

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü :Hızlı Destek Projesi

Proje No :14H0239003

Proje Yöneticisi : Prof. Dr. Asuman ÖZEN

Proje Başlığı : Genç ve yaşlı köpeklerin yağ dokusundan elde edilen mezenkimal hücrelerin karakterizasyonu

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

.../.../20..

Prof. Dr. Asuman ÖZEN
Proje Yöneticisi
İmza

1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Genç ve yaşlı köpeklerin yağ dokusundan elde edilen mezenkimal hücrelerin karakterizasyonu

Prof. Dr. Asuman ÖZEN

Doç. Dr. İrem Gül SANCAK ,

Doç. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU,

Dr. Ahmet CEYLAN,

Araş. Gör. Pınar CAN

Proje Numarası:14H0239003

Başlama Tarihi:24.11.2014

Bitiş Tarihi:24.11.2015

Rapor Tarihi:24.11.2015

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2015 "

I. Genç ve yaşlı köpeklerin yağ dokusundan elde edilen mezenkimal hücrelerin karakterizasyonu

Özet

Mezenkimal kök hücrelerin veteriner hekimlik alanında kullanımı birçok hastalığın tedavisi için umut ışığı olarak görülmektedir. Yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin eldesinin kolay olması ve üretiminin ek bir maliyet getirmemesi sebebiyle yağ dokudan kök hücre üretimi en çok kullanılan yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Yağ doku kökenli hücrelerin multilineage potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Köpek yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin başarılı bir şekilde transplante edildiği de daha önceki çalışmalar da da bildirilmiştir. Bu çalışmada 3 adet yaşlı (5 yaş üzeri) ve 3 adet genç (6 ay ve altı) köpekten operasyon sırasında alınan yağ doku örneklerinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin karşılaştırılması, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyeli (karakterizasyonu), farklılaşma hızı, üreme hızı ve boyanma potansiyeli yönünden aralarındaki farkların ortaya konulması, lipoaspiratın içerdiği kök hücre potansiyelinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda genç ve yaşlı köpekler arasında lipid vakuol oranının farklı olduğu ve bu oranın gençlerde fazla olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: mezenkimal kök hücre, yağ doku, köpek, differensiyasyon.

Characterization of Mesenchymal Cells Isolated from the Adipose Tissue of Young and Old Dogs

Abstract

The use of mesenchymal cells in veterinary medicine is considered to be promising for the treatment of several diseases. Due to adipose mesenchymal stem cells being readily available and the expansion of these cells not incurring any additional cost, the culturing of adipose mesenchymal cells has become a commonly applied method. Adipose mesenchymal cells are known to have a multilineage potential of differentiation. Previous research has demonstrated success in the transplantation of canine adipose mesenchymal cells. This study was aimed at the comparative evaluation of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue samples taken at surgery from 3 old dogs (above 5 years of age) and 3 young dogs (1 to 6-months-old or younger), and at the determination of any differences in the adipogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation potential (characterization), differentiation rate, proliferation rate, and staining potential of these cells. Furthermore, a comparison was made for the stem cell potential of the lipoaspirates.

Key words: Mesenchymal stem cell, adipose tissue, dog, differentiation.

II. Amaç ve Kapsam

İnsanlarda ve tüm omurgalılarda yağ doku (adipoz doku) bulunmaktadır. Yağ doku, yağ hücrelerinin (adiposit) sayıca fazla olduğu özel bir bağ dokusudur. Yağ doku hücreleri arasında vücudun anatomik bölgelerine göre değişen sıkı ya da gevşek bir bağ dokusu bulunmaktadır. Bu bağ dokusu fibroblastlar, bağ doku iplikleri, kan ve lenf damarları ve sinirlerden oluşur (Buzoğlu,2015). Bir gram yağ dokusunda 350.000 dolayında preadiposit denilen multipotent hücre ile beş bin dolayında yağ doku kaynaklı kök hücre bulunmaktadır. Bu sayı kemik iliğinde bulunan kök hücre sayısının 35 katına denk gelmektedir. Yani yağ dokusu kemik iliğinden çok daha fazla kök hücreye sahiptir (Gürlek,2012). Veteriner hekimlikte kök hücre tedavileri yağ doku dışında kemik iliğinden elde edilerek de yapılmaktadır. Daha çok atlarda tendo ve ligament yaralanmalarında, köpeklerde kas ve iskelet sistemi hastalıklarında, kıkırdak ve eklem hasarlarında kullanılmaktadır (Csaki,2007,Özen,2014). Klinikte hücre bazlı tedavilerde artık her organın kendi kök hücrelerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (GülSancak,2015). Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin transmisyon elektron mikroskobu ve scanning elektron mikroskobu ile ince yapısı ve farklılaşma özellikleri incelenmiş, bu hücrelerin sürekli olarak birbirleri ile bir iletişim halinde oldukları ve bunun da sinyalizasyonda oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Özen,2013,2014).

Yağ doku, mezenkimal kök hücreleri (multipotent özellikli) eldesinde önemli bir kaynaktır. Embriyonal kök hücrelerdeki etik sınırlandırmalardan dolayı çalışmalar mezenkimal kök hücreler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yağ doku kökenli mezenkimal

hücrelerin klinikte tedavi amaçlı kullanımı oldukça fazladır. Tedavide kullanılan bu hücrelerin güvenliği, etkinliği, çoğaltılması ve kalitesi önem taşımaktadır. Dolayısıyla yağ doku kökenli mezenkimal hücrelerin izolasyon ve hücre çoğaltma protokolleri geliştirilmiştir. Yağ doku kök hücreleri yüksek çoğalma oranları ve kemik, kas ve kıkırdak hücrelerine dönüşebilme potansiyeline sahip, düşük immunojeniteleri nedeniyle allojenik kök hücre tedavisinde kullanılabilen, eldesi en kolay kök hücre türü olarak görülmektedir (Clynes,2014;Özen,2014;Patrikoski,2013).

Günümüzde obezitenin çok fazla yaygınlaşması hem esmer hem de beyaz yağ dokusu üzerindeki ve yağ metabolizmasındaki araştırmaların artmasına neden olmuştur. Yağ doku, insan hekimliğinde cerrahi yolla materyale kolay ulaşılabilir olması ve mezenkimal kök hücreleri elde etmede kullanılabilir olması açısından biyomedikal araştırmalarda önemli bir materyal teşkil eder. Yağ doku mezenkimal hücrelerin karaciğer hepatositlerine, kemik hücrelerine (osteoblast), kıkırdak hücrelerine (kondrosit), kas hücrelerine (myosit) ve sinir hücrelerine farklılaştığı ve hatta uygun koşullarda tekrar yağ hücrelerine dönüşebildiği bildirilmiştir (Clynes,2014).

Yağ doku kök hücrelerinin; osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasiteleri, her biri için protokolleri optimize edilmek şartıyla farklılaşma etkinliği artırılabilir. Farklılaşma potansiyelinin azalmasının bir nedeni; hücrelerin tutunma yüzeylerinin azalması olabilir. Ayrıca güçlü bir farklılaşma için besin maddelerinden zengin besi yerine gereksinim vardır (Kang,2012;Park,2009;Patrikoski,2013). Yağ doku kök hücreleri, oil red O, alcian blue ve Von Kossa boyaları ile boyanarak üç yönlü (trilinear) farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterilir (Patrikoski,2013).

Mezenkimal kök hücrelere (MKH) ilişkin elde edilen bilgiler arttıkça, söz konusu hücrelerin rejeneratif (onarıcı) tıpta kullanılma olasılığı da artmaktadır. Bu durum

özellikle kas ve iskelet dokuları için geçerli olup, araştırmacılar, MKH'lerin ortopedik rahatsızlıklarda kullanılabileceğine dair pek çok bildirimde bulunmuştur. Otolog hücre transplantasyonuna dayalı terapilerin uygulaması, söz konusu hücrelerin çok yönlü tedavi potansiyeli ve düşük immunojenitesi dolayısıyla önerilmektedir. Ancak önerilen bu terapilerin büyük bir bölümü, hücre popülasyonlarının önceden in vitro koşullarda çoğaltılmasını gerektirmektedir ki, bu süreç yavaş ilerlediği gibi hücre fenotipini olumsuz etkileyebilmektedir. Otolog MKH'lerin izole edilerek kısa süre içerisinde yara bölgesine nakledildiği ve tekli cerrahi müdahaleye dayalı terapilerde, hem maliyetin düşürülmesi hem de nekahat süresinin kısaltılması imkânı bulunmaktadır (Marble,2014). Lipoaspiratın stromal ve vasküler fraksiyonundan izole edilen insan yağ dokusu kökenli kök hücreleri, yağ dokusundan kolaylıkla ve yüksek oranda elde edilebilmeleri nedeniyle olduğu kadar, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma yetileri nedeniyle de, bu tür tekli cerrahi girişim stratejilerinde kullanım için özellikle uygundur (Zuk,2001).

Mezenkimal kök hücreler yağ doku, tendon, periodontal ligament, sinovial membran, trabeküler kemik ve kemik iliğinden, embriyonik dokular, sinir sistemi ve deriden, periosteum (Orbay,2012), kıkırdak (Diaz-Romero,2013) ve kastan izole edilmiştir (Orbay,2012). Adipoz doku kolay ulaşılabilir bir kök hücre kaynağıdır (Vieira,2010). Adipoz kökenli stromal hücreler (ASCs) olarak adlandırılan bu hücreler fibroblast benzeri hücreler olup, çok yönlü farklılaşma özelliğine sahip hücrelerdir (Csaki,2007;Sarraf,2011;Zuk,2001). Mezenkimal kök hücrelerdeki çalışmalar rejeneratif tıpta kullanım alanı bulmasının yanı sıra insan hekimliğinde sistemik transplantasyonda, gen tedavisi ile kombine kök hücre tedavisinde ve doku mühendisliğinde karşımıza çıkmaktadır (Zuk,2001). Kardiyovasküler hastalıklarda insanda adipoz doku kökenli mezenkimal hücrelerin (Miranville,2002;Planet-Benard,2004;Rehman,2004) hücre

tedavilerinde hücre kaynağı olarak görülmektedir. İnsanda adipoz dokudan elde edilen mezenkimal hücrelerin neuronal farklılaşması nörolojik hastalıklarda tedavide kullanılabilir alternatif hücre kaynağı olabileceğini düşündürmektedir (Safford,2002). Hepatosit rejenerasyonunda ya da karaciğer hücre transplantasyonunda da yağ doku kökenli mezenkimal hücrelerin kullanılabilirliği bildirilmiştir (Seo,2005).

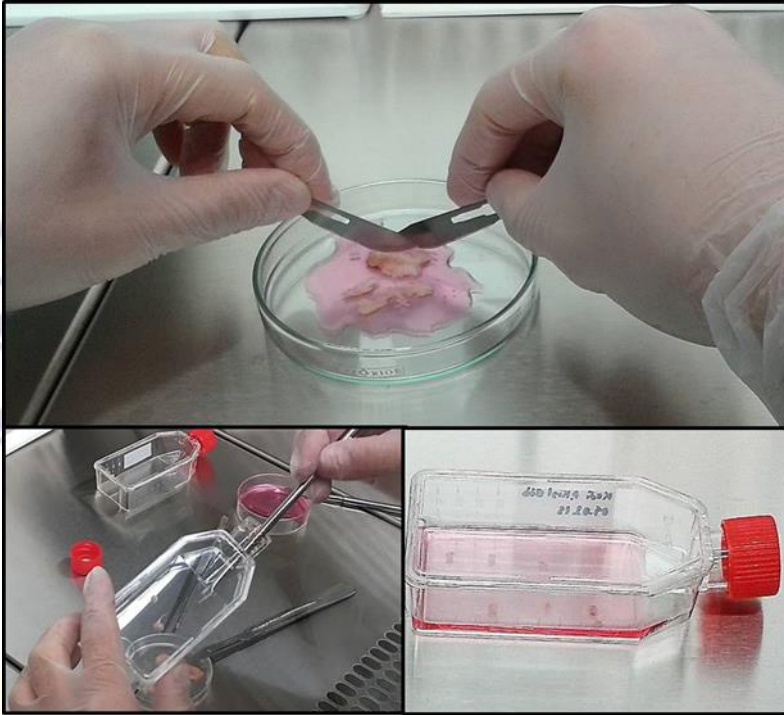
Bu proje köpeklerde yağ dokusundan elde edilen mezenkimal hücrelerin karakterizasyonun belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Pek çok hastalıkta umut kaynağı olan mezenkimal kök hücrelerin eldesi ve karakterizasyonu yapılmış, 3. Pasaja kadar üretilen hücreler dondurulmuştur. Bu çalışmada yaşlı ve genç köpeklerden elde edilen yağ doku kökenli mezenkimal hücrelerin differensiyasyon ve üreme hızını, genç ve yaşlılarda karşılaştırılması amaçlanmıştır, yaşın mezenkimal kök hücrelerin differensiyasyonundaki etkileri gözlenmiştir.

III. Materyal ve Yöntem

Genel anestezi uygulanan hastaların inguinal bölgesinden alınan yağ doku materyali ile çalışılmıştır

(HADYEK-2014-19-143 nolu Etik kurul kararı). Hastalar propofol indüksiyonu (6.6 mg/kg) ve ısoflurane (%1) idamesi ile anesteziye alınarak inguinal bölge asepsi antisepsi kurallarına göre hazırlandı ve derialtı bölgeden elde edilen 0.5 cm³ boyutunda yağ dokusu alındı. Steril tüp içerisinde laboratuvara nakledildi. Nakledilen yağ doku laminar flow altında Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Belçika) solüsyonuna alınarak steril petri kabı içinde küçük parçalara ayrıldı (Resim 1). T25 flasklara yerleştirilerek ve explant kültür yöntemi ile üretildi. %5 CO₂'li inkübatörde 15 dakika bekletilerek sonrasında %20 Fetal bovine serum (Lonza, Belçika), %2 L-Glutamine (Lonza, Belçika), %1 Penicilin, Streptomycin, Amphotericin (Biological

Industries, İsrail) ve %77 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Belçika) içeren besi yeri eklendi. Üç günde bir besi yeri değişimi yapıldı ve hücrelerin gelişimi inverted mikroskop (Olympus Cx45) ile gözlemlendi. %70 konfluent olan flasklara 1:2 oranında pasaj işlemi yapılarak ekim öncesinde hücrelerin sayısı ve canlılığı kontrol edildi. Üçüncü pasaj sonunda hücreler farklılaşmaya sokularak adipojenik (yağ), osteojenik (kemik), kondrojenik (kıkırdak) doku hücrelerine farklılaştırıldı.



Resim 1: Yağ dokusunun köpekten ekstraksiyonu.

Adiposit farklılaşma için Adiposit differansiyasyon Basal Mediumu ve supplementi (Gibco, USA) kullanıldı. Üçüncü pasaja gelen hücreler adiposit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılarak üçüncü hafta sonunda Oil Red (Sigma Aldrich- USA- lotSLBC9102V) ile boyama işlemi gerçekleştirildi ve hücre içinde oluşan yağ damlacıkları invert mikroskobu ile görüntülendi ve yağ dokuya farklılaşma belirlenerek kayıt altına alındı.

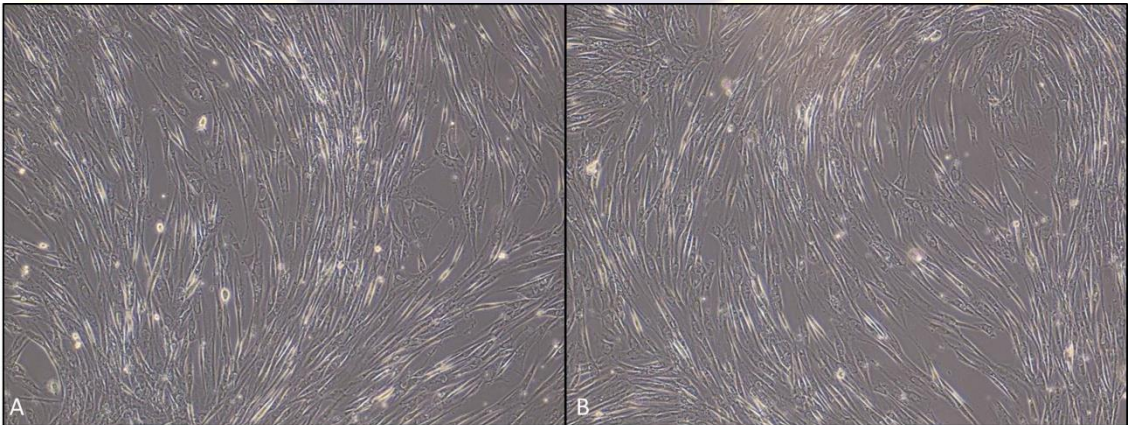
Osteosit farklılaşma için Osteosit Differansiyasyon Basal Mediumu (Gibco, USA) kullanıldı. Üçüncü pasaja gelen hücreler osteosit besi yeri ile üç günde bir besi yeri değişikliği yapıldı. Üçüncü hafta sonunda Von Kossa (Merck, Lot HC392067) ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Osteojenik hücreler invert mikroskobu ile görüntüledi.

Kondrosit farklılaşma için Kondrosit Differansiyasyon Basal Mediumu (Darmstadt, Germany) kullanıldı. Üçüncü pasaja gelen hücreler kondrosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı. Üçüncü hafta sonunda Alcian Blue (Millipore-California-USA Lot 2496226) ile boyama işlemi gerçekleştirildi ve kondrosit hücreleri invert mikroskobu ile görüntülenerek, kondrosite farklılaşmış hücreler belirlendi (Vieira,2010).

IV. Analiz ve Bulgular

Hücre üreme potansiyeli

Genç ve yaşlı köpeklerden elde edilen yağ doku (Resim 1) örneklerinin üreme potansiyellerinin karşılaştırılmasında genç köpeklerin yağ doku örneklerinin 12. günde 1. Pasajda %70 konfluent olduğu yaşlı köpeklerin ise 14-15. günde 1. Pasajda %70 konfluent olduğu belirlendi (Resim 2).



Resim 2: Konfluent flask görünümü. Genç köpek (A), yaşlı köpek (B).

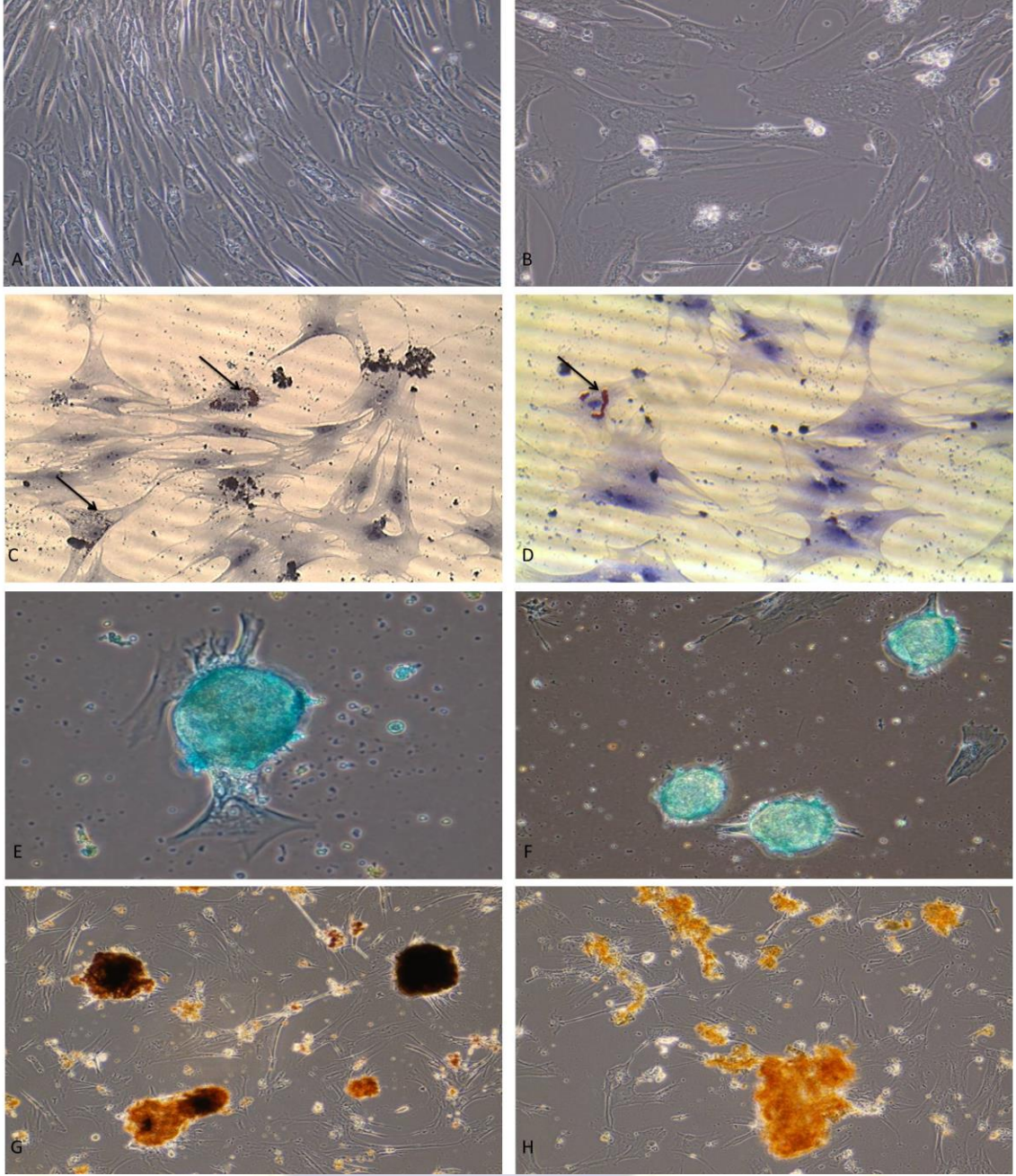
Elde edilen hücrelerin 1. günde fibroblast benzeri morfoloji (Resim 3a) gösterdiği ve pasaj sayısı arttıkça bu morfolojinin oval şekle (Resim 3b) dönüştüğü izlendi. Genç köpeklerden elde edilen hücrelerin 19-20. gün sonra oval şekle dönüştüğü yaşlı köpeklerden alınan hücrelerin ise 22-23. gün sonra oval şekle dönüştüğü izlendi.

Farklanma potansiyeli

Gençlerde (Resim 3c) adipojenik farklılaşma sırasında lipid damlacıklarının yaşlılara göre (Resim 3d) daha erken oluştuğu ve yoğunluğunun daha fazla olduğu izlenmiştir. Bunun yanında yağ damlacıklarının oluşumunun öncelikle flask kenarında başladığı ve sinyalizasyon artışı oluştuğunda merkeze doğru ilerlediği belirlenmiştir.

Kondrojenik farklılaşma sonrasında alcian blue ile boyanmalarda gençlerde (Resim 3e) yaşlıların (Resim 3f) örneklerine göre daha belirgin boyanma gözlenmiştir.

Osteojenik farklılaşma sonrasında von kossa ile boyanmalarda gençlerde (Resim 3g) yaşlıların (Resim 3h) örneklerine göre daha belirgin renk oluşumu izlenmiştir.



Resim 3. İlk pasajdaki fibroblast benzeri hücreler (A), artan pasaj sayısı ile ilişkili hücre morfolojisinde ovalleşme (B), genç (C) ve yaşlı (D) köpeklerde adipojenik farklılaşmadaki hücrelerdeki yağ damlacıklarının (Oklar) formasyonu; genç (E) ve yaşlı (F) köpeklerden izole edilen hücrelerde kondrojenik farklılaşmadaki glikozaminoglikan sentezi; genç (G) ve yaşlı (H) köpeklerden izole edilen hücrelerde osteojenik farklılaşmanın Von Kossa boyaması ile gösterimi.

V. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada operatif müdahale sırasında alınan inguinal yağ dokunun alınması sırasında da hastadan 0,5 cm³ boyutunda doku alınmış ve bu alınan dokunun da flasklara ekilmesi sırasında 0.01 m³ ün yeterli olduğu ve kök hücre üretilebildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada köpeklerden elde edilen yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yaprağına (adipojenik, osteojenik, kondrojenik) farklılaştırılması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Genç köpeklerde gözlenen farklılaşma ile yaşlılarda gözlenen farklılaşma karşılaştırılmış ve yaşlılarda gözlenen farklılaşmanın daha yavaş ve az olduğu gözlenmiştir. Bununda hücrelerin yaşlandıkça azalan extraselüler matriksinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Adipojenik farklılaşmaya giren hücrelerin köpek ve insan örnekleri karşılaştırıldığı bir çalışmada köpek örneklerindeki lipid vakuollerinin insanlardakine oranla daha az görüldüğü bildirilmiştir (Vieira,2010). Bizim çalışmamızda ise genç ve yaşlı köpekler arasında lipid vakuol oranının farklı olduğu ve bu oranın gençlerde fazla olduğu görülmüştür.

Bu çalışma ile yağ doku kökenli mezenkimal hücrelerin üreme potansiyelleri araştırılmış olup, yağ doku kök hücreleri klinik uygulamalarda pek çok hastalığın tedavisinde kullanılacak rezerv kök hücre kaynağı olduğu için araştırmaya açık bir konudur.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkıları

İlgili projeye ilişkili olarak kongre katılımı gerçekleştirilmiş olup (2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 2015, Antalya) proje verileri Ankara Üniversitesi veteriner fakültesi dergisine yayınlanmak üzere gönderilmiştir. Diğer bir yayın ise Tübitak veteriner hayvancılık dergisine gönderilmiş ve değerlendirme aşamasındadır. Ayrıca birimizde yağ doku üretimi ile ilişkili olarak bir banka

oluşturulmuş ileride vereceğimiz projeler için altyapı kuvvetlendirilmiştir.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Bir Doktora öğrencisi ve bir post-doktoral araştırmacıya bu alanda çalışma olanağı sağlanmış ve yüksek lisans eğitimine katkı sağlanmıştır.

IX. Kaynaklar

1. Buzoğlu H : Yağ dokusu, adipoz doku. <http://www.hakanbuzoglu.com/yag-dokusu-adipoz-doku-2/> (2 Nisan 2015)
2. Clynes M (2014): Cell culture models for study of differentiated adipose cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(137):2
3. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M (2007): Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol*, 128:507-20.
4. Diaz-Romero J, Quintin A, Schoenholzer E, Pauli C, Despont A, Zumstein MA, Kohl S, Nestic D (2013): S100A1 and S100B Expression Patterns Identify Differentiation Status of Human Articular Chondrocytes. *J Cell Physiol*, 229: 1106-1117.
5. Gül Sancak İ, Özen A, Alparslan Pınarlı F, Tiryaki M, Ceylan A, Acar U, Delibaşı T (2014): Limbal Stem Cells in dogs and cats their identification culture and differentiation into keratinocytes. *Kafkas Üni Vet Fak Derg*, 20: 909-914.
6. Gürlek A (2012): Yağ enjeksiyonu. <http://www.draligurlek.com/vucut-estetigi/yag-enjeksiyonu.html> (2 Nisan 2015)
7. Kang JM, Han M, Park IS, Jung Y, Kim SH, Kim SH (2012): Adhesion and differentiation of adipose-derived stem cells on a substrate with immobilized fibroblast growth factor. *Acta Biomater*, 8: 1759-1767.
8. Marble HD, Sutermaster BA, Kanthilal M, Fonseca VC, Darling EM (2014): Gene expression-based enrichment of live cells from adipose tissue produces subpopulations with improved osteogenic potential . *Stem Cell Research & Therapy*, 5(12):2-13.
9. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat C A, Busse R, Bouloumie A (2002): Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 110: 349–355.
10. Orbay H, Tobita M, Mizuno H (2012): Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells*

International Volume, Article ID 461718, 9. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/461718>

11. Ozen A, Gul Sancak I, Koch S, Von Rechenberg B (2013): Ultrastructural characteristics of sheep and horse mesenchymal stem cells (MSCs). *Mic Res.* 1,17-23.
12. Özen A, Gül Sancak İ (2014): Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61,79-84.
13. Park IS, Han M, Rhie JW, Kim SH, Jung Y, Kim IH, Kim SH (2009): The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism. *Biomaterials*, 30: 6835–6843.
14. Patrikoski M, Juntunen M, Boucher S, Campbell A, Vemuri MC, Mannerström B, Miettinen S (2013): Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4 (27): 2-15.
15. Planat-Benard V, Silvestre J S, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L (2004): Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109: 656–663.
16. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove C J, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL (2004): Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109:1292.
17. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble J M, Rice HE (2002): Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 294: 371–379.
18. Sarraf CE, Otto WR, Eastwood M (2011): In vitro mesenchymal stem cell differentiation after mechanical stimulation. *Cell Prolif.* Feb, 44(1):99-108. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00740.x.
19. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS (2005): Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 328:258–264.
20. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M (2010): Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Transplantation*, 19: 279–289.
21. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7: 211-28.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bu projenin gerçekleşmesi için temin edilen bütçe, öngörülen harcama planı ve takvimine uygun olarak kullanılmıştır.

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar:

Bu proje ile birimimizdeki laboratuvarında kullanılmak üzere alınan -20 buzdolabı ve su banyosu kullanıma devam etmektedir.

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

Gül Sancak İ, **Özen A**, Bayraktaroğlu A.G, Ceylan A, Can P.:Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the adipose tissue of young and old dogs. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies. 15-18 October 2015,Antalya (Poster).

e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

A.ÖZEN, İ. G. SANCAK, A. CEYLAN, Ö. ÖZGENÇ: Adipose tissue-derived stem cells, Tubitak veterinary and animal sciences, (In Press)

Gül Sancak İ, Özen A, Bayraktaroğlu A.G, Ceylan A, Can P.: Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the adipose tissue of young and old dogs. Veterinary Journal of Ankara University, (In Press).

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

