve enfeksiyon riskinde artışa; daha fazla kırmızı kan hücre transfüzyonuna neden olmaktadır (12). Hali hazırda klinikte kullanılan mobilizasyon ajanlarının yetersiz olması nedeni ile yeni ajanlar araştırılmaktadır. *U.S. National Institutes of Health (NIH)*'e ait resmi bir veri tabanı olan *www.clinicaltrials.gov*'un Mart 2017 verilerine göre HKH mobilizasyonu başlığı altında 215 klinik araştırma bildirilmiştir.

2.2. Endokannabinoid sistemi

Endokannabinoidler vücutta sentezlenip; spesifik etkilerini kannabinoid reseptörleri (CB1 ve CB2) üzerinden gösteren endojen esrar ligandlardır (46). Endokannabinoidler, doymamış yağ asidi yapısındadır ve en bilinen üyeleri AEA ve 2-AG'dir. 1992 yılında ilk bulunan endokannabinoid, AEA olmuştur (47). Ardından 2-AG (48, 49) ve diğer endokannabinoidler izole edilmiştir. Endojen kannabinoid sistemi (endokannabinoidler) iki klasik kannabinoid reseptörü (CB1, CB2), birçok ligand ve ligandların sentez ve yıkımından sorumlu enzimleri içermektedir (18, 19). Endokannabinoidler ve reseptörleri, başta MSS olmak üzere pek çok sistemde dağılım gösterir. Endokannabinoidler ve reseptörleri açlık kontrolü, ağrı algılama, motor fonksiyonlar, kemik metabolizması ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte etkilidir (18, 19, 46).

2.2.1. Endokannabinoidlerin ligandları

Kannabinoid reseptör ligandları kaynaklarına göre; memeli hücrelerinden membran fosfolipidlerinin hidrolizi ile üretilenler, bitkiler (özellikle *Cannabis*

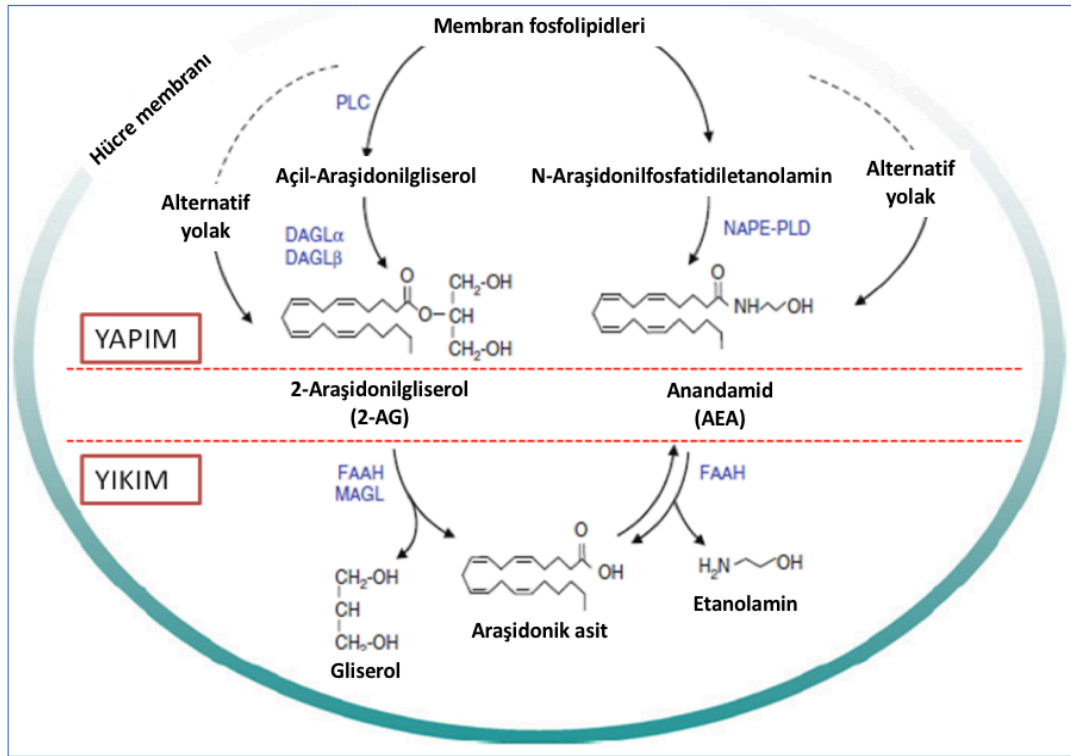
Sativa'dan) tarafından üretilen fitokannabinoidler ve sentetik cannabinoidler olarak üç gruba ayrılır (50). Ligandlar, reseptörlere agonistik veya antagonistik etki gösterebilir. Vücutta en yaygın bulunduğu bildirilen endokannabinoidler olan AEA ve 2-AG; araşidonik asit türevleridir ve hücre zarında bulunan gliserofosfolipidlerin yıkımı ile oluşur (50). *Cannabis sativa* bitkisi birçok cannabinoidi içermektedir. Cannabis sativanın etkilerinin yaklaşık yüzde yüzünden sorumlu etken madde olan D9-tetrahydrocannabinol (THC) CB1 ve CB2 reseptörlerinin agonistidir (51). Çoğu fitokannabinoid, CB reseptörlerine zayıf olarak bağlanmaktadır (20). Agonist ve ters agonist/antagonist olarak üretilen birçok sentetik cannabinoid bulunmaktadır (52). Bunların bir kısmı yapıca (CP55,490 gibi) THC'a benzemektedir (53). Sentetik cannabinoidlerden bazıları reseptörleri için seçici iken (HU308;CB2); WIN55,212-2 ve CP55,490 gibi bazı agonistler seçici değildir ve hem CB1 hem de CB2 reseptörünü uyarır (53). Cannabinoid ligandları ve reseptörleri ile ilgili çalışmalar antagonistlerin aslında ters agonist (doz bağımlı antagonist) olduklarını göstermiştir (54).

2.2.2. Endokannabinoidlerin reseptörleri

Kannabinoid reseptörleri G proteini reseptör süperailisi üyesidir. İki klasik cannabinoid reseptörü (CB1 ve CB2) bulunmaktadır (55). Son yıllarda cannabinoidler için yeni reseptörler tanımlanmıştır. Bunlar *G protein-coupled receptor 55* (GPR55) (56), *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1) (57), ve *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) (58). CB1 reseptörü CNR1 geninde kodlanır ve uyarılması sinir iletiminin kontrolünü sağlar (59). Merkezi sinir sistemi dışında dalak, tonsil, gastrointestinal sistem, böbrek üstü bezi, kalp, akciğer, üreme organları, kemik ve sinoviyal eklemler gibi perifer dokularda eksprese olmaktadır (59, 60). CB2 reseptörü CNR2 geninde kodlanır ve ilk olarak dalağın marjinal zonunda bulunan makrofajlarda eksprese olduğu bildirilmiştir (61). Bunun dışında kemik, sinoviyal eklemler ve MSS'nin bazı bölgelerinde eksprese olmaktadır (59, 62, 63). GPR55 reseptörü GPR55 geninde kodlanır ve yaygın bir ekspresyon profili vardır. Fakat en fazla ekspresyon böbrek üstü bezinde, gastrointestinal kanalda, beyinde ve kemikteki osteoblastlarla osteoklastlarda olmaktadır (64, 65).

2.2.3. Endokannabinoidlerin sentez ve yıkımı

Kannabinoidlerin etkinliği, cannabinoid sentez ve yıkımı arasındaki dengeye bağlı olarak düzenlenir. Şekil 2.2.'de de görüldüğü gibi AEA, *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D* (NAPE-PLD) enzimi ile NAPE'den üretilmektedir. NAPE-bağımsız bir yolak olarak birçok ara metabolit içermektedir (66). 2-AG membran fosfolipidlerinden *phospholipase C* (PLC) ve *diacylglycerol lipase alpha* ve *beta* (DAGL α ve DAGL β) enzimleri aracılığıyla sentezlenir (67). Alternatif sentez yolları da bulunmaktadır (68). 2-AG, *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) ve *monoacylglycerol lipase* (MAGL) ile yıkılırken AEA sadece FAAH ile yıkılır (69).



Şekil 2.2. Endokannabinoidlerden AEA ve 2-AG'nin yapım ve yıkım basamakları gösterilmiştir. (30) nolu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır. PLC; *Phospholipase C*, DAGL α ; *Diacylglycerol lipase alpha*, DAGL β ; *Diacylglycerol lipase beta*, NAPE-PLD; *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*, FAAH; *Fatty acid amide hydrolase*, MAGL; *Monoacylglycerol lipase*.

2.2.4. Endokannabinoidlerin etkileri

Vücutta sinir sisteminde ve periferde yaygın olarak bulunan endokannabinoidler fizyolojik koşullarda pek çok organ ve sistemde etki göstermektedir. Bu etkilerin bazıları Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Endokannabinoidlerin genel etkileri

YERLEŞİM	ENDOKANNABİNOİD	RESEPTÖR	FİZYOLOJİK ETKİ (KAYNAK)
Sinir sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2, TRPV1	Bellek (70) Açlık kontrolü (71) Enerji dengesi ve metabolizma (72) Strese yanıt (73) Anksiyete (74) Ağrı kontrolü (75) Isı regülasyonu (76) Uyku (77)
İskelet sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2, GPR55	Kemik yapım ve yıkımının düzenlenmesi (62, 63, 65)
Bağışıklık sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2	Doğal bağışıklığın Toll-like reseptörler üzerinden düzenlenmesi (78) İnflamasyonun önlenmesi (79)
Kalp damar sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2, GPR18	Pro-anjiyogenez (80) Kan basıncında düşme (81)
Sindirim sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2	Mukozada inflamasyonun engellenmesi (82)
Kadın üreme sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2	Oosit maturasyonu, (83) Embriyo implantasyonu ve gelişimi (83)
Erkek üreme sistemi	AEA, 2-AG	CB1, CB2	Sperm aktivasyonu (84) Sperm üretiminin düzenlenmesi (85)
Solunum sistemi	AEA	CB1, CB2	İnflamasyonun önlenmesi (86)

Endokannabinoidler hücre düzeyinde pek çok temel mekanizmayı düzenler (21-26). Bu nedenle implantasyondan, inflamasyona, kök hücre farklılaşmasından kanserlere kadar pek çok hücrel mekanizmada endokannabinoid etkileri araştırılmaktadır. Bu etkilerden çoğalma, farklılaşma, migrasyon ile ilgili çalışmalar Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Endokannabinoidlerin hücrel mekanizmaları

Kaynak	Kannabinoid	Reseptör	Çalışılan doz	Etkili doz	Etki
(22)	AEA, 8-THC, Cannabidiol, CP55940 WIN55212-2, Cannabinol	CB1, CB2	0.1-10 umol/L	AEA için; 10 umol/L. Diğerleri 0.1-10 umol/L’de sabit etkili	HKH çoğalması
(21)	2-AG, AEA, WIN 55212-2, Cannabinol, Cannabidiol, δ^8 -THC, δ^9 -THC, PEA, POEA, CP55940, SR141716 (CB1 spesifik antagonist), SR144528 (CB2 spesifik antagonist)	CB2	300 Nm, 1 Um	2-AG için; 300 Nm, 1 Um AEA için; 1 Um	HKH migrasyonu
(23)	AM1241	CB2			HKH koloni sayısında artış; hücre çoğalması ve farklılaşması Migrasyon
(24)	AEA 2-AG <i>Palmitoyl ethanolamide (PEA)</i> , <i>2-palmitoyl</i>	CB1, CB2	Koloniler için 0-5 Um Migrasyon için 0-1Um	0.5 Um dozlarda 2-AG migrasyonu arttırırken, AEA ve diğer kannabinoidler	HKH Koloni sayısında artış; hangi hücre çoğalması ve farklılaşması;

	<i>glycerol (2-PG), myristoyl ethanolamide (MEA), 2-myristoyl glycerol (2-MG), linoleoyl ethanolamide (LEA), 2-linoleoyl glycerol (2-LG), Arachidonoyl serine (ARA-S) Cannabidiol (CBD),</i>			bu etkiyi göstermemiştir. Koloniler 5 Um'da artış göstermiştir.	Migrasyon
(25)	AEA, 2-AG	CB1, CB2	1Nm-10Um	2-AG için 10Nm, 1Um, 10 Um AEA için 10Um	Osteoblast farklılaşmasında artış Osteoblast proliferasyonunda artış
(26)	AEA	CB1, CB2	5Um-20Um	20Um	Kondrosit apoptozunda artış

2.3. Kemik iliği ve endokannabinoidler

2.3.1. Endokannabinoidler ve hücre göçü

Kannabinoid reseptör aracılı hücre migrasyonu kemiricilerdeki miyeloid lösemi hücreleri (21), fare Kİ MNH (24), fare embriyonik böbrek hücreleri (87), fare mikroglia hücreleri (88) ve endotel hücrelerinde (31) çalışılmıştır. Genetik olarak CB2 reseptörü eksprese ettirilen kemirici kökenli miyeloid lösemi hücrelerine in vitro koşullarda transvel *assay* düzeneği kullanılarak, 300 nM, 1 µM 2-AG ve 1 µM AEA uygulandığında 4 saatin sonunda kemoatraktan etki gösterdiği bildirilmiştir (21). Transvel *assay* kullanılan diğer in vitro çalışmada, 250 nM dozda uygulanan 2-AG ve AEA, 4 saatte 8-12 haftalık C3H/HeJ fare Kİ MNH'lerinde migrasyon sağlamıştır (24). Farklı kimyasal yapıdaki üç CB1 reseptör agonisti, HU-210,

WIN55212-2 ve AEA, CB1 geni transfekte edilmiş insan embriyonik böbrek hücrelerinin (HEK293 hücre hattı) migrasyonunu sağlamıştır (87). Başka bir çalışmada 2-AG ve AEA *Boyden chamber* kullanılarak in vitro koşullarda, 10 µM dozda uygulandığında, CB1 ve CB2 eksprese eden yenidoğan fare neopallia mikrogliya hücreleri ve fare mikrogliya hücre hattında (BV-2) migrasyona yol açmıştır (88). Fizyoaktif olmayan bir kannabinoid agonisti olan ‘*abnormal-cannabidiol*’ün (abn-cbd) 10-100 µM doz aralığında insan umbilikal veni kökenli endotel hücrelerinin göçünü uyardığı in vitro olarak *transvel assay* kullanılarak gösterilmiştir. Bu etki CB1 ve CB2 haricinde endotel üzerinde bulunan farklı bir AEA reseptörünün antagonisti olan O1918 ile 30 µM dozda inhibe edilmiştir (31).

2.3.2. Endokannabinoidlerin kemik iliğindeki yerleşimi

Endokannabinoidlerin Kİ’ndeki dağılımı yakın zamanda genellikle deney hayvanlarında gerçekleştirilmiş sınırlı sayıda çalışmada bildirilmiştir (21-24, 28, 29). Endokannabinoid sistemi ile Kİ hücreleri arasındaki ilişki ilk olarak 1997 yılında Valk ve diğ. tarafından bildirilmiştir (22). Çalışmada kemirici Kİ hücreleri ve hematopoetik büyüme faktörlerine [*Hepatocyte growth factor* (HGF); *Interleukin-3* (IL-3), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), G-CSF ve *erythropoietin* (EPO)] bağımlı hücre hatlarında kannabinoid reseptörlerinin varlığı araştırılmıştır (22). CB1 reseptörü bir T-lenfoid hücre hattında; CB2 reseptörü 26 miyeloid, 6 makrofaj, 3 eritroid, 5 B-lenfoid, 3 T-lenfoid, 2 mast hücre hattında *RNaz protection* yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Aynı çalışmada CB2 reseptörünün kan yapımındaki rolü araştırılmış ve AEA’nın in vitro olarak normal fare Kİ koloni kültürlerinde IL-3 ile uyarılmış koloni büyümesini desteklediği gösterilmiştir (22). Tek başına HGF uygulaması ile yukarıda bahsedilen hücre hatlarında zayıf, AEA ile kombine edildiğinde ise HGF’ye göre daha güçlü proliferatif etki gözlenmiştir. AEA’nın proliferasyonu uyarıcı etkisi IL-3, GM-CSF, G-CSF ve EPO ile artmıştır. Sonuç olarak AEA’nın hematopoetik hücreler için yeni bir büyüme faktörü olabileceği; bilinen büyüme faktörleri ile kombine kullanılarak sinerjistik etki sağlanabileceği öne sürülmüştür (22).

Jorda MA ve diğ.'lerinin 2002 yılında yaptığı çalışmada uyarılmamış ve retroviral indüksiyon ile CB2 mRNA düzeyi uyarılan kemirici kökenli miyeloid lösemi hücreler kullanılmıştır (21). Bu çalışmada AEA, 2-AG ve diğer kannabinoidler [doğal; *d8-tetrahydrocannabinol* (d8-THC), d9-THC, *cannabinol* ve *cannabidiol*, sentetik; WIN 55212-2 ve CP55940, endojen; 2-AG, AEA, PEA ve *N-acylethanolamine* (POEA)] uygulanarak CB2 eksprese eden fare hematopoetik hücrelerinin bu ajanlara doğru migrasyonu araştırılmıştır. AEA (1 µM) ve 2-AG'nin (300 nM and 1 µM) in vitro koşullarda transvel *assay* yöntemi uygulandığında hematopoetik hücreler için kemoatraktan etkili olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada sağlıklı dalak ve timus örneklerinde CB2 reseptörünün varlığı saptanmıştır. Buna göre, B lenfositlerdeki CB2 reseptörünün asıl işlevinin bu hücrelerde migrasyonunu düzenlemek olduğu öne sürülmüştür (21).

Endokannabinoidlerin hematopoetik hücre migrasyonu ve farklılaşması üzerindeki rolü Patinkin ve diğ.'leri tarafından da araştırılmıştır (24). Yapılan çalışmalarda egzojen olarak uygulanan 0.5 µM dozlarda AEA ve 2-AG'nin fare Kİ'nden elde edilen CFU-GEMM (*colony-forming unit: granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*) kolonilerini 2 katına çıkardığı belirlenmiştir. Proliferatif etkinin AEA için 2-AG'ye göre daha belirgin olduğu bildirilmiştir (24). Ayrıca aynı çalışmada 8-12 haftalık C3H/HeJ fare Kİ MNH'lerinin migrasyonu 250 nM doz 2-AG ve AEA ile 4 saat içerisinde stimule edilmiştir. CB1 ve CB2 reseptör antagonistleri (sırasıyla, SR141716 ve SR144528) ile yapılan çalışmalarda 2-AG'nin etkisinin CB1 aracılı olduğu; AEA kaynaklı migrasyonun ise reseptör aracılı olmadığı saptanmıştır (24).

Scutt ve Williamson'un 2007 yılında yaptıkları çalışmada kannabinoidlerin Kİ MKH migrasyonuna etkisi araştırılmıştır (28). Sıçan Kİ kökenli CFU-F kültürlerine 2-AG uygulandığında doz bağımlı olarak fibroblastik koloni ve farklılaşmış koloni oluşumu ile koloni boyutunda artış olduğu görülmüştür. Spesifik olmayan CB1 agonistleri (CP 55,940 ve WIN 55,212) ve CB2 agonistleri (BML190 ve JWH015) CFU-F koloni sayısını arttırırken; spesifik CB1 agonistinin koloni sayısına hiçbir etkisi olmadığı belirlenmiştir (28). Primer Kİ kültürlerine 14 gün 1 µM dozda 2-AG uygulaması çoğalmayı ve kollagen sentezini arttırmıştır. Fakat bu

etki 2-AG'nin Kİ stromal hücrelerine uygulanması sonrasında saptanamamıştır. Bundan dolayı Kİ'nde 2-AG'nin hedef hücrelerinin stromal hücreler değil; aksesuar hücreler olabileceği öne sürülmüştür. Bu varsayımı desteklemek üzere Kİ stromal hücrelerinde CB1 ve CB2 reseptörlerinin bulunmadığı; Kİ'ndeki küçük bir hücre grubunda (*side population*) her iki reseptörün var olduğu gösterilmiştir (28).

Başka bir çalışmada lösemi hastalarından tanı sırasında veya pürin analogu tedavisinden sonra alınan Kİ'ndeki B lenfositlerde CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonu immunohistokimyasal ve akım sitometrik yöntemlerle araştırılmıştır. Neoplastik hücrelerdeki CB1 ekspresyonunun CB2'ye göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (29). Tedaviye yanıt veren hastalarda CB1 ekspresyonu azalırken CB2 ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir. Tedaviye yanıt vermeyen hastalarda ise reseptörlerin miktarı artmıştır. Sonuç olarak lösemi tedavisi için endokannabinoid sisteminin yeni bir hedef olabileceği öne sürülmüştür (29).

Aynı grubun 2011 yılında yayınlanan çalışmasında (23) endokannabinoid sisteminin HKH trafiği ve mobilizasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. CB2 ve agonisti AM1241'in subletal ışınlamaya maruz kalan farelerde hematopoetik iyileşmeye katkısı çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda subletal ışınlanma sonrası CB2 *knock out* (Cnr2(-/-)) farede *wild type* (WT) fareye göre düşük koloni oluşumu ve düşük PK sayımı ile birlikte hematopoetik iyileşmenin azaldığı gözlenmiştir. Subletal ışınlanma sonrası WT fareye AM1241 uygulandığında Kİ iyileşmesi hızlanmış; toplam Kİ (yaklaşık 2 kat) ve toplam lin⁻ckit⁺ hücre sayısı (yaklaşık 7 kat) artmış, böylece HKH sağkalımı artmıştır. Ek olarak AM1241 subletal ışınlanma almadan 12 gün önce *wild type* (WT) fareye uygulandığında, HKH apoptozu azalmış; sağkalımı artmış, toplam Kİ ve toplam ckit⁺ hücre sayısı artmıştır. Sonuç olarak CB2 agonisti AM1241'in subletal ışınlanma sonrası HKH apoptozunu engelleyerek, sağkalımını arttırarak ve hücre döngüsüne giren HKH sayısını arttırarak iyileşmeye katkı sağladığı saptanmıştır.

Başka bir çalışmada HKH nakli öncesinde, nakil sırasında ve nakilden 100 gün sonra AEA ve 2-AG'nin stres ve inflamasyon ile ilişkisi periferik kanda araştırılmış; nakil öncesi ve sonrasında stres ile IL-6 ve 2-AG'nin korele bir şekilde artış gösterdiği saptanmıştır. 2-AG'nin artışı alıcılardaki stres koşullarına

bağlanmıştır (89). Kannabinoidlerin hematopoetik sistemdeki dağılımı ve bu ilgili organlardaki etkileri ile ilgili çalışmalar Tablo 2.3’de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Kemik iliği ile ilgili kannabinoid çalışmaları

Kemik iliği ile ilgili özet kannabinoid çalışmaları	Kaynak
Miyeloid, lenfoid, makrofaj, eritrosit ve mast hücrelerini içeren 51 hücre hattının 45’inde CB1 veya CB2 reseptörleri eksprese olmaktadır. AEA fare Kİ kültürlerinde IL-3 ile uyarılmış koloni büyümesini artırır.	(22)
2-AG, HKH’lerde kemoatraktan etkilidir. 2-AG, IL-3 veya G-CSF ile birlikte sinerjistik etki gösterir.	(21)
AEA ve 2-AG fare kemik iliği kökenli CFU-GEMM kolonilerini uyarır; HKH migrasyonunu artırır.	(24)
Kemirici MKH’lerinde CB1 ve CB2 reseptörleri çok düşük miktarda saptanırken; HKH’ler her iki reseptörü bulundurur.	(28)
Lösemi hastalarından tanı sırasında veya pürin analogu tedavisinden sonra Kİ’ndeki B lenfositlerde CB1 ve CB2 ekspresyonu araştırılmıştır. Neoplastik hücrelerin yüzeyinde CB1 ekspresyonu CB2’ye göre daha düşüktür. Tedaviye yanıt veren hastalarda CB1 ekspresyonu azalmış; vermeyenlerde artmıştır.	(29)
CB2 agonisti AM1241 farelerde subletal ışınlanma sonrası HKH apoptozunu engelleyerek, sağkalımını arttırarak ve hücre döngüsüne giren HKH sayısını arttırarak iyileşmeye katkı sağlamıştır.	(23)

Sonuç olarak kannabinoid sistemine ait çeşitli endojen ve egzogen bileşenlerin, hematopoetik sistemin çeşitli alanlarında hücrelerin çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptozunu düzenleyerek, fizyopatolojik mekanizmalarda etkili olduğu bilinmektedir (21-24, 28, 29). Endokannabinoidler ve reseptörlerinin, bazı deney hayvanlarında sitokin aracılı HKH migrasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (23, 24). Ancak bu medyatörlerin insan Kİ’nde G-CSF ile ilişkili olarak HKH migrasyonuna etkisi ve bu etkinin sempatik sinir uyarımı ile olası ilişkisi bilinmemektedir. **Varsayımımıza göre**, endokannabinoidler Kİ mikroçevresinde

MKH'ler üzerinden β adrenerjik nöral mekanizmalar ve G-CSF ile ilişkili olarak HKH migrasyonunu düzenleyebilir. Tez çalışması, bu varsayımı test etmek üzere gerçekleştirilmiştir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Tasarımı; Tez çalışması kapsamında sayıları Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu iznine göre (Karar No: GO 13/170-17) kontrol ve deney grupları sırasıyla G-CSF uygulanmamış (n=10) ve uygulanmış (n=10) sağlıklı donörlere ait Kİ ve PK plazmaları; MNH ve MKH'leri kullanılmıştır. Çalışma, **Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (PEDİSTEM)**, merkeze ait alt yapı, laboratuvar ve teknik donanım kullanılarak, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Doktora Programı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma; disiplinlerarası, rastgele seçilmiş (randomize), kontrol grubu içeren, ileriye yönelik (prospektif) in vitro deneysel araştırma şeklinde planlanmıştır. Bağımlı değişkenler, gruplar; bağımsız değişkenler, AEA, 2-AG, CB1 ve CB2 reseptör, $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 3$ -AR düzeyleri, hücrelerin migrasyonuna ait ölçüm parametrelerdir.

Giriş bölümündeki araştırma sorularını yanıtlamak üzere aşağıdaki iş paketleri gerçekleştirilmiştir.

3.1. İş Paketi 1 (İP1): Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, üretilmesi ve karakterizasyonu

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu iznine göre (Karar No: GO 13/170-17) yaşları 10 ve 30 arasında değişen 3 gün süre ile 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ standart dozda G-CSF uygulanmış (n=10) ve uygulanmamış (n=10) sağlıklı donörlere ait Kİ ve PK plazmaları ve Kİ MNH örnekleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmuştur. Donörlerin yaş ortalamaları gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir (p=0,353; Tablo 3.1). Bu da deney ve kontrol gruplarının yaş olarak birbiriyle benzer olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.1. Tez kapsamında çalışılan donörlere ait demografik veriler görülmektedir. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan donör grupları, yaş ortalaması açısından benzerdir (p=0,353).

Grup	G-CSF uygulanmayan (n=10)	G-CSF uygulanan (n=10)
Ortalama yaş \pm standart sapma	15,1 \pm 10,2	12,4 \pm 7,6
Cinsiyet	8/10 Kadın	5/10 Kadın

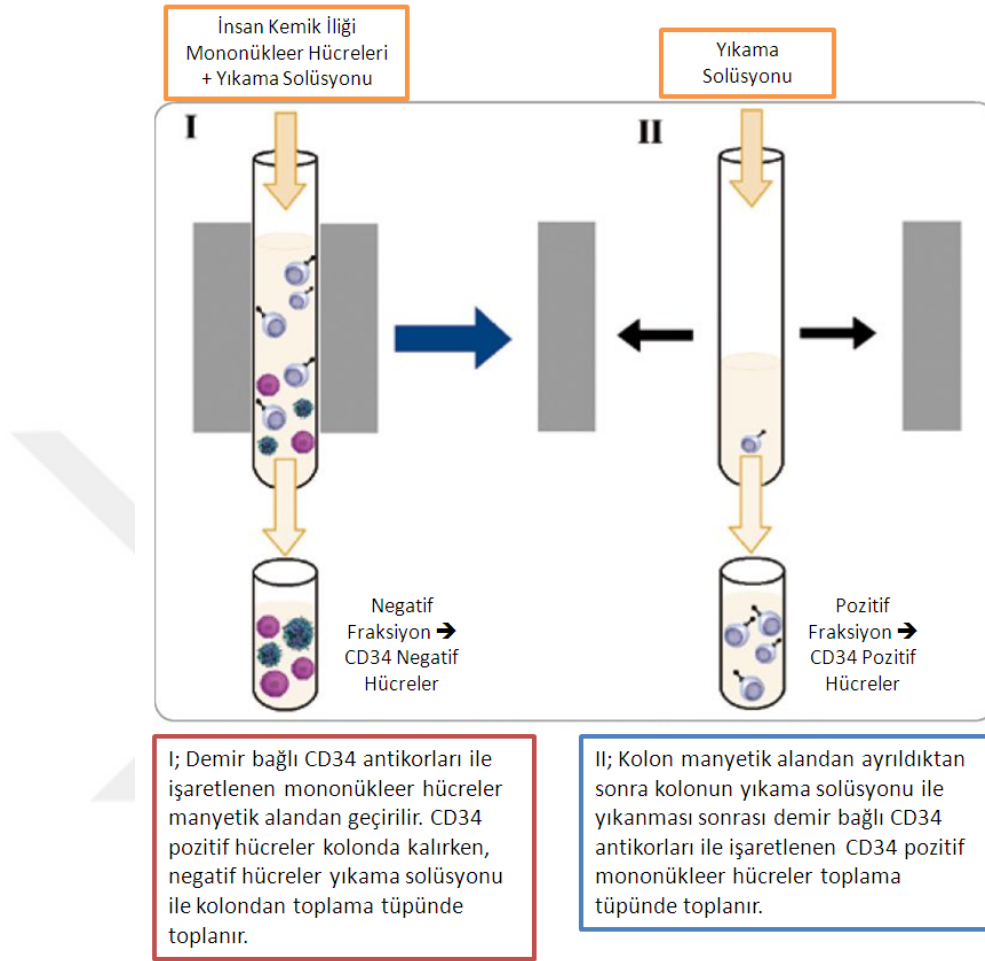
3.1.1. Hematopoetik kök hücre izolasyonu

Donmuş haldeki Kİ MNH içeren *cryovial*, 37°C'lik su banyosuna konularak hücrelerin çözülmesi sağlanmıştır. Hücrelerin agregat oluşturma eğiliminden dolayı MNH çözme protokolü uygulanmıştır; çözülen hücreler doğrudan 15 ml'lik tüp içerisine aktarılmış ve üzerine 1 damla/dk olacak şekilde hazırlanan Dnaz içeren çözme solüsyonundan eklenmiştir. Ekleme sırasında tüp vortekslenmiş ve bu işlemin ardından 10 ml çözme solüsyonu damla damla hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler 430 g'de santrifüj edilerek sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı tripan mavisi boyası ve Bürker lamı kullanılarak, 1:20 sulandırma yapılarak elde edilmiştir.

Belirlenen hücre sayısına göre, hücrelerden (i) β 1-AR, β 2-AR ve β 3-AR ve kannabinoid reseptörlerinin (CB1 ve CB2) akım sitometri ve (ii) qRT-PCR analizi için; (iii) CD34 bulunduran (CD34⁺) hücre izolasyonu amacıyla *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS) yöntemi için ve (iv) MKH üretimi için ekim gerçekleştirilmiştir.

CD34⁺ hücre izolasyonu için ayrılan hücreler ile manyetik izolasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Üreticinin protokolüne göre, MNH'ler MACS tamponu içerisinde önce FcR bloklama solüsyonu ve sonrasında manyetik boncuk taşıyan anti-CD34 antikor ile inkübe edilerek işaretlenmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu MACS® MS kolonlarına aktararak manyetik işaretli CD34⁺ elüsyonu

gerçekleştirilmiştir. Elde edilen $CD34^+$ hücreler daha önce belirtilen yöntem ile sayılmıştır (1:1 sulandırma).



Şekil 3.1. MACS yöntemi şematizasyonu. Manyetik izolasyon tekniği ile insan Kİ MNH'lerden $CD34^+$ ve $CD34^-$ hücre fraksiyonlarının elde edilme yöntemi şematize edilmiştir.

3.1.2. Mezenkimal kök hücre kültürü ve karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücre kültürü

MKH'ler MACS yöntemi ile Kİ MNH'lerinden elde edilen $CD34^-$ hücrelerin T75 doku kültür kabına 20×10^6 hücre olacak şekilde 10 ml büyüme besiyeri (DMEM-LG (Gibco, ABD), %10 fetal bovine serum (Gibco, ABD), %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin, Sigma-Aldrich, ABD) ile birlikte ekilmesi ve 37°C , %5

CO₂'li inkübatörde (Thermo Electron Corporation, Almanya) kültüre edilmesi ile elde edilmiştir. CD34⁺ hücrelerin kültüre edilmesini takiben 24 saat içinde kültür kabının yüzeyine yapışmaya başlayan MKH'lerin gözlenmesi ile her 3 günde 1 kez kültür kabının içindeki besiyeri boşaltılarak taze besiyeri eklenmiştir. Böylece kültür kabına yapışmayan hematopoetik hücreler elimine edilmekte ve sadece adeziv hücre özelliğinde olan MKH'ler çoğaltılmaktadır. İki hafta içinde adeziv hücrelerin çoğalarak kültür kabını doldurması sağlanmıştır. %70 oranındaki fibroblast görünümündeki hücreler, PBS ile yıkanmış ve 2 ml %0.25 tripsin-EDTA (Gibco, ABD) uygulanarak adezyon gösterdikleri yüzeyden ve birbirlerinden kopmaları sağlanmıştır. 5 dakika inkübatörde tutulan, kültür kabının yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılan hücreler 8 ml besiyeri ile toplanarak hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücreler, tripan mavisi ile 1:1 oranında sulandırılarak sayılmıştır. Hücre sayımının sonucuna göre 1 T75 kültür kabına 2×10^5 hücre 10 ml büyüme besiyeri ile beraber aktarılmış ve 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir. Kalan hücreler ise DMEM-LG, %20 fetal bovine serum ve %10 DMSO (Appllichem, Almanya) içeren dondurma besiyeri ile dondurularak -196°C'lik sıvı azot tankında saklanmıştır. Aynı işlem hücreler 3. Pasaja gelene kadar tekrarlanmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu

Tüm karakterizasyon çalışmaları pasaj 3'e getirilen MKH'ler ile yapılmıştır.

Morfolojik analiz; MKH'lerin karakterizasyonunda ilk adım hücrelerin plastik yüzeye yapışabilmeleri ve içsi-poligonal morfoloji göstermeleridir. Bu özellikler inverte ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir.

Farklılaşma analizi;

Adipojenik farklılaştırma; Üçüncü pasajda olan hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 4×10^4 /kuyu olacak şekilde ekilerek çoğaltılmaya başlanmıştır. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %100 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından tüm kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkanmış ve adipojenik farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri [DMEM-LG, %10 serum, 1 µM deksametazon (Sigma, ABD), 60 µM indometazin (Sigma, ABD), 500

μ M izobutilmetilksantin (IBMX, Sigma, ABD) ve 5 μ g/ml insülin (Sigma, ABD)] eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise büyüme besiyeri eklenmiştir.

Üç hafta sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri toplanmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından yağ hücrelerine farklılaşması beklenen hücreler 1 ml %10 formaldehit (Sigma, ABD) ile 20 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından kuyucuklara 1 ml Oil Red O (ORO) boyası (Sigma, ABD) eklenerek 10 dakika beklenmiş ve ardından distile su ile 2 kere yıkama yapılmıştır. Dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile ışık mikroskopunda fotoğraflandıktan sonra semi-kantitatif sonuç almak üzere, kuyucuklara deterjan özelliğinde olan %2 igepal/izopropanol (v/v) (Sigma-Aldrich, ABD; DOP Organik Kimya Sanayi, Türkiye) eklenerek boyanın hücrelerden ekstraksiyonu sağlanmıştır. İgepal eklenmesinden 1 saat sonra kuyucuklar içerisinde toplanan igepal-boya karışımı; yağ hücrelerine farklılaşan hücre miktarının belirlenmesi amacı ile 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 μ l olacak şekilde bölüştürülmüştür. Kontrol olarak ise ORO boyası kullanarak hazırlanan standartlar kullanılmıştır. Kuyucuklar içindeki karışım ELISA okuyucusunda (Tecan, Avustralya) 492 nm dalga boyunda okutulmuş ve standartlar ile oranlanan veriler grafiğe geçirilmiştir.

Osteojenik Farklılaştırma; Tripsinize edilmiş olan pasaj 3 MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına toplam 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek çoğaltılmış ve haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından tüm kuyucuklar 1'er ml PBS ile yıkanmış ve kemik hücrelerine farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml osteojenik farklılaşma besiyeri [DMEM-LG, %10 fetal bovine serum, 100 nM deksametazon, 10 mM beta gliserofosfat (Applichem, Almanya) ve 0,2 mM L-askorbik asit (Sigma, ABD)] eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına büyüme besiyeri eklenmiştir. 3 hafta sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri toplanmış ve 1 ml PBS ile yıkama yapılmıştır.

Farklılaşma analizi için %10 formaldehit ile 20 dakika fikse edilen hücrelerin üzerine 1 ml Alizarin Red S (ARS) boyası (pH= 4.2, Sigma, ABD) eklenerek 10 dakika bekletilmişlerdir. Ardından boya toplanarak kuyucuklar 1 ml distile su ile yıkanmış ve dijital görüntüleme sistemi ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

Kantitatif sonuç almak için Quantichrom Calcium Assay Kiti (Bioassay Systems, ABD) kullanılmıştır. Bu amaçla tüm kuyucuklar 1ml PBS ile yıkanarak 500 µl %0.6 M HCl (Carlo Erba Reagent, Fransa) eklenmiştir. 5 saat sonunda Hel toplanarak tüplere aktarılmış ve kalsiyum miktarının belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu kültür kaplarına 5 µl olacak şekilde bölüştürülmüş ve üzerlerine 95 µl solüsyon A ve B'den (1:1) eklenmiştir. Kontrol olarak kit içinde bulunan kalsiyum standartları kullanılmıştır. Kuyucuklar ELISA okuyucusunda 620 nm dalga boyunda okutulmuş ve çıkan sonuçlar grafiğe geçirilmiştir.

Hücre Yüzey Belirteçlerinin Analizi; Hücrelerin yüzey belirteçlerinin analizi için pasaj 3 MKH'ler kullanılmıştır. T75 doku kültür kabında üretilen hücreler PBS ile yıkanmış ve ardından 5 ml tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 5 dakika bekletilmiş ve böylece hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmasını sağlanmıştır. İnkübasyon bitiminde tripsinin etkisini durdurmak amacıyla kültür kabına serum içeren büyüme besiyeri eklenmiş ve hücreler tüpte toplanmıştır. Tripin mavisi boyası kullanılarak sayımı yapılan hücreler FACS tüplerine, tüp başına 2×10^5 hücre olacak şekilde 2 ml PBS kullanılarak bölüştürülmüştür. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan tüplerdeki pellet homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücre pelleti üzerine 100 µl 'PBS-BSA-Na Azide' (PBN) ile birlikte her birinden 5 µl olacak şekilde Tablo 3.2'de yer alan antikorlardan eklenmiştir. Tüpler +4°C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiş; inkübasyon bitiminde 2 kez PBN ile yıkama yapılan tüplere 200 µl PBN eklenerek FACS ARÍA (Beckon Dickinson Biosciences, ABD) cihazı ile okutulmaya geçilmiştir.

Tablo 3.2. Mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda kullanılan yüzey antijenlerine ait akım sitometri antikorları listelenmiştir.

Antikor	Florokrom	Marka, Ülke	Katalog numarası
Fare anti insan CD90, IgG1	FITC	BD Biosciences, ABD	555595
Fare anti insan CD29, IgG1	APC	BD Biosciences, ABD	559883
Fare anti insan CD73, IgG1	PE	BD Biosciences, ABD	550257

Fare anti insan CD44, IgG1	FITC	BD Biosciences, ABD	347943
Fare anti insan CD34, IgG1	PE-Cy7	BD Biosciences, ABD	560710
Fare anti insan CD45, IgG1	FITC	BD Biosciences, ABD	555482
Fare anti insan HLA-DR, IgG2	APC	BD Biosciences, ABD	347403

İşaretlenmiş hücrelerin yüzey belirteçlerinin analizi toplam 10,000 olgu (*event*) okutulurak *FACS Aria* cihazı ile yapılmıştır. Analiz için *BD FACSDiva Software v6.1.2* yazılımı (Beckon Dickinson Biosciences, ABD) kullanılmıştır.

3.2. İş paketi 2 (İP2): Endokannabinoid (AEA, 2-AG) düzeylerinin LC/EPI/MS-MS yöntemi ile ölçümü

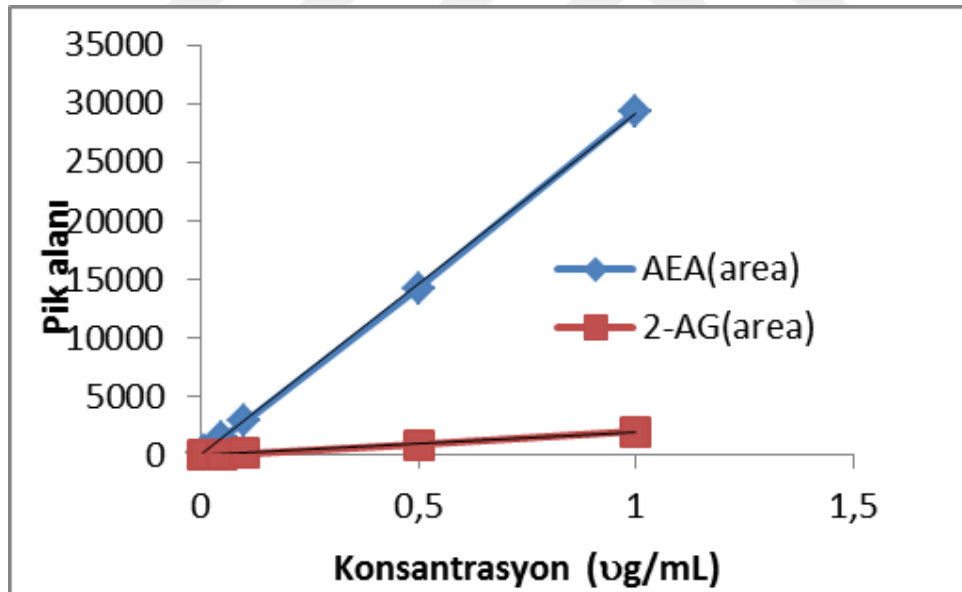
Bu iş paketinde Kİ ve PK plazmasına ve MKH süpernatantına salınan endokannabinoidlerin miktarları LC-ESI-MS/MS yöntemi ile ölçülmüştür. Katı faz tüketme fazına hazırlık amacı ile belirlenen Kİ ve PK plazmaları (250 µl) ve MKH süpernatantları (7 ml) arşivden (-80°C) çıkarılarak oda ısısında çözümleri sağlanmıştır. Örneklerin üzerine aynı hacimde distile su eklenerek katı faz tüketme protokolüne uygun hale getirilmiştir.

Katı faz tüketme işlemi; Bu çalışmada polimerik (Strata X, 30 mg/ml) kolonlar kullanılmıştır. Tüketme öncesinde kolon sırasıyla 2 kez 1 ml MeOH (%100) ve 2 kez 1 ml su ile şartlandırılmıştır. Katı faz tüketme için hazırlanan örneklerin kolona yüklenmesinden sonra, sırasıyla 2 kez 1 ml su ve 2 kez 750 µl MeOH içeren su (55:45, h:h) ile yıkanmıştır. Ardından vakum 2 dakika çalıştırılarak kolonun kuruması sağlanmıştır. Kolondan 2 kez 1 ml MeOH (%100) ile yıkanarak örneklerin kolondan elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Elüat vakumlu santrifüjde 4 saat tutulmuş ve metanolün uzaklaşması sağlanmıştır. Örneklerin üzerine 100 µl asetonitril eklenerek katı faz tüketme fazı tamamlanmıştır.

Kromatografik koşullar: Hareketli faz, dörtlü gradient pompa ile %0.1 formik asit ve asetonitril analiz sırasında karıştırılarak oluşturulmuştur. Hareketli fazın bileşenlerinin her biri 0.45 µm filtreden süzöldükten sonra ultrasonik banyoda

15 dak tutularak gazı uzaklaştırılmıştır. Akış hızı 0.2 ml/dak, enjeksiyon hacmi 5 µl ve kolon sıcaklığı 40°C'dir. Analizler Phenomenex C18 model (4 mm x 3.0 mm) kolonda gerçekleştirilmiştir. LC-ESI-MS/MS sistemi ile günlük çalışmanın başlangıcında 20 dakika (akış hızı: 0.2 ml/dak) deiyonize su geçirilmiştir.

Doğrusallık; Kalibrasyon eğrileri su materyaline 6 ayrı derişimde (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 ppm) standart çözelti eklenerek her AEA ve 2-AG için oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi her bir AEG ve 2-AG pik alanının değerin derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Yöntemlerin doğrusallığı; kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel olarak (ANOVA testi) değerlendirilmesi ile kontrol edilmiştir. ANOVA testi ile korelasyon katsayısının önemi ve regresyon katsayılarının sıfırdan farklı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca olması gereken derişimlere karşı, kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimlerin grafiğe geçirilerek bir doğru elde edilip edilmemesi ile de yöntemin doğrusallığı değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. AEA ve 2-AG'ye ait kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir.

Geri kazanım çalışmaları; AEA ve 2-AG için mutlak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Mutlak geri kazanımda suya eklenmiş AEA ve 2-AG analizinden elde edilen verilerin, herhangi bir tüketme işlemine maruz bırakmadan

elde edilen verilerin karşılaştırılması ile değerlendirilmiş ve ortalama geri kazanım hesaplanmıştır.

3.3. İş Paketi 2 (İP2): Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ve qRT-PCR yöntemi ile analizi

İP 1’de yapılan çalışma kapsamında arşiv hücrelerinden elde edilen MNH’lerin bir kısmı İP2 için kullanılmıştır.

3.3.1. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri yöntemi ile analizi

Kannabinoid reseptörleri hücre yüzeyinde ve içerisinde yer alan tüm membranlarda bulunabildiği için, akım sitometri yönteminde bu antikorların kullanıldığı hücre popülasyonu permeabilize edilmiştir. Permeabilizasyon protokolü gerektiren antikorlar, markaları ve katalog numaraları Tablo 3.3’de belirtilmiştir.

Tablo 3.3. β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ile işaretlenmesinde kullanılan antikorlar listelenmiştir. (*) Endokannabinoid reseptörleri hücre içinde buldukları için bu antijenlerin analizi için permeabilizasyon yöntemi uygulanmıştır.

Antikor	Florokrom	Marka, Ülke
Tavşan anti insan β 1-AR poliklonal IgG	FITC	Bioss, ABD
Fare anti insan β 2-AR IgG1	PE	Santa Cruz, ABD
Keçi anti insan β 3-AR poliklonal IgG	-	Santa Cruz, ABD
Tavşan anti keçi IgG (sekonder antikor),	FITC	Abcam, İngiltere
Tavşan anti insan CB1 poliklonal IgG (*)	PE	Abcam, İngiltere
Tavşan anti insan CB2 poliklonal IgG (*)	FITC	Cayman, ABD
Fare anti insan CD34 IgG1	PE-Cy7	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan CD38 IgG1	APC	BD Biosciences, ABD

İP 1’de elde edilen MNH’ler ve pasaj 2 MKH’ler FACS tüplerine, sırası ile tüp başına 1×10^5 ve 2×10^5 hücre olacak şekilde 1 ml PBS kullanılarak bölüştürülmüştür. Permeabilizasyon gerektiren antikoları içeren tüplerle yapılan deneylerde; negatif kontrol tüplerinde yüksek oranda yalancı pozitiflik görülmesi üzerine protokol modifiye edilmiştir. Buna göre hücre pelletleri öncelikle 500 μ l perm2 (558052, BD Phosflow™, Becton Dickinson, ABD) solüsyonu ile 8 dakika oda ısısında inkübe edilerek permeabilize edilmeleri sağlanmıştır. PBS ile yıkama amacı ile yapılan 430 g’de 5 dakika santrifüj sonrası, zemin boyamasının (*background*) azaltılması amacı ile PBS içerisinde %2 insan AB serumu içeren solüsyon ile 15 dakika oda ısısında inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası protokol permeabilizasyon gerekmeyen antikoların protokolü ile devam etmiştir. Protokolde yapılan bu modifikasyon ile permeabilize edilen hücrelerde spesifik olmayan işaretlenmenin önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir.

Homojenize edilen hücre pelleti üzerine 100 μ l PBS ile Tablo 3.3.’de belirtilen antikorlardan 5 μ l eklenmiştir. Tüpler +4°C’de ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiş; inkübasyon bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan tüplere 200 μ l PBS eklenerek akım sitometri cihazı (FACS ARIA, Beckton Dickinson, ABD) ile okutulmuştur (10,000 olgu). Analiz için cihaza ait yazılım (BD FACS Diva Software v6.1.2 yazılımı, ABD) kullanılmıştır.

β 3-AR antijeni indirekt immünofluoresan tekniği ile ise yukarıdaki paragrafta anlatıldığı gibi primer antikor ile inkübasyon sonrası, süspansne haldeki hücrelere sekonder antikordan 5 μ l eklenerek ve tüpler +4°C’de ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra değerlendirildi. İnkübasyon bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan tüplere 200 μ l PBS eklenerek akım sitometri cihazında (FACS Aria, BD, ABD) ile okutulmuştur (10,000 olgu). Analiz için cihaza ait yazılım (BD FACSDiva Software v6.1.2, ABD) kullanılmıştır.

3.3.2. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi

RNA izolasyonu için, İP 1’de yapılan çalışma kapsamında arşiv hücrelerinden elde edilen MNH’ler kullanılmıştır. Bu İP kapsamında MNH qRT-

PCR yöntemi ile β -AR ve CB1, CB2 reseptör analizi için RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Pellet halindeki hücrelerin üzerine 1ml lizis tamponu (QIAzol lysis buffer, Qiagen) eklenerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Ardından hücreler 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine toplanarak -80°C derin dondurucuda depolanmıştır. RNA izolasyonu için ticari olarak satın alınan kite (RNA easy mini kit, Qiagen, ABD, katalog no:74104) ait protokol izlenmiştir. Olası gDNA kontaminasyonunu önlemek için RNA örnekleri *Rnase-free Dnase Digestion* (Qiagen ABD) ile muamele edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin kantitatif kontrolü A260/280 ve A260/230 oranlarının spektrometre cihazı (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmesi ile belirlenmiştir.

RNA örnekleri ölçümden sonra qRT-PCR çalışmasına kadar -80°C 'de saklanmıştır. Komplemanter DNA (cDNA) 200 ng RNA örneğinden ticari kit (ProtoScript® First Strand Cdna Synthesis Kit; New England BioLabs Inc. ABD) kullanılarak sentezlenmiştir. qRT-PCR, PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (#A25741, Thermo, USA) ile ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen genlerin (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*, *CNR1* ve *CNR2*) göreceli mRNA ekspresyon analizi delta delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) metodu ile ViiA™ 7 Software (v1.2.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm hedef genler (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*, *CNR1* ve *CNR2*), *house keeping* gen olan ACTB genine göre (beta aktin) normalize edilmiştir. G-CSF uygulanmış donörlere ait Kİ MNH ve MKH'leri, G-CSF uygulanmamış donörlere ait Kİ MNH ve MKH'leri ile karşılaştırılmıştır.

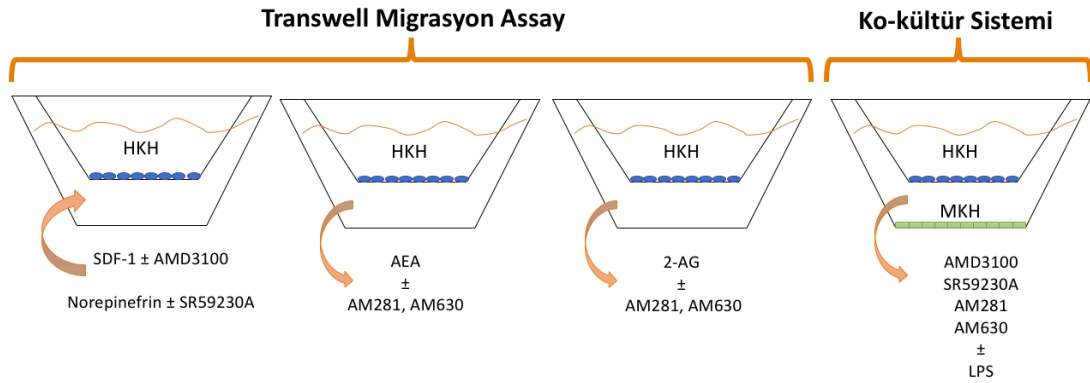
3.4. İş paketi 4 (İP4): Hematopetik kök hücrelerin endokannabinoidlere migrasyonunun incelenmesi

Bu iş paketinde hematopoetik hücre kaynağı olarak 6 adet sağlıklı donörden aferez yöntemi ile toplanan PKKH'lar kullanılmıştır. Kullanılan hücrelerin CD34, CD38 ve CD34/CD38 ikili işaretlenme yüzdeleri; β 1, β 2, β 3-AR ve CB1 ve CB2 reseptörleri ile işaretlenme yüzdeleri akım sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Akım sitometri analizi İP 1'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Aferez ürünleri İP 1’de anlatılan yöntem ile çözülmüştür. Deneyler 3 kuyucuk tekrarlı olarak 6 farklı donörle gerçekleştirilmiştir. Kullanılan maddelerin konsantrasyonları ve ticari bilgileri Tablo 3.4’de, deney düzeneği Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Hematopoetik kök hücrelerin endokannabinoidlere migrasyonun incelendiği deney sisteminde kullanılan maddeler. Kullanılan etken maddelerin adları, kısa tanımları, deneylerde kullanılan dozları ve markaları listelenmiştir.

Etken Madde	Açıklama	Doz	Marka, Ülke
SDF-1	Kemotaktik sitokin	200 ng/ml	American Research Products, ABD
AMD3100	CXCR4 antagonisti	25 µg/ml	Sigma, Almanya
Norepinefrin	Adrenerjik nörotransmitter	1 µg/ml	Sigma, Almanya
SR59230A	β-AR antagonisti	2,5 µM	Sigma, Almanya
AEA	CB1 reseptörü ful agonisti	AEA1; 30 nM AEA2; 1 µM AEA3; 50 µM	Sigma, Almanya
2-AG	CB2 reseptörü ful agonisti	AG1; 30 nM AG2; 1 µM AG3; 50 µM	Sigma, Almanya
AM281	Selektif CB1 reseptörü antagonisti	10 µM	Tocris, İngiltere
AM630	Selektif CB2 reseptörü antagonisti	10 µM	Tocris, İngiltere



Şekil 3.3. Endokannabinoidler ve reseptör antagonistleri varlığında gerçekleştirilen HKH migrasyon deneyi protokolü şematize edilmiştir. İlk deney sisteminde PKKH'lerin SDF-1 ile reseptörü CXCR4'in antagonisti AMD3100, norepinefrin ile β -AR antagonisti SR59230A'ya migrasyonu; ikinci deney sisteminde PKKH'lerin AEA ve/veya CB antagonistlerine migrasyonu; üçüncü deney sisteminde PKKH'lerin 2-AG ve onunla birlikte CB antagonistlerine migrasyonu; dördüncü deney sisteminde HKH'lerin MKH'lere göçünün inhibitör ve antagonistler ile inhibisyonu araştırılmıştır.

Transvel kapları deneyden bir gece önce PBS ile ıslatılmıştır. Deney günü kapların alt kısımlarına Tablo 3.4'de belirtilen besiyerleri 600 ul olacak şekilde eklenmiş ve PKKH'leri 100 μ l DMEM-HG ile birlikte transvelin üst kısmına eklenmiştir. Dört saatlik migrasyon deneyinin ardından kuyuların alt kısımlarına göç eden HKH'ler toplanarak; *Turk's* boyası ile 1:1 sulandırma yapılarak sayılmıştır.

3.5. İş Paketi 5 (İP5): Hematopoetik kök hücrelerin antagonistler varlığında mezenkimal kök hücrelere doğru migrasyonunun incelenmesi

Bu iş paketinde 6 adet sağlıklı donörden aferez yöntemi ile toplanan PKKH'ler ve G-CSF almamış bir donöre ait MKH'ler kullanılmıştır. MKH'ler İP 1'de anlatıldığı gibi çoğaltılmış ve tripsin enzimi kullanılarak yapıştıkları ortamdan kaldırılmışlardır. Kuyu başına 5×10^4 olacak şekilde transvellere alt kısımlarına ekilmişlerdir. Ekimi takiben 24 saat sonra G-CSF (10 ng/ml) 3 gün boyunca DMEM içinde uygulanmıştır. Migrasyon deneyinden 4 saat önce ise belirlenen gruplara 200 ng/ml konsantrasyonda LPS (L5668, Sigma-Aldrich, Almanya) (90) uygulanmıştır.

4. saatin sonunda Şekil 3.3’de belirtilen maddeler Tablo 3.4’de belirtilen dozlarda MKH’lerin buldukları kuyulara eklenmiştir. PKKH’leri 100 µl DMEM ile birlikte transvel kabının üzerine eklenerek migrasyon deneyi başlatılmıştır.

İş Paketi 6 (İP6): İstatistiksel analiz

Verilerin analizinde *IBM SPSS Statistics* versiyon 21 paket programı kullanılmıştır. Sayısal veriler, ortalama ve standart sapma değerleri ile özetlenmiştir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi ile test edilmiştir. Parametrik varsayımlar sağlanmadığında, sayısal bir değişken bakımından bağımsız ikiden çok grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, bağımsız iki grup karşılaştırmasında ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bağımlı gruplarda, ikiden çok grubun karşılaştırılmasında Friedman testi, iki grup karşılaştırmasında ise Wilcoxon testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Kantitatif deneyler 3 paralelli ve 2 veya 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, üretilmesi ve karakterizasyonu

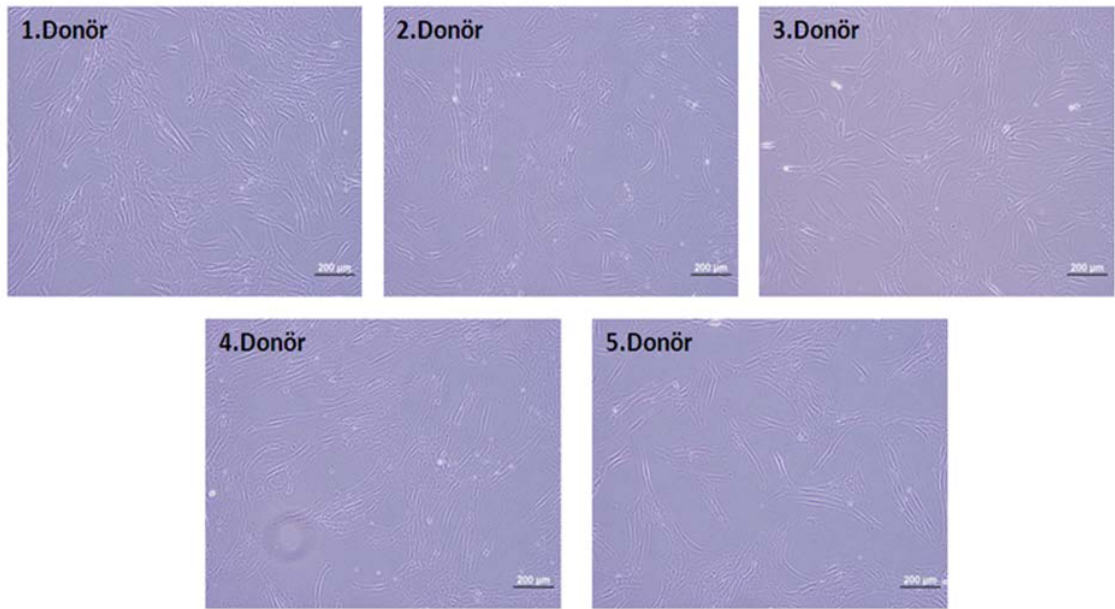
4.1.1. Hematopoetik hücre izolasyonu,

Arşivde yer alan Kİ MNH'ler, başarılı bir şekilde çözülmüş, sayılmış ve gerekli iş paketlerinde kullanılmıştır. MACS yöntemi ile CD34⁺ hücreler izole edilebilmiştir.

4.1.2. Mezenkimal kök hücre izolasyonu, çoğaltılması ve karakterizasyonu

Ekimi gerçekleştirilen tüm donörlere ait CD34⁻ hücrelerden MKH'ler üretilmiş ve gerekli iş paketlerinde kullanılmıştır.

Morfolojik analiz; Hücrelerin beklendiği üzere plastik kültür kaplarına yapışabildikleri ve iğsi morfolojiye sahip oldukları görülmektedir. Üretilen MKH'lere ait örnek mikrograflar Şekil 4.1'de verilmiştir.

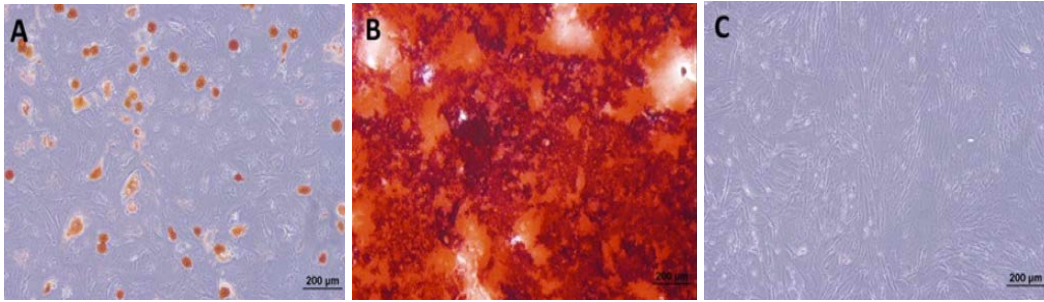


Şekil 4.1. Örnek olarak verilen 5 donöre ait pasaj 1 MKH kültürlerinin invertte ışık mikrograflarıdır; x10.

Farklılaşma analizi;

Adipojenik farklılaştırma; İncelenen tüm donörlere ait MKH'lerin yağ hücre farklılaştırma analizi tamamlanmıştır. Yirmibir gün boyunca adipojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan pasaj 3 MKH'lerde, *Oil Red O* (ORO) ile yağ damlacıklarının olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Yapılan semikantitatif analiz sonucu hücrelerin içerdikleri ORO boya miktarları saptanmıştır (Tablo 4.1). Adipojenik olarak farklılandırılan hücrelerin içerdği ORO boya miktarının, kontrol hücrelerine oranla fazla olduğu görülmektedir. Böylece izole edilen ve çoğaltılan hücrelerin başarılı bir şekilde yağ hücrelerine farklılaşabildiği belirlenmiştir. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan donörlere ait MKH'lerdeki adipojenik farklılaşmanın, benzer olduğu saptanmıştır.

Osteojenik Farklılaştırma; İncelenen tüm donörlere ait MKH'lerin morfolojik olarak kemik hücre farklılaştırma analizi gerçekleştirilmiştir. Yirmi bir gün boyunca kemik hücrelerine farklılaşma besiyeri uygulanan pasaj 3 MKH'lerin, Alizarin Kırmızısı S boyaması sonrası invertte ışık mikroskobu ile morfolojik analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde kalsiyum kristallerinin biriktiği gözlenmiştir (Şekil 4.2). Yapılan kantitatif analiz sonucu hücrelerin kalsiyum miktarları saptanmış, (Tablo 4.1) ve istatistiksel olarak osteojenik olarak farklılaştırılan hücrelerin içerdği kalsiyum miktarının kontrol hücrelerine oranla anlamlı biçimde yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,002$). Buna göre izole edilen ve çoğaltılan hücrelerin başarılı bir şekilde kemik hücrelerine farklılaştığı belirlenmiştir. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan donörlere ait MKH'lerdeki osteojenik farklılaşmanın, benzer olduğu saptanmıştır ($p\geq 0.05$).

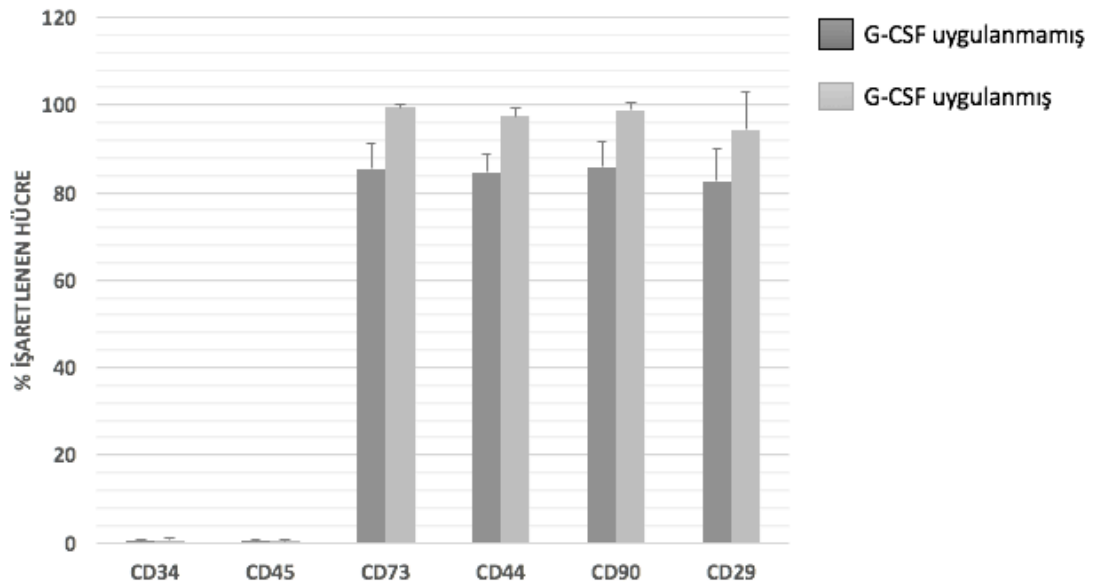


Şekil 4.2. Mezenkimal kök hücrelerde adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya ait mikrograflardır. (A) Donör MKH'leri 21 gün boyunca adipojenik farklılaşma besiyeri ile indüklendikten sonra ORO ile boyanan hücrelerde nötral lipid oluşumu gözlemlendi. (B) Osteojenik farklılaşma besiyeri ile indüklendiğinde ARS ile boyanan hücrelerde kalsiyum depozitleri gözlemlendi. (C) Kontrol MKH'lerin ORO ile boyanmadığı gözlemlendi.

Tablo 4.1. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan donörlere ait hücrelerin osteojenik farklılaşma sonrası ve kontrol hücrelerinin ortalama kalsiyum içerikleri ile adipojenik farklılaşma sonrası ve kontrol hücrelerin ortalama ORO boya miktarları gösterilmiştir.

	G-CSF uygulanmayan grup (n=10)	G-CSF uygulanan grup (n=10)
Ca (mg/dl)	15,79 ± 5,1	16,97 ± 3,7
ORO (mg/ml)	1,89 ± 1,3	1,97 ± 1,5

Hücre Yüzey Belirteçlerinin Analizi; Tablo 3.2'de yer alan antikorlar kullanılarak izole edilen ve çoğaltılan pasaj 2 MKH'lerin yüzey antijenik özellikleri belirlenmiştir. G-CSF uygulanmış (n=10) ve uygulanmamış (n=10) donörlere ait akım sitometri çalışmasının işaretlenen ortalama hücre yüzdesi olarak sonuçları Şekil 4.3'de verilmiştir. Buna göre Kİ'nden izole edilen hücrelerin CD90, CD44, CD73, CD29 yüzey moleküllerini eksprese ettiği; CD34, CD45 ve HLA-DR'i kapsayan diğer yüzey moleküllerini eksprese etmediği/düşük eksprese ettiği saptanmıştır.



Şekil 4.3. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış MKH'lerin akım sitometri tekniğiyle belirlenen yüzey belirteçleri ile yüzde işaretlenme oranlarına ait çubuk grafik. Gruplar arasında işaretlenme açısından anlamlı fark bulunmamaktadır.

Böylece analiz edilen hücrelerin yüzey molekül özelliklerinin MKH karakterini yansıttığı belirlenmiştir. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış gruplardaki MKH yüzey belirteç (CD34, CD45, HLA-DR, CD73, CD44, CD90, CD29) ekspresyonu benzer olarak saptanmıştır ($p \geq 0.05$).

4.2. Endokannabinoid (AEA ve 2-AG) düzeylerinin LC-ESI-MS/MS yöntemi ile ölçümü

Bu iş paketi için İP1'de kullanılan donörlere ait, arşivde saklanan (-80°C) G-CSF uygulanmış ($n=10$) ve uygulanmamış ($n=10$) toplam 20 donörden Kİ ve 20 donörden PK plazması örneği ve pasaj 1 MKH süpernatantı ($n=10$) kullanılmıştır. Kullanılan standart örneklerde AEA ve 2-AG miktarları belirlenebildiğinden kullanılan yöntemin doğruluğu onaylanmıştır. Donör örneklerinde 2-AG ve AEA mililitrede nanogram (nmol/L) seviyesinde saptanabilmiştir. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlerin Kİ ve PK plazmalarına ve MKH süpernatantına ait 2-AG ve AEA sonuçlarına ait tanımsal veriler Tablo 4.2.'de verilmiştir. Buna göre G-CSF uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait örneklerde benzer miktarda 2-AG ve AEA

saptanmıştır. G-CSF alan grupta PK plazma 2-AG seviyesi anlamlı olarak Kİ plazmasından daha yüksek olarak saptanmıştır ($p=0,011$). 2-AG seviyesi her iki grupta da AEA seviyesinden yüksektir, ancak bu veri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). G-CSF uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait MKH süpernatantları benzer seviyelerde 2-AG ve AEA bulundurmaktadır. Literatür ile karşılaştırabilmek amacıyla Tablo 4.2’de verilen sayısal data ng/ml birimi ile EK-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlerin Kİ, PK plazmalarına ve MKH süpernatantlarına ait AEA ve 2-AG miktarları (nmol/L) tabloda verilmiştir. (*) $p=0,011$

	G-CSF Uygulanmamış Grup		G-CSF Uygulanmış Grup	
	AEA (nmol/L)	2-AG (nmol/L)	AEA (nmol/L)	2-AG (nmol/L)
PK Plazma	80,99 (20,1-188,93)	131,08 (42,58-1631,76)	62,09 (58,12-178,21)	1655,23 (325,41-1816,14)*
Kİ Plazma	77,76 (7,69-286,42)	70,38 (9,27-402,84)	17,42 (5,1-534,3)	30,7 (5,94-400,99)
MKH Süpernatantı	5,62 (1,07-10,63)	2,24 (0,77-6,13)	3,92 (1,44-8,67)	1,45 (0,63-12,88)

4.3.Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ve qRT-PCR yöntemi ile analizi

G-CSF uygulanan ve uygulanmayan insan Kİ HKH ve MKH’lerinde klasik kannabinoid (CB1, CB2) ve β -AR (β 1-AR, β 2-AR, β 3-AR) ekspresyon düzeyleri akım sitometri ve qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

4.3.1.Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin akım sitometri ile analizi

Proje kapsamında G-CSF uygulanmış ($n=10$) ve uygulanmamış ($n=10$) toplam 20 adet donöre ait MNH, CD34⁺ hücreler ve MKH’ler β -AR (β 1, β 2-, β 3-AR) ve kannabinoid reseptörleri (CB1, CB2) için analiz edilmiştir. MNH, CD34⁺ hücreler ve MKH’lerdeki β -AR ve kannabinoid reseptör ekspresyon yüzdeleri

açısından karşılaştırıldığında, β 1-AR dağılımı haricinde diğer tüm reseptörlerde gruplar içerisinde anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. Şekil 4.4'de G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlere ait MNH, CD34⁺ hücre ve MKH'lerin akım sitometrideki yüzde işaretlenme oranları grafik olarak; yüzde sayısal verileri EK-1'de verilmektedir.

Her iki gruba ait MNH'lerdeki **β 1-AR** işaretlenme oranı sırasıyla G-CSF uygulanan grupta %13,9±11,7 ve uygulanmayan grupta %12,0±9,7 olarak saptandı. Her iki gruba ait MKH'ler β 1-AR'ler ile oldukça düşük oranlarda işaretlenmiştir (sırasıyla G-CSF uygulanan grupta %3,7±0,9 ve G-CSF uygulanmayan grupta %3,1±2,8). Her iki gruba ait CD34⁺ hücrelerdeki β 1-AR (G-CSF uygulanan grupta %40,2±28,4 G-CSF uygulanmayan grupta %38,4±26,8), diğer iki hücre grubuna göre daha fazlaydı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 4.4; EK-1B).

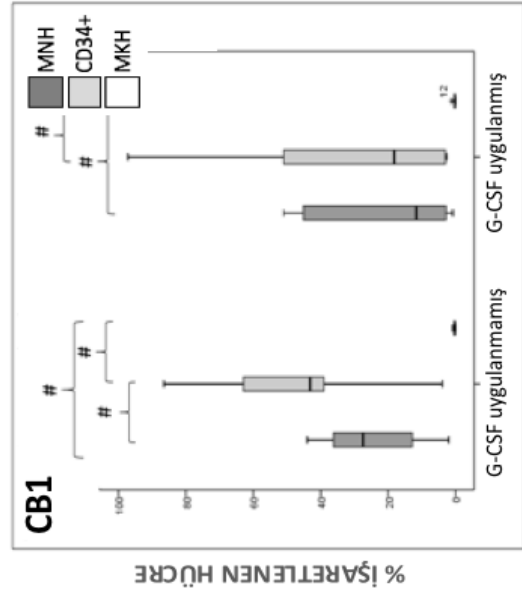
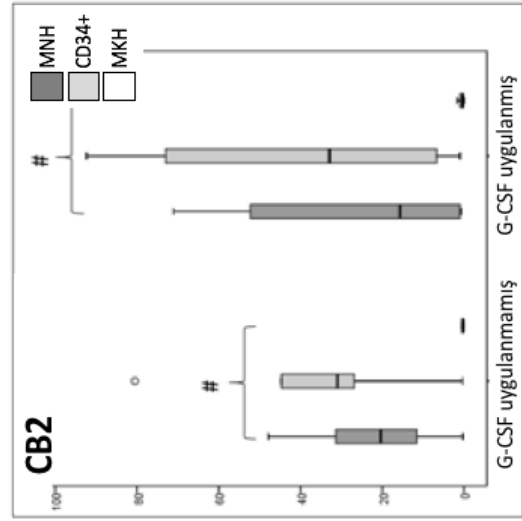
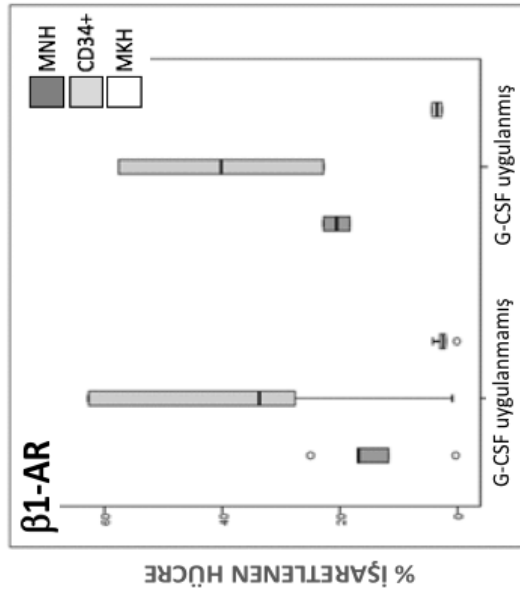
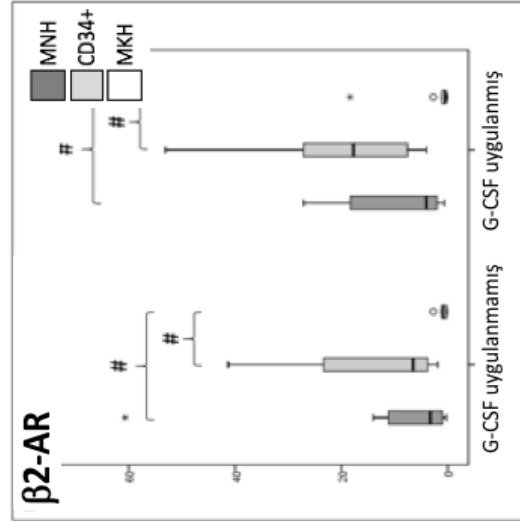
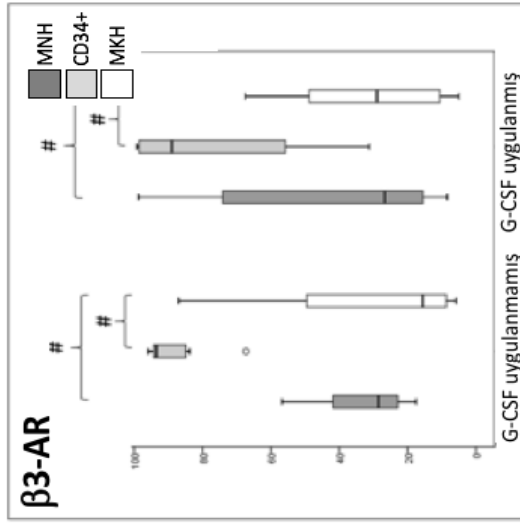
Deney ve kontrol grubuna ait MNH (G-CSF uygulanan grupta %13,3±14,5; G-CSF uygulanmayan grupta %10,7±19,3) ve CD34⁺ hücrelerdeki (G-CSF uygulanan grupta %24,7±18,8, G-CSF uygulanmayan grupta %14,9±13,7) **β 2-AR** işaretlenme oranı birbiriyle benzerlik göstermiştir. Her iki gruba ait MKH'ler, β 1-AR gibi β 2-AR ile de oldukça düşük oranlarda işaretlenmiştir (G-CSF uygulanan grupta %2,5±5,6 ve G-CSF uygulanmayan grupta %4,4±0,8). MKH'lerdeki β 2-AR dağılımı MNH ve CD34⁺ hücrelere göre anlamlı biçimde az olarak saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$ MNH için, $p=0,004$ CD34⁺ hücreler için). β 2-AR dağılımı G-CSF uygulanan ve uygulanmayan MNH, CD34⁺ ve MKH'lerde deney ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.4; EK-1B).

β 3-AR tüm hücrelerde ama en belirgin olarak CD34⁺ hücrelerde (G-CSF uygulanan grupta %78,7±26,1 ve G-CSF uygulanmayan grupta %89,8±9,7) yüksek oranlarda saptanmıştır. Bu hücrelerle MNH ve MKH'ler arasındaki β 3-AR işaretlenme yüzdesi farkı istatistiksel olarak anlamlıdır (G-CSF uygulanan için sırasıyla $p=0,013$, $p=0,002$; G-CSF uygulanmayan için sırasıyla, $p=0,001$, $p=0,001$). Her iki gruptaki MNH ve MKH'lerdeki (sırasıyla G-CSF uygulanan grupta %43,2±33,9 ve %31,2±22,1; ve G-CSF uygulanmayan grupta %36,2±43,2 ve

%24,5±31,7) β 3-AR işaretlenme oranları birbirine benzer olarak saptandı. β 3-AR dağılımı, deney ve kontrol gruplarında MNH'ler, CD34⁺ hücreler ve MKH'lerde benzer olarak saptandı ($p>0,05$) (Şekil 4.4; EK-1B).

Deney ve kontrol gruplarında **CB1 reseptörlerinin** CD34⁺ hücreler (sırasıyla G-CSF uygulanan grupta %32,8±34,4 ve G-CSF uygulanmayan grupta %59,2±27,7) ve MNH'lerde (G-CSF uygulanan grupta %20,7±20,1 ve G-CSF uygulanmayan grupta %19,8±17,0) yaygın dağılım gösterdiği; MKH'lerde (G-CSF uygulanan grupta %0,3±0,3 ve G-CSF uygulanmayan grupta %0,2±0,3) ise çok düşük oranlarda bulunduğu saptanmıştır. CB1 reseptör dağılımı, MKH'lerde MNH ve CD34⁺ hücrelere göre anlamlı olarak azdı (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). G-CSF uygulanan gruptaki MNH'ler ile CD34⁺ hücrelerdeki CB1 reseptör dağılımı, G-CSF uygulanmayan gruba göre anlamlı olarak daha fazlaydı (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,004$) (Şekil 4.4; EK-1B).

Deney ve kontrol gruplarındaki **CB2 reseptörlerinin**, CB1 reseptörlerine benzer biçimde CD34⁺ hücreler (G-CSF uygulanan grupta %47,1±34,7 ve G-CSF uygulanmayan grupta %43,2±23,0) ve MNH'lerde (G-CSF uygulanmayan grupta %25,9±26,2 ve G-CSF uygulanmayan grupta %22,5±15,6) yüksek oranda bulunduğu; MKH'lerde (G-CSF uygulanan grupta %0,5±0,5 ve G-CSF uygulanmayan grupta %0,3±0,2) ise bunlara göre anlamlı olarak çok düşük oranlarda olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,004$). G-CSF uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait MNH, CD34⁺ ve MKH'lerdeki CB2 reseptör dağılımı birbiriyle farklılık göstermedi ($p>0,05$) (Şekil 4.4; EK-2).

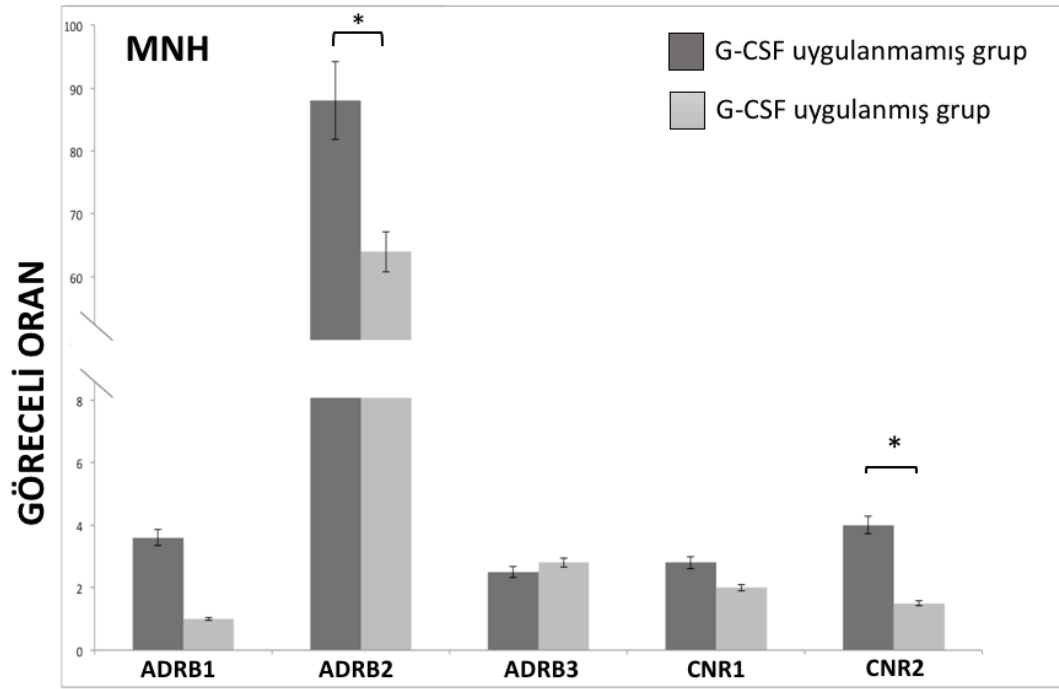


Şekil 4.4. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlere ait MNH, CD34⁺ hücre ve MKH'lerin akım sitometrideki yüzde işaretlenme oranları görülmektedir. Üçlü gruplarda sırasıyla G-CSF uygulanmayan ve uygulanan MNH, CD34⁺ hücre ve MKH'ler verilmiştir. Gruplarda sırasıyla β 1, β 2 ve β 3-AR; CB1 ve CB2 reseptörleri için işaretlenme oranları verilmiştir. (*) $p < 0.05$

4.3.2. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerde β -AR ve CB1, CB2 reseptörlerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi

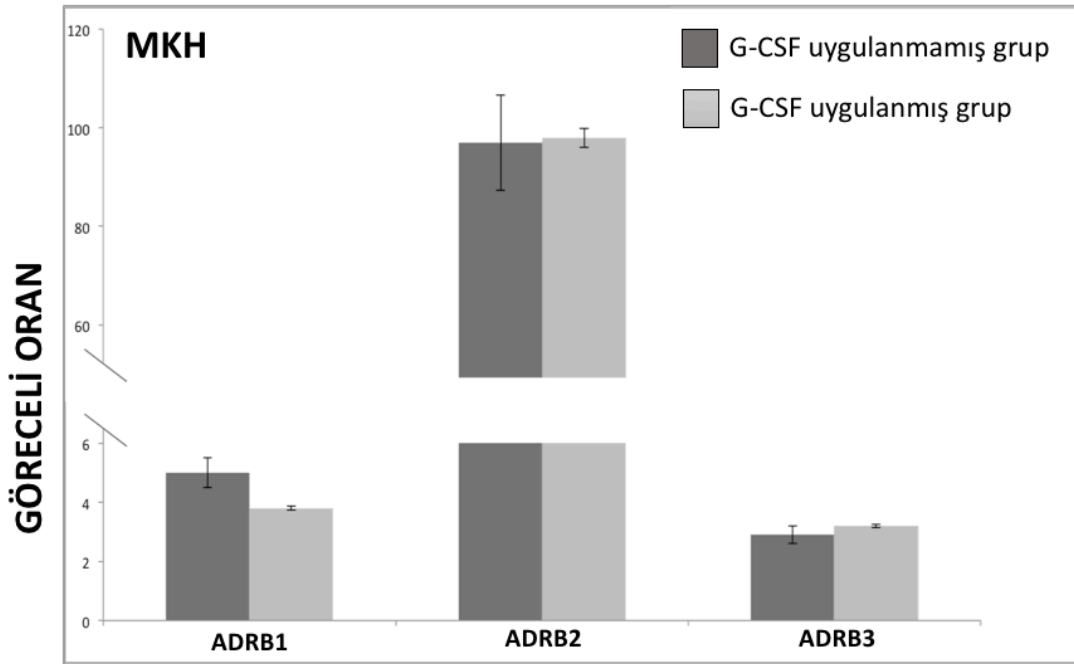
İzole edilen total RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR analizi yapılmış ve kat artış değerleri göz önünde bulundurularak kantitasyon gerçekleştirilmiştir. Deney ve kontrol gruplarına ait MNH ve MKH'lerde β 1 (*ADRB1*), β 2 (*ADRB2*), β 3-AR (*ADRB3*); MNH'lerde CB1 ve CB2 reseptörlerine ait (*CNR1* ve *CNR2*) genlerin ifadeleri saptanmıştır.

G-CSF uygulanan (n=10) ve uygulanmayan (n=10) donörlere ait MNH'lerdeki reseptör ifadeleri karşılaştırıldığında, *ADRB2* ve *CNR2* gen ifade düzeylerinde anlamlı farklılık olduğu; G-CSF uygulanan donörlere ait MNH'lerde bu genlerin ifadelerinin uygulanmayan donör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artış gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla $p=0,016$ ve $p=0,041$) (Şekil 4.5). G-CSF uygulanan (n=10) ve uygulanmayan (n=10) donörlere ait MNH'lerdeki *ADRB1*, *ADRB3* ve *CNR1* gen ifade düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. qRT-PCR ile deney ve kontrol gruplarına ait MNH'lerdeki adrenerjik reseptör (*ADRB1*, 2, 3) ve cannabinoid reseptör (*CNR1* ve 2) gen ifadesi analizi sonuçları görülmektedir. Dikey eksen *ACTB* genine göre kat artış ifadesini göstermektedir. (*) $p < 0.05$

G-CSF uygulanan ($n=6$) ve uygulanmayan donörlere ait ($n=6$) MKH'lerde qRT-PCR yöntemi ile *ADRB1*, *ADRB2* ve *ADRB3* gen ifadesi saptanırken, cannabinoid reseptörlerine ait *CNR1* ve *CNR2* gen ifadesi saptanmamıştır. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış gruplara ait MKH'lerde β_1 , β_2 , β_3 -AR gen ifade düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.6).

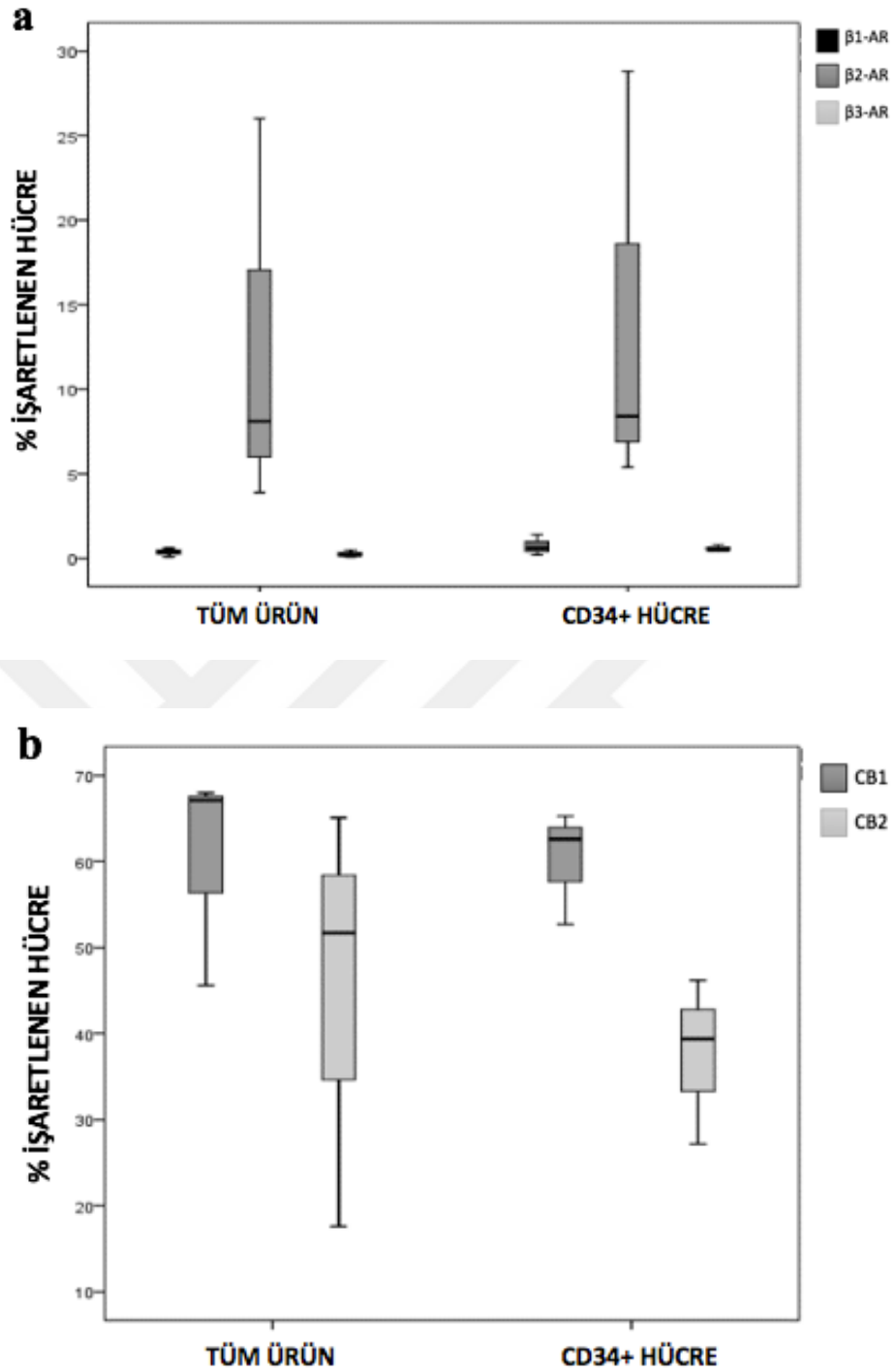


Şekil 4.6. qRT-PCR ile deney ve kontrol gruplarına ait MKH'lerdeki adrenerjik reseptör (*ADRB1*, 2 ve 3) ifadesi analizi sonuçları görülmektedir. *CNR1* ve *CNR2* gen analizi anlamlı sonuç vermediği için tabloya eklenmemiştir. Dikey eksen göreceli gen ifadesini göstermektedir. G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış gruplara ait MKH'lerde $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ -AR gen ifade düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

4.4. Hematopoetik kök hücrelerin endokannabinoidlere migrasyonunun incelenmesi

Bu iş paketinde hematopoetik hücre kaynağı olarak 3 adet sağlıklı donörden aferez yöntemi ile toplanan PKKH'lerin CD34, CD38 ve CD34/CD38 ikili işaretlenme yüzdeleri akım sitometri yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu yüzey belirteçleri ile aferez ürününün içerdiği hematopoetik kök ve/veya progenitör hücre miktarı belirlenmiştir. Hücrelerin CD34 işaretlenme yüzdesi $87,9 \pm 4,5$, CD38 işaretlenme yüzdesi $35,5 \pm 12,4$, CD34/CD38 ikili işaretlenme yüzdeleri $33,0 \pm 12,7$ olarak belirlenmiştir.

Akım sitometri yöntemiyle PKKH'lerinin $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ -AR, CB1 ve CB2 reseptörleri için işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır (Şekil 4.7).

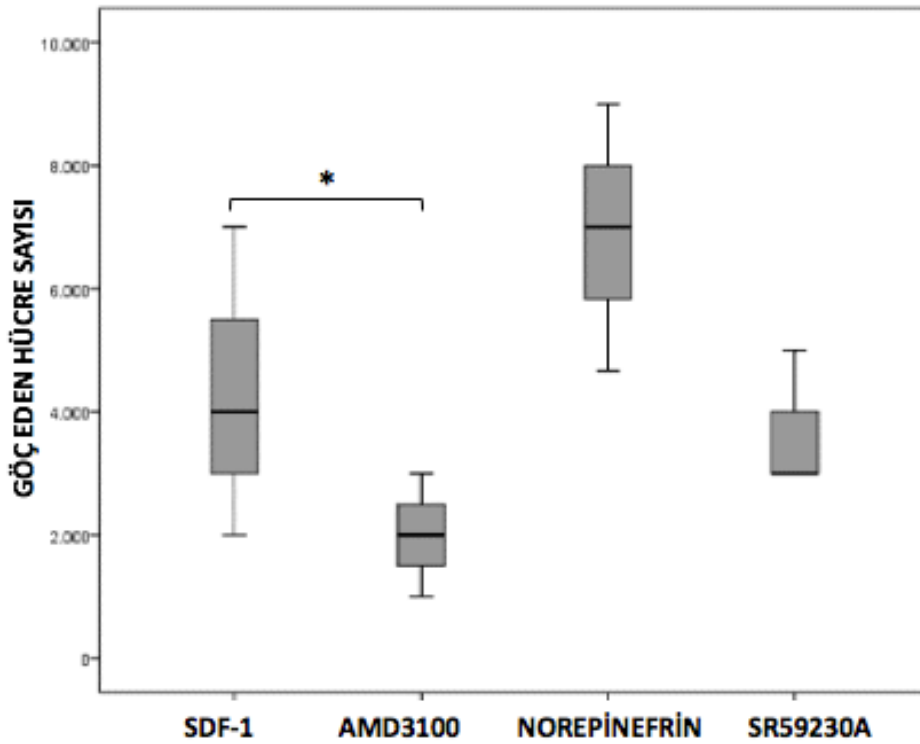


Şekil 4.7. PKKH'ların akım sitometri yöntemi ile β 1, β 2, β 3-AR (a), CB1 ve CB2 reseptörleri (b) için işaretlenme yüzdeleri görülmektedir. Her reseptör için sırasıyla MNH'lerin (tüm ürün) ve CD34⁺ hücrelerin işaretlenme yüzdeleri verilmiştir.

Şekil 3.3'de belirtilen gruplara göre kurulan deneyde 4 saatin sonunda göç eden MNH'ler Turk's boyası kullanılarak sayılmıştır. Deney 3 paralelli ve farklı

donörden elde edilen MNH hücreler ile 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan kimyasalların bilgileri ve dozları Tablo 3.4’de yer almaktadır.

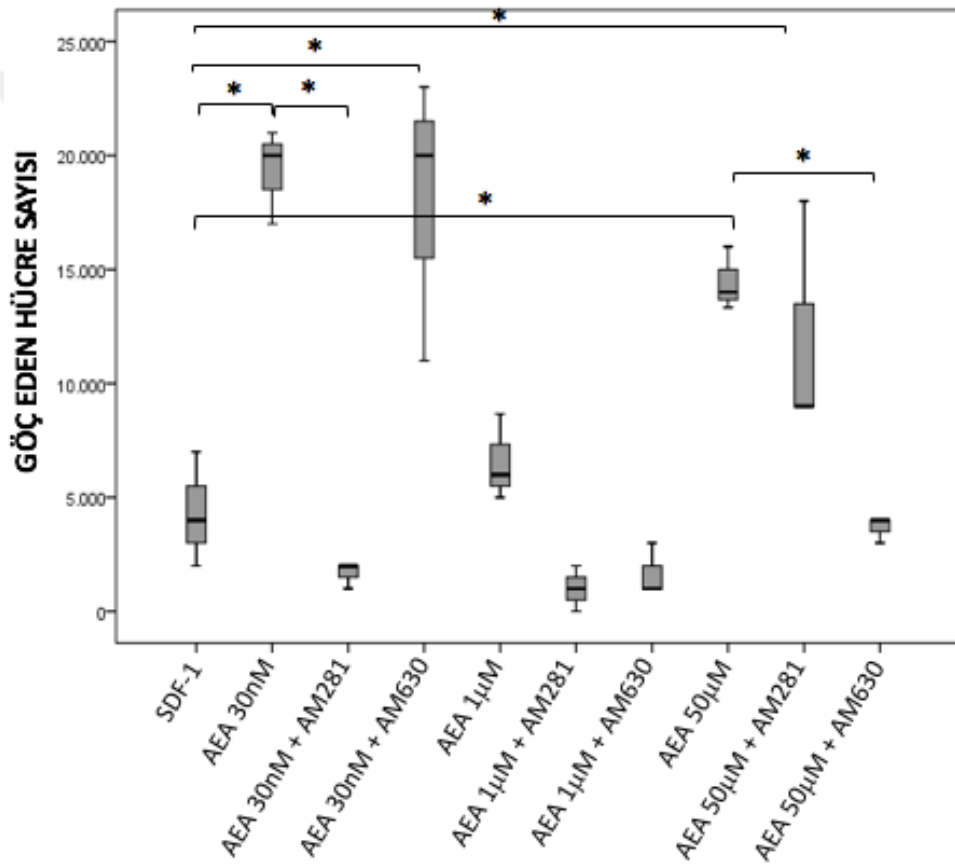
Elde edilen sonuçlara göre PKKH’lerinin SDF-1’e göçleri SDF-1 inhibitörü AMD3100 ile anlamlı olarak inhibe olurken ($p=0,027$); norepinefrine doğru göçleri β -AR inhibitörü SR59230A ile inhibe olmaktadır. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Şekil 4.8). Kontrol olarak, kemoatraktan madde olmadan HKH göçü analiz edilmiş ancak göç gözlenmediği için grafiklere eklenmemiştir.



Şekil 4.8. Hematopoetik hücrelerin kemoatraktanlara (SDF-1 ve norepinefrin) ve onların inhibitörlerine (AMD3100 ve SR59230A) doğru göçleri sonucu elde edilen hücre sayımları gösterilmektedir. Dikey eksen göç eden hematopoetik hücre sayısını; test edilen etken maddeleri göstermektedir. HKH’lerin SDF-1’e ve norepinefrine doğru göçünün sırasıyla SDF-1’in reseptörüne bağlanmasını bloke eden AMD3100 ve β -AR blokörü SR59230A ile inhibe olduğu görülmektedir. (*) $p<0.05$

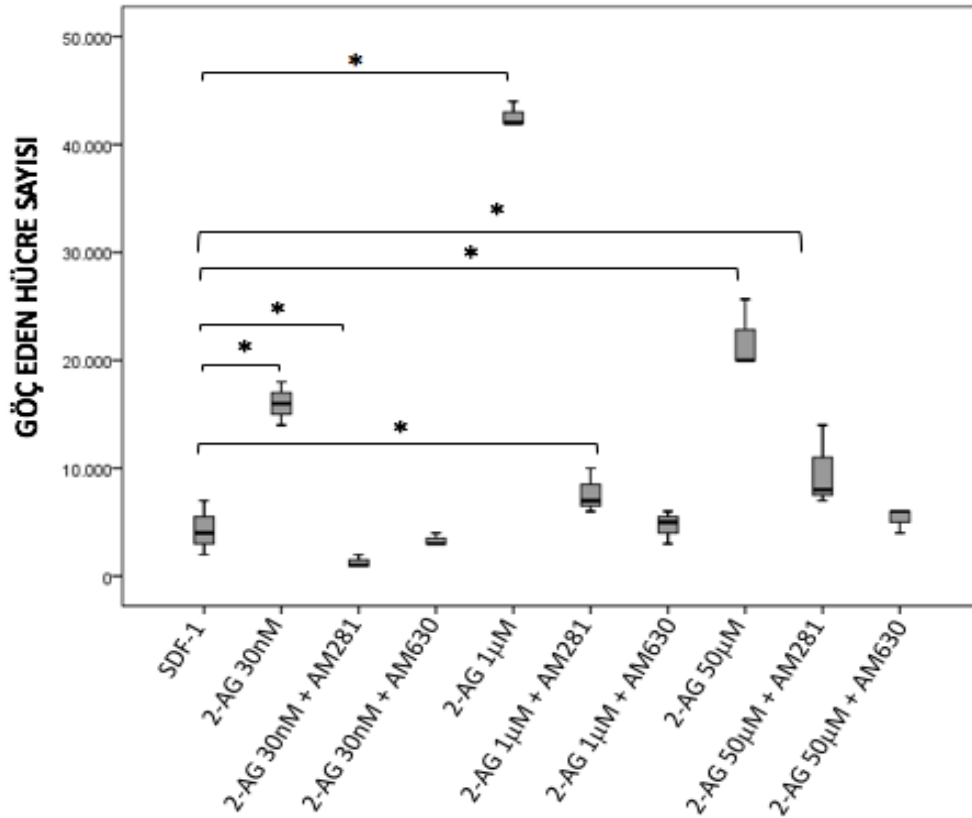
AEA’ya doğru göç eden hematopoetik hücrelerin sayısının SDF-1 uygulamasına oranla artmış olduğu belirlenmiştir. Bu artış tüm dozlarda (30 nM, 1 μ M, 50 μ M)

geçerli olmakla beraber, 30 nM ve 50 μ M AEA'ye göç istatistiksel olarak anlamlıdır (sırasıyla $p= 0.027$ ve $p= 0.028$). CB1 ve CB2 antagonistleri ile göç inhibe anlamlı biçimde inhibe olmuştur. AEA ile birlikte selektif CB1 antagonisti AM281 ve zayıf CB2 antagonisti AM630 uygulandığında göç eden hücre sayısı azalmıştır. 30 nM AEA'ye göç eden hücre sayısı AM281 ile anlamlı olarak azalma gösterirken ($p= 0,028$); 50 μ M AEA'ye göç AM630 ile anlamlı biçimde ($p= 0,027$) inhibe olmuştur (Şekil 4.9). Kontrol olarak, kemoatraktan madde olmadan HKH göçü analiz edilmiş ancak göç gözlenmediği için grafiklere eklenmemiştir.



Şekil 4.9. SDF-1, AEA ve CB1, CB2 antagonistlerine (AM281 ve AM630) doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir. Dikey eksen göç eden PKKH sayısını; yatay eksen test edilen etken maddeleri göstermektedir. PKKH'lerin AEA'ye doğru SDF-1'e oranla daha fazla göç ettiği; göçün antagonistler ile bloke olduğu görülmektedir. (*) $p < 0.05$

Endokannabinoidlerden 2-AG, daha çok CB2 reseptörleri, daha az olarak da CB1 reseptörleri üzerinden etki göstermektedir. 2-AG ile güçlü CB2 reseptör antagonisti AM630 ve zayıf CB2 antagonisti AM281 ile yapılan migrasyon deneyinde 2-AG'e doğru göç eden PKKH'lerin sayısının SDF-1'e göç edenlere oranla anlamlı biçimde artmış olduğu belirlenmiştir (30 nM için $p = 0.027$, 1 μM için $p = 0.027$, 50 μM için $p = 0.028$). Bu artış her üç dozla sağlanmışsa da 1 μM 2-AG uygulandığında en belirgin olarak gözlenmiştir. AM281 ve AM630 uygulamasıyla göç eden PKKH sayısı azalmaktadır (AM281 ve AM630 için sırasıyla 30 nM için $p=0.027$ ve $p=0.027$; 1 μM için $p=0.028$ ve $p=0.027$; 50 μM için $p = 0.028$ ve $p = 0.026$) (Şekil 4.10). Kontrol olarak, kemoatraktan madde olmadan HKH göçü analiz edilmiş ancak göç gözlenmediği için grafiklere eklenmemiştir.



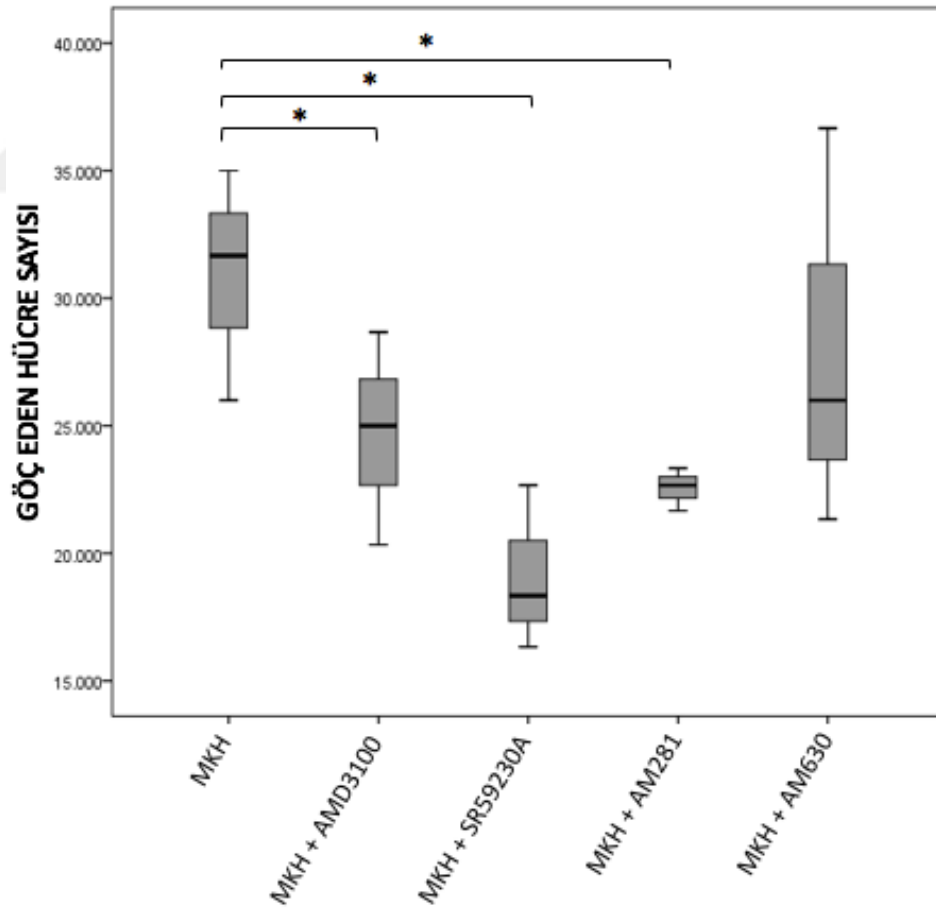
Şekil 4.10. SDF-1, 2-AG ve 2-AG ile birlikte CB reseptör antagonistlerine (AM281 ve AM630) doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir. Dikey eksen göç eden PKKH sayısını; yatay eksen test edilen etken maddeleri göstermektedir. PKKH'lerin

2-AG'e doğru, SDF-1'e göre daha fazla göç ettikleri; antagonistler ile göçün azaldığı görülmektedir. (*) $p < 0.05$

4.5.Hematopoetik kök hücrelerin antagonistler varlığında MKH'lere doğru migrasyonunun incelenmesi

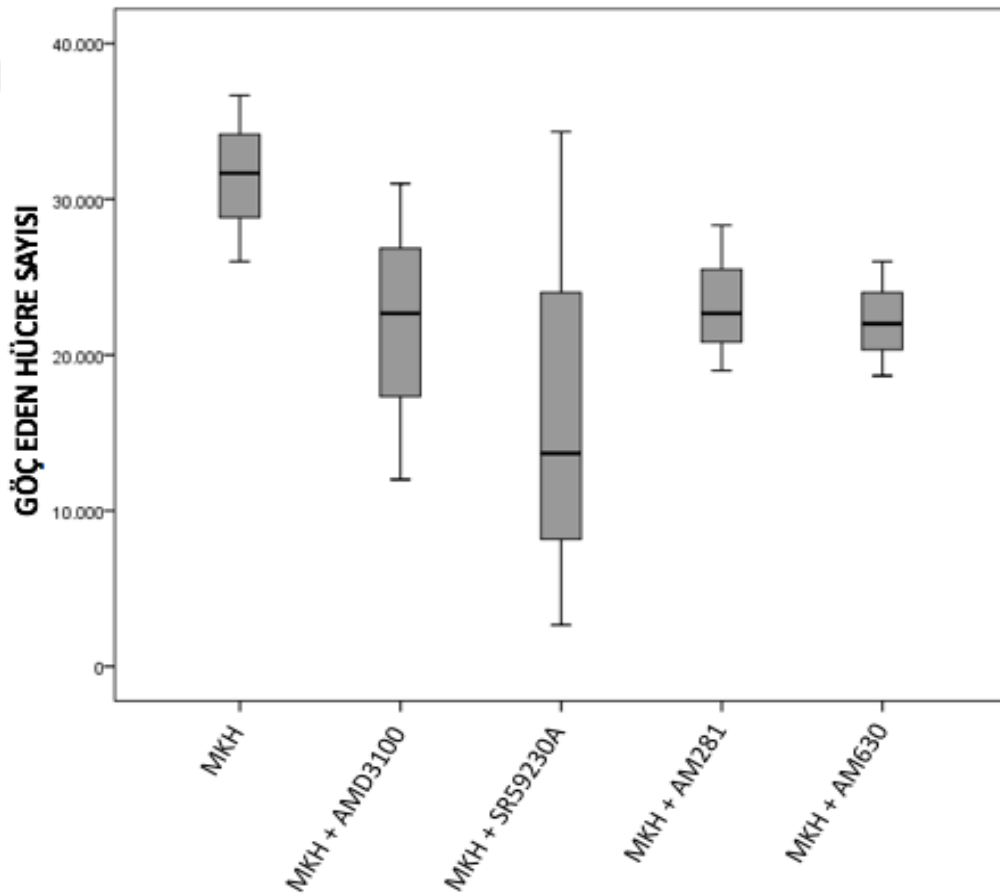
Bu iş paketinde 6 donöre ait PKKH'lerin G-CSF uygulanmış ve LPS ile uyarılmış MKH'lerine göçü incelenmiştir. Sonuçlar LPS uygulanan ve uygulanmayan MKH'ler olarak iki grupta incelenmiştir.

Şekil 4.11'de CXCR4, kannabinoid ve β -AR inhibitörleri varlığında, LPS uygulanan MKH'lere doğru göç eden PKKH sayısı görülmektedir. Buna göre, LPS ile uyarılan MKH'lere göç eden PKKH sayısı AMD3100 ($p=0,046$), SR59230A ($p=0,028$) ve AM281 ($p=0,028$) ile anlamlı olarak azalmaktadır.



Şekil 4.11. LPS ile uyarılmış MKH'lere doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir. AMD3100, SR59230A ve AM281 ile göç eden hücre sayısı anlamlı olarak azalmaktadır. (*) $p < 0.05$

Şekil 4.12'de CXCR4, kannabinoid ve β -AR inhibitörleri varlığında, LPS ile uyarılmayan MKH'lere doğru göç eden hematopoetik hücrelere ait sayısal veriler sunulmuştur. Buna göre, göç eden PKKH sayısı sırası ile SR59230A, AMD3100, AM630 ve AM281 ile azalmaktadır. Ancak inhibitör etki, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p \geq 0.05$).



Şekil 4.12. LPS ile uyarılmamış MKH'lere doğru göç eden PKKH sayıları gösterilmektedir. AMD3100, SR59230A, AM281 ve AM630 ile göç eden hücre sayısı azalmaktadır. Ancak antagonistlerin hiçbirisi için inhibitör etki istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamaktadır ($p \geq 0.05$).

5.TARTIŞMA

Kemik iliği mikroçevresi, HKH'lerin kendilerini yenileme, farklılaşma ve mobilizasyonlarının düzenli olarak gerçekleştiği özelleşmiş niş bölgelerini içerir (33, 34). Vücutta yaygın olarak etki gösterdiği bilinen endokannabinoid sisteminin Kİ'deki dağılımı sınırlı sayıda çalışmada bildirilmiştir (21, 27-30). Bazı endokannabinoidlerin sitokin aracılı HKH migrasyonunda rol aldığı bilinmektedir (23, 24). Endokannabinoidler Kİ mikroçevresinde MKH üzerinden adrenerjik nöral mekanizmalar ile benzer biçimde G-CSF ile ilişkili olarak HKH migrasyonunu düzenleyebilir. Tez çalışmasında, bu varsayım test edilmiştir.

Bu çalışmadaki tüm iş paketlerinden elde edilen veriler istatistiksel yöntemler ile değerlendirildiğinde, egzojen olarak uygulanan ve MKH'lerden salgılanan AEA ve 2AG'nin, in vitro ortamda G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış Kİ HKH'lerinin migrasyonunu, adrenerjik sinir aşırımı ile meydana gelen göçe benzer şekilde uyardığı saptanmıştır. Aşağıda; iş paketlerinden elde edilen veriler sırasıyla tartışılmış ve ardından her bölümle ilgili sınırlamalara yer verilmiştir. Sonuçlar bölümünde ise her iş paketinden elde edilen nihai sonuç özetlenmiştir.

G-CSF tedavisi uygulanan ve uygulanmayan donörlerden elde edilen Kİ MKH'leri fenotipik ve morfolojik olarak benzer bulunmuştur (İP1).

Deney düzeninde ön görüldüğü üzere kontrol ve deney gruplarını oluşturan sırasıyla G-CSF tedavisi uygulanmış (n=10) ve uygulanmamış (n=10), toplam 20 donöre ait örnekler elde edilmiştir. Her iki gruba ait demografik veriler değerlendirildiğinde, yaş olarak grupların benzer oldukları ve geçerli güvenilir biçimde kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır. Bundan sonra her iki gruptan elde edilen Kİ MNH'ler, çözme protokolü uygulanarak başarılı bir şekilde çözülmüş, sayılmış, yüzey antijenik özellikleri ve farklılaşma potansiyelleri değerlendirilmiştir. G-CSF uygulanan ve uygulanmayan donörlere ait MKH'lerin yüzey antijenik profili ile adipojenik ve osteojenik farklılaşma özelliklerinin, istatistiksel olarak benzer olduğu saptanmıştır. Osteojenik farklılaştırma yapılan MKH'lerin kontrollerine oranla kalsiyum fosfat miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış; adipojenik farklılaşmanın ORO boya ölçümü ile yapılan semi-kantitatif analizinde

deney grubunda kontrole göre anlamlı farklılık belirlenmemiştir. Bununla birlikte morfolojik olarak farkın saptanmış olması, bu deney için yeterli bir veri olarak kabul edilmiştir. Yine G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış sağlıklı donörlere ait Kİ CD34⁺ hücreler elde edilmiş; karakterizasyonları başarılı olarak tamamlanmıştır. Bu aşamalardan başarıyla geçen, her iki gruba ait hücreler gerekli iş paketlerinde kullanılmıştır. Bu ilk iş paketi, sonraki aşamalar için olmazsa olmaz bir aşama olduğundan, çalışmanın temel standardını oluşturmuştur.

Etik gerekçelerle insan kaynaklı örneklem sayısının az olması karakterizasyonu içeren bu iş paketi için sınırlama oluşturmaktadır. Ancak tüm deney paketlerinde kullanılan örneklem sayısı çalışmanın başlangıcında gerçekleştirilen güç analizi ile literatüre dayalı olarak hesaplandığından, sonuçların geçerlilik ve güvenilirliği literatürdeki diğer insan çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

AEA ve 2-AG'nin, tüm donörlere ait Kİ MKH'lerinden salgılandığı; PK ve Kİ nişinde bulunduğu belirlenmiştir (İP2).

2-AG seviyesi G-CSF uygulanan gruba ait PK plazmasında Kİ plazmasına göre anlamlı biçimde yüksek olarak saptanmıştır. Her iki grupta da 2-AG seviyesi, AEA seviyesine göre yüksek olsa da bu veri istatistiksel olarak anlamlı değildir. AEA, G-CSF uygulanmış ve uygulanmamış donörlere ait Kİ ve PK plazma örneklerinde benzer seviyelerde bulunmuştur. Endokannabinoidlerin sağlıklı donörlerin PK plazmalarındaki varlığı ile ilgili olarak yapılan literatür incelemesinde üç yayına rastlanmıştır. Sağlıklı donörlerin PK plazmalarında bulunan AEA ve 2-AG miktarlarının ölçüldüğü çalışmada AEA $0,8 \pm 0,12$ nM ve 2-AG $19,0 \pm 2,61$ nM olarak saptanmıştır (91). Bir diğer çalışmada, sağlıklı donörlerin PK plazmalarında AEA ve 2-AG düzeyleri sırası ile $0,56$ ng/ml ve $2,0$ ng/ml olarak saptanmıştır (92). Travmatik stres uygulaması sırasında alınan insan PK plazma örneklerinde AEA seviyesi $0,36 \pm 0,14$ ng/ml; 2-AG seviyesi $6,26 \pm 2,10$ ng/ml olarak saptanmıştır (93). Her üç çalışmaya ait veriler, bu tez kapsamında kullanılan LC-ESI-MS/MS yöntemi uygulanarak elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler, yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Literatürde AEA ve 2-AG düzeylerinin insan veya diğer deney hayvanlarının Kİ plazmasında ölçümüne ait bir yayına rastlanmamıştır. Çalışmamızda, deney ve kontrol grubuna ait Kİ ve PK plazmalarında AEA ve 2-AG'nin bulunduğu saptanmıştır. AEA düzeyi her iki grupta benzer olarak ölçülmüştür. Bununla birlikte, G-CSF uygulanan donör grubundaki 2-AG seviyesi PK plazmasında aynı grubun Kİ'ne göre anlamlı oranda yüksek olarak bulunmuştur. Bu veri, G-CSF uygulaması ile 2-AG salgılanması arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Tezin migrasyon iş paketlerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, özellikle 2-AG'nin 1µM dozda HKH'lerin migrasyonunu –SDF-1 ve AEA'e göre- daha çok arttırdığı görülmektedir. 2-AG'nin G-CSF uygulanan grupta Kİ'ne göre PK'da fazla olması, uygulanan G-CSF etkisi ile Kİ'nden salınan 2-AG'nin perifere geçerek HKH migrasyonunu yönlendirdiği düşünülebilir. Literatürde bu varsayımı destekleyecek bir bilgi bulunmadığından, ileri araştırmalar ile desteklenmelidir.

Çalışmamıza göre sağlıklı donörlere ait insan MKH'leri AEA ve 2-AG salgılamaktadır. MKH süpernatantlarındaki AEA ve 2-AG düzeyleri G-CSF alan ve almayan gruplarda benzerlik göstermektedir. Bu konu ile ilgili iki yayın bulunmaktadır. İnsan yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin süpernatantlarında gerçekleştirilen çalışmada AEA ve 2-AG sırasıyla, 3,5 pmol/mg protein ve 7,3 pmol/mg protein olarak ölçüldüğü bildirilmiştir (94). Rossi ve diğerlerinin gerçekleştirdiği çalışmada, farklı pasajlardaki insan Kİ MKH'leri, AEA ve 2-AG için analiz edilmiştir. En yüksek miktarda salgılama pasaj 1'de elde edilmiş; ileri pasajlarda salgı miktarının hızla düştüğü gözlenmiştir. Pasaj 1 MKH süpernatantında AEA seviyesi 5 pmol/mg protein; 2-AG seviyesi 11 pmol/mg protein olarak saptanmıştır (95). Tez kapsamındaki bu iş paketinde ve PKKH:MKH ko-kültür çalışmasında (İP5) pasaj 1 MKH'ler kullanılmıştır. Çalışmamızda MKH süpernatantında endokannabinoidler nmol/L birimi üzerinden LC-ESI-MS/MS yöntemi kullanılarak rapor edilmiştir. Buna göre MKH süpernatantlarındaki AEA ve 2-AG düzeyleri doğrudan sıvı fazdan ölçülmüştür. Rossi ve diğ. ile Ivanov ve diğ.'nin yaptıkları çalışmada, bizimle benzer olarak LC-ESI-MS/MS tekniği uygulanmakla beraber; örneklerin toplam kuru protein miktarı ölçülmüş; AEA ve 2-AG düzeyleri bunlar üzerinden oranlanarak hesaplanmıştır. Bu nedenle elde edilen sayısal veriler, bizim verilerimizle sağlıklı olarak karşılaştırılamamıştır.

Kİ MNH'lerinin ve CD34⁺ hücrelerin CB1, CB2 ve β -AR'leri eksprese ettiği saptanmıştır (İP3).

Akım sitometri çalışması ile MNH'lerin ve CD34⁺ hücrelerin her iki grupta CB1 ve CB2 reseptörlerini MKH'lere göre anlamlı olarak yüksek düzeyde eksprese ettiği gösterilmiştir. qRT-PCR ile MNH'lerde CB1 ve CB2 gen ekspresyonu saptanırken, MKH'lerde bu genlerin ekspresyonuna rastlanmamıştır. CB1 ve/veya CB2 reseptörlerinin hematopoetik hücrelerde dağılım gösterdiğini bildiren sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır (22, 28). CB1 reseptör ekspresyonu tek bir kemirici T-lenfoid hücre hattında saptanırken; CB2 reseptörü çeşitli miyeloid, makrofaj, eritroid, B/T-lenfoid ve mast hücre hatlarında bulunmuştur (22). Diğer çalışmada, akım sitometri yöntemi ile sıçan Kİ hücrelerindeki CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonları analiz edilmiştir. Buna göre CB1 ekspresyonu MKH'lerde % 4.8 ve HKH'lerde % 13.8; CB2 ekspresyonu MKH'lerde % 3.9 ve HKH'lerde % 12.1 olarak saptanmıştır (28). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler ile insan primer Kİ hücrelerinde kannabinoid reseptörleri ilk kez gösterilmiştir. Elde ettiğimiz veriler ile literatürdeki veriler karşılaştırıldığında; MKH'lerde daha düşük (CB1 ve CB2 reseptörleri akım sitometri çalışmasında sıfıra yakın; qRT-PCR çalışmasında hiç saptanamamıştır), CD34⁺ hücrelerde ise daha yüksek (CB1 ve CB2 reseptörleri akım sitometri çalışmasında sırasıyla G-CSF uygulanmayan grup için %21,50 (2,6-97,2) ve %34,20 (1,0-92,3); G-CSF uygulanan grup için %46,40 (3,9-86,5) ve 37,80 (0,4-80,5) bulunmuştur. Veriler arasındaki varyasyonun tür farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda, CB1 ekspresyonu en fazla CD34⁺ hücrelerde saptanmıştır ve bu yüksekliğin G-CSF uygulanmayan grupta MNH ve MKH'lere göre anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu veri qRT-PCR yöntemi ile de doğrulanmıştır. CD34⁺ hücrelerin kök hücre potansiyalleri yüksek olduğu için ve stres ve enfeksiyon durumlarında rejenerasyonu sağlayacak asıl hücre grubu olduklarından bu hücrelerde farklılaşmış hücrelere oranla yüksek kannabinoid reseptör ekspresyonu beklenebilir.

Çalışmamızda, akım sitometri ve qRT-PCR yöntemi ile MNH ve MKH'lerin akım sitometri ile CD34⁺ hücrelerin değişen oranlarda β -AR alt tiplerini eksprese ettiği gösterilmiştir. Her iki gruptaki akım sitometriyle CD34⁺ hücreler β 2 ve β 3-AR'leri aynı grubun MNH ve MKH'lerine göre yüksek miktarda eksprese etmektedir. Ancak fark β 3-AR için istatistiksel olarak anlamlıdır. Tez kapsamında analiz edilen hücrelerdeki β -AR dağılımı genel olarak daha önce yayınlanan çalışmalara ait veriler ile benzerlik göstermektedir (5, 6, 37, 43, 44). Lin^- , Sca1^+ , CD117^+ fare Kİ HKH'leri ile yapılan çalışmada β 2-AR ekspresyonu akım sitometri ve konfokal mikroskopi yöntemleri ile analiz edilmiş ve akım sitometri çalışmasında β 2-AR ekspresyonu %90 olarak rapor edilmiştir (43). Birçok çalışmada, β -AR ekspresyonu gösterilmeden, agonist ve antagonistler üzerinden uyarılan göç mekanizması işlevsel olarak araştırılmıştır. β -AR antagonistler uygulanarak gerçekleştirilen fonksiyonel bir çalışmada; β 2 ve β 3-AR uyarımının sıçan hematopoetik progenitor hücre (HPH) (44) ve fare HKH ve HPH'lerinin (5) göçünü arttırdığı belirlenmiştir. Diğer çalışmada, egzojen olarak norepinefrin uygulanmasının insan Kİ CD34⁺ HPH proliferasyonunu arttırdığı ve β 2-AR üzerinden göç mekanizmasını uyardığı saptanmıştır (6). Fare Kİ MKH'lerinde β 2 ve β 3-AR aktivasyonu ile SDF-1'in azaldığı ve HPH'lerde G-CSF aracılı migrasyonun düzenlendiği belirlenmiştir (37). Moleküler biyolojik ve fonksiyonel parametreleri kullanarak Kİ'de β adrenerjik sinir aşırımını ortaya koyan yayınlar, bu tez çalışmasına da temel oluşturmuştur. Sempatik sinir uyarımına bağlı olarak ortaya çıkan ve çalışmamıza dayanak oluşturan β -AR reseptör aracılı HKH göçü, endokannabinoidlerle karşılaştırmalı olarak İP5'te tartışılmıştır.

Bu iş paketinde donörlerin Kİ'nden elde edilen CD34⁺ hücrelerin sayıca az olmasından dolayı, bu hücrelerde CB1, CB2 reseptörleri ve β -AR'ler qRT-PCR yöntemi ile analiz edilememiştir. Fakat CD34⁺ hücrelerin β -AR ve CB1, CB2 reseptör ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile analiz edilmiş ve literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

PKKH'lerin SDF-1, NE, AEA ve 2-AG'e doğru göç ettiği ve bu göçün spesifik reseptör antagonistleri ile inhibe olduğu gösterilmiştir (İP4).

Kİ mikroçevresindeki membrana bağlı veya solubl haldeki SDF-1 seviyesi HPH'lerin PK'a mobilizasyonunun göstergesidir (45). Membrana bağlı haldeki SDF-1 ile reseptörü CXCR4 ile arasındaki etkileşimin bozulması ve solubl durumdaki SDF-1'in artışı ile HKH'ler endosteal nişten ayrılır, farklılaşır ve perivasküler nişe ilereyerek periferde mobilize olur (45). Buna dayalı olarak kurguladığımız migrasyon deneyinde PKK'ların SDF-1'e göçleri kontrol olarak kullanılmış ve reseptör antagonistleri ile reseptör aracılı spesifik etkinin varlığı denetlenmiştir. PKK'ların SDF-1'e göçleri SDF-1 inhibitörü AMD3100 ile inhibe olurken; norepinefrine doğru göçleri β -AR inhibitörü SR59230A ile inhibe olmuştur. PKK'ların AEA ve 2-AG'ye SDF-1'e oranla daha fazla göç ettiği ve bu göçün CB1 ve CB2 reseptörleri aracılı gerçekleştiği belirlenmiştir.

30 nM, 1 μ M ve 50 μ M AEA'ye doğru göç eden PKK sayısının SDF-1'e göç edenlerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Göç, 30 nM ve 1 μ M dozda AEA ile en belirgindir. 30 nM AEA'ye göç, güçlü CB1 reseptör antagonisti AM281 ile; 1 μ M AEA'ye göç ise, AM281 ve CB2'ye afinitesi daha yüksek olan AM630 ile anlamlı biçimde bloke olmuştur. Bu sonuçlar, AEA'nın öncelikli olarak CB1 reseptörleri aracılığıyla doz bağımlı ve spesifik olarak HKH göçünü arttırdığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, AEA'nın CB1 reseptörleri aracılığıyla doz bağımlı ve spesifik olarak HKH göçünü arttırdığını göstermektedir.

30 nM, 1 μ M ve 50 μ M dozda 2-AG'ye doğru göç eden PKK sayısının SDF-1'e göç edenlere oranla anlamlı biçimde yüksek olduğu belirlenmiştir. 1 μ M 2-AG'ye göç eden hücre sayısı en fazladır. Göç eden hücre sayısında güçlü CB2 reseptör antagonisti AM630 daha belirgin olmak üzere anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, 2-AG'nin ağırlıkla CB2 reseptörleri aracılığıyla doz bağımlı ve spesifik olarak PKK göçünü arttırdığını göstermektedir.

2-AG, daha çok CB2 reseptörleri, daha az olarak da CB1 reseptörleri üzerinden etki göstermektedir (96). 2-AG ile güçlü antagonisti AM630 ve zayıf antagonisti AM281 ile yapılan migrasyon deneyinde 2-AG'e doğru göç eden PKKH sayısının SDF-1'e göç edenlere oranla anlamlı biçimde artmış olduğu belirlenmiştir. Bu artış her üç doz (30 nM, 1 µM, 50 µM) için geçerli olsa da özellikle ilaç 1 µM dozda uygulandığında daha belirgindir. Antagonistler uygulandığında göç eden hücre sayısında azalma olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, 2-AG'nin ağırlıkla CB2 reseptörleri aracılığıyla doz bağımlı ve spesifik olarak HKH göçünü arttırdığını göstermektedir.

Kemik iliğinde endokannabinoid aracılı hücre migrasyonuna ait dört çalışmaya rastlanmıştır. Jorda ve diğ.'lerinin transvel assay kullanılarak gerçekleştirdiği çalışmada genetik olarak CB2 ekspresyonu arttırılan kemirici miyeloid lösemi hücrelerine uygulanan 1 µM dozda AEA, ve 300 nM ve 1 µM dozlarda 2-AG'nin kemoatraktan etkili olduğu belirlenmiştir (21). Benzer yöntem ile CB1 ekspresyonu arttırılan HEK293T hücrelerine 3 farklı kimyasal özelliğe sahip CB1 reseptör agonisti uygulandığında [HU-210, WIN55212-2 ve AEA (50 µM)] bu hücrelerde migrasyonun arttığı transvel assay ile gösterilmiştir (87). Diğer çalışmada; 0.25 µM dozda uygulanan 2-AG and AEA'nın 8–12 haftalık fare Kİ MNH'lerinin migrasyonunu sağladığı *in vitro* koşullarda gösterilmiştir (24). Yeni doğan fare neopalya mikroglia hücrelerinin ve bir kemirici mikroglia hücre hattı olan BV-2 hücrelerinin CB1 ve CB2 reseptörlerini eksprese ettiği ve AEA ve 2-AG ile bu reseptörler üzerinden migrasyonun sağlandığı *Boyden chamber* kullanılarak gösterilmiştir (88). Tez kapsamında yapılan yapılan *transvel migrasyon assay* deneyinin sonuçları ile literatürden elde edilen veriler karşılaştırıldığında; çalışılan ve migrasyonda etkili olan endokannabinoid dozlarının benzer olduğu görülmektedir. Ayrıca AEA ve 2-AG'nin kannabinoid reseptörleri üzerinden etkili olduğu literatürle uyumlu olarak bu çalışmada da gösterilmiştir.

Oluşturulan *transvel assay* sisteminde migrasyonun etkili olarak ölçülebilmesi için kannabinoid reseptörlerini ve β-AR'leri en fazla eksprese eden hücre grubu olan CD34⁺ hücreler kullanılmıştır. Etik sınırlamalardan dolayı Kİ örneklerinin kısıtlı miktarda kullanılabilmesi, buna karşın transvel assay yönteminin

çok sayıda grup ve tekrar gerektirmesi nedeniyle bu deneyde aferez ürününden elde edilen PKKH'ler kullanılmıştır. Bu durum, migrasyon iş paketi ile ilgili olarak bir sınırlama olarak değerlendirilebilir. Sınırlamayı aşmak üzere, Kİ mikroçevresindeki CD34⁺ hücrelerin özelliklerini yansıtabildiklerini kanıtlamak amacı ile bu hücreler (i) CD34 ve CD38 yüzey belirteçleri için ve (ii) CB1, CB2 reseptörleri ve β -AR'lerin varlığı için analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hücrelerin kök hücre niteliğinde oldukları ve CB1, CB2 reseptörleri ve β -AR'leri taşıdıkları belirlenmiştir.

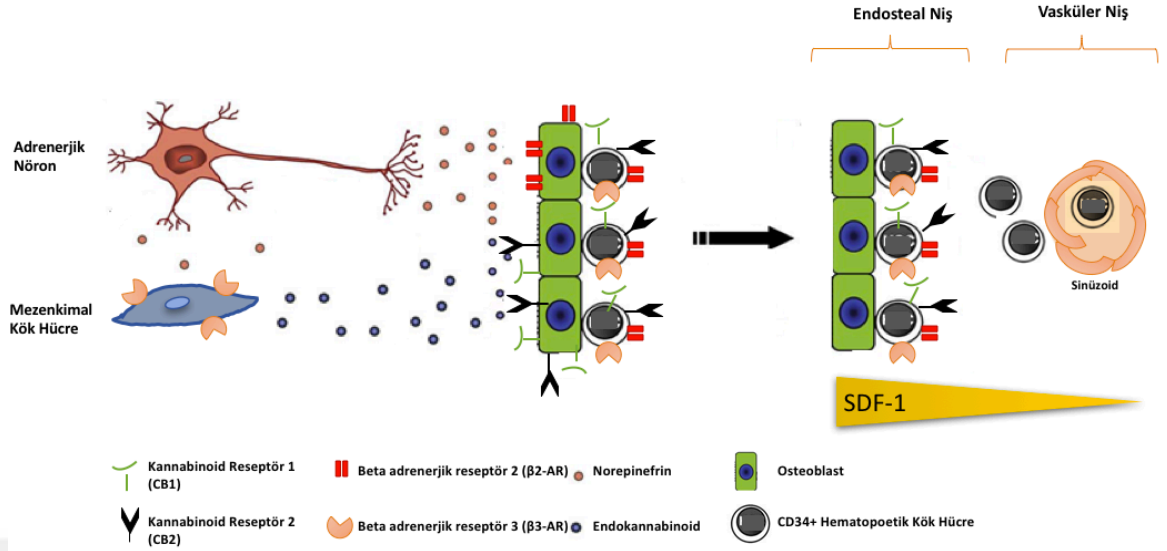
Bu tez kapsamında *transvel* deney sistemi ile in vitro koşullarda oluşturduğumuz düzenek, vücuttaki gerçek üç boyutlu Kİ mikroçevresi yapısına kısmen benzerlik göstermektedir. Bu durum, migrasyon iş paketinin sınırlaması olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle, oluşturulan migrasyon modelinin in vivo hayvan deneyleriyle teyid edilmesi gerekmektedir. İn vivo hayvan modellerinde etkinin tekrarlanabilirliği ölçüsünde geçerlilik ve güvenilirliği kanıtlanabilecektir. Bununla birlikte farklı deney hayvanı türlerindeki endokannabinoid salgılama ve/veya kannabinoid reseptör ekspresyon profili farklılık gösterebileceğinden, insan Kİ'ndeki mobilizasyon mekanizmasını tam olarak yansıtmayabilir. Buradan yola çıkılarak, sunulan sonuçlar insan örnekleri kullanılarak elde edildiği için literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

PKKH'ların MKH'lere doğru göçü kannabinoid reseptör ve β -AR antagonistleri ile inhibe olmuştur (İP5).

Çalışmamızda PKKH'ların G-CSF uygulanmış ve LPS ile uyarılmış MKH'lere göçü ko-kültür deney sistemi kullanılarak incelenmiştir. LPS bakteriyel enfeksiyonu taklit ederek MKH'ler gibi Kİ mikroçevresindeki hücreleri uyarır ve G-CSF salınımı, adezyon moleküllerinin etkileşiminin bozulması gibi bir dizi olay ile HKH mobilizasyonuna neden olmaktadır (41, 97, 98). Bu nedenle tez kapsamında yapılan HKH:MKH ko-kültürü çalışmasında MKH'ler LPS ile uyarılarak migrasyon mekanizması incelenmiştir. Kontrol olarak LPS ile uyarılmayan MKH'ler kullanılmıştır.

Sonuçlar LPS ile uyarılan ve uyarılmayan MKH'ler olarak 2 grupta incelenmiştir. CXCR4, kannabinoid (CB1, CB2) reseptörler ve β -AR inhibitörleri varlığında, LPS ile uyarılan MKH'lere doğru göç eden PKKH sayısı sırası ile SR59230A, AMD3100 ve AM281 (CB1 reseptör antagonisti) ile anlamlı azalma göstermiştir. Azalma AM630 (CB2 reseptör antagonisti) ile de gözlenirse de veri istatistiksel olarak anlamlı değildir. LPS uyarısı yapılmayan MKH'lere göç; sırası ile SR59230A, AM630, AMD3100 ve AM281 ile azalma göstermiş ama bu azalma hiçbir inhibitör uygulaması için anlamlı düzeye ulaşmamıştır. MKH aracılı PKKH göçünde endokannabinoidlerin rolü daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışma kapsamında AEA ve 2-AG'nin Kİ MKH'lerinden endojen olarak salgılandığı ve MKH'lerin bu endokannabinoidler aracılığı ile CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden PKKH göçünü desteklediği *in vitro* koşullarda gösterilmiştir.

Sonuç olarak Kİ mikroçevresindeki mobilizasyon sürecinde osteoblastlar ve diğer stromal hücrelerden salınan G-CSF, HKH'lerin çoğalma ve farklılaşmasını uyarır (3, 10). Klinikte, egzojen olarak yüksek konsantrasyonlarda G-CSF verilmesi HKH'lerin ilikten mobilizasyonunu sağlar (9). G-CSF aracılı mobilizasyon, tam olarak aydınlatılmamış birden fazla mekanizmayla gerçekleşebilir. Bunlardan birisi G-CSF ile ilik mikroçevresindeki sempatik sinir uyarımının artışı ve ilişkili endokannabinoid salımı olabilir. Bu tez çalışması kapsamında G-CSF tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış sağlıklı donörlerde Kİ ve/veya PK'daki HKH ve MKH'lerin β -AR'ler ile benzer biçimde endokannabinoid sistemi bileşenlerini bulduklarını ortaya konmuştur. Her iki gruptaki MKH'lerin AEA ve 2-AG salgılayarak, HKH'lerin taşıdıkları spesifik CB1 ve CB2 reseptörleri aracılığıyla, doz bağımlı olarak; ve sempatik sinir aşırıdaki β -AR'ler ile benzer biçimde HKH'lerin Kİ'nden göç sürecinde rol alabildiği *in vitro* koşullarda gösterilmiştir. Şekil 5.1'de tezde önerilen mekanizmaya ait ortaya konulan bulgular özetlenmiştir. Buradan hareketle endokannabinoid sistemi bileşenleri *in vivo* hayvan modellerinde ve klinikte yapılacak çalışmalarda diğer mobilizasyon stratejileri arasında temel olarak HKH'lerin MKH'lerle olan etkileşimi üzerinden yerini almak için hazırdır.



Şekil 5.1. HKH migrasyon/mobilizasyonunda endokannabinoid sisteminin etkisi. Tez kapsamında yapılan çalışmalar ile, endokannabinoidlerden AEA ve 2-AG'nin, G-CSF tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış donörlere ait Kİ MKH'lerinden salgılandığı; PK ve Kİ nişinde bulunduğu; Kİ MNH'lerinin ve CD34⁺ hücrelerin cannabinoid reseptörleri CB1, CB2'yi ve β2, β3-AR'leri eksprese ettiği; PKKH'lerin SDF-1, norepinefrin, AEA ve 2-AG'ye doğru göç ettiği, bu göçün spesifik antagonistler ile; PKKH'lerin MKH'lere doğru göçünün cannabinoid reseptör CB1, CB2 ve β-AR antagonistleri ile inhibe olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ

1. Bu çalışmada G-CSF tedavisi uygulanan ve uygulanmayan donörlerden elde edilen Kİ MKH'lerinin fenotipik ve morfolojik olarak benzer olduğu belirlenmiştir.
2. Endokannabinoidlerden AEA ve 2-AG'nin, G-CSF tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış donörlere ait Kİ MKH'lerinden salgılandığı; PK ve Kİ nişinde bulunduğu gösterilmiştir.
3. Kİ MNH'lerinin ve CD34⁺ hücrelerin kannabinoid reseptörlerinden CB1, CB2 ve β_2 , β_3 -AR'leri eksprese ettiği belirlenmiştir.
4. PKKH'lerin SDF-1, norepinefrin, AEA ve 2-AG'ye doğru göç ettiği ve bu göçün spesifik antagonistler ile inhibe olduğu gösterilmiştir.
5. PKKH'lerin MKH'lere doğru göçünün kannabinoid reseptör CB1, CB2 ve β -AR antagonistleri ile inhibe olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
2. Wu L, Mo W, Zhang Y, Zhou M, Li Y, Zhou R, et al. Vascular and perivascular niches, but not the osteoblastic niche, are numerically restored following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2017.
3. Tay J, Levesque JP, Winkler IG. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int J Hematol*. 2017;105(2):129-40.
4. Spiegel A, Kalinkovich A, Shvitiel S, Kollet O, Lapidot T. Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment. *Cell Stem Cell*. 2008;3(5):484-92.
5. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.
6. Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, et al. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol*. 2007;8(10):1123-31.
7. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008;452(7186):442-7.
8. Motabi IH, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev*. 2012;26(6):267-78.
9. Bendall L. Extracellular molecules in hematopoietic stem cell mobilisation. *Int J Hematol*. 2017;105(2):118-28.
10. Civriz Bozdog S, Tekgunduz E, Altuntas F. The current status in hematopoietic stem cell mobilization. *J Clin Apher*. 2015;30(5):273-80.
11. Giralt S, Costa L, Schriber J, DiPersio J, Maziarz R, McCarty J, et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(3):295-308.

12. Basak GW, Urbanowska E, Boguradzki P, Torosian T, Halaburda K, Wiktor-Jedrzejczak W. Booster of plerixafor can be successfully used in addition to chemotherapy-based regimen to rescue stem cell mobilization failure. *Ann Transplant*. 2010;15(4):61-7.
13. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0028.
14. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, et al. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol*. 2016;7:470.
15. Hoggatt J, Pelus LM. Eicosanoid regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor trafficking. *Leukemia*. 2010;24(12):1993-2002.
16. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(9):973-81.
17. Mohle R, Bautz F, Denzlinger C, Kanz L. Transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. Role of chemotactic factors. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:26-34; discussion -5.
18. Diaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem*. 2005;5(7):619-30.
19. Yazulla S. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(5):501-26.
20. Mechoulam R. Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *Br J Pharmacol*. 2005;146(7):913-5.
21. Jorda MA, Verbakel SE, Valk PJ, Vankan-Berkhoudt YV, Maccarrone M, Finazzi-Agro A, et al. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*. 2002;99(8):2786-93.
22. Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, et al. Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood*. 1997;90(4):1448-57.

23. Jiang S, Fu Y, Avraham HK. Regulation of hematopoietic stem cell trafficking and mobilization by the endocannabinoid system. *Transfusion*. 2011;51 Suppl 4:65S-71S.
24. Patinkin D, Milman G, Breuer A, Fride E, Mechoulam R. Endocannabinoids as positive or negative factors in hematopoietic cell migration and differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2008;595(1-3):1-6.
25. Smith M, Wilson R, O'Brien S, Tufarelli C, Anderson SI, O'Sullivan SE. The Effects of the Endocannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol on Human Osteoblast Proliferation and Differentiation. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136546.
26. Gomez R, Conde J, Scotece M, Lopez V, Lago F, Gomez Reino JJ, et al. Endogenous cannabinoid anandamide impairs cell growth and induces apoptosis in chondrocytes. *J Orthop Res*. 2014;32(9):1137-46.
27. Jiang S, Alberich-Jorda M, Zagozdzon R, Parmar K, Fu Y, Mauch P, et al. Cannabinoid receptor 2 and its agonists mediate hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor cell mobilization. *Blood*. 2011;117(3):827-38.
28. Scutt A, Williamson EM. Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcif Tissue Int*. 2007;80(1):50-9.
29. Piszcz JA, Lemancewicz D, Kloczko J, Dzieciol J, Rusak M, Dabrowska M. Cannabinoid receptors expression in bone marrow trephine biopsy of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with purine analogues. *Exp Oncol*. 2007;29(3):221-5.
30. Idris AI, Ralston SH. Cannabinoids and bone: friend or foe? *Calcif Tissue Int*. 2010;87(4):285-97.
31. Mo FM, Offertaler L, Kunos G. Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol*. 2004;489(1-2):21-7.
32. Harvey RD, Kaufman JL, Johnson HR, Nooka A, Vaughn L, Flowers CR, et al. Temporal changes in plerixafor administration and hematopoietic stem cell mobilization efficacy: results of a prospective clinical trial in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(9):1393-5.

33. Beerman I, Luis TC, Singbrant S, Lo Celso C, Mendez-Ferrer S. The Evolving View of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Exp Hematol*. 2017.
34. Shimoto M, Sugiyama T, Nagasawa T. Numerous niches for hematopoietic stem cells remain empty during homeostasis. *Blood*. 2017.
35. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):693-9.
36. Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):376-89.
37. Mendez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:139-44.
38. Du Z, Wang L, Zhao Y, Cao J, Wang T, Liu P, et al. Sympathetic denervation-induced MSC mobilization in distraction osteogenesis associates with inhibition of MSC migration and osteogenesis by norepinephrine/adrb3. *PLoS One*. 2014;9(8):e105976.
39. Li H, Fong C, Chen Y, Cai G, Yang M. beta2- and beta3-, but not beta1-adrenergic receptors are involved in osteogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2010;496(2):77-83.
40. Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front Immunol*. 2015;6:301.
41. Burberry A, Zeng MY, Ding L, Wicks I, Inohara N, Morrison SJ, et al. Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling. *Cell Host Microbe*. 2014;15(6):779-91.
42. Hoggatt J, Pelus LM. Many mechanisms mediating mobilization: an alliterative review. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(4):231-8.
43. Muthu K, Iyer S, He LK, Szilagy A, Gamelli RL, Shankar R, et al. Murine hematopoietic stem cells and progenitors express adrenergic receptors. *J Neuroimmunol*. 2007;186(1-2):27-36.
44. Beiermeister KA, Keck BM, Sifri ZC, ElHassan IO, Hannoush EJ, Alzate WD, et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization is mediated through beta-2 and beta-3 receptors after injury. *J Trauma*. 2010;69(2):338-43.

45. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*. 2002;195(9):1145-54.
46. Aizpurua-Olaizola O, Elezgarai I, Rico-Barrio I, Zarandona I, Etxebarria N, Usobiaga A. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discov Today*. 2017;22(1):105-10.
47. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
48. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.
49. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):89-97.
50. Burstein SH. The cannabinoid acids, analogs and endogenous counterparts. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(10):2830-43.
51. ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Prog Chem Org Nat Prod*. 2017;103:1-36.
52. Castellanos D, Gralnik LM. Synthetic cannabinoids 2015: An update for pediatricians in clinical practice. *World J Clin Pediatr*. 2016;5(1):16-24.
53. Gurney SM, Scott KS, Kacinko SL, Presley BC, Logan BK. Pharmacology, Toxicology, and Adverse Effects of Synthetic Cannabinoid Drugs. *Forensic Sci Rev*. 2014;26(1):53-78.
54. Pertwee RG. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(7):1553-71.
55. Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66(2-3):101-21.
56. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(1):1-4.

57. Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;135(1-2):162-8.
58. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*. 2007;152(5):576-82.
59. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995;232(1):54-61.
60. Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, et al. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab*. 2009;10(2):139-47.
61. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
62. Idris AI, van 't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, et al. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med*. 2005;11(7):774-9.
63. Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, et al. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):696-701.
64. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1092-101.
65. Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16511-6.
66. Ross RA. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009;30(3):156-63.
67. Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2699-704.

68. Murataeva N, Straiker A, Mackie K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol*. 2014;171(6):1379-91.
69. Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, et al. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29817-27.
70. Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3104-16.
71. Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, et al. Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(2):935-9.
72. Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(6):850-7.
73. Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(20):9406-11.
74. Haring M, Kaiser N, Monory K, Lutz B. Circuit specific functions of cannabinoid CB1 receptor in the balance of investigatory drive and exploration. *PLoS One*. 2011;6(11):e26617.
75. Paladini A, Fusco M, Coaccioli S, Skaper SD, Varrassi G. Chronic Pain in the Elderly: The Case for New Therapeutic Strategies. *Pain Physician*. 2015;18(5):E863-76.
76. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2003;140(5):790-801.
77. Wang L, Yang T, Qian W, Hou X. The role of endocannabinoids in visceral hyposensitivity induced by rapid eye movement sleep deprivation in rats: regional differences. *Int J Mol Med*. 2011;27(1):119-26.
78. Henry RJ, Kerr DM, Finn DP, Roche M. For whom the endocannabinoid tolls: Modulation of innate immune function and implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;64:167-80.

79. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Konje JC, Bell SC, Teixeira NA. Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:121.
80. Zhang X, Maor Y, Wang JF, Kunos G, Groopman JE. Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. *Br J Pharmacol.* 2010;160(7):1583-94.
81. Matouk AI, Taye A, El-Moselhy MA, Heeba GH, Abdel-Rahman AA. The Effect of Chronic Activation of the Novel Endocannabinoid Receptor GPR18 on Myocardial Function and Blood Pressure in Conscious Rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;69(1):23-33.
82. Gyires K, Zadori ZS. Role of Cannabinoids in Gastrointestinal Mucosal Defense and Inflammation. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(8):935-51.
83. Dmitrieva N, Nagabukuro H, Resuehr D, Zhang G, McAllister SL, McGinty KA, et al. Endocannabinoid involvement in endometriosis. *Pain.* 2010;151(3):703-10.
84. Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, et al. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science.* 2016;352(6285):555-9.
85. du Plessis SS, Agarwal A, Syriac A. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(11):1575-88.
86. Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. Impact of Cannabis, Cannabinoids, and Endocannabinoids in the Lungs. *Front Pharmacol.* 2016;7:317.
87. Song ZH, Zhong M. CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(1):204-9.
88. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, et al. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci.* 2003;23(4):1398-405.
89. Knight JM, Szabo A, Zhao S, Lyness JM, Sahler OJ, Liesveld JL, et al. Circulating endocannabinoids during hematopoietic stem cell transplantation: A pilot study. *Neurobiol Stress.* 2015;2:44-50.

90. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(3):C675-82.
91. Jean-Gilles L, Feng S, Tench CR, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA, et al. Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2009;287(1-2):212-5.
92. Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F, et al. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J*. 2011;32(11):1369-78.
93. Hauer D, Schelling G, Gola H, Campolongo P, Morath J, Roozendaal B, et al. Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *PLoS One*. 2013;8(5):e62741.
94. Ivanov I, Borchert P, Hinz B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonylethanolamine, N-oleoylethanolamine, N-palmitoylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(6):1781-7.
95. Rossi F, Bernardo ME, Bellini G, Luongo L, Conforti A, Manzo I, et al. The cannabinoid receptor type 2 as mediator of mesenchymal stromal cell immunosuppressive properties. *PLoS One*. 2013;8(11):e80022.
96. Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*. 2000;57(5):1045-50.
97. Kota DJ, DiCarlo B, Hetz RA, Smith P, Cox CS, Jr., Olson SD. Differential MSC activation leads to distinct mononuclear leukocyte binding mechanisms. *Sci Rep*. 2014;4:4565.
98. Schuettpelz LG, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Front Immunol*. 2013;4:204.

8.EKLER

EK-1 LC/EPI/MS-MS yöntemi ile elde edilen datalar ng/ml birimi ile gösterilmiştir.

	G-CSF Uygulanmamış Grup		G-CSF Uygulanmış Grup	
	AEA (ng/ml)	2-AG (ng/ml)	AEA (ng/ml)	2-AG (ng/ml)
PK Plazma	28,12 (7,29-65,6)	49,65 (16,13-618,09)	21,56 (20,18-61,88)	626,98 (123,26-687,93)*
Kİ Plazma	27,60 (2,67-99,45)	26,66 (3,51-152,59)	6,05 (1,77-185,52)	11,63 (2,25-151,89)
MKH süpernatantı	1,95 (0,37-3,69)	0,85 (0,29-2,32)	1,36 (0,5-3,01)	0,55 (0,24-4,88)

EK-2 MNH, CD34⁺ hücre ve MKH'lerin akım sitometrideki yüzde işaretlenme yüzde sayısal verileri

	G-CSF Uygulanmamış Grup			G-CSF Uygulanmış Grup		
	MNH	CD34 ⁺ hücre	MKH	MNH	CD34 ⁺ hücre	MKH
CB1	18,10 (0,8-51,0)	21,50 (2,6-97,2)	0,20 (0,0-1,0)	20,50 (2,0-44,0)	46,40 (3,9-86,5)	0,15 (0,0-0,8)
CB2	25,40 (0,7-71,1)	34,20 (1,0-92,3)	0,35 (0,0-1,7)	20,40 (0,3-47,9)	37,80 (0,4-80,5)	0,20 (0,1-0,6)
β1-AR	18,30 (0,6-22,8)	22,80 (1,3-57,6)	4,00 (2,5-4,6)	14,25 (0,3-25,0)	30,65 (0,9-62,8)	2,75 (0,1-8,4)
β2-AR	4,30 (0,6-44,5)	18,20 (4,0-59,1)	0,55 (0,1-18,4)	4,60 (0,3-60,7)	7,50 (1,9-41,3)	0,75 (0,1-2,7)
β3-AR	34,20 (8,4-98,7)	92,60 (31,2-99,4)	28,95 (5,0-67,5)	30,90 (17,5-65,1)	93,60 (67,3-99,5)	15,55 (5,8-87,0)

EK-3



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
 Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
 E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

18 Nisan 2013

Sayı: 16969557 - 478

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 10.04.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/07
Proje No : GO 13/170 (Değerlendirme Tarihi 27.02.2013)
Karar No : GO 13/170 - 17

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, öğretim üyelerinden Prof.Dr. Petek Korkusuz'un sorumlu araştırmacı olduğu Doç. Dr. Emirhan Nemutlu, Prof.Dr. Duygu Çetinkaya ve Dr. Belgin Altun ile birlikte çalışacakları Uzm.Bio. Sevil Köse'nin tezi olan GO 13/170 kayıt numaralı ve "Endokannabinoidler ve Reseptörlerinin İnsan Hematopoetik Kök Hücreleri ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerindeki Varlığı ve Düzeyinin Araştırılması" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. N. Yıldırım Sara (Üye) | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevdal. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| İZİNLİ | İZİNLİ |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | GÖREVLİ |
| KATILMADI | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | |

EK-4**Tez çalışması ile ilgili Bildiriler****Uluslararası kongrede sunulan bildiriler**

- Sevil Köse, Çağla Köprü, Beren Karaosmanoğlu, Ekim Zihni Taşkıran, Fatima Aerts Kaya, Emirhan Nemutlu, Duygu Uçkan Çetinkaya, Petek Korkusuz. Mesenchymal stem cells regulate the hematopoietic stem cell mobilization through the endocannabinoids P025. ISSCR/ESGCT – International Society For Stem Cell Research Annual Meeting, 17-22 Ekim 2016, Floransa/İTALYA
- Sevil Köse, Fatima Aerts Kaya, Duygu Uçkan Çetinkaya, Petek Korkusuz. Endocannabinoids increase SDF-1 release from human mesenchymal stem cells. The 41st FEBS Congress. 03-08 Eylül 2016, kuşadası, TÜRKİYE, abstract no: 3730, Poster
- Sevil Köse, Fatima Aerts Kaya, İrem Akar Soycan, Emirhan Nemutlu, Çetin Kocaefe, Duygu Uçkan Çetinkaya, Petek Korkusuz. Endocannabinoids and their receptors are located on human bone marrow niche mesenchymal stem and hematopoietic progenitor cells. 24-27 June 2015, Stokholm, İSVEÇ, F-1082

Ulusal kongrede sunulan bildiriler

- Sevil Köse, Çağla Köprü, Beren Karaosmanoğlu, Ekim Zihni Taşkıran, Fatima Aerts Kaya, Emirhan Nemutlu, Uçkan Çetinkaya Duygu, Petek Korkusuz Mezenkimal Kök Hücreler Hematopoetik Kök Hücrelerin Mobilizasyonunu Endokannabinoidler Aracılığı İle Düzenlemektedir, THED 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Sözlü sunu

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Sevil KÖSE

Doğum Yeri ve Tarihi: Giresun/17.12.1985

Uyruğu: T.C.

İletişim Adresi: Gayret Mahallesi, Ahmet Hamdi Sokak, Yüzüncüyıl Sitesi A8/76,
Yenimahalle/ANKARA

Telefon: 05354998200

E-mail: sevilarslan@hotmail.com

II. Eğitim

2009-2011

Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Akademik Ortalama: 3,64

Tez başlığı: Omurilik Hasarında Kullanılmak Üzere Polimerik Doku İskelelerinin Hazırlanması, Optimizasyonu Ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Etkileştirilmesi

Yayın; Sevil Köse, Fatima Aerts Kaya, Emir Baki Denkbaş, Petek Korkusuz, Fahriye Duygu Çetinkaya, Evaluation of biocompatibility of random or aligned electrospun polyhydroxybutyrate scaffolds combined with human mesenchymal stem cells, Turk J Biol, 40, (2016), 410-419. DOI: 10.3906/biy-1508-18

2002-2007

Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Lisans, Biyoloji Bölümü

Lisans Akademik Ortalama: 3,13

III.Mesleki Deneyimi

2007-2012 Hemosoft Bilişim ve Eğitim Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara
AR-GE Uzmanı

IV.Bilimsel Faaliyet

Yayınlar

- Mendi A, Köse S, Uçkan D, Akca G, Yılmaz D, Aral L, Gültekin SE, Eroğlu T, Kiliç E, Uçkan S. Lactobacillus rhamnosus could inhibit Porphyromonas gingivalis derived CXCL8 attenuation. J Appl Oral Sci. 2016 Jan-Feb;24(1):67-75.
- Sevil Köse, Fatima Aerts Kaya, Emir Baki Denkbaş, Petek Korkusuz, Fahriye Duygu Çetinkaya, **Evaluation of biocompatibility of random or aligned electrospun polyhydroxybutyrate scaffolds combined with human mesenchymal stem cells, Turk J Biol, 40, (2016), 410-419. DOI: 10.3906/biy-1508-18**
- Korkusuz P, Kose S, Kopru CZ. Biomaterial And Stem Cell Interactions: Histological Biocompatibility. Curr Stem Cell Res Ther. 2016, 11(6): 475 – 486. DOI: 10.2174/1574888X10666150306160027 REVIEW
- Kankilic B, Köse S, Korkusuz P, Timuçin M, Korkusuz F. Mesenchymal Stem Cells And Nano-Bioceramics For Bone Regeneration. Curr Stem Cell Res Ther. 2016,11(6):487-493. DOI: 10.2174/1574888X10666150202150518. REVIEW
- Mendi A, Köse S, Yılmaz D, Uçkan D. Oral probiotics for dentistry. OA Dentistry 2014 Jun 14;2(1):9. REVIEW
- Eda Çifçi, Sevil Köse, Petek Korkusuz, Muharrem Timuçin, Feza Korkusuz. Boron containing Nano Hydroxyapatites (B-n-HAp) stimulate Mesenchymal Stem Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation. Key Engineering

Materials. 2015. 631, 373-378. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.631.373

- Sakar M, Korkusuz P, Demirbilek M, Cetinkaya DU, Arslan S, Baki Denkbaş E, Temuçin CM, Bilgiç E, Burcu Hazer D, Bozkurt G. The effect of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) and human mesenchymal stem cell (hMSC) on axonal regeneration in experimental sciatic nerve damage. *Int J Neurosci.* 2014 Sep;124(9):685-96. doi: 10.3109/00207454.2013.876636.
- Arslan, S., Mendi, A., Çetinkaya D., Aral, L., Yılmaz D., Akça, G (2012). Competition of Probiotic Cultures with *Streptococcus mutans* for Adhesion to Gingival Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells. *J Biotechnol., 161 (Supp): 44. (2012)*

Kitap Bölümleri

- Dr. Sevil Köse, Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Esin Aşan. **Bölüm 3: Periyodonsiyumun Gelişimi, Histolojisi Ve Rejenerasyonu, Periodontoloji, Editör; Prof. Dr. Gürhan Çağlayan, Basımda**
- Sevil Köse, Duygu Uçkan Çetinkaya, Gaurav Sharma, Tae Kyun Kim, Petek Korkusuz, Feza Korkusuz. Stem Cell Therapy and Orthopedics. Musculoskeletal Research and Basic Science Editors: **Korkusuz, Feza** pp:269-281, ISBN 978-3-319-20777-3, 2016, Springer International Publishing
- Köse S, Uçkan-Çetinkaya D, Korkusuz P, Korkusuz F. Kök hücreler ve ortopedi. In. Korkusuz F. Temel Bilimler ve Araştırma Kitabı, Second Edition. Pelin Ofset, Ankara, Turkey, 2016, pp. 235-249 (ISBN: 978-605-66007-3-9)

- Sevil Köse, Petek Korkusuz. Alt ekstremite yaralanmalarında rehabilitasyon, bölüm 1. Kemik ve yumuşak dokuların iyileşmesi, Basımda

Poster ve Özetler

- Emine Kılıç, Banu Anlar, Ahmet Kürşat Azkur, Sevil Arslan, Fatima Aerts Kaya, Mehmet Yörübulut, Duygu Uçkan Çetinkaya, İnsan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Demir Oksit Partikülleri İle İşaretlenmesi, Birinci ulusal Ulusal hücrel tedavi ve rejeneratif tıp kongresi, 5-8 mart 2009 nevşehir poster 13, abstract no 16
- Fatima Aerts Kaya, Sevil Arslan, Duygu Uçkan Çetinkaya, Culture of mesenchymal stem cells in presence of human platelet lysate as an alternative for animal-derived serum, EBMT 2010
- Sevil ARSLAN, Barış KUŞKONMAZ, Fatima AERTS KAYA, Emine KILIÇ, Mualla ÇETİN, Turgay COŞKUN, Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA, 'I Cell' Hastalığında Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu, 4-6 Mart 2010, 6.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Ref. No: 51, Poster Numarası: 51
- Sevil ARSLAN, Barış KUŞKONMAZ, Fatima AERTS KAYA, Emine KILIÇ, Mualla ÇETİN, Turgay COŞKUN, Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA, “Mukolipidozis Tip II” Hastalığında Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu, Lizozomal Depo Hastalıkları Dergisi, J LSD 2010;2(1):68
- Korkusuz F, Koç N, Arslan S, Korkusuz P, Uçkan D, Timuçin M. Nano-hidroksiapatit seramiklerin mezenkimal kök hücrelerle uyumu. 22. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi. 31 Ekim-5 Kasım 2011, Belek, Antalya (Acta Orthopaedica Traumatologica Turcica 2011-Supp I-;45:284'te yayımlanmıştır.)
- Feza Korkusuz MD, Nursen Koc, Sevil Arslan, Petek Korkusuz, Duygu Uçkan-Cetinkaya, Muharrem Timucin MESENCHYMAL STEM CELLS

PROLIFERATE PROPERLY ON NANO SR-SI-HAP IN VITRO 9:04-9:11 AM Discussion Thursday, May 3, 2012 Session II – Basic Science Paper #98:57-9:04 AM

- Korkusuz F, Koç N, Arslan S, Korkusuz P, Uçkan-Çetinkaya D, Timuçin M. Mesenchymal stem cells proliferate properly on nano Sr-Si-Hap in vitro. 64th Annual Meeting of The Association of Bone and Joint Surgeons in Charleston, South Carolina, USA, May 2-6, 2012
- Arslan, S., Mendi, A., Çetinkaya D., Aral, L., Yılmaz D., Akça, G. Competition of Probiotic Cultures with *Streptococcus mutans* for Adhesion to Gingival Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells. *J Biotechnol.*, 161 (Supp): 44. (2012) Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium, 12-14 Nisan 2012, European Biotechnology Thematic Network Association (EBTNA), Kayseri/TÜRKİYE
- Fatima Aerts Kaya, Sevil Kose, Gozde Aydin, Ilgin Cagnan, Sena Bocutcu, Baris Kuskonmaz, Duygu Uckan. Effects of in-vivo g-csf stimulation on cytokine levels in bone marrow plasma samples from healthy donors. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2013; 41 (Suppl 1): S60. P1143
- Fatima Aerts Kaya, Ilgin Cagnan, Gozde Aydin, Sevil Kose, Asli Semerci, Baris Kuskonmaz, Duygu Uckan - Assessment Of Human Bone Marrow Plasma Samples Suggests A Different Role For Mesenchymal Stromal Cells In Distinct Areas Mediated By Pdgf-Bb/Pdgf-R. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2013; 41 (Suppl 1): S61. P1144
- Fatima Aerts Kaya, Emine Kilic, Gozde Aydin, Sevil Kose, Ilgin Cagnan, Ozge Gultekin, Baris Kuskonmaz, Duygu Uckan. Differential cytokine expression profile of healthy human bone marrow plasma samples from the endosteal and vascular region. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2013; 41 (Suppl 1): S61. P1145

- Emine Kilic, Fatima Aerts Kaya, Sevil Kose, Banu Anlar, Duygu Uckan. Iron oxide nanoparticle labeling of mesenchymal stromal cells. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2013; 41 (Suppl 1): S61. P1147
- Sevil Kose, Fatima Aerts Kaya, Emir Denkbaz, Petek Korkusuz, Duygu Uckan. Polymeric scaffolds with different alignment and their interactions with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2013; 41 (Suppl 1): S62. P1148
- Aysegul Mendi, Sevil Kose, Fatima Aerts Kaya, Duygu Uckan, Dervis Yilmaz, Levent Aral. Lactic Acid Bacteria Can Reduce Tlr-4 Expression On Inflamated Gingival Fibroblasts And Mesenchymal Stem Cells In Vitro. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2013; 41 (Suppl 1): S62. P1149
- Fatima Aerts Kaya, Ilgin Cagnan, Sevil Kose, Gozde Aydin, Baris Kuskonmaz. Sağlıklı İnsan Kemik İliği Endosteal ve Santral Bölgelerinde Sitokin Ekspresyonları ve G-CSF Etkisi. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 23-26 Ekim 2013, Abstract no:0363, S-35.
- Gamze Tan, Necdet Sağlam, Çağla Zübeyde Köprü, Sevil Köse, Mehmet Ali Onur, Ayşen Günel Özcan, Duygu Uçkan Çetinkaya, Petek Korkusuz. Cellular Destination of Gold Nanoparticles Directed to Mesenchymal Stem Cells. 1.Uluslar Arası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli/TÜRKİYE. Sözlü Sunu No: S-10
- Ayşegül Mendi, Sevil Köse, İrem Akar Soycan, Derviş Yılmaz, Levent Aral, Gülçin Akca, Duygu Uçkan. Interleukin (IL)-8 Regulation in Gingiva-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Lactic Acid Bacteria Could Modulate İmmun Response Against Porphyromonas Gingivalis. 1.Uluslar Arası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli/TÜRKİYE. Poster No: P-07
- Sevil Köse, Fatima Aerts Kaya, Emir Baki Denkbaş, Petek Korkusuz, Duygu Uçkan Çetinkaya. Polymeric Scaffolds with different Alignment And Their Interactions With Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. 1.Uluslar

Arası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli/TÜRKİYE. Poster No: P-24

- Kankılıç B, Köse S, Korkusuz F, Calero JC, Pau-Ginerba M, Martinez M, Minguella J, Poll B, Villegas. Yüksek hızlı ekleyici üretim tekniğiyle geliştirilen biyoseramiklerin karakterizasyonu ve hücre uyumunun araştırılması. 22. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2014, Belek, Antalya (Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica Supp. 1, sf 177)(Poster)
- Korkusuz F, Korkusuz P, Çiftçi E, Köse S. Bor içeren nano hidroksiapatit seramikler ovariyektomili tavşanların femurlarına hyaluronanla birlikte intramedüller uygulandığında kemik mineral yoğunluğunu artırır. 24. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2014, Belek, Antalya (Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica 2014 Supp. 1, sf 48)
- Köse Sevil, Aerts Kaya Fatima, Akar Soyca İrem, Nemutlu Emirhan, Kocafe Çetin, Uçkan Çetinkaya Duygu, Korkusuz Petek. Endocannabinoids and their receptors are located on human bone marrow niche mesenchymal stem and hematopoietic progenitor cells. 24-27 June 2015, Stockholm, SWEDEN, F-1082
- Hakan Ozdogan, Bala Gur Dedeoglu, Arzu Atalay, Sevil Kose, Zeynep Arzu Yegin, Ferit Avcu, Duygu Uckan Cetinkaya, Osman Ilhan. Characterization and MicroRNA Expression Profile Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Myelodysplastic Syndrome and Acute myeloid leukemia (AML) Patients and Comparison with Healthy Controls. EBMT kongresi. İstanbul 22-25 march 2015. Poster sunumu. 24march, P362
- Sevil Köse, Çağla Köprü, Beren Karaosmanoğlu, Ekim Zihni Taşkıran, Fatima Aerts Kaya, Emirhan Nemutlu, Uçkan Çetinkaya Duygu, Petek Korkusuz Mezenkimal Kök Hücreler Hematopoetik Kök Hücrelerin Mobilizasyonunu Endokannabinoidler Aracılığı İle Düzenlemektedir, THED 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Sözlü sunu
- Eda Çiftci Dede, Petek Korkusuz, Sevil Köse, Elif Bilgiç, M. Alper Çetinkaya, A. Atilla Ertan, Muharrem Timuçin, Feza Korkusuz. Bor İçeren

Nano Hidroksiapatit Seramikler, Mezenkimal Kök Hücrelerle Osteoporozlu Tavşan Uzun Kemiklerinde İyileştirici Etki Göstermektedir. THED 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Poster

- S. Köse, F. Aerts Kaya, D. Uçkan Çetinkaya, P. Korkusuz. Endocannabinoids increase SDF-1 release from human mesenchymal stem cells. The 41st FEBS Congress. 03-08 september 2016, ephesus kuşadası, TURKEY, abstract no: 3730, Poster
- Sevil Köse, Çağla Köprü, Beren Karaosmanoğlu, Ekim Zihni Taşkıran, Fatima Aerts Kaya, Emirhan Nemutlu, Duygu Uçkan Çetinkaya, Petek Korkusuz. Mesenchymal stem cells regulate the hematopoietic stem cell mobilization through the endocannabinoids P025. ISSCR/ESGCT – International Society For Stem Cell Research Annual Meeting, 17-22 Ekim 2016, Floransa/İTALYA

Burslar

- TÜBİTAK, 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Projeleri, Proje No: 112S217, Proje Adı: Endokannabinoidlerin endometriyozisteki reseptör aracılı olası etkilerinin araştırılması, Bölüm; Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Petek Korkusuz
- TÜBİTAK, 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Projeleri, Proje No: 113S819, Proje Adı: Endokannabinoidler ve Reseptörlerinin İnsan Hematopoetik Kök Hücreleri ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerindeki Varlığı ve Düzeyinin Araştırılması, Bölüm; Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Petek Korkusuz
- TÜBİTAK ikili işbirliği destekleri programı, Proje no: 215S834, Proje Adı: Osteoindüktif nanoseramikler ve kemik morfojenik proteini (BMP) kombinasyonu ile kemik rejenerasyonu için yeni bir teknolojinin

geliştirilmesi, Bölüm; Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Petek Korkusuz

Editörlük Yapılan Dergiler

- Turkish Journal of Biology (Turk J Biol), E-ISSN: 1303-6092
ISSN: 1300-0152

Katılan Kurslar

- Deney Hayvanları Kursu, 2007, Gazi Üniversitesi, Ankara/TÜRKİYE.
- Mezenkimal Kök Hücre Pratik Kursu, 5 Mart 2009, Erciyes Üniversitesi, Nevşehir/TÜRKİYE
- Mezenkimal Kök Hücre Pratik Kursu, 4 Şubat 2010, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir/TÜRKİYE
- COST-Action BM0805 Summer Training School in Bioinformatics 2011, 18-20 Temmuz 2011, Queens Üniversitesi, Belfast/İRLANDA
- Konfokal Mikroskopi Teknikleri, Uygulamaları ve Gelişen Teknolojiler, Leica Gantenbein Firması, 23-24 Eylül 2013, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE
- 1. Hacettepe writing workshop, 01-02 Eylül 2014, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

Katılan Sempozyum/Kongreler

- TÜBA 3. Kök Hücre Sempozyumu, 05.11.2007, TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu, Ankara/TÜRKİYE.
- Tıp ve Doku Mühendisliğinde Kök Hücreler, Klinik Pratikte 3. Kök Hücre ve Gen Terapisi Kongresi, 30.05- 01.06.2008, İstanbul/TÜRKİYE

- Pratik Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Teknikleri, Hibridoma ve Konfokal Kursu 29.05.2008, İstanbul/TÜRKİYE
- 1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, Erciyes Üniversitesi, 6-8 Mart 2009, Nevşehir/TÜRKİYE
- Doku Mühendisliği Uygulamaları: Biyomateryaller – Doku Adaptasyonu, 27 Mart 2009, Hacettepe Üniversitesi/TÜRKİYE
- TÜBA 4. Kök Hücre Sempozyumu, 5 Kasım 2009, TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu, Ankara/TÜRKİYE.
- 1. Ulusal Mezenkimal Kök Hücre Sempozyumu, 5-6 Şubat 2010, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir/TÜRKİYE
- Hacettepe Üniversitesi Teknokent Günleri, 25-26 Mart 2010, Hacettepe Üniversitesi/TÜRKİYE
- 2. Uluslar Arası Katılımlı Lizozomal Hastalıklar Sempozyumu, 29-30 Nisan 2010, Gazi Üniversitesi, Ankara/TÜRKİYE.
- 1. Uluslar Arası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, 29 Eylül-01 Ekim 2010, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun/TÜRKİYE
- 2. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, 11-13 Şubat 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi – Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, İzmir/TÜRKİYE
- Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium, 12-14 Nisan 2012, EUROPEAN BIOTECHNOLOGY THEMATIC NETWORK ASSOCIATION (EBTNA), Kayseri/TÜRKİYE
- Biyomalzemelerin Medikal Alanda Kullanımı, 19 Mart 2013, ODTU BIOMATEN Ankara/TÜRKİYE

- Rejeneratif Tıp Sempozyumu, 30 Mart 2013, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, Çanakkale/TÜRKİYE
- TÜBİTAK 2237 Programı destekli Sağlık Bilimleri Alanında Uygulamalı Araştırma Projesi Hazırlama Etkinliği, 10 Mayıs/28 Mayıs 2013, Hacettepe Üniversitesi, Ankara/TÜRKİYE
- Kök Hücre Günü 2013, 8 Kasım 2013, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE
- 1.Uluslar Arası Katılımlı Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli/TÜRKİYE
- Kök Hücre Günü 2014, 19 Kasım 2014, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE
- ISSCR – International society for stem cell research Annual Meeting, 24-27 Haziran 2015, Stokholm/İSVEÇ
- Kök Hücre Günü 2015, 21 Kasım 2015, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE
- THED 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 30 Nisan-3 Mayıs 2016,
- ISSCR/ESGCT – International Society For Stem Cell Research Annual Meeting, 17-22 Ekim 2016, Floransa/İTALYA
- Kök Hücre Günü 2015, 22 Kasım 2016, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

