

## ***Effect of Neurotrophin-3 on differentiation of rat hair follicle stem cells into neural like cells***

***Moghani Ghoroghi F., M.Sc\*, Nobakht M., Ph.D., Esmaeilzade B., M.Sc., Bakhtiyari M., Ph.D., Hejazian L.B., M.Sc.***

*\* P. O, Box: 14155-6183 Histology and Neuroscience Department, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: Dec 2011 Accepted: Mar 2012

### ***Abstract***

**Purpose:** The aim of this study was to evaluate the effect of NT-3 on the decrease of the differentiation time of bulge stem cells of rat hair follicle from neuron like cells.

**Materials and Methods:** The bulge region of the rat whisker was isolated from and cultured in DMEM/F12 supplemented with epidermal growth factor (EGF) in 3 groups for 7,8 and 9 days . Then 10 ng /ml NT-3 was added to each group for 3 days. Finally, cell differentiation was assessed by immunocytochemistry using  $\beta$ III-tubulin antibody and the result was compared with control groups.

**Results:** According to our results hair follicle bulge stem cells expressed CD34 and Nestin in 7-9 and 10-12 first days after cultivation respectively. By using NT-3 duration differentiation process the cells showed positive reaction to  $\beta$ III-tubulin antibody.

**Conclusion:** The results indicate that NT-3 can affect on differentiation speed even in less than 10 days.

**Key Words:** Bulge of hair follicle, CD34, Nestin, NT-3,  $\beta$ III-tubulin

## اثر نوروتروفین ۳ بر تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی به سلول‌های شبه نورون

فاطمه مغنی قرقی *M.Sc.*، ملیحه نوبخت *Ph.D.*، مهرداد بختیاری *Ph.D.*، بنفشه اسمعیل‌زاده *M.Sc.*،  
لیلا بیگم حجازیان *M.Sc.*

\* گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\*\* گروه بافت شناسی و علوم اعصاب و مرکز تحقیقات مقاومت‌های ضد میکروبی، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\*\*\* گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، و گروه آناتومی، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، ایران

\*\*\*\* گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، و گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

تاریخ دریافت: دی ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۹۰

### چکیده

**هدف:** بررسی تأثیر NT-3 بر کاهش زمان تمایز سلول‌های بنیادی ناحیه bulge فولیکول مو به سلول‌های شبه نورون

**مواد و روش‌ها:** ابتدای فولیکول‌های ناحیه گونه و پشت لب موش صحرایی جدا شده و ناحیه bulge آن کشت داده شد. سلول‌های بنیادی به دست آمده از ناحیه bulge در محیط DMEM/F12 حاوی EGF در ۳ گروه کشت داده شدند. در این ۳ گروه پاساژ در روزهای ۷، ۸ و ۹ انجام شد. سپس هر گروه به مدت ۳ روز در مجاورت NT-3 با دوز ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر قرار داده شدند. به وسیله روش ایمونوسیتوشیمی تمایز سلول‌ها با آنتی‌بادی بتاتری توبولین ( $\beta$ III tubulin) در این سه گروه بررسی و با گروه کنترل مقایسه شد. نتایج با استفاده از آزمون تی تست آنالیز شده و  $p < 0.05$  به عنوان سطح اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه سلول‌های بنیادی به دست آمده از ناحیه bulge فولیکول در ۷-۹ روز اول نشانگر CD34 و طی ۱۰-۱۲ روز اول نشانگر نستین را بیان کردند. سپس پس از دریافت NT-3 به مدت ۳ روز در گروه‌های ذکر شده همزمان با روند تمایز، این سلول‌ها با آنتی‌بادی بتاتری توبولین ( $\beta$ III tubulin) واکنش مثبت نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این مطالعه، NT-3 بر تسریع روند تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو اثر معنی‌داری دارد و حتی می‌تواند در کمتر از ۱۰ روز سلول‌های بنیادی ناحیه bulge را به سلول‌های شبه نورون متمایز کند.

**کلید واژه‌ها:** bulge فولیکول مو، CD34، نستین، NT-3، بتاتری توبولین

### مقدمه

گرفته است. در این راستا، استفاده از سلول‌های بنیادی برای تمایز به سلول‌های شبه نورون، مورد توجه قرار گرفته است.

با توجه به پیشرفت‌های جدید در علوم اعصاب و کشت سلولی، درمان‌های جدید برای ترمیم عصبی مد نظر قرار

آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه آناتومی و علوم اعصاب، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳  
Email: m-nobakht@sina.tums.ac.ir

جنینی و رویانی، توانایی در رشد مجدد نورون‌ها و قابلیت پیوند اتولوگ است [۷].

در سال ۲۰۰۹ آمو (Amoh) و همکاران توانستند در مدت ۳-۴ هفته از این سلول‌ها، سلول‌های GFAP، S100 $\beta$ ، III $\beta$ tubulin و K15 مثبت به دست آورند. همچنین نوبخت و همکاران در سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ به ترتیب در مدت ۸ و ۳ هفته توانستند از این سلول‌ها، سلول‌های III $\beta$ tubulin مثبت به دست آورند [۸-۱۰].

نوروتروفین‌ها بهترین فاکتورهای تروفیک شناخته شده در سیستم عصبی هستند. نوروتروفین‌ها از خانواده فاکتورهای رشد پلی پپتیدی هستند که روی افزایش، تکثیر، تمایز، زنده ماندن و مرگ سلول‌های نورونی و غیر نورونی تأثیر می‌گذارند. این فاکتورها برای سلامتی و بهبود سیستم عصبی لازم و ضروری است. این فاکتورها شامل NGF، BDNF، NT-3 و NT-4 است که علاوه بر عملکرد اصلی شان برای زنده نگهداشتن سلول‌ها، فعالیت‌هایی در سطح بالاتر از قبیل یادگیری، حافظه و رفتار را نیز واسطه‌گری می‌کنند [۱۱].

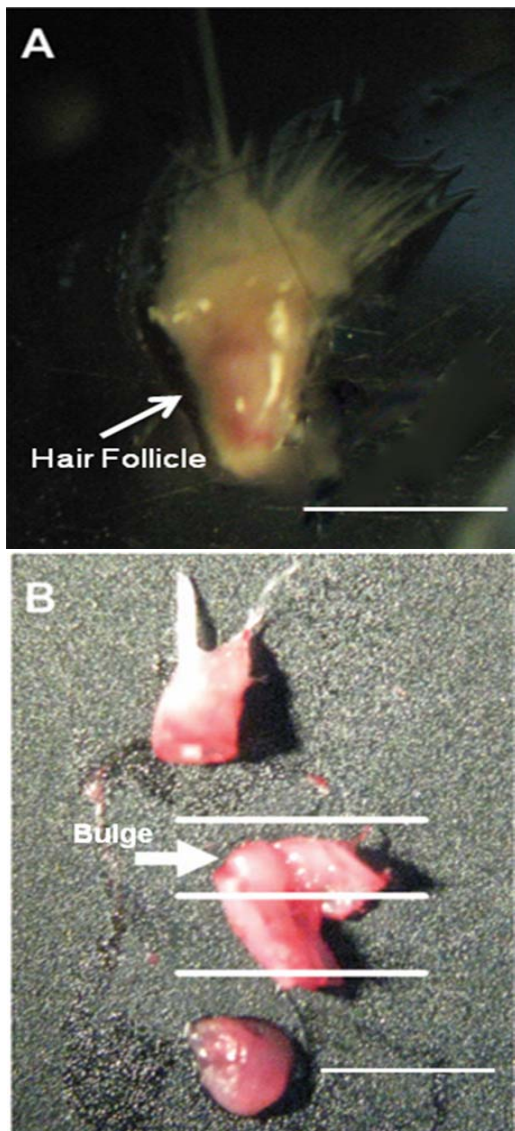
فاکتورهای نوروتروفیک در دوران تکامل و بلوغ در پاسخ به آسیب‌های عصبی عملکرد تنظیم نورونی را انجام می‌دهد [۱۲]. نوروتروفین‌ها در پاتوفیزیولوژی گروه گسترده‌ای از اختلالات نورودژنراتیو و روانی، موثر شناخته شده‌اند. همچنین تغییرات در سطح نوروتروفین‌ها در اختلالات نورودژنراتیو مانند بیماری آلزایمر وهانتینگتون و اختلالات روانی شامل افسردگی و سوء مصرف مواد یافت شده است. در نتیجه نوروتروفین‌ها به‌عنوان یک استراتژی درمانی برای اختلالات روانی - عصبی مورد توجه قرار گرفته‌اند. تأثیر نوروتروفین‌ها بستگی به دو عامل دارد: سطح و میزان دسترسی بودن آن‌ها و تمایل آن‌ها برای اتصال به رسپتورهای خلال غشایی و واکنش‌های آبخاری سیگنالی که پس از اتصال به رسپتور تحریک می‌شود [۱۱].

نوروتروفین‌ها ابتدا به شکل پیش سازها یا پیش-نوروتروفین‌ها ساخته می‌شوند که این پیش سازها شکسته شده و پروتئین فعال بالغ را آزاد می‌کنند [۱۳]. پروتئین‌های بالغ دایمرهای پایدار غیر کووالان را تشکیل می‌دهند و معمولاً در طول دوران تکامل در

برای این منظور استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ موجود در ناحیه bulge فولیکول مو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. NT-3 نیز به‌عنوان یکی از فاکتورهای تروفیک شناخته شده سیستم عصبی برای ایفای نقش مهم تسهیل در زنده ماندن و تمایز نورونی طی تکامل بسیار مورد توجه است. از آنجایی که کوتاه کردن زمان ترمیم عصبی فاکتور بسیار مهمی در روند درمان است؛ در پژوهش حاضر تأثیر NT-3 بر کاهش زمان تمایز سلول‌های بنیادی ناحیه bulge فولیکول مو به سلول‌های شبه نورون بررسی شد.

بدن انسان از سه دسته سلول ساخته می‌شود: سلول‌های جنسی، سلول‌های سوماتیک یا احشایی و سلول‌های بنیادی. سلول بنیادی سلولی است که تمایز نیافته و دارای قابلیت تقسیم زیادی است. این سلول‌ها هم دارای خاصیت خود تکثیری هستند و هم پتانسیل تبدیل شدن به انواع سلول‌های تخصص یافته بالغ را دارند [۱]. اگرچه زمانی تصور براین بود که ترمیم سیستم عصبی مرکزی پستانداران غیرممکن است اما مطالعات دو دهه اخیر نشان داده است که ترمیم سلول‌های عصبی می‌تواند در یک محیط مناسب رخ دهد. پیوند بافتی یا گرافت‌های عصب محیطی برای ترمیم نواحی آسیب دیده سیستم عصبی مرکزی به صورت سستی استفاده می‌شود. اما در این روش‌ها اختلالات ایمونولوژیکی و بیماری‌های عفونی مشکل ساز است. خوشبختانه پیشرفت‌های جدید در علوم اعصاب و کشت سلولی، درمان‌های جدید برای ترمیم عصبی پیش رو قرار داده است [۲]. در این راستا استفاده از سلول‌های بنیادی برای تمایز به نورون‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. به این منظور می‌توان از انواع سلول‌های بنیادی استفاده کرد. از جمله سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی موجود در ناحیه bulge فولیکول مو در نزدیک محل اتصال عضله راست کننده مو زیر غدد سباسه هستند. این ناحیه دارای سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی است [۳]. همچنین بیان نستین (نشانه سلول‌های بنیادی عصبی) در این سلول‌ها نشان‌دهنده خاستگاه این سلول‌ها از ستیغ عصبی است [۴-۶]. سلول‌های بنیادی فولیکول مو دارای مزایای متعددی هستند. از جمله این مزایا در دسترس بودن آن‌ها، اختصاصی بودن برای هر فرد، کشت راحت و آسان، چند ظرفیتی بودن، نداشتن موارد اخلاقی سلول‌های بنیادی

بافت خارج شد (شکل A-۱). با دو برش عرضی در ناحیه فوقانی و تحتانی فولیکول ناحیه Bulge جدا شد (شکل B-۱). سپس به مدت چند دقیقه در محیط DMEM/F12 محتوی پنی سیلین ۱۰۰ واحد در میلی لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر انکوبه شد. سپس فولیکولها در Trypsin-EDTA ۰/۲۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و زیر هود لامینار به صورت قطعات کوچک درآمدند. در نهایت قطعات فولیکول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند.



شکل ۱. فتوگراف از فولیکول موی رت ویستار. (A) فولیکول همراه با بافت همبند و کیسول اطراف آن. (B) ناحیه Bulge پس از برش طولی کیسول کلاژن (Arrow head). علامت بار: ۵۰۰ میکرومتر

سطح خیلی پایین بیان می شوند. تأثیرات سلولی نوروتروفینها از طریق ۲ رسپتور متفاوت اعمال می شود: رسپتور تیروزین کیناز (Trk) و P75 رسپتور نوروتروفین (P75 NTR). NT-3 به صورت اختصاصی به TrkC متصل می شود. NT-3 به دلیل ایفای نقش مهم تسهیل در زنده ماندن و تمایز نورونی طی تکامل بسیار مشهور است [۱۴].

در سال ۲۰۰۹ لی (Li) و همکاران تمایز سلولهای NSC را به سلولهای نورونی با استفاده از NT-3 با دوز ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر و بعد از مدت ۲ هفته عنوان کردند [۱۵]. همچنین ژانگ (Zhang) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بعد از مدت ۳ هفته با استفاده از NT-3 تمایز SKPs (Skin-derived precursors) را به نوروگزارش کردند [۱۶]. از آنجا که در ترمیم ضایعات عصبی زمان از اهمیت بالایی برخوردار است، در مطالعه حاضر اثر NT-3 بر تمایز سلولهای بنیادی فولیکول موی موش صحرائی به سلولهای شبه نورون در زمانی کمتر از زمانهای عنوان شده، ارزیابی شد.

## مواد و روشها

در این مطالعه از موش صحرائی ویستار نر با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور خریداری شدند و ضمن رعایت قوانین بین المللی حمایت از حیوانات، در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. آب و غذای کافی در اختیار حیوانات قرار داده شد. برای استخراج سلولهای بنیادی، از فولیکول موی پشت لب و گونههای موشهای صحرائی استفاده شد. گونههای موش به روش اصلاح شده Amoh پس از بیهوشی توسط کلروفرم تشریح شد [۵ و ۱۷]. گونهها به وسیله بتادین و الکل ۷۰ درصد ضد عفونی و تراشیده شد. کل بافت پشت لب و گونهها برداشته شد و نمونهها در الکل ۷۰ درصد و ۰/۲ PB مولار و pH=7.4 شستشو داده شد. سپس به منظور جدا شدن پوست و بافت اطراف فولیکولها، نمونهها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول کلاژناز I و دیسپاز II با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از آن فولیکولها با دقت و توسط یک پنس ظریف از لابه لای

### کشت Bulge فولیکول مو

پس از سانتریفوژ، قطعات فولیکول در فلاسک کشت فیلتردار ۲۵ سانتی متر مربع که یک روز قبل با کلاژن نوع یک پوشانده شده بود، کشت داده شدند. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت (DMEM/DMEM F12(3:1) حاوی ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر هیدروکورتیزون، ۱۰ نانو گرم بر میلی لیتر EGF (Epidermal Growth Factor) (Sigma-Aldrich)،  $10^{-9}$  M کلرا توکسین (Sigma-Aldrich) به همراه ۱۰ درصد استفاده شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه و  $CO_2$  ۵ درصد انکوبه شدند. سلول‌های بنیادی فولیکول مو در روزهای ۹ و ۱۲ به وسیله روش ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتومتری ارزیابی شدند. سپس برای بررسی وضعیت تمایز سلول‌ها در سه گروه، پاساژ سلول‌ها در سه زمان انجام شد. پاساژ در روزهای ۷، ۸ و ۹ انجام شد. EGF از محیط سلول‌ها خارج شد و NT-3 (Sigma-Aldrich) با دوز ۱۰ نانو گرم بر میلی لیتر به مدت ۳ روز به محیط کشت اضافه و هر روز محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. پس از ۳ روز دریافت NT-3 سلول‌های هر گروه به وسیله روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند.

### ایمونوسیتوشیمی

سلول‌ها با ۲ میلی لیتر Trypsin-EDTA ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا شدند. سپس به فلاسک ۱۰ درصد اضافه شد. پس از آن سلول‌ها سانتریفوژ شده و روی لاملی که از ۲۴ ساعت قبل با کلاژن پوشانده شده بود، ریخته شدند. ۲۴ ساعت پس از چسبیدن سلول‌ها به لامل محیط روی سلول‌ها برداشته شد و رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی طبق مراحل زیر انجام شد. سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تثبیت شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه و سه بار با فسفات بافر ۰/۱ مولار و pH=۷/۴ شستشو داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در تربتون ۰/۱٪ قرار داده شدند. سپس مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با فسفات

بافر ۰/۱ مولار و pH=۷/۴ شستشو داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک ساعت در Normal Goat Serum ۰/۳ درصد قرار داده شدند. سپس آنتی‌بادی‌های اولیه در غلظت‌های زیراضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شدند. آنتی‌بادی پلی کلونال CD34 (Sigma, 1:75)، آنتی‌بادی مونوکلونال نستین (Sigma, 1:200)، آنتی‌بادی مونوکلونال بتاتری توپین (Sigma, 1:200) و آنتی‌بادی مونوکلونال K15 (Sigma, 1:30) استفاده شد. پس از گذشت زمان فوق نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و سه بار با فسفات بافر ۰/۱ مولار و pH=۷/۴ شستشو داده شدند و سپس به مدت ۱ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه FITC (Sigma, 1:1400)، انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با فسفات بافر، رنگ هسته 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg/ml, Sigma) به مدت ۱-۲ دقیقه اضافه شد. سپس یک بار شستشو با فسفات بافر انجام شد. لامل با چسب گلیسرول به لام چسبانده شد و در نهایت سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلئورسنت مدل Olympus AX70 مشاهده شدند. در هر نمونه ۵ زمینه به صورت راندوم انتخاب شد و توسط نرم افزار Olysia Bioreport شمارش سلولی انجام شد. سپس یافته‌ها به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون Independent-samples T-test تجزیه و تحلیل شد.

### فلوسایتومتری

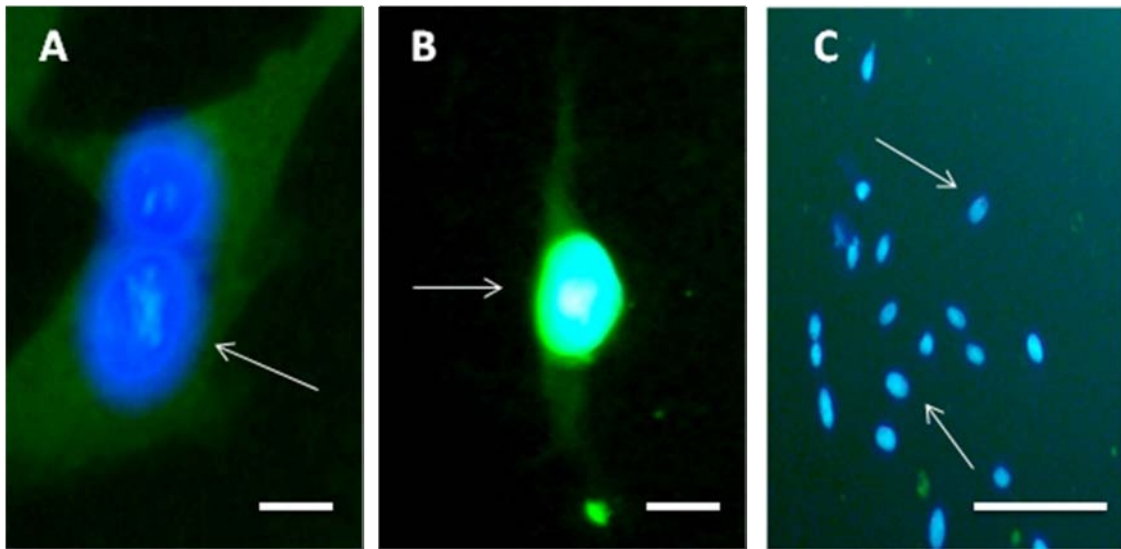
پس از تریپسینه کردن فلاسک و سانتریفوژ سلول‌ها، تعداد ۱۰۰ هزار سلول در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های اولیه (Nestin (۱:۲۰۰)،  $\beta$ -III Tubulin (۱:۲۰۰)، CD34 (۱:۷۵) و K15 (۱:۳۰) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق مجاور شدند. سپس با اضافه کردن ۲-۱ میلی لیتر PB ۰/۱ مولار، سلول‌ها سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه FITC (۱:۱۴۰۰) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شدند. پس از زمان فوق آنالیز فلوسایتومتری

در ۷-۱۰ روز اول کشت و نشانگر Nestin (نشانگر سلول‌های بنیادی عصبی) را در ۱۰-۱۲ روز اول کشت بیان می‌کنند. در حالی‌که نشانگر K15 (نشانگر کراتینوسیت‌ها) را بیان نمی‌کنند (شکل‌های ۲A، ۲B). همچنین نتایج فلوسایتومتری بیان نشانگرهای CD34 و Nestin را در زمان‌های مطرح شده تأیید کرد (شکل ۳).

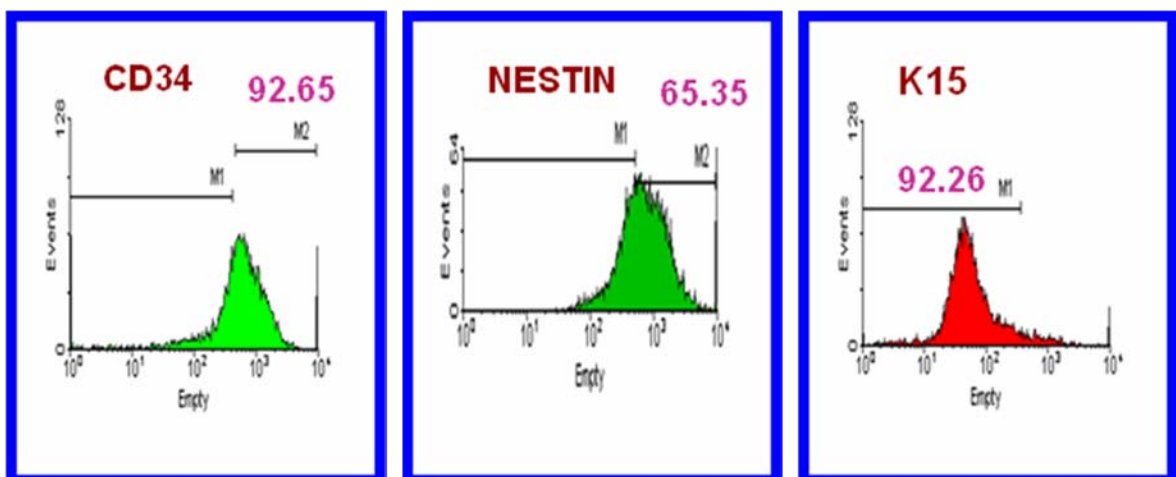
روی آن‌ها انجام شد.

## یافته‌ها

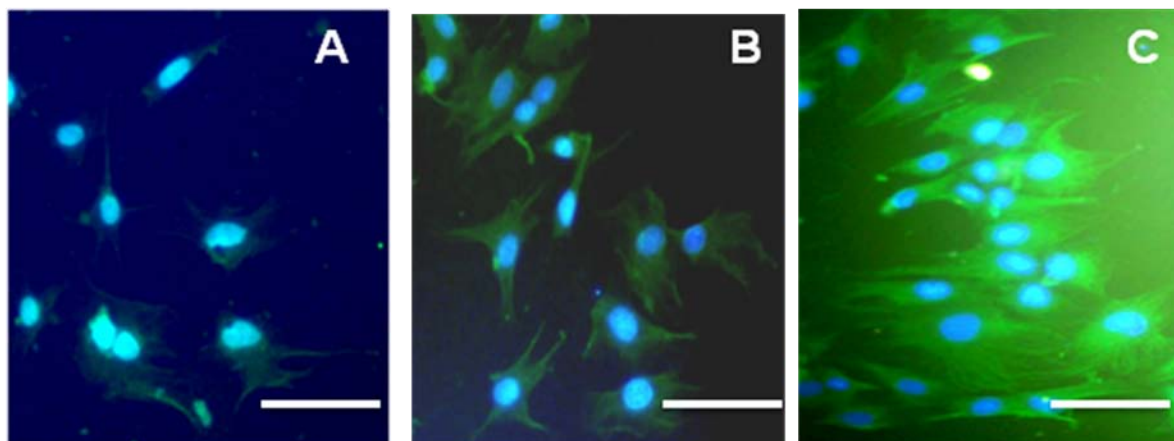
در این پژوهش سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرائی با استفاده از فاکتور EGF کشت داده شدند. این سلول‌های بنیادی نشانگر CD34 (نشانگر سلول‌های بنیادی) را



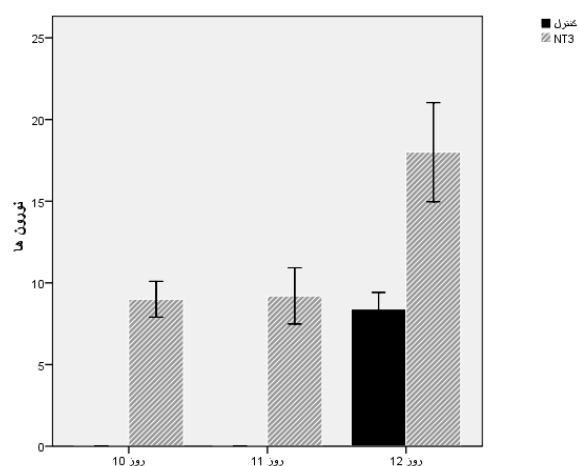
شکل ۲. ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی فولیکول مو. A: بیان CD34 در سلول‌های بنیادی فولیکول مو در ۷-۱۰ روز اول کشت. B: بیان نشانگر Nestin در سلول‌های بنیادی فولیکول مو در ۱۰-۱۲ روز اول کشت. C: پس از گذشت ۳ هفته با شروع روند تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به آنتی‌بادی‌های CD34 و Nestin واکنشی نشان ندادند. هسته‌ها با DAPI (رنگ هسته) رنگ شد. (فلش‌ها). علامت بار A و B: ۱۰ میکرومتر. C: ۵۰ میکرومتر



شکل ۳. فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرائی. پس از گیت بندی جمعیت سلولی و اعمال آن روی FL1 میزان سلول‌های Nestin مثبت، سلول‌های CD34 مثبت و K15 مثبت به دست آمد. میزان M2 در مورد آنتی‌بادی Nestin ۶۵ درصد و در مورد آنتی‌بادی CD34 ۹۲ درصد است ولی در مورد آنتی‌بادی K15 میزان M1 ۹۲ درصد است که منفی در نظر گرفته شد.



شکل ۴. ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی پس از القای تمایز به نورون به وسیله نوروتروفین ۳. سلول‌ها در روزهای ۷، ۸، ۹ و ۱۰ پس از کشت اولیه پاساژ داده شدند و پس از ۳ روز دریافت نوروتروفین ۳ ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی بتا تری توپولین انجام شد. سلول‌ها بی که ۱۰ روز پس از کشت اولیه به آنتی‌بادی بتا تری توپولین واکنش مثبت نشان دادند. A: سلول‌های بتا تری توپولین مثبت در گروه ۱۱ روز پس از کشت اولیه. B: سلول‌های تمایز یافته در گروه سوم که ۱۲ روز پس از کشت اولیه بتا تری توپولین مثبت هستند. C هسته با رنگ DAPI رنگ شده است. علامت بار: ۲۰ میکرومتر



شکل ۵. مقایسه تعداد سلول‌های بیان کننده بتا تری توپولین ۳ در دو گروه کنترل و گروه دریافت کننده NT3 در روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲. در روزهای ۱۰ و ۱۱ در گروه کنترل سلول بیان کننده بتا تری توپولین مشاهده نشد. در حالی که در گروه NT-3 سلول بتا تری توپولین مثبت دیده شد. طبق نتایج اختلاف معنی‌داری بین روزهای ۱۰ و ۱۱ مشاهده نشد ولی بین روزهای ۱۰ و ۱۱ با روز ۱۲ اختلاف معنی‌داری مشهود است. \* نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت کننده NT3 در روز ۱۲ نسبت به روزهای ۱۰ و ۱۱ است ( $p < 0.05$ ).

## بحث

اخیراً تحقیقات بسیاری درباره سلول‌های بنیادی بالغ انجام

دو هفته پس از کشت سلول‌ها، سلول‌های بنیادی عصبی Bulge فولیکول مو شروع به تمایز به سلول‌های عصبی و غیرعصبی می‌کنند. بنابراین پس از گذشت تقریباً ۳ هفته از کشت سلول‌های بنیادی در ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی‌های Nestin و CD34 هیچ‌گونه واکنشی نشان داده نشد (شکل ۲C). در حالی که به آنتی‌بادی اولیه  $\beta$ III Tubulin و آنتی‌بادی ثانویه FITC واکنش نشان داده و سلول‌های تمایز یافته نورونی در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند.

به منظور سرعت بخشیدن به روند تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به نورون از فاکتور NT-3 با دوز ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، به مدت سه روز استفاده شد. سلول‌ها در ۳ گروه زمانی در روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مقایسه شدند. در این سه گروه سلول‌ها پس از دریافت NT-3 به آنتی‌بادی بتا تری توپولین واکنش مثبت نشان دادند (شکل ۴).

شمارش سلول‌ها در این سه گروه و گروه کنترل انجام شد. در آنالیز آماری  $p < 0.05$  بود که نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه دریافت کننده NT-3 و گروه کنترل بود (شکل ۵). نتایج به دست آمده، تمایز در هر سه گروه روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ را نشان داد.

درمان ضایعات سیستم عصبی از اهمیت بالایی برخوردار است، برای کوتاه کردن زمان تمایز سلول‌های بنیادی ناحیه Bulge به سلول‌های شبه نرونی از فاکتور نوروترنژیک NT-3 استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اضافه کردن NT-3 با دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر تأثیر معنی‌داری بر کاهش زمان تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو در مقایسه با زمان‌های گزارش شده دارد و زمان تمایز این سلول‌ها از ۸ و ۳ هفته به ۱۰ روز کاهش داده شد. در این پژوهش در روزهای ۷-۹، ۸-۱۰ و ۱۱-۹ پس از کشت اولیه به مدت ۳ روز و با دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر NT-3 به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. نتایج به‌دست آمده از ایمونوسیتوشیمی سلول‌های تمایز یافته نشان داد که سلول‌های بنیادی ناحیه Bulge فولیکول مو حتی در روز ۱۰ پس از کشت اولیه نیز با دریافت دوز بیان شده NT-3 قادر به بیان پروتئین  $\beta$ -III tubulin هستند. همچنین نتایج شمارش سلولی در این مطالعه نشان داد که با افزایش سن سلول‌های بنیادی میزان تمایز به سلول‌های شبه نرون افزایش می‌یابد. در این پژوهش مشاهده شد که میزان تمایز در روز ۱۲ نسبت به روزهای ۱۰ و ۱۱ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت در حالی که شمارش نرونی در روزهای ۱۰ و ۱۱ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت.

در مطالعات دیگری فرناندس (Fernandes) و همکاران در سال ۲۰۰۴، با استفاده از NT-3 با دوز ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و پس از ۱۴ روز و Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۹، با دوز ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و پس از ۲۱ روز توانستند سلول‌های SKPs را به سلول‌های  $\beta$ -III Tubulin مثبت تمایز دهند [۲۴ و ۱۶]. محققان در بررسی حاضر در زمانی کوتاه‌تر از زمان‌های فوق و پس از ۱۰ روز سلول‌های بنیادی فولیکول مو موش صحرائی را به سلول‌های شبه نرون متمایز نمودند.

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که نوروترنژین ۳ اثر نروتروفیک مؤثری بر سلول‌های بنیادی ناحیه

شده است زیرا مشکلات سلول‌های بنیادی رویانی و جنینی از جمله مشکلات مربوط به تطابق ایمونولوژیکی را ندارند. فولیکول مو یک ارگان کوچک فعال است که دستخوش تغییرات دوره‌ای در دوران رشد است. همچنین یک منبع فعال و در دسترس سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی بالغ است [۱۷ و ۱۸]. مطالعات محققان نشان داده است که ناحیه Bulge دارای سلول‌های بنیادی است که قابلیت تمایز به انواع سلول‌های فولیکول را دارند [۱۹ و ۲۰]. بنابراین در این مطالعه از سلول‌های بنیادی ناحیه Bulge فولیکول مو به عنوان یک منبع سلولی قابل دسترس و چند ظرفیتی که توانایی تمایز به سلول‌های شبه نرون را دارند، استفاده شد. همان‌طور که در مطالعات گذشته محققان حاضر Nestin مثبت بودن سلول‌های این ناحیه گزارش شده بود [۹، ۱۰ و ۲۱]، در این مطالعه نیز نتایج به دست آمده از ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی کشت داده شده بیان Nestin را در این سلول‌ها تأیید کرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی ناحیه Bulge فولیکول موی موش صحرائی CD34 مثبت و K15 منفی هستند. واکنش این سلول‌ها به آنتی‌بادی CD34 در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۹ توسط آمو (Amoh) و همکاران به‌عنوان نشانگر بنیادی بودن این سلول‌ها مطرح شده بود [۱۷ و ۲۲]. روند تمایز موجب می‌شود که بیان دو نشانگر CD34 و Nestin به صورت کاملاً واضحی متوقف شده و نشانگر اختصاصی  $\beta$ -III Tubulin در رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی مشاهده شود. این نشانگر یکی از زیر واحدهای توبولین-پروتئین موجود در سیتوپلاسم - است. توبولین خود دارای ۲ زیر واحد به نام‌های  $\alpha$  و  $\beta$  است. هرکدام از این زیر واحدها دارای چند ایزومر است. از جمله این ایزومرها ایزومر  $\beta$  III است. این ایزومر در سلول‌های نرونی یافت می‌شود [۲۳]. بنابراین در این مطالعه برای نشان دادن حضور سلول‌های تمایز یافته شبه نرونی از آنتی‌بادی  $\beta$ -III Tubulin استفاده شد. مطالعات قبلی محققان حاضر تمایز سلول‌های بنیادی ناحیه Bulge را پس از گذشت ۳ و ۸ هفته نشان داد [۱۰، ۹ و ۲۱]. از آنجا که زمان در



## تقدیر و تشکر

این مطالعه نتایج حاصل از پایان‌نامه کارشناسی ارشد به شماره ۱۰۲۲ مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران است که بدینوسیله از مسئولین محترم دانشگاه قدردانی می‌شود.

Bulge فولیکول موی موش صحرایی داشته و باعث کوتاه کردن زمان تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه نوروبون می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که تأثیر دوزهای مختلف این فاکتور در کنار عوامل دیگر بر این سلول‌های بنیادی بررسی شود.

## References

1. **Bongso A, Richards M.** History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18: 827-42.
2. **Tabesh H, Amoabediny G, Nik NS, Heydari M, Yosefifard M, Siadat SO, et al.** The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochem Int* 2009; 54:73-83.
3. **Alonso L, Fuchs E.** Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev*; 2003 15;17:1189-200..
4. **Sieber-Blum M, Grim M, Hu F, Szeder V.** Pluripotent Neural Crest Stem Cells in the Adult Hair Follicle. *Dev Dyna* 2004; 231: 258-69.
5. **Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM.** Multipotent Nestin-Positive, Keratin-Negative Hair-Follicle Bulge Stem Cell Can Form Neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5530-4.
6. **Zhang Y, Xiang M, Wang Y, Yan J, Zeng Y.** Bulge Cells Human Hair Follicles Segregation Cultivation and Properties. *Coll Surfaces* 2006; 47: 50-6.
7. **Hoffman RM.** The pluripotency of hair follicle stem cells. *Cell Cycle* 2006;5: 232-3
8. **Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Sato Y, Katsuoka K, et al.** Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. *Cell Cycle* 2009; 8:176-7.
9. **Nobakht M, Najafzadeh N, Safari M, Rahbar Roshandel N, Delaviz H, Joghataie MT, et al.** Bulge Cells of Rat Hair Follicles: Isolation, Cultivation, Morphological and Biological Features. *Cell* 2010; 12: 51-58
10. **Nobakht M, Asalgoo S, Rahbar Roshandel N, Mousavizadeh K, Najafzadeh N.** Effects of Silibinin on Hair Follicle Stem Cells Differentiation to Neural-like Cells. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 1: 212-22.
11. **Chao MV, Rajagopal R, Lee FS.** Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci* 2006; 110: 167-73.
12. **Huang EJ, Reichardt LF.** Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736.
13. **Hempstead BL.** The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12: 260-7.
14. **Levi-Montalcini R.** The nerve growth factor: thirty-five years later. *Science* 1987; 37: 1154-64.
15. **Li X, Yang Z, Zhang A.** The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials* 2009; 30 :4978-85.
16. **Zhang W, Zeng YS, Wang JM, Ding Y, Li Y, Wu W.** Neurotrophin-3 improves retinoic acid-induced neural differentiation of skin-derived precursors through a p75NTR-dependent signaling pathway. *Neurosci Res* 2009; .64: 170-6.
17. **Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, et al.** Implanted hair follicle stem cell form schwan cells that support repair of severed peripheral nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17734-8.
18. **Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM.** Multipotent hair follicle stem cells promote repair

- of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle* 2008; 7:1865-9.
19. **Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y.** Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001;104: 233-45.
  20. **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; 61:1329-37.
  21. **Nobakht M, Asalgoo S, Rahbar Roshandel N, Mousavizadeh K, Najafzadeh N.** Effects of Silibinin on Hair Follicle Stem Cells Differentiation to Neural-like Cells. *Qom Univ Med Sci J* 2009; 3:12-9.
  22. **Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, et al.** Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem* 2009; 107:1016-20.
  23. **Raff EC, Fackenthal JD, Hutchens JA, Hoyle HD, Turner FR.** Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform. *Science* 1997; 275: 70-3.
  24. **Fernandes KJL, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, et al.** A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biol* 2004; 6:1082-93.