Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.14, No.4, Winter 2014, Pages 360- 370

Evaluating the Expression of Mesenchymal Stem Cells Markers in Human Hair Follicle Stem Cells

Behvarz M, Maleki M*, Mashayekhi M

Department of Biology, College of Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author. Tel: +989144318522 Fax:+98413-33295731 E-mail: maleki.masoud@gmail.com

Received: 7 Aug 2014 Accepted: 1 Nov 2014

ABSTRACT

Background & objectives: Adult stem cells are undifferentiated cells that replace dead or injured cells. There are adult stem cells in some regions of human tissues and hair follicle is one of the tissues that have adult stem cell source and these cells have an important role in hair life cycle. In this study, we investigated the isolation of hair follicle stem cells (HFSCs) and expression of mesenchymal stem cell markers on the isolated cells.

Methods*:* Human hair follicles obtained from men scalp tissue by micro punch technique. Hair follicles isolated and cultured in culture flasks in DMEM-F12 + FBS. After outgrowth of stem cells from hair bulges, they analyzed by flow cytometry for detection of stem cell markers.

Results: 23 to 27 days after isolation and culture of HFSCs in uncoated cell culture flasks, cell surface markers expression studied by flow cytometry. Flow cytometric analysis showed 25.26% Stro-1, 50.85% CD90, 45.24% CD105, 61.20% CD44, 8.20% CD45, 11.86% CD146, 2.72% CD106, 7.21% CD166 and 26.74% CD19 expression in HFSCs.

Conclusion: In this study, isolated stem cells significantly expressed some of the mesenchymal stem cell markers higher than other markers. These markers give certain characteristics to HFSCs, and introduce the cells as an alternative option for cell therapy, tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: Hair Follicle; Mesenchymal Stem Cells; Flow Cytometry

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

بررسی بیان نشانگرهای سلولهای بنیادی مزانشیمی در سلولهای بنیادی فولیکول موی انسان

محمدرضا بهورز ، مسعود ملکی ، محمدرضا مشایخی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱٤٤۳۱۸۵۲۲ فاکس: ۳۳۲۹۵۷۳۱-۰٤۱۳ پست الکترونیک: maleki.masoud@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سلولهای بنیادی بالغ سلولهایی تمایز نیافته اند که در مراحل خاصی از زندگی فرد یا در هنگام بروز آسیب به بدن فعال شده و سلولهای مرده و آسیب دیده را جایگزین می کنند. سلولهای بنیادی بالغ در بخشهایی از بدن فرد بالغ وجود دارند و فولیکول مو نیز از جمله مناطقی است که دارای ذخیره ای از سلولهای بنیادی بالغ است که نقش مهمی در چرخه زندگی مو بر عهده دارند. هدف از این مطالعه جداسازی سلولهای بنیادی از فولیکول موی سر انسانی و بررسی بیان آنتی ژنهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی، توسط سلولهای بنیادی فولیکول مو است.

روش کار: فولیکول مو از پوست سر انسان با استفاده از روش میکروپانچ جداسازی شد و در آزمایشگاه پس از جداسازی کپسول، فولیکولها در فلاسک کشت در داخل محیط کشت DMEM-F12+ FBS کشت داده شدند. پس از رشد به بیرون سلولهای بنیادی فولیکول مو از ناحیه برجستگی فولیکول ها، بیان نشانگرهای سلول های بنیادی با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: آنالیز نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلولهای بنیادی فولیکول مو به میزان Stro-1 25.26%، CD90 50.85%، CD105 45.24%، CD44 61.20%، CD45 8.20%، CD146 11.86%، CD106 2.72%، CD166 7.21%، CD19 26.74% را بیان می کنند.

نتیجه گیری:سلولهای بنیادی جداسازی شده این مطالعه، برخی از نشانگرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی را به طور قابل توجهی بیان می کنند. ویژگی های خاصی که این نشانگرها به سلول می دهند، سلولهای بنیادی فولیکول مو را به عنوان گزینه ای مناسب برای سلول درمانی، مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی معرفی می کنند.

کلمات کلیدی: فولیکول مو، سلول بنیادی مزانشیمی، فلوسایتومتری

دریافت: ۹۳/۵/۱۶ **پذیرش:** ۹۳/۸/۱۰

مقدمه

سلولهای بنیادی با توانایی تقسیم نامحدود و تمایز به دیگر انواع سلولها مشخص می شوند [۱]. این سلولها در زمینه‌های تحقیقاتی و پایه زیست شناسی و پزشکی از جایگاه خاصی برخوردارند. سلولهای بنیادی در بافتهایی مانند استخوان، بیضه، تخمدان، پوست، سیستم عصبی، عضله، خون و... وجود دارند و با فعالیت خود در سر تا سر طول زندگی، سلولهای از دست رفته در بافتها را با سلولهای تازه جایگزین می‌کنند. سلولهای بنیادی موجود در بافتهای مختلف به صورت خاموش باقی می‌مانند و در شرایط و مراحلی خاص از زندگی فرد یا به هنگام بروز جراحت شروع به فعالیت می‌کنند. این مفهوم بیان می‌کند که سلولهای بنیادی فقط در جایگاههای خاصی از بافتها زندگی و رشد می‌کنند [۲].

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

سلولهای بنیادی از لحاظ تمایزی به انواع همه توان[۱]، پرتوان[۲]، چندتوان[۳]، تک توان[٤] تقسیم بندی می شوند [۳] و از نظر منشاءِ نیز به دو نوع سلولهای بنیادی رویانی و سلولهای بنیادی بالغ طبقه بندی می شوند. سلولهای بنیادی رویانی توان ساخت یک جاندار کامل را دارند و این در حالی است که سلولهای بنیادی بالغ محدودتر بوده و سلولهای پیر یا آسیب دیده ی بافتهای خاصی را جایگزین می کنند [٤].

سلول های بنیادی کاربرد فراوانی در پزشکی ترمیمی دارند. از آن جمله شناسایی سلولهای بنیادی اپیتلیال قرنیه در ابداع تکنیک‌های جدیدی برای پیوند قرنیه و درمان انواع خاصی از کوری موجب پیشرفت هایی شده است [۵]، همچنین شناسایی و جداسازی سلولهای بنیادی خون‌ساز منجر به ابداع روشهای جدید در پیوند اتولوگ و انتقال ژن شده است [۶]. اگرچه امروزه پیشرفت‌هایی در درمان ریزش مو و دیگر بیماریهای پوستی بدست آمده است ولی هنوز این روش به شناسایی صحیح سلولهای بنیادی فولیکول مو و ژنهای مربوط به آن وابسته است [۷]. عقیده بر این است که ذات رشد چرخه‌ای فولیکول مو به سلولهای بنیادی موجود در فولیکول مو مربوط است. بنابراین بررسی و شناسایی دقیق ویژگی های سلولهای بنیادی فولیکول مو از نیازهای جدی در پیشبرد روشهای نوین درمان ریزش مو و دیگر بیماریهای پوستی به شمار می‌روند [۸]. یکی از مهمترین ویژگی‌های زیست شناسی سلولهای بنیادی فولیکول مو، چرخه‌ی رشد کند آنهاست علاوه بر این، سلولهای بنیادی فولیکول مو در کنام[۵] خود، سلولهایی خاموش‌اند که در خارج از چرخه‌ی رشد و به غیر از مواقع مورد نیاز، تکثیر ندارند. از اینرو می‌توانند از طریق روشهای حفظ لیبل[۶] در داخل بافت اپیتلیال مورد شناسایی قرار گیرند [۹]. مطالعات بر روی فولیکول موی موش صحرائی نشان داده است که سلولهای موجود در قسمت برجستگی مو می‌توانند برچسب رنگی را حدود ١٤ ماه در خود نگه دارند [۱۱] که این مدت تمام طول عمر یک موش به حساب می‌آید [۹].

در سال ۱۹۹۳ کوباپاشی و همکارانش با استفاده از قطعات فولیکول موی سبیل موش صحرایی، خاصیت ایجاد کلونی مناطق مختلف فولیکول مو را در محیط آزمایشگاهی بررسی کردند. مطالعه‌ی آنها نشان داد که ۹۵٪ کلونی‌های ایجاد شده در کشت بافت در مناطق برجستگی فولیکول قرار داشتند و کمتر از ٤٪ از سلولهای سازنده‌ی کلونی نیز در منطقه‌ی ماتریکس فولیکل مو قرار داشتند. این نتایج نشان می‌داد که علاوه بر قسمت برجستگی، در منطقه‌ی ماتریکس فولیکول مو نیز سلولهای بنیادی حضور دارند و قسمت برجستگی به صورت مخزنی برای سلولهای بنیادی فولیکول مو عمل می‌کند [۱۲]. سلولهای کلونی‌ساز موجود در برجستگی مو در موش و انسان در مقایسه با جمعیت‌های دیگر کراتینوسایت در پوست، دارای خاصیت تکثیر و پتانسیل رشد بیشتری هستند که نشان دهنده‌ی وجود ویژگی بنیادی درسلولهای منطقه‌ی برجستگی فولیکول مو می باشد [۹]. بافت‌هایی مانند اپیدرم و فولیکول مو که سلول هایشان خود نوزایی[۷] دارند، به طور دائم سلولهای جدیدی می‌سازند که جایگزین لایه‌های مرده‌ی پوست و فولیکول مو می شوند [۱۳].

سلولهای بنیادی فولیکول مو، مانند دیگر سلولهای بنیادی موجود در بدن فرد بالغ، چرخه‌ی رشد کندی دارند و بندرت وارد چرخه‌ی رشد می شوند، که با استفاده از این ویژگی ماده ژنتیکی خود را از آسیب

[1] Totipotent Stem Cells
[2] Pluripotent Stem Cells
[3] Multipotent Stem Cells
[4] Unipotent Stem Cells
[5] Niche
[6] Label Retaining Methods
[7] Self- Renewal

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

هایی که در اثر تقسیم زیاد می توانند رخ دهند، حفظ می کنند [۱۵،۱٤]. سلولهای بنیادی دارای چرخه تکثیر کند، در اثر یکبار تقسیم دو نوع سلول تولید می کنند، یک سلول بنیادی که جایگزین سلول تقسیم شده می شود و یک سلول انتقالی تکثیر یافته که مسیر تمایزی را پیش گرفته و به سلول مورد نیاز بافت تمایز می یابد [۱۶]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ناحیه برجستگی فولیکول مو ناحیه‌ای محدود شده است که به عنوان مخزنی برای سلولهای بنیادی بالغ در نظر گرفته می‌شود [۱۷].

در چرخه‌ی رشد، هر فولیکول مو از سه مرحله عبور می‌کند: مرحله‌ی رشد یا آناژن مرحله‌ی سکون یا کاتاژن، مرحله‌ی استراحت یا تلوژن که عبور از هر مرحله نیازمند همکاری سلولهای بنیادی موجود در ساختار مو است و سلولهای بنیادی فولیکول مو تمام سلولهای موجود در فولیکول را که در هر مرحله موردنیاز است، می‌سازند [۱۷]. ناحیه برجستگی مو ناحیه‌ای در قسمت میانه متمایل به پایین فولیکول موی انسان است که به عنوان مخزنی برای سلولهای بنیادی ناحیه برجستگی فولیکول مو در این چرخه نقش قابل توجهی دارند [۷]. اما در فولیکول موی موش صحرائی وموش سوری، ناحیه ی برجستگی متمایل به بالای میانه ی فولیکول مو است [۱۸].

اگرچه گروه‌های متعددی سعی در جداسازی سلولهای بنیادی از فولیکول موی انسان با روشهای مکانیکی [۱۹] یا تکنیک‌های جداسازی با استفاده از لیزر[1] داشته‌اند ولی همچنان جداسازی سلولهای زنده از قسمت برجستگی مو نیازمند روشهای دقیق‌تر است [۲۰]. مطالعات پیوند سلول [۱۹] و نشانه‌گذاری غیرمستقیم [۲۱] پیشنهاد کرده‌اند که سلولهای بنیادی جداسازی شده از برجستگی مو توانایی تمایز به سلولهای نورونی و چندین سلول موجود در اپیدرم پوست را دارند [۷،۲۲]. این نوع از سلولهای بنیادی برای ساخت لایه‌ای مشابه پوست مورد استفاده قرار می‌گیرند که در درمان زخم‌های سوختگی و آسیب های اپیتلیوم کاربرد دارند [۲۳،۲٤]. چون سلولهای بنیادی فولیکول مو توانایی ساخت تمام انواع سلولهای موجود در پوست را دارند می‌توان از آنها برای ساخت پوست ترکیبی استفاده کرد که هم دارای لایه درم و هم دارای لایه-ی اپیدرم است [۱۶،۲۵].

در سالهای اخیر تلاشهایی برای شناسایی نشانگرهای بنیادی سلولهای بنیادی فولیکول مو انجام شده است. در سال ۲۰۰٤ ما و همکارانش نشانگرهای CD71, keratin 19, keratin15, b1-integrin و فاکتورهای رونویسی CD34, P63 را برای تشخیص سلولهای بنیادی فولیکول مو، بررسی کردند [۱۶] در ۲۰۰۶ یو و همکارانش نشان دادند کهOct4, cytokeratin نشانگرهای مثبت برای سلولهای بنیادی فولیکول مو هستند، در سال ۲۰۰۳ اوهیاما و همکارانش جمعیت سلولی مهمی با نشانگرهای مثبت CD200 از فولیکول موی انسان جداسازی کردند که دارای خاصیت کلونی‌زایی بالایی بودند [۳]. همچنین در مطالعاتی که در سالهای اخیر بر روی موش صحرائی و موش سوری انجام گرفت، در سال ۲۰۱۳ نجف زاده و همکارانش نشان دادند که سلول های بنیادی که با مارکرهای Nestin از فولیکول مو جداسازی می شوند دارای ویژگی بنیادی و قدرت تمایزی بالایی هستند [۲۲]. در سال ۲۰۱۱ نوبخت و همکارانش جمعیتی از سلولهای بنیادی از فولیکول مو را جداسازی کردند که نشانگرهای Nestin، CD34 و K15 را بیان می کردند [۲۶]، و در سال ۲۰۱۲ نیز Nestin و Sox10 را به عنوان نشانگر شناساگر سلولهای بنیادی فولیکول مو معرفی کردند [۲۷].

در مطالعه ای دیگر نیز Cytokeratine7، CK 8، CK15، CK18 به عنوان نشانگرهایی برای شناسایی سلولهای بنیادی فولیکول مو در موش صحرائی معرفی گردید [۲۸].

[1] Laser Capture Microdisection (LCM)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

با وجود مطالعات اخیر بر روی نشانگرهای سطحی جمعیت های سلول ها ی بنیادی جدا سازی شده از فولیکول موی انسان، همچنان نیاز به بررسی این نشانگرها در جمعیت های جدید سلولی به منظور اثبات حالت بنیادی آنها احساس می شود. در مطالعه حاضر ، ضمن بررسی امکان کشت و تکثیر سلول های بنیادی از فولیکول موی جداسازی شده با استفاده از روش میکروپانچ، در محیط کشت آزمایشگاهی، بیان نشانگرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی در سلول های بدست آمده مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

جداسازی و کشت سلولهای بنیادی فولیکول مو

فولیکول های مو از طریق روش میکروپانچ و در اتاق عمل استریل، پس از کسب رضایت از بیمار، از بافت پوست سر یک مرد بالغ جداسازی شدند و در ظرف حاوی سرم فیزیولوژیک قرار داده شدند. سپس در داخل یخ به آزمایشگاه کشت سلول انتقال یافتند. بعد از یک ساعت از جداسازی فولیکول مو از پوست سر، آنها در فلاسک حاوی محیط کشت بدین صورت کشت داده شدند: فولیکولهای مو از ظرف حاوی سرم فیزیولوژیک خارج شدند. در پتری دیش حاوی ۵ میلی‌لیتر HBSS حاوی ۲٪ آنتی بیوتیک Pen/Strep قرار داده شدند. با استفاده از تیغ جراحی یک برش طولی بر روی فولیکول ایجاد شده و کپسول اطراف فولیکول از آن جدا شد تا سلول های بنیادی اطراف فولیکول ها با محیط کشت و کف فلاسک کشت تماس داشته و امکان رشد داشته باشند. در فولیکولهایی که کپسول اطراف آنها جدا شده بودند برشی در پایین و راس انجام داده شد تا بخش میانی فولیکول که دارای کنام سلولهای بنیادی است در دسترس باشد. سپس به فلاسک کشت T25 حاوی محیط کشت دارای ۷۸/٤ درصد DMEM-F12، ۲۰درصد FBS، ۱/۶٪ آنتی بیوتیک Pen/Strep انتقال یافتند و در انکوباتور Co_2 دار در رطوبت ۸۵٪ و دمای 37° و مقدار Co_2 ۵٪ نگهداری شدند.

پاساژ سلول ها

از روز پنجم فولیکول های موجود در فلاسک کشت به کف فلاسک چسبیده و ثابت شدند، این حالت نشان دهنده رشد و تکثیر سلول از قسمت پشت فولیکول به طرف کف فلاسک بود. از روز پنجم به بعد هر چهار روز یکبار محیط کشت فلاسک ها تعویض شد. در روز شانزدهم بعد از اولین کشت فولیکول ها در فلاسک کشت، سلول های رشد و تکثیر یافته در اطراف فولیکول مو و کف فلاسک مشاهده شدند، در روز شانزدهم فولیکول ها از کف فلاسک با استفاده از محلول 0.25% trypsin/ 0.02% EDTA جداشده و از محیط خارج گردیدند. در روز بیستم تمام کف فلاسک کشت توسط سلول ها پر شده بود، سلول ها با استفاده از0.25% trypsin/ 0.02% EDTA، هموژن شده و پس از خنثی شدن تریپسین با استفاده از محیط کشت DMEM-F12 حاوی سرم محتویات فلاسک وارد فالکون ۱۵میلی لیتر شدند و در دمای ۲٤ درجه به مدت ۵ دقیقه و در دور ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ شدند. بعد از خالی کردن محیط رویی فالکون ، سلول ها هموژن شده و پس از شمارش سلولها، 4.8×10^{6} سلول بین دو فلاسک کشت T25، حاوی محیط کشت دارای ۷۸/٤٪ DMEM-F12، ۲۰٪ FBS، ۱/۶٪ آنتی بیوتیک Pen/Strep، تقسیم شدند به این ترتیب سلول ها به پاساژ ۱ انتقال یافتند.

آنالیز فلوسایتومتری

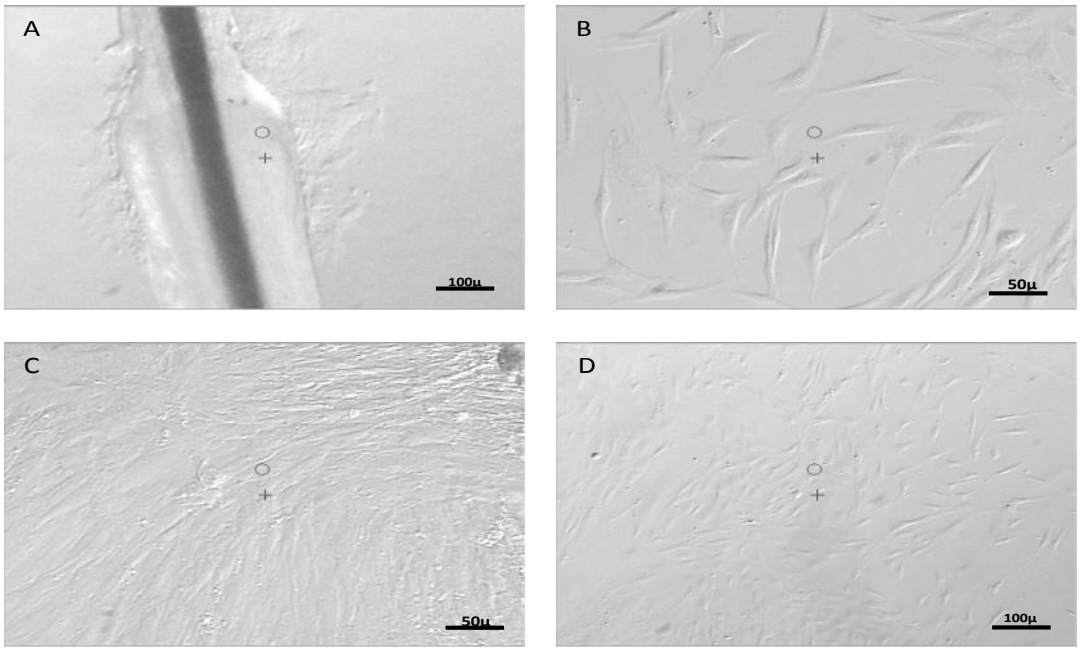
در اولین پاساژ و روز بیست و هفتم، فلاسک کشت T25 به صد در صد فاز رشد رسید. لایه سلولی بوسیله‌ی محلول 0.25% trypsin/ 0.02% EDTA، به صورت شناور درآورده شد و از کف فلاسک جدا گردید. سلولهای شناور ۵ دقیقه در دور 1500 rpm سانتریفرژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و پلاک سلولی در ۲ میلی لیتر از D-PBSA هموژن شده و روی یخ قرار داده شد. سوسپانسیون سلولی

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

به ۹ تیوب سانتریفوژ تقسیم شدند. هر تیوب که حاوی µl ۱۰۰ از سوسپانسیون سلولی بود که روی آن ۲۵µl آنتی‌بادی اولیه اضافه شد (Human mesenchymal stem cell marker Panel R&D system cat# sc107) و در ٤ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون اولیه سوسپانسیون سلولی حاوی آنتی-بادی اولیه ۱۵ دقیقه در دور 1200 rpm سانتریفوژ شد. پلاک سلولی با بافر فلوسایتومتری شستشو داده شده و به آن آنتی‌بادی ثانویه اضافه گردید (Goat anti mouse IgG-FlTC Dako cat#FO474, Goat anti mouse IgM-FITC Abcam Cat# Ser04ec). سوسپانسیون حاصل به مدت ٤٥ دقیقه در $4^{\circ C}$ انکوبه شد و بعد از اتمام مدت انکوباسیون با دستگاه فلوسایتومتری BP FACSCalibur، مورد بررسی قرار گرفتند.

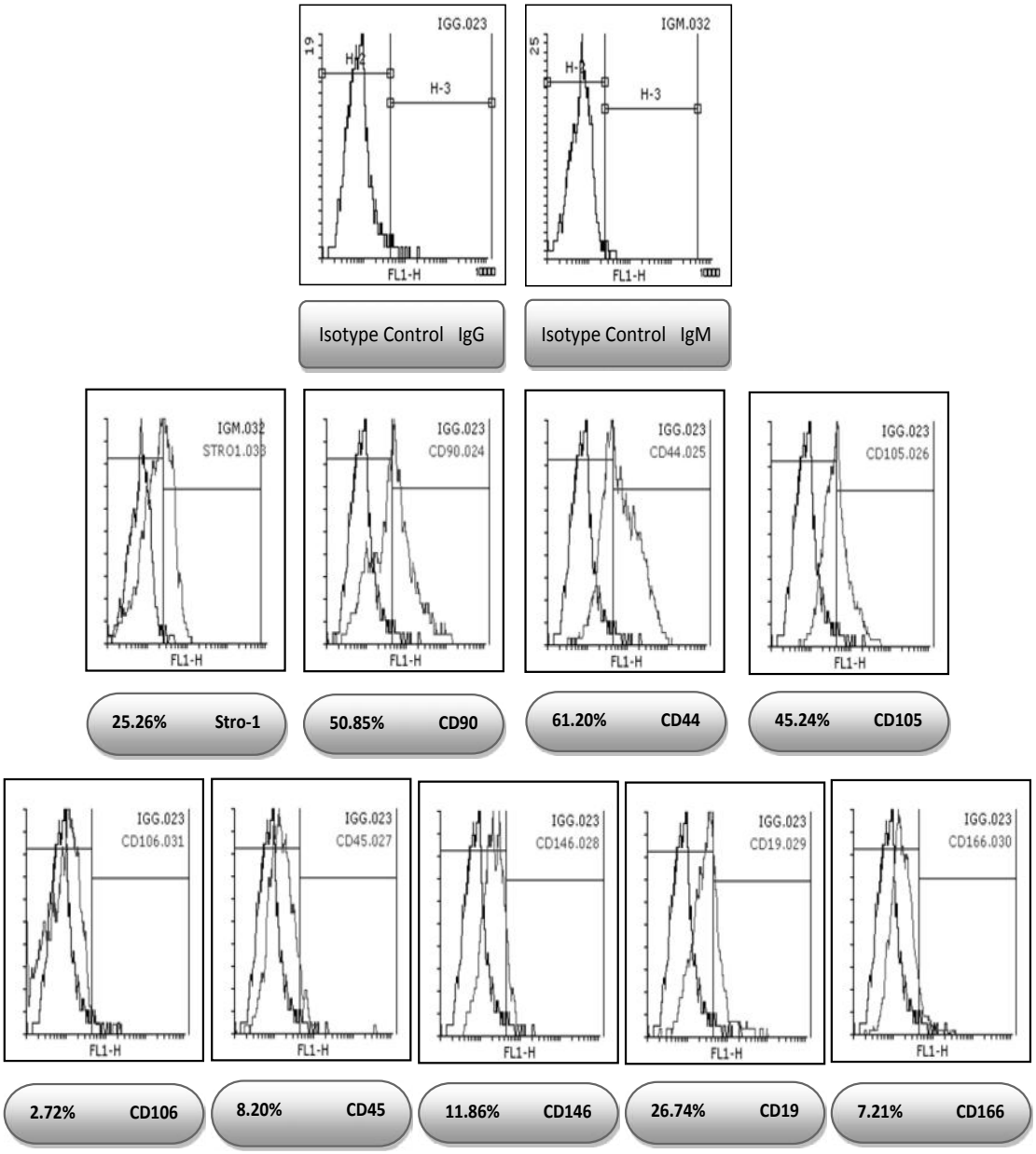
یافته ها

بعد از ۱۶ روز از کشت فولیکولهای مو در فلاسک کشت اولین سلولهای تکثیر یافته، در محیط کشت در ناحیه‌ی برجستگی فولیکول مو مشاهده شدند. سلول های بنیادی تکثیر یافته در اطراف فولیکول مو بعد از خارج کردن فولیکول مو از محیط، به شکل فیبروبلاستی تغییر شکل یافتند و در ادامه مدت زمان کشت نیز این حالت خود را حفظ کردند. ۲۰ روز بعد از کشت اولیه صد در صد کف فلاسک از سلولهای فیبروبلاستی شکل پر شده بود که کشت سلولی، پاساژ داده شد (شکل۱). در پاساژ ۱، سلولها به منظور بررسی میزان بیان نشانگرهای CD90، CD45، CD44،CD105، CD45، CD146، CD106، CD166، CD19 که بیانگر ویژگی سلول های بنیادی مزانشیمی هستند، تحت آنالیز فلوسایتومتری قرار گرفتند و داده‌ها با نرم‌افزار Cell Quest Pro مورد



شکل ۱. فولیکول موی جداسازی شده با استفاده از روش میکروپانچ پس از جدا سازی کپسول در فلاسک کشت ، کشت داده شد a) روز شانزدهم کشت ، در اطراف فولیکول مو اولین سلول های تکثیر یافته دیده می شوند b) پس از خارج کردن فولیکول از محیط کشت ، سلول های اطراف فولیکول مو که ظاهر فیبروبلاستی داشتند به رشد وتکثیر خود ادامه می دهند تا c) در روز بیستم تمام کف فلاسک را دربر می گیرند d) سلول ها جدا سازی شده از فولیکول مو در روز بیست وهفتم و در پاساژ اول تحت آنالیز فلوسایتومتری قرار گرفتند.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]



نمودار ۱. نتایج بررسی فلوسایتومتری نه نشانگر سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی بروی سلول های بنیادی جداسازی شده از فولیکول مو در پاساژ یک

تحلیل قرار گرفتند (نمودار ۱).

بحث

سلول های بنیادی علاوه بر ویژگی‌های مشترکی که دارند. گاهی در بیان برخی مارکرها تفاوت نشان می دهند که این حالت می‌تواند از تفاوت در منشاءِ، بوجود آمده باشد. سلول های بنیادی موجود در بافت های مختلف بدن فرد بالغ یا سلول های بنیادی رویانی هر کدام با توجه به مولکولهای نشانگری که در سطح شان بیان می کنند شناسایی و جداسازی می شوند. بافت فولیکول مو نیز مانند دیگر بافت های

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

بدن دارای سلول های بنیادی است که به عنوان ذخیره ای برای فولیکول مو عمل کرده و سلول های مورد نیاز فولیکول مو و اطراف آن را تامین می کنند [۲۹]. فولیکول مو بافتی تجدیدپذیر است که فازهای رشد، سکون و استراحت را طی می کند [۳۰].

در میان مناطق مختلف فولیکول مو ، بخش های غلاف پوستی[1]و پاپیلای پوستی[2] نقش مهمی در رشد نمو و حالت خود نوزایی فولیکول مو دارند [۳۰] و جمعیت های مختلفی از سلول های بنیادی بالغ را دربر می گیرند. علاوه بر این مناطق، سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان در فولیکول مو نیز مشاهده کرد که نقش اصلی را در زندگی چرخه ای فولیکول مو بر عهده دارند [۳۱،۳۲]. در مطالعه ی حاضر سعی شده است، سلول های بنیادی مزانشیمی از فولیکول مو جداسازی شده و کشت داده شوند. بعد از خارج کردن فولیکول مو از محیط کشت سلول هایی که توانسته بودند در محیط کشت رشد و تکثیر یابند تحت آنالیز فلو سایتومتری قرار گرفتند. در این مطالعه نه مارکر سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی بررسی شد. از بین این نه مارکر، پنج مارکر دارای بیان قابل توجهی بودند که نشانگر ویژگی های خاص سلول هایی است که در این مطالعه جداسازی شده اند.

آنتی ژن سطحی Stro-1 که بیشتر در سلولهای استرومایی مغز استخوان بیان می شود یکی از پنج مارکری است که در مطالعه ی حاضر توسط سلول های بنیادی جداسازی شده بیان نسبتا بالایی در مقایسه با مارکرهای سطحی دیگر دارد [۳۳]. جمعیت های سلولی که از نظر وجود این آنتی ژن مثبت هستند توانایی کلنی زایی بالایی داشته و همچنین توانایی تمایز به دودمان سلول های مزانشیمی را در محیط آزمایشگاهی دارند [۳٤]. علاوه بر این، سلولهای $Stro\text{-}1^+$ می توانند به عنوان لایه ی تغذیه کننده ی سلول های خونساز مغز استخوان در کشت های ex vivo مورد استفاده قرار گیرند [۳۵] و همچنین سلول های مزانشیمی $stro\text{-}1^+$ توانایی سرکوب ایمنی[3] و لانه گزینی[4] بیشتری نسبت به دیگر سلول های بنیادی در مدل های حیوانی دارند [۳۶،۳۷] مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول های $Stro\text{-}1^+$ دارای توانایی تمایز به سلول های عضله صاف، سلول های چربی و استئوبلاست را نیز دارا هستند [۳٤،۳۸]. بنابراین این سلول ها کاندید مناسبی جهت استفاده در سلول درمانی می باشند.

مارکر سطحی دیگری که در مطالعه حاضر بیان نسبتا بیشتری دارد CD90 است. این گلیکوپروتئین در فرایندهای ایمونولوژیکی از جمله فعال کردن لنفویست‌های T نقش دارد [۳۹،٤۰]. به علاوه در برخی فرآیندهای غیر ایمونولوژیکی از جمله مهار رشد اکسونی، سیگنالینگ آپوپتوز، چسبندگی و مهاجرت سلولی، سرکوب تومور و تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌ها از جایگاه مهمی برخوردار است، که در مجموع این فعالیت ها نشان دهنده ی نقش مهم این آنتی ژن در تنظیم تعامل سلول - سلول و سلول - ماتریکس هستند [٤۱].

در بین نه مارکر بررسی شده آنتی ژن سطحی CD44 دارای بیان ۶۱/۲۰ درصدی بود که بیان نسبتا بالایی داشت. این آنتی ژن سطحی در میانکنش های سلول- سلول بین سلول های زاینده و سلول های محیط اطراف آنها ضروری بوده و باعث حفظ ویژگی بنیادی سلول های زاینده می شود [٤۲] و علاوه بر این CD44 در لانه گزینی و مهاجرت سلول های بنیادی پیش ساز از جمله مارکرهای مهم به شمار می‌رود [٤۳،٤٤].

CD105 گلیکو پروتئینی است که بیشتر در سلول های اندوتلیال رگ هایی که جدید ساخته شده اند بیان بالایی دارد[٤۵]. همچنین CD105 در رشد و

[1] Dermal Sheath
[2] Dermal Papilla
[3] Immunosuppressive
[4] Homing

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

مهاجرت و اتصال سلولی نقش داشته و بیان آن، اتصالات سلولی بین سلول ها، مدت زمان زنده ماندن و رشد سلول های دارای این مارکر را در شرایط رشد بدون سرم بهبود می بخشد [۴۶].

آنتی ژن سطحی CD19 که دارای بیان ۲۶/۷۴ درصدی است، بیشتر در سلو لهای پیش ساز سلول های خونی بیان می شود [۴۷] فعال شدن این مارکر سطحی در لنفویست های B باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلولی شده و با تحریک میتوز تکثیر و فعالیت سلول را کنترل می کند [۴۸].

همان طور که قبلا ذکر شد ویژگی های سلول های بنیادی با توجه به مارکرهای سطحی شان شناسایی می شوند. در این مطالعه نیز با توجه به نتایج فلوسایتو متری می توان ویژگی های خاصی برای سلول های بنیادی جدا سازی شده از فولیکول موی در مطالعه حاضر در نظر گرفت.

نتیجه گیری

در این مطالعه بیان پنج نشانگر سلولهای بنیادی، در سلولهای بنیادی فولیکول موی انسان مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که پیشتر گفته شد، بیان آنتی ژن های سطحی CD105 وCD19 موجب بوجود آمدن ویژگی های تکثیر و رشد بالا و استحکام اتصالات سلولی در سلولهای دارای این آنتی ژن ها می شوند و مارکر های سطحی CD90, CD34 و Stro-1 نیز ویژگی هایی از قبیل توانایی تمایز به دودمانهای مختلف، توانایی ایجاد ارتباط با محیط اطراف سلول، مهاجرت و سرعت رشد بالا را به سلول های مذکور می دهد، این ویژگی ها باعث می شوند سلولهای بنیادی فولیکول مو توان رشد و تکثیر در محیط آزمایشگاهی را داشته و بتوانند به سلولهای مختلفی تمایز داده شوند، از اینرو می توان سلول های بنیادی فولیکول مو را به عنوان کاندیدی مناسب برای استفاده در پزشکی ترمیمی و سلول درمانی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین مرکز درمان ناباروری و تحقیقات سلول های بنیادی آذربایجان که امکانات آزمایشگاهی را در اختیار ما قرار دادند نهایت تشکر را داریم.

References

1- Tiede S, Kloepper JE, Bodò E, Tiwari S, Kruse C, Paus R. Hair follicle stem cells: walking the maze. Eur J Cell Biol. 2007 Jul; 86(7):355-76.
2- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell. 2008 Feb; 132(4):598-611.
3- Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. Cell. 2004 Mar; 116(5):639-48.
4- Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. Cell. 1989 Apr; 57(2): 201-9.
5- Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med. 2000 Jul; 343(2):86-93.
6- Bernstein ID, Andrews RG, Rowley S. Isolation of human hematopoietic stem cells. Blood Cells. 1994; 20(1):15-23.
7- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. Nat Biotechnol. 2004 Apr; 22(4):411-7.
8- Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. Trends Mol Med. 2001 Jul; 7(7):293-301
9- Ohyama M. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. J Dermatol Sci. 2007 May; (2):81-9.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

10- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell. 1990 Jun; 61(7):1329-37.
11- Morris RJ, Potten CS. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. J Invest Dermatol. 1999 Apr; 112(4):470-5.
12- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon y. Segregation of keratinocyte colony forming cells in the bulge of the rat vibrissa. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Aug; 90(15): 7391–7395.
13- Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. J Invest Dermatol. 2006 Jul; 126(7):1459-68.
14- Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. Cell. 2011 Jan; 144(1):92-105.
15- Lavker RM, Sun TT. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. Science. 1982 Mar 5; 215(4537):1239-41.
16- Ma DR, Yang EN, Lee ST. A review: the location, molecular characterisation and multipotency of hair follicle epidermal stem cells. Ann Acad Med Singapore. 2004 Nov; 33(6):784-8.
17- Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. Am J Pathol. 2006 Jun; 168(6):1879-88.
18- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell. 2001 Jan; 104(2):233-45.
19- Moll I. Differential epithelial outgrowth of plucked and microdissected human hair follicles in explant culture. Arch Dermatol Res. 1996 Sep; 288(10):604-10.
20- Xu X, Lyle S, Liu Y, Solky B, Cotsarelis G. Differential expression of cyclin D1 in the human hair follicle. Am J Pathol. 2003 Sep; 163(3):969-78.
21- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science. 2004 Jan; 303(5656):359-63.
22- Najafzadeh N, Nobakht M, Pourheydar B, Golmohammadi MG. Rat hair follicle stem cells differentiate and promote recovery following spinal cord injury. Neural Regen Res. 2013 Dec; 8(36):3365-72.
23- Hoeller D, Huppertz B, Roos TC, Poblete Gutiérrez P, Merk HF, Frank J, et al. An improved and rapid method to construct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. Exp Dermatol. 2001 Aug; 10(4):264-71.
24- Navsaria HA, Ojeh NO, Moiemen N, Griffiths MA, Frame JD. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). Plast Reconstr Surg. 2004 Mar; 113(3):978-81.
25- Jaks V, Kasper M, Toftgård R. The hair follicle-a stem cell zoo. Exp Cell Res. 2010 May; 316 (8):1422-8.
26- Nobakht M, Najafzadeh N, Pourheydar B, Golmohammadi MG. Isolation of Rat Hair Follicle Stem Cells and in Vitro Study of Stem Cell Factors. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(2): 176-185.
27- Esmaeilzade B, Nobakht M, Joghataei MT, Rahbar Roshandel N, Rasouli H, Samadi Kuchaksaraei A, et al. Delivery of epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) to hippocamp in Alzheimer's disease rat model. Iran Biomed J. 2012; 16(1):1-9.
28- Drewa T, Joachimiak R, Bajek A, Gagat M, Grzanka A, Bodnar M, et al. Hair follicle stem cells can be driven into a urothelial-like phenotype: an experimental study. Int J Urol. 2013 May; 20(5): 537-42.
29- Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. J Clin Invest. 2006 Jan; 116(1): 249-60.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]

30- Ohyama M, Zheng Y, Paus R, Stenn KS. The mesenchymal component of hair follicle neogenesis: background, methods and molecular characterization. Exp Dermatol. 2010 Feb; 19(2): 89-99
31- Richardson GD, Arnott EC, Whitehouse CJ, Lawrence CM, Hole N, Jahoda CA. Cultured cells from the adult human hair follicle dermis can be directed toward adipogenic and osteogenic differentiation. J Invest Dermatol. 2005 May; 124(5):1090-1.
32- Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CA. Trans-gender induction of hair follicles. Nature. 1999 Nov; 402(6757):33-4.
33- Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells. In: The Stem Cell Research Community, editors. StemBook, 1st ed. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008: 2-7.
34- Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood. 1991 Jul; 78(1):55-62.
35- Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs. 2002 Jan; 170(2-3):73-82.
36- Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. Blood. 2004 May 1; 103(9):3313-9.
37- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 2000 Aug; 28(8):875-84.
38- Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. Blood. 1994 Dec; 84(12):4164-73.
39- Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. J Immunol. 2004 Sep 15; 173(6):3581-8.
40- Barboni E, Gormley AM, Pliego Rivero FB, Vidal M, Morris RJ. Activation of T lymphocytes by cross-linking of glycophospholipid-anchored Thy-1 mobilizes separate pools of intracellular second messengers to those induced by the antigen-receptor/CD3 complex. Immunology. 1991 Apr; 72(4):457-63.
41- Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. FASEB J. 2006 Jun; 20(8):1045-54.
42- Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, et al. Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. Cells Tissues Organs. 2008 Jul; 188(1-2):160-9.
43- Wu L, Kincade PW, Shortman K. The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate. Immunol Lett. 1993 Sep; 38(1):69-75.
44- Khaldoyanidi S. Directing stem cell homing. Cell Stem Cell. 2008 Mar; 2(3): 198-200.
45- Barresi V, Grosso M, Vitarelli E, Granese R, Barresi G. Endoglin (CD105) immuno-expression in human foetal and neonatal lungs. Histol Histopathol. 2008 Jun; 23(6): 701-8.
46- Guo B, Rooney P, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D, et al. Overexpression of CD105 in rat myoblasts: role of CD105 in cell attachment, spreading and survival. Int J Oncol. 2004 Aug; 25(2):285-91.
47- Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ, Schwarting R, Daley J, Tedder TF. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. Mol Cell Biol. 1994 Jun; 14(6):3884-94.
48- Rijkers GT, Griffioen AW, Zegers BJ, Cambier JC. Ligation of membrane immunoglobulin leads to inactivation of the signal-transducing ability of membrane immunoglobulin, CD19, CD21, and B-cell gp95. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Nov; 87(22):8766-70.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2022-10-04]