

تاثیر غلظت‌های مختلف ال- ترانس رتینوئیک اسید بر رشد و بقای سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش سوری

دکتر نوروز نجف‌زاده^۱، شیرین حیدری تجدد^۲، دکتر محمد مازنی^۳، نسرين تاتا^۴

نویسنده‌ی مسوول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه زیست شناسی shirinheydari@gmail.com

دریافت: ۹۱/۱۱/۲۵ پذیرش: ۹۲/۵/۷

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی فولیکول مو چند توانه هستند و در ناحیه‌ی بالچ واقع در فولیکول مو قرار دارند. این سلول‌ها قدرت تکثیری بالایی دارند. رتینوئیدها باعث متمایز شدن سلول‌های اپیدرم و کراتینه شدن آن‌ها می‌شود. ال- ترانس رتینوئیک اسید برای درمان برخی بیماری‌های پوستی نظیر ملاسما، ایکتیوز و اکنه استفاده می‌شود، لذا مطالعه‌ی تاثیر ال- ترانس رتینوئیک اسید روی سلول‌های بنیادی فولیکول مو و تعیین غلظت موثر آن برای بقای سلول‌های بنیادی فولیکول مو ضروری به نظر می‌رسید.

روش بررسی: در این مطالعه، سلول‌های بنیادی فولیکول موی مشتق از سیل موش سوری Balb/c بعد از جداسازی و کشت در آزمایشگاه، تحت تیمار غلظت‌های مختلف ال- ترانس رتینوئیک اسید قرار گرفت. غلظت‌های ۰/۵ تا ۲۰ (به ترتیب: ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰) میکرومولار ال- ترانس رتینوئیک اسید برای بررسی اثرات مهاري یا تکثیری مورد بررسی قرار گرفت. اثرات سیتوتوکسیکسیتی رتینوئیک اسید، با استفاده از روش MTT بررسی شد. جهت بررسی مرگ و میر و بقای سلول‌ها، از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/ اتیديوم بر مایید استفاده شد و نتایج با میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت و تعداد سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک با استفاده از نرم‌افزار Image J شمارش شدند. **یافته‌ها:** نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی نشان داد که غلظت ۱۰ میکرومولار و بالاتر ال- ترانس رتینوئیک اسید باعث مرگ آپوپتوتیک و نکروتیک سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌شود و مقدار IC_{50} به دست آمده از منحنی پاسخ غلظت، $14/38 \pm 1/03$ میکرومولار بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش سوری در صورتی که در آزمایشگاه، تحت تاثیر غلظت‌های بالاتر از ده میکرومولار قرار گیرند با مرگ آپوپتوز یا نکروز از بین می‌روند و لذا از غلظت‌های بالاتر ال- ترانس رتینوئیک اسید می‌توان جهت از بین بردن موهای زاید استفاده کرد و از غلظت‌های پایین این ماده هم می‌توان جهت درمان بیماری‌های پوستی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی فولیکول مو، رتینوئیک اسید، آپوپتوز، نکروز

مقدمه

سلول‌های بنیادی دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تولید سلول‌های با خواص یکسان و ایجاد انواع سلول‌های تمایز یافته، دارند. بر اساس توان تمایزی سلول‌های بنیادی به انواع همه توان، پرتوان، چندتوان تقسیم می‌شوند. سلول‌های

۱- دکترای علوم تشریحی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی علوم جانوری، گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه

۳- دکترای بیوشیمی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

۴- کارشناس مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

می‌شود. تبدیل ویتامین A غیر فعال (رتینول) به رتینوئیک اسید فعال تحت کنترل مجموعه سلولی است که موجب حفظ تعادل عملکرد مناسب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود (۱۰). ویتامین A و مشتقات آن از جمله رتینوئیک اسید از طریق دو دسته گیرنده RAR و RXR اثرات خود را در سلول‌های بدن اعمال می‌کند. ال- ترانس رتینوئیک اسید در پوست و فولیکول مو از طریق گیرنده‌های خود عمل می‌کند. در هسته‌ی سلول، گیرنده‌ی رتینوئیک اسید پس از اتصال به عنصر پاسخی رتینوئیک اسید، اثرات خود را بر بیان ژن القا می‌کند. ال- ترانس رتینوئیک اسید همچنین سبب افزایش فسفوریلاسیون آنزیم‌های کینازی نظیر کینازهای خارج سلولی ۲ و ۱ می‌شود (۱۱ و ۱۲).

در کراتینوسیت‌های پوست رتینوئیک اسید بیان می‌شود و در تکامل فولیکول مو نقش مهمی را ایفا می‌کند، مطالعات زیادی در زمینه‌ی تاثیر رتینوئیک اسید روی اپیدرم انجام شده و این ماده باعث آپوپتوز کراتینوسیت‌های کشت یافته اپیدرم می‌شود (۱۳) و برعکس روی سلول‌های اپیدرم در بدن اثر تکثیری دارد و فرآورده‌های تجاری آن در درمان بعضی از بیماری‌های پوست همچون آکنه، پیری پوست، سوختگی استفاده می‌شود (۱۵ و ۱۴). با اینحال اطلاع کمی در مورد اثر ال- ترانس رتینوئیک اسید روی فولیکول مو وجود دارد، لذا در این مطالعه، تاثیر غلظت‌های مختلف ال- ترانس رتینوئیک اسید روی تکثیر سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش Balb/c مورد بررسی قرار گرفت تا غلظت موثر در درمان بیماری‌های پوستی مشخص شده و از آن جهت تسهیل روش‌های درمانی استفاده به عمل آید.

روش بررسی

حیوانات مورد استفاده: در این مطالعه از موش‌های سوری ۲ الی ۴ ماهه استفاده شد. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. اتاق نگهداری دارای نور و حرارت کافی بود.

بنیادی جنینی از توده‌ی سلولی داخلی جنین در مرحله‌ی بلاستوسیست به دست می‌آید (۱). در طی دوران زندگی، بعد از اینکه سلول‌های بسیاری از ارگان‌ها در بدن، به‌طور فیزیولوژیکی و یا در اثر آسیب از بین می‌روند، توانایی ایجاد سلول جدید را دارند. اساسا توانایی ترمیم سلولی به سلول‌های بنیادی بالغین وابسته است، سلول‌های بنیادی بالغین در ناحیه‌ای که نیچه (آشیان) نامیده می‌شود، قرار می‌گیرند. در نیچه سلول‌های بنیادی توسط سلول‌های متمایز شده‌ای احاطه می‌شود و تحت تاثیر فاکتورهای تولید شده توسط این سلول‌ها تکثیر پیدا می‌کند (۳ و ۲). سلول‌های بنیادی در اغلب ارگان‌های بدن همچون کبد، سیستم عصبی، سیستم خونی و پوست وجود دارند (۵ و ۴). سلول‌های بنیادی فولیکول مو، نقش اساسی در مورفوژنز فولیکول مو دارد، این سلول‌ها قابلیت خود تکثیری داشته، پتانسیل تبدیل به اپیدرم، غدد سباسه و فولیکول مو را دارند. سلول‌های بنیادی فولیکول مو، در ناحیه‌ی بالج فولیکول مو که قسمتی از غلاف ریشه‌ای خارج مو که بلافاصله در زیر عضله‌ی راست کننده‌ی مو است، قرار گرفته‌اند، این سلول‌ها حالت چند توانی دارند و می‌توانند به انواع سلول‌های اپیتلیالی همچون فولیکول مو، سباسه، اپیدرم و سلول‌های غیر اپیتلیالی همچون نورون تمایز پیدا کنند (۷ و ۶). در طی دوران زندگی فولیکول موهای بدن وارد سه فاز رشد آنائزن، کاتاژن و تلوزن می‌شوند. در مرحله‌ی کاتاژن نیمه‌ی تحتانی فولیکول مو تخریب می‌شود و سلول‌های واقع در ناحیه‌ی بالج در فاز آنائزن تکثیر پیدا می‌کنند. در مرحله‌ی آنائزن پایلای درمی با سلول‌های بنیادی ناحیه‌ی بالج واکنش می‌دهد تا بخش تحتانی فولیکول مو ایجاد شود (۹ و ۸). ویتامین A (رتینول) شامل گروهی از مواد شیمیایی طبیعی یا ساختگی با فعالیت شبه هورمونی است. رتینول در شرایط طبیعی در لومن روده هیدرولیز و پس از جذب توسط شیلو میکرون وارد جریان خون می‌شود. همچنین در اثر اکسیداسیون در روده به رتینوئیک اسید تبدیل

شرایط نوری حیوانات به صورت دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی بود. درجه‌ی حرارت اتاق در محدوده‌ی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد. آب و غذای کافی برای حیوانات به صورت آزاد وجود داشت.

جدا کردن ناحیه‌ی بالچ فولیکول مو: جهت جدا کردن فولیکول مو و ناحیه‌ی بالچ از روش تعدیل شده‌ی کوبیاشی و همکاران استفاده شد (۱۶). در این روش بعد از بیهوشی حیوانات با اتر، صورت و سر حیوانات توسط محلول ۱:۱ بتادین به مدت سه دقیقه شستشو داده شد و بعد از تراشیدن موها، ناحیه‌ی صورت با الکل ۷۰ درصد تمیز و ضد عفونی شد و بافت لب بالا که حاوی فولیکول‌های موی سبیل موش است، بریده شد. بعد از برداشتن بافت لب بالا در زیر هود و محیط استریل، نمونه‌ها در محیط DMEM/F۱۲ (اینویتروژن) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر- اینویتروژن)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر- اینویتروژن)، آمفوتریسین B (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر- سیگما) به مدت نیم ساعت قرار داده شدند.

کشت سلولی: کشت سلول‌های ناحیه‌ی بالچ طی مراحل انجام گرفت (۱۷). ناحیه‌ی بالچ جدا شده در محلول ۰/۰۱ درصد اتیل دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) و ۰/۱۲۵ درصد تریپسین به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌های جدا شده با سرعت ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس لایه‌ی سلولی ایجاد شده با محیط کشت مخلوط شده و سلول‌ها در فلاسک‌هایی که قبلاً با کلاژن نوع یک پوشیده شده بودند، کشت یافتند. سلول‌ها در محیط DMEM/F۱۲ حاوی ال-گلوتامین (۳/۴ میلی‌مول)، انسولین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، کلراتوکسین (10^{-9})، هیدروکورتیزون (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، فاکتور رشد اپیدرمال، (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، و ۱۰ درصد سرم گاوی کشت داده شدند.

گروه‌ها: در این آزمایش سلول‌هایی که چهارده روز در فلاسک T۲۵ کشت یافته بودند تریپسین شدند و در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و سلول‌ها به مدت یک هفته تحت تاثیر رقت‌های ۰/۵ الی ۲۰ (به ترتیب: ۰/۵، ۱، ۱۵ و ۲۰) میکرومولار ال- ترانس رتینوئیک اسید قرار گرفتند. ارزیابی میکروسکوپی مورفولوژی سلولی و بررسی میزان بقای سلولی به روش MTT به شرح ذیل انجام شد.

روش MTT: میزان بقای سلولی با روش MTT بررسی شد. در این روش به تعداد ۲۰۰۰۰ سلول بنیادی فولیکول موی در هر خانه یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و روز بعد سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تاثیر رقت‌های ۰/۵ الی ۲۰ میکرومولار ال- ترانس رتینوئیک اسید قرار گرفتند. در روز دوم به هر خانه ۲۰ میکرولیتر رنگ ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT اضافه شد و ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و در مرحله‌ی بعد ۱۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید به هر خانه اضافه شد و جذب رنگ پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا محاسبه شد و میزان بقای سلولی در پلیت ۹۶ خانه، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{OD Untreated Sample} / \text{OD Sample} = 100\% / X$$

ارزیابی مورفولوژی سلولی برای ارزیابی مرگ سلولی: سلول‌ها در فلاسک‌های T۲۵ کشت داده شدند بعد از یک هفته سلول‌ها را با تریپسین جدا کرده بعد از سانتریفوژ، تعداد ۱۲ هزار سلول در هر پلیت شش خانه، به مدت هفت روز کشت داده شد، و به مدت هفت روز، یک روز در میان محیط کشت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید تعویض شد. بعد از هفت روز، نیم میلی‌لیتر محلول حاوی ۱۰۰ میکروگرم اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید اضافه شد و ۵ دقیقه بعد با میکروسکوپ فلوروسنت مدل امپوس تصاویری تهیه شد. سلول‌های آپوپتوتیک، دارای هسته‌ی متراکم و قطعه قطعه شده و براحتی از سلول‌های طبیعی قابل

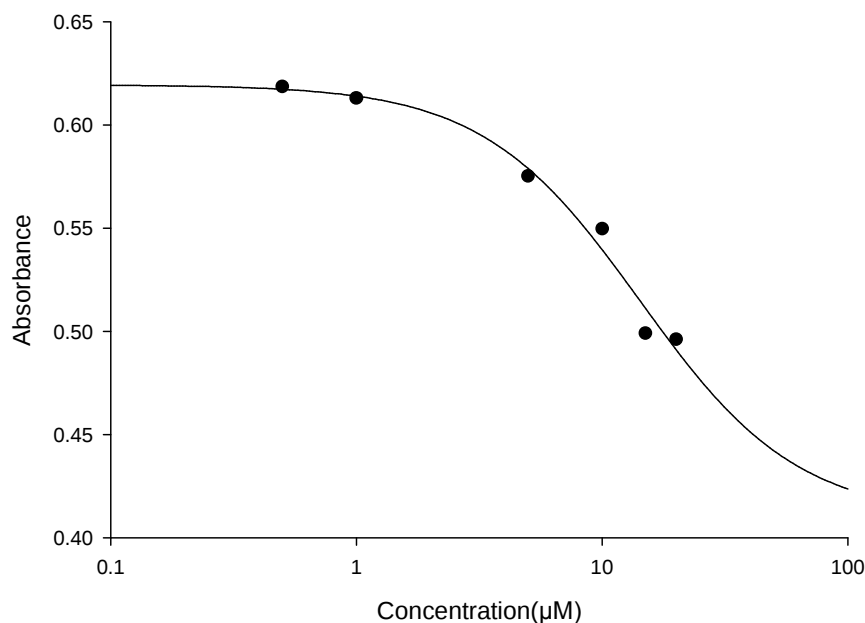
زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک به صورت درصد بیان شد.

نتایج

بررسی با روش MTT: همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده، درصد سلول‌های زنده در روش MTT با غلظت ۲۰ میکرومولار کمتر است و اغلب سلول‌ها در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرومولار زنده مانده‌اند و به طور تقریبی غلظت $14/38 \pm 1/03$ میکرومول بر میلی‌لیتر از ال-ترانس رتینوئیک اسید، موجب القای مرگ سلولی در ۵۰ درصد سلول‌ها شده است.

تشخیص می‌باشند. علاوه بر آن با این روش می‌توان سلول‌های آپوپتوتیک اولیه با هسته‌ی متراکم سبز کم رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم را از سلول‌های آپوپتوتیک تاخیری با هسته‌ی متراکم قرمز فلوئوروسنت و قطعه قطعه شده تشخیص داد. سلول‌های نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و یک دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص می‌باشند و سلول‌های سالم نیز به رنگ سبز پررنگ، قابل تشخیص می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری: بعد از به دست آمدن میزان بقای سلولی، میزان IC_{50} با برنامه‌ی SigmaPlot v12/0 محاسبه شد، اطلاعات به دست آمده از شمارش سلول‌های



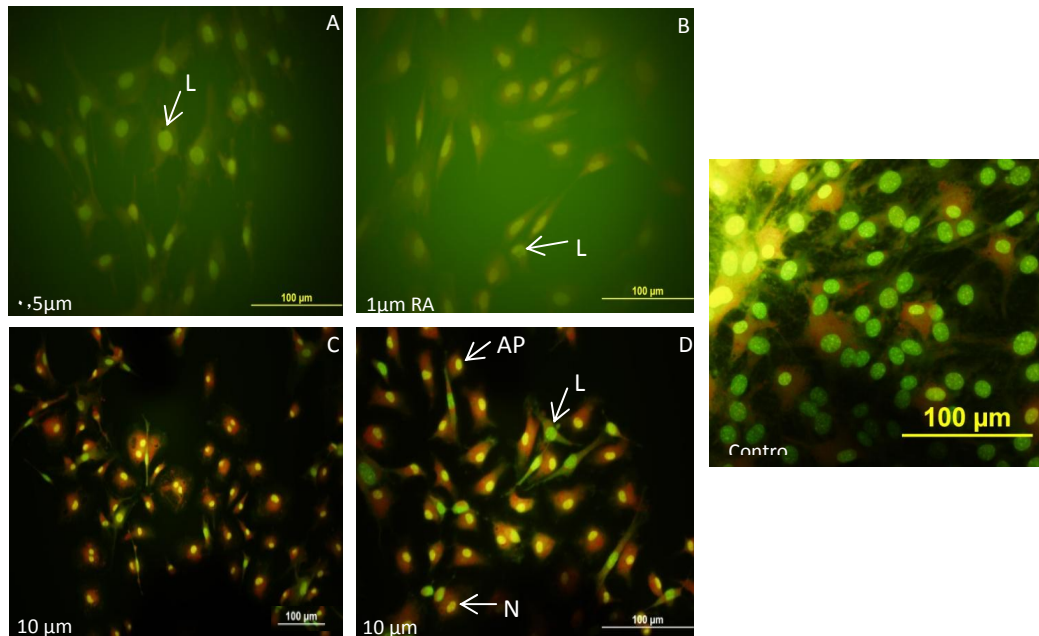
نمودار ۱: در این نمودار میزان تاثیر غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید روی سلول‌های بنیادی فولیکول مو نشان داده شده است. بعد از آنالیز با برنامه‌ی **Sigma Plot** میزان $IC_{50} = 14/38 \pm 1/03 \mu M$ محاسبه شد.

تنها تعداد اندکی از سلول‌ها توانستند زنده (۳۲ درصد) بمانند (شکل ۱ و نمودار ۲). سلول‌ها به مدت هفت روز با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱۰ میکرومولار ال-ترانس رتینوئیک اسید تیمار شدند و با روش رنگ آمیزی آکریدین و اتیدیوم بروماید، تعداد سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک

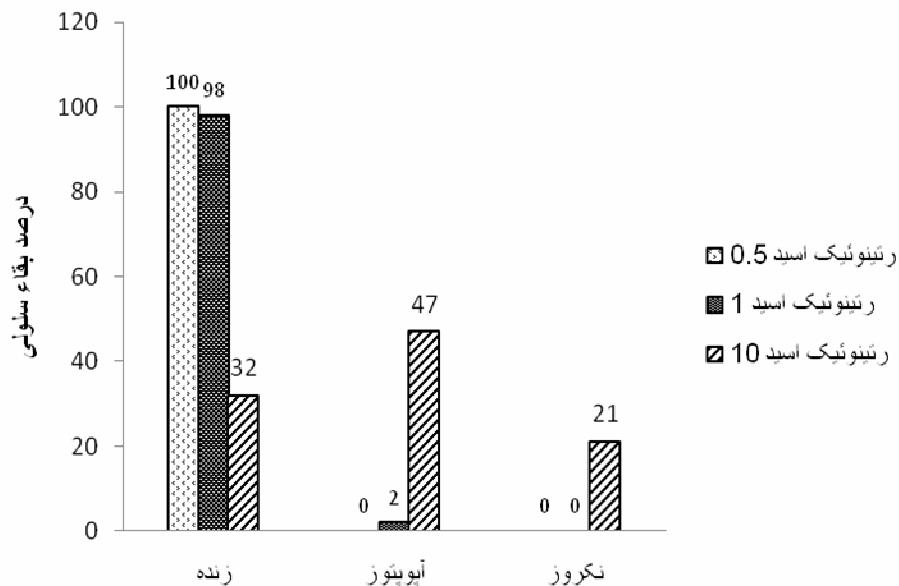
بررسی با رنگ آمیزی آکریدین و اتیدیوم بروماید: بعد از رنگ آمیزی سلول‌ها، مشخص شد که غلظت ده میکرومولار ال-ترانس رتینوئیک اسید باعث آپوپتوز (۴۷ درصد) تعداد زیادی از سلول‌ها شده و برخی از سلول‌ها هم با مرگ نکروتیک یا نکروزی (۲۱ درصد) از بین رفتند و

در حالی که غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرومولار هیچ تاثیری روی مرگ و میر سلول‌های بنیادی فولیکول مو نداشته‌اند (نمودار ۲).

شمارش شدند و نتایج این شمارش سلولی در نمودار ۲ ارایه شده است، تاثیر غلظت ۱۰ میکرومولار بر روی مرگ سلولی بیشتر بوده و اغلب سلول‌ها با مرگ آپوپتوتیک از بین رفتند.



شکل ۱: مقایسه‌ی مرگ سلولی در پاسخ به غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید. حروف AP, N, L به ترتیب live, Necrotic, Apoptotic cell می‌باشد.



نمودار ۲: درصد سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک در پاسخ به غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید

بحث

در این مطالعه سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی ناشی از درمان با غلظت‌های مختلف ال-ترانس رتینوئیک اسید روی سلول‌های بنیادی فولیکول مو بررسی شد. مطالعه‌ی ما برای اولین بار نشان داد که اثرات ال-ترانس رتینوئیک اسید روی رشد سلول‌های بنیادی وابسته به غلظت است و در غلظت‌های بالاتر، رشد کراتینوسیت‌های حاصل از سلول‌های بنیادی را مهار می‌کند و باعث القای آپوپتوز می‌شود و غلظت‌های پایین‌تر، باعث آپوپتوز یا نکروز نمی‌شوند. علاوه بر این، به طور تقریبی غلظت $1.4/3$ میکرومولار از ال-ترانس رتینوئیک اسید، موجب القای مرگ سلولی در ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود. بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این غلظت برای سلول‌های بنیادی فولیکول مو کشنده است، و استفاده از غلظت‌های بالاتر می‌تواند فاز کاتاژن را القا کند و باعث ریزش مو شود. کراتینوسیت‌های اپیدرم توانایی جذب و تبدیل ویتامین A به ۴-هیدروکسی رتینوئیک اسید را دارند و سیتوکروم P450 رتینوئیک اسید را به ۴-اکسو-رتینوئیک اسید تبدیل می‌کند (۱۸). رتینوئیک اسید در بیماری پسوریازیس استفاده می‌شود و از کراتینیزه شدن پوست جلوگیری می‌کند (۱۹). در سال ۲۰۰۵، مطالعه‌ی فوتوزیک و همکارانش بر روی اثر رتینوئیک اسید روی سلول‌های غلاف ریشه‌ای خارجی فولیکول مو نشان داد که در فولیکول‌های تیمار شده با رتینوئیک اسید میزان بیان $TGF-\beta_1$ و رسپتور $TGF\beta$ نوع II (TGFR II) افزایش پیدا می‌کند، همچنین رتینوئیک اسید باعث القای فاز کاتاژن در فولیکول‌های موی انسانی می‌شود و از طولیل شدن تنه مو جلوگیری می‌کند (۲۰). رسپتورهای RAR و RXR در اپیدرم و فولیکول مو بیان می‌شوند (۲۱) و جهش در RXR α کراتینوسیت‌های فولیکول مو باعث آلופشی می‌شود (۲۲). رتینوئیک اسید به رسپتورهای RAR و RXR متصل می‌شود و به نظر می‌رسد که رتینوئیک اسید عملکرد مهار روی رشد موی انسان را از طریق رسپتور RAR β که

در پاپیلای درمی بیان می‌شود، اعمال می‌کند (۲۳). داده‌های موجود نشان می‌دهد که مکانیسم احتمالی ایجاد آپوپتوز در سلول‌های بنیادی فولیکول مو، فعال شدن رسپتور RAR β در این سلول‌ها و به دنبال آن افزایش بیان $TGF\beta_2$ باعث توقف تکثیر سلولی و آپوپتوز می‌شود (۲۰). یافته‌های ما در این مطالعه نشان داد که ال-ترانس رتینوئیک اسید قادر به القای آپوپتوز در فولیکول‌های موی سبیل موش است، سلول‌های بنیادی درمان شده با غلظت‌های بالا (ده میکرومولار) باعث ظهور سلول‌های آپوپتوتیک با مورفولوژی هسته‌ی متراکم و قطعه قطعه شده می‌شود و می‌تواند فاز کاتاژن را القا کند. در تایید این یافته‌ها، بررسی‌ها نشان داده‌اند که در بیمارانی که به صورت سیستمیک ترکیبات رتینوئیک اسید دریافت می‌کنند علایم ریزش موی پراکنده و ایدیوپاتیک (تلوزن افلوویوم) ظاهر می‌شود (۲۴). از طرفی غلظت یک میکرومولار ال-ترانس رتینوئیک اسید کاربرد زیادی در تحقیقات دارد و به نظر می‌رسد باعث تمایز انواع مختلفی از سلول‌ها می‌شود و اخیراً محققان از غلظت یک میکرومولار ال-ترانس رتینوئیک اسید جهت تمایز نورونی سلول‌های بنیادی پیش ساز پوست (۲۵) استفاده کرده‌اند و همچنین ممداو و همکارانش از همین غلظت جهت تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان هم استفاده کرده‌اند (۲۶)، محققان دیگری همچون آجبی نشان دادند که رتینوئیک اسید باعث تسهیل آپوپتوز سلول‌های سرطانی تخمدان و سر و گردن می‌گردد (۲۷). به نظر می‌رسد تاثیر رتینوئیک اسید وابسته به غلظت است. در غلظت‌های پایین همچون یک میکرومولار تأثیری روی مرگ سلولی ندارد و حتی ممکن است اثرات تمایزی داشته باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تاثیر ال-ترانس رتینوئیک اسید روی رشد و بقای سلول‌های بنیادی فولیکول مو، وابسته به غلظت است. در غلظت‌های پایین

شهاب بهلولی و دکتر هادی پیری دوگاهه اعضای هیات علمی گروه فارماکولوژی و میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به خاطر مساعدت و همکاری در انجام این مطالعه قدردانی نمایند. این مطالعه حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی ثبت شده به شماره ی ۸۹۳۵۰ می باشد و نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع ندارند.

همچون یک میکرومولار تأثیری روی مرگ سلولی ندارد اما در غلظت ۱۰ میکرومولار و بالاتر باعث مرگ سلولی به صورت آپوپتوز و ریزش مو می شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از دکتر

References

- 1- Baharvand H, Kazemi Ashtiani S. Embryonic stem cells: concepts and potentials. *Yakhteh*. 2005; 7: 178-93.
- 2- Terskikh V, Vasiliev A, Vorotelyak E. Stem cell niches. *Biol Bull*. 2007; 34: 211-20.
- 3- Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 2004; 303: 359-63.
- 4- Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, et al. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*. 2003; 56: 86-96.
- 5- Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005; 19: 405-13.
- 6- Liu F, Uchugonova A, Kimura H, et al. The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla. *Cell Cycle*. 2011; 10: 830-39.
- 7- Nobakht M, Najafzadeh N, Safari M, et al. Bulge cells of rat hair follicles: isolation, cultivation, morphological and biological features. *Yakhteh*. 2010; 12: 51-8.
- 8- Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *J Cell Sci*. 2006; 119: 391-93.
- 9- Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev*. 2001; 81: 449-9.
- 10- Bazzano G, Terezakis N, Attia H, et al. Effect of retinoids on follicular cells. *J Invest Dermatol*. 1993; 101: 138S-42S.
- 11- Crowe DL, Kim R, Chandraratna RA. Retinoic acid differentially regulates cancer cell proliferation via dose-dependent modulation of the mitogen-activated protein kinase pathway11NIH grant DE10966. *Mol Cancer Res*. 2003; 1: 532-40.
- 12- Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J* 1996; 10: 1002-13.
- 13- Islam TC, Skarin T, Sumitran S, Toftgard R, et al. Retinoids induce apoptosis in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2000; 143: 709-19.
- 14- Zaenglein AL. Topical retinoids in the treatment of acne vulgaris. *Semin Cutan Med Surg*. 2008; 27: 177-82.
- 15- Mukherjee S, Date A, Patravale V, et al. Retinoids in the treatment of skin aging: an

- overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging*. 2006; 1: 327-48.
- 16- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 7391-95.
- 17- Najafzadeh N, Nobakht M, Mansoori K, Niapoor A, Golmohammadi MG, et al. Electromyographic and behavioral changes after transplantation of hair follicle stem cells into rats with spinal cord injury by compression model. *J Zanzan Univ Med Sci*. 2012; 20: 31-42.
- 18- Baron JM, Merk HF, Bickers DR. Recent Studies on the Pharmacokinetics and Metabolism of Retinoids in the Skin. *Basic and Clin Dermatol*. 2007; 39: 69-75.
- 19- Noji S, Yamaai T, Koyama E, et al. Expression of retinoic acid receptor genes in keratinizing front of skin. *FEBS Lett*. 1989; 259: 86-90.
- 20- Foitzik K, Spexard T, Nakamura M, Halsner U, Paus R. Towards dissecting the pathogenesis of retinoid-induced hair loss: all-trans retinoic acid induces premature hair follicle regression (catagen) by upregulation of transforming growth factor-beta2 in the dermal papilla. *J Invest Dermatol*. 2005; 124: 1119-26.
- 21- Billoni N, Gautier B, Mahe YF, et al. Expression of retinoid nuclear receptor superfamily members in human hair follicles and its implication in hair growth. *Acta Derm Venereol*. 1997; 77: 350-55.
- 22- Li M, Indra AK, Warot X, et al. Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature*. 2000; 407: 633-36
- 23- Reichrath J, Mittmann M, Kamradt J, et al. Expression of retinoid-X receptors (-alpha,-beta,-gamma) and retinoic acid receptors (-alpha,-beta,-gamma) in normal human skin: an immunohistological evaluation. *Histochem J*. 1997; 29: 127-33.
- 24- Kligman AM. The growing importance of topical retinoids in clinical dermatology: a retrospective and prospective analysis. *J Am Acad Dermatol*. 1998; 39: S2-7.
- 25- Zhang W, Zeng Y-s, Wang J-m, et al. Neurotrophin-3 improves retinoic acid-induced neural differentiation of skin-derived precursors through a p75NTR-dependent signaling pathway. *Neurosci Res*. 2009; 64: 170-76.
- 26- Mammadov B, Karakas N, Isik S. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011; 47: 484-91.
- 27- Aebi S, Kroning R, Cenni B, Sharma A, Fink D, Los G, et al. all-trans retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 2033-38.

The Effect of Different Concentrations of All-Trans Retinoic Acid on the Growth and Survival of Mouse Hair Follicle Stem Cells

Najafzadeh N¹, Heydari tajadod Sh², Mazeni M³, Tata N¹

¹Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

²Dept. of Biochemistry, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

³Dept. of Biology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Corresponding Author: Heydari tajadod Sh, Dept. of Biology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

E-mail: shirinheydari1@gmail.com

Received: 13 Feb 2013 **Accepted:** 29 Jul 2013

Background and Objective: Hair follicle stem cells are multipotent, located in the bulge area, and are highly proliferating. Retinoids have an effect on epidermal differentiation and keratinization. Retinoic acid is used to treat some skin diseases such as Melasma, Acne and Ichthyosis. So, the study of all-trans retinoic acid effect on hair follicle stem cells and determination of the effective concentration of retinoic acid on hair follicle stem cell survival seems to be essential.

Materials and Methods: In this study, we isolated and cultured hair follicle stem cells derived from Balb/c mice Whisker follicles. Then, the cells were treated with different concentrations of all-trans retinoic acid. 0.5 to 20 μ M of all-trans retinoic acid was used to evaluate inhibitory or proliferative effects. MTT assay was used to evaluate cytotoxicity of all-trans retinoic acid. To investigate cell death and survival, we used acridine orange/ethidium bromide staining method. The results were analyzed by fluorescent microscopy. Apoptotic and necrotic cell numbers were counted using Image J software.

Results: Results indicated that apoptotic, rather than necrotic, cell death was caused by 10 μ M and higher concentrations of retinoic acid. The IC₅₀ value determined by the dose response curve was found to be 14.3 μ M.

Conclusion: Results of this study indicate that if hair follicle stem cells expose to high concentrations of all-trans retinoic acid, the cells may undergo apoptotic or necrotic cell death. Therefore, higher concentrations of retinoic acid can be used to eliminate redundant hairs and low concentrations can be used for the treatment of skin diseases.

Keywords: Hair follicle stem cells, Retinoic acid, Apoptosis, Necrosis