

بررسی ویژگی‌ها و قابلیت‌های سلول‌های درمی کشت شده بستر چنگال موش در ایجاد برهم‌کنش با اپی‌درم هتروتوپیک

احمد قارزی Ph.D.*

- دانشگاه رازی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کرمانشاه، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ahgharzi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵

چکیده

هدف: در این تحقیق ویژگی‌های مورفولوژیکی، کشت سلولی، ایمونوشیمیایی و القایی سلول‌های درمی چنگال موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا انگشتان موش از محل آخرین مفصل منتهی به چنگال قطع و بخش‌های قطع شده برای مطالعات بافت‌شناسی آماده شد. همچنین بافت درمی زیر صفحه چنگال استخراج و در شرایط *in vitro* کشت داده شد. سلول‌های کشت شده در پاساژ ۲ و ۳ به‌روی لامل‌متقل و با آنتی‌بادی *smooth muscle actin* - (ASMA) واکنش داده شدند. در نهایت سلول‌های کشت شده با DiI رنگ شده و به نیمه-فولیکول‌های ویرسا و گوش پیوند زده شدند.

نتایج: سلول‌های درمی چنگال از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، کشت سلولی، بیان پروتئین ASMA با پاپیلای درمی فولیکول مو شباهت نشان دادند. این سلول‌ها یک مورفولوژی دو قطبی و دوکی شکل را به نمایش گذاشتند که در یک ماتریکس خارج سلولی غنی از گلیکوزآمینوگلیکان قرار داشتند. اکثریت سلول‌های کشت شده پروتئین ASMA را در سیتوپلاسم خود بیان کردند و این پروتئین با شدت بیشتری در پاهای تیغه‌ای مشاهده شد. با وجود این، برخلاف سلول‌های درمی فولیکول مو این سلول‌ها قادر نبودند اپی‌درم اکتوپیک را برای ایجاد یک زائده پوستی القا کنند.

نتیجه‌گیری: قابلیت القایی که در سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول مو مشاهده شده است قابل تعمیم به سلول‌های درمی سایر ضمام پوستی از جمله سلول‌های درمی چنگال نیست. از شواهد چنین استنباط می‌شود که عامل القاکننده موجود در سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول مو در سلول‌های درمی چنگال بیان نمی‌شود.

واژگان کلیدی: کشت سلول، بافت‌شناسی، ایمونوشیمی، القا، موش صحرایی

مقدمه

ضمایم پوستی ندارد. اما مطالعات بعدی مشخص کرد که درم نیز یک نقش غیرقابل انکاری در این فرآیند دارد. همچنین نشان داده شده است که علاوه بر القای اولیه اپی‌درم، درم در تمام مراحل تشکیل ضمایم پوستی نقش دارد. به علاوه، مشخص شده که مورفولوژی و طرح ضمایم پوستی به وسیله درم تعیین می‌شود (۱۹). مطالعات انجام شده روی برهم‌کنش‌های درمی-اپی‌درمی طی بلوغ نیز پیشنهاد می‌کند که حتی در بلوغ نیز درم به‌طور مداوم و موثر روی سرنوشت اپی‌درم تاثیر می‌گذارد. این شاهد از انجام نوترکیبی‌هایی می‌آید که بین فولیکول پر و فولیکول مو انجام گرفته است (۲۰).

به دنبال کشت سلول‌های پاپیلای درمی حاصل از ضمایم پوستی (مو، پشم و ویبریسا) محققین نشان دادند که این سلول‌ها همچون بافت‌های کامل خود ویژگی‌های القایی را حفظ می‌کنند به نحوی که این سلول‌های کشت شده می‌توانستند تولید مو را بر روی پوست گوش القا کنند (۲۱). با وجود این یافته‌های جالب توجه، هنوز سوالات بی‌جواب متعددی در زمینه برهم‌کنش‌های درمی-اپی‌درمی وجود دارد. لیکن در این مقاله سعی می‌شود به یک سوال جواب داده شود و آن اینکه سلول‌های درمی مشتق شده از سایر ضمایم اپی‌درمی (در اینجا چنگال موش صحرائی) نیز قابلیت‌های القایی مشابه آنچه در سلول‌های درمی فولیکول مو و پر مشاهده می‌شود را به نمایش می‌گذارند یا خیر.

ناخن در انسان‌ها و چنگال در حیوانات غیر-پریمات نیز یک زائده پوستی محسوب می‌شود که در طی مراحل جنینی در نتیجه برهم‌کنش‌های درمی-اپی‌درمی ایجاد می‌شود. اگرچه، برخلاف فولیکول مو، چنگال و ناخن دارای رشد مداوم بوده و فاقد مرحله استراحت می‌باشند ولی در سرتاسر حیاتشان بین این دو شباهت‌هایی وجود دارد. پیشنهاد شده که ناخن و چنگال در واقع شکل تانخورده و باز شده فولیکول مو هستند. همچنین از لحاظ بیوشیمیایی نیز این دو ساختار شباهت زیادی به هم نشان می‌دهند (۲۲). علی‌رغم این شباهت‌ها بر اساس سابقه تحقیقات نوترکیبی تاکنون پژوهشی بر روی ویژگی‌های القایی بخش درمی ناخن یا چنگال صورت نگرفته است. از این‌رو در این مطالعه علاوه بر بررسی ویژگی‌های سلول‌های درمی چنگال در محیط کشت به این سوال پرداخته می‌شود که آیا سلول‌های درمی حاصل از بستر چنگال موش صحرائی دارای این قابلیت هستند که در پیوند با اپی‌درم هتروتوپیک (فولیکول مو) تشکیل ضمایم پوستی را القا کنند؟ و اگر این قابلیت را دارند در نتیجه این نوترکیبی چه زائده پوستی به وجود می‌آید؟

برهم‌کنش بین سلول‌هایی با منشا انتوزنی متفاوت که در نتیجه حرکات سلولی در مجاورت هم قرار می‌گیرند یکی از اتفاقات معمول طی تکوین جنین است. این برهم‌کنش‌های دو سویه، دقیقاً زمان‌بندی شده، منظم و زنجیر وار اساس تکوین تعدادی از اندام‌های جنین را تشکیل می‌دهد (۱، ۲، ۳ و ۴). مطالعات زیادی روی برهم‌کنش‌های مزانشیمی-اکتودرمی پوست و ضمایم پوستی (فولیکول مو، فولیکول پر و غدد پستانی) انجام گرفته و در این مطالعات نقش حیاتی این برهم‌کنش‌ها در تکوین طبیعی پوست و ضمایم آن نشان داده شده است (۱۲-۵). علاوه بر اهمیت این برهم‌کنش‌ها در طی تکوین جنینی شواهدی وجود دارد که پیشنهاد می‌کند این برهم‌کنش‌ها برای رشد و تمایز صحیح اپی‌تلیوم در موجود بالغ نیز حیاتی می‌باشند (۱۳). در پی این مطالعات چنین مطرح شده که فاکتورهای پیام‌رسانی وجود دارند که روی هر یک از اپی‌تلیوم و مزانشیم عمل کرده و هومئوستازی آن‌ها را تنظیم می‌کنند (۱۴).

مطالعه این برهم‌کنش‌ها و تاثیرات مستقیم آن در شرایط *in vivo* و طی فرآیند مورفوژنز سخت و دشوار است چرا که متغیرهای بسیاری در این موضوع دخالت دارند و اینکه نمی‌توان به آسانی شرایط آزمایش را تحت کنترل قرار داد. از این‌رو، برای درک بهتر ماهیت این برهم‌کنش‌ها محققین به تکنیک‌های نوترکیبی مراجعه می‌کنند. در این تکنیک‌ها، بافت‌های در حال تکوین درمی - اپی‌درمی از یکدیگر جدا شده و با بافت‌هایی از حیوان هم نوع ولی از ناحیه متفاوتی از بدن (Heterotopic)، حیوان هم نوع ولی متفاوت از نظر تکوین (Heterochronic) و یا حیوانی که در رده متفاوتی قرار دارد (Heterospecific) مجاور می‌شوند. این بافت‌های نوترکیب شده سپس یا در شرایط *in vitro* کشت می‌شوند یا روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه قرار می‌گیرند و یا به یک میزبان مناسب پیوند می‌شوند. چنین آزمایشات نوترکیبی نه تنها کروماتوژنی و آبشار وقایع را طی تکوین ضمایم پوستی مشخص می‌کند بلکه نقش هر بافت را در این اتفاقات آشکار می‌کند (۱۵)

با استفاده از نوترکیبی‌های *heterospecific* که در آغاز بین بافت‌های جنین موش و جنین جوجه انجام شد مشخص شد که ویژگی گونه‌ای (species specificity) ضمایم پوستی در اپی‌درم نهفته است (۱۶، ۱۷ و ۱۸). از این آزمایشات چنین استنتاج می‌شد که ظاهراً درم یک نقش تعیین‌کننده در تکوین

مواد و روش‌ها

بافت شناسی: بعد از طی دوره نحوه رفتار با حیوانات و کسب مجوز مربوطه از کمیته اخلاق دانشگاه، به‌منظور دستیابی به دانش و فهم دقیق‌تری از مورفولوژی و محل دقیق قرارگیری سلول‌های درمی در چنگال موش صحرایی نژاد PVG (inbred Piebald Virol Glaxo)، یک نوزاد موش ۴ روزه انتخاب شد. حیوان با دوز بالایی از CO₂ کشته و انگشتان دست و پای آن با کمک یک تیغه اسکالپل قطع شد. انگشتان در محلول فرمالین نمکی ۴ درصد تثبیت شدند و نمونه‌های تثبیت شده متعاقباً به‌طریق معمول برای مطالعات بافت شناسی آماده شد.

جداسازی و کشت سلول‌های درمی از بستر چنگال: برای این بخش موش‌هایی با سنین بین ۴ تا ۳۰ روز استفاده شد. حیوانات با دوز بالایی از CO₂ کشته و سپس انتهای اندام‌های حرکتی آن‌ها با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. با استفاده از یک تیغه اسکالپل نوک انگشتان از محل آخرین مفصل منتهی به چنگال قطع گردید (شکل ۱a) و قطعه‌های جدا شده بلافاصله در یک پتری دیش حاوی MEM و آنتی‌بیوتیک‌ها (100 U/ml پنسیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دوز استروپتومایسین، ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فونگیزون، همگی تهیه شده از شرکت Gibco) قرار گرفت. در زیر استرئومیکروسکوپ و با استفاده از قیچی جراحی ظریف یک برش طولی در طول پوست بخش قطع شده ایجاد شد تا ساختارهای داخلی آشکار گردند. پوست نمونه‌ها متعاقباً جدا شده و دور انداخته شد. ساختارهای داخلی قطعه‌ها عبارت بودند از استخوان آخرین بند انگشت به‌اضافه بافت‌های مربوط به چنگال که به‌همراه هم به یک ظرف جدید MEM و آنتی‌بیوتیک منتقل شد. در اینجا با کمک پنس-های ظریف صفحه کراتینه چنگال به‌آرامی از استخوان جدا و دور انداخته شد. بافت پاپیلای درمی که درست زیر صفحه کراتینه قرار می‌گیرند اکنون تنها بافتی بودند که چسبیده به سطح استخوان آخرین بند انگشت باقی مانده بود. اکنون این بافت به‌آرامی با کمک پنس و نوک سوزن سرنگ از استخوان جدا شده (شکل ۱b) و به ظروف کشت ۳۵ میلی‌متر انتقال یافت. این بافت‌ها ابتدا در یک یا دو قطره محیط کشت [MEM + ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) + آنتی‌بیوتیک‌ها] کشت داده شد. شرایط داخلی انکوباتور برای کشت عبارت بود از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد CO₂. ظروف

چهار روز پس از کشت در زیر میکروسکوپ اینورت مورد مشاهده قرار گرفته و پس از دیدن نشانه‌ای دال بر چسبیدن بافت‌ها به کف ظرف و شروع رشد سلول‌ها، ۲ میلی‌لیتر از همان محیط کشت به ظروف اضافه شد. پس از ایجاد، رشد و خروج کامل سلول‌ها از بافت‌ها (tissue explants) و همچنین در ادامه کار تا رسیدن به مرحله پاساژ سلول‌ها با محیط کشت [MEM + ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) + آنتی‌بیوتیک‌ها] تغذیه شد (شکل ۱c).

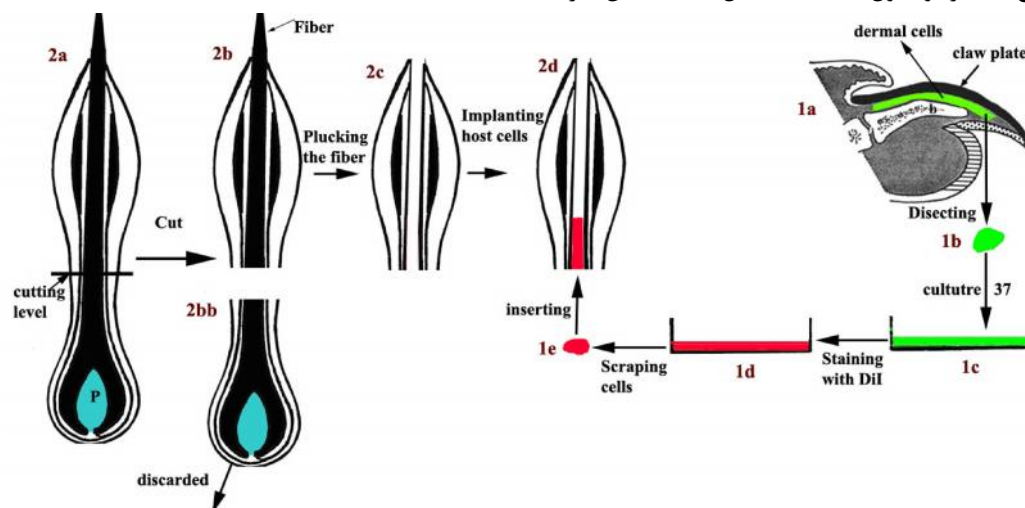
رنگ آمیزی سلول‌های کشت شده با رنگ حیاتی 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine DiI یا Perchlorate

برای آشکار کردن قابلیت القایی سلول‌های درمی حاصل از چنگال در برهم‌کنش با اپی‌درم هتروتوپیک (اپی‌درم فولیکول ویبریسای و اپی‌درم گوش) در شرایط *in vivo*، ابتدا سلول‌های درمی کشت داده شده بعد از پاساژ ۲ و ۳ با رنگ حیاتی DiI رنگ آمیزی شدند (شکل ۱d). هدف از این کار این بود که ما بتوانیم تا بدون آسیب رساندن به سلول‌ها در انتهای کار سرنوشت سلول‌های پیوند شده را در محل پیوند تعقیب کنیم. برای این منظور بعد از تریپسینه کردن و سانتریفوژ نمودن سلول‌ها، پلیت سلولی کف لوله سانتریفوژ در یک میلی‌لیتر MEM حاوی ۵ میکرومول FM-DiI (مولکولار پروبوز، آمریکا) به‌حالت سوسپانسیون درآمد. سوسپانسیون سلولی متعاقباً ابتدا برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بعد برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌ها سپس در شرایط ۱۸۰۰rpm سانتریفوژ و محلول رویی (supernatant) حاوی رنگ اضافی دور ریخته شد. پلت سلولی با ۵ میلی‌لیتر MEM به‌صورت سوسپانسیون درآمد و سوسپانسیون دوباره به‌صورت قبل سانتریفوژ شد. در این مرحله پلت سلولی در MEM حاوی ۱۰ درصد FCS به‌حالت سوسپانسیون درآمد و در همین محیط به ظروف کشت ۳۵ میلی‌متر منتقل شد. ظروف برای مدت ۳ روز در شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خوابانده شدند. بعد از پایان این مدت محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت MEM تنها تعویض شد. ظروف در این محیط برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا اینکه برای پیوند زدن به‌طریقی که شرح آن در زیر می‌آید آماده شوند.

پیوند سلول‌های رنگ آمیزی شده با DiI به داخل فولیکول ویبریسای قطع شده (فاقد پاپیلای درمی): برای

پیوند ۲ موش صحرایی با سن ۴ ماه به‌عنوان پذیرنده سلول‌های پیوندی انتخاب شدند و محل پیوند فولیکول‌های ویبرسا (موهای زبر و درشت پشت لب فوقانی جوندگان و سایر پستانداران) بود. موش‌ها با کمک فلوتن (Mallinckrodt Veterinary Ltd, UK) بی‌هوش شدند. سپس با کمک قیچی و تیغه اسکالپل ظریف پوست ناحیه لب فوقانی از عقب ناحیه‌ای که ویبرسا قرار دارند بریده و ناحیه بریده با روشی که با جزئیات در جای دیگر شرح داده شده است (۲۲) معکوس شد تا فولیکول‌ها در معرض قرار گرفتند. فولیکول‌ها سپس به‌طور مجزا از بافت‌های همبند اطراف آزاد شدند و موقعیت آن‌ها بر مبنای فرمول اولیور (۲۳) ثبت شد. عملیات پیوند روی فولیکول‌های بزرگ‌تر که در آخرین ردیف پشتی-شکمی قرار می‌گیرند انجام گرفت. فولیکول‌ها بر طبق روش معمول و استاندارد برای پذیرش سلول‌های پیوندی آماده شدند (۲۴). به‌طور خلاصه، ابتدا با استفاده از پنس فولیکول‌ها از محل اتصال به سطح پوست گرفته شده و سپس طولی از فولیکول با کمک قیچی ظریفی قطع شدند (شکل ۲a). محل قطع شدگی درست در بالای محل ورود عصب به دیواره کیسول فولیکول بود و با این کار به‌عبارتی نیمه فوقانی فولیکول (شکل ۲b) از نیمه تحتانی جدا شد (شکل ۲b). نیمه تحتانی سپس دور انداخته شد (ناحیه تحتانی همان محلی است که سلول‌های پاپیلای درمی خود فولیکول در آن قرار می‌گیرند). سپس رشته ویبرسای موجود در نیمه فوقانی و به‌جا مانده فولیکول قطع شده از فولیکول کنده شد (شکل ۲c) تا با این کار

فضای لازم برای جا دادن سلول‌های پیوندی مهیا شود. پس از آماده شدن نیمه فولیکول‌های پذیرنده به‌سراغ ظروف کشت سلول‌های درمی چنگال که با DiI رنگ شده بودند رفته و بعد از دور ریختن محیط کشت روی سلول‌ها، تک‌لایه سلولی روی کف ظرف با کمک یک تیغه لاستیکی تراشیده شده (۱e) و به‌صورت یک توده (clamp) جمع‌آوری شد. این توده سلولی سپس به‌وسیله پنس به فضایی که در انتهای نیمه فولیکول‌ها قرار داشت و از کندن رشته ویبرسا ایجاد شده بود منتقل شد (شکل ۲d). به‌طور کلی تعداد ۹ نیمه فولیکول به این طریق سلول‌های درمی رنگ شده با DiI را دریافت نمودند. بعد از تزریق سلول‌ها به این نیمه فولیکول‌ها، پوست این ناحیه به‌حالت اول برگردانده شده و بریدگی ایجاد شده بخیه زده شد. موش‌ها سپس به‌هوش آورده شده و به قفس‌های مجزا منتقل شدند. ذکر این نکته ضروری است که پس از به‌هوش آمدن، این حیوانات مشکلی در خوردن و آشامیدن نداشتند. بعد از ۲۰ روز از عملیات پیوند شدن، موش‌های میزبان کشته شده و نیمه فولیکول‌های دریافت کننده پیوند جدا و به‌طور فوری با مایع tissue-tek (میلز، آمریکا) قالب‌گیری و با نیتروژن مایع فریز شدند. با استفاده از میکروتوم کرایوستات (برایت، انگلستان) برش‌های ۶ میکرومتری تهیه و بر روی لام قرار داده شدند. سپس به‌طور سریع برش‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنس مجهز به فیلتر فلورسنس رودامین و همچنین عدسی‌های فاز کنتراست مورد مشاهده قرار گرفتند.



شکل ۱: مراحل آماده‌سازی و پیوند سلول‌های پاپیلای درمی چنگال به نیمه فولیکول ویبرسا. محل قرارگیری بافت پاپیلای درمی در چنگال (1a)، خارج کردن بافت پاپیلای (1b)، کشت بافت در محیط کشت (1c)، رنگ آمیزی سلول‌های کشت شده با DiI (1d)، پیوند سلول‌ها به نیمه بالایی نیمه فولیکول ویبرسا. دو نیمه فولیکول ویبرسا (2a) دور انداختن نیمه پائینی فولیکول (2b)، کندن رشته مو از نیمه بالایی فولیکول (2c)، پذیرش سلول‌های درمی چنگال به فضای برجای مانده از محل رشته مو (2d).

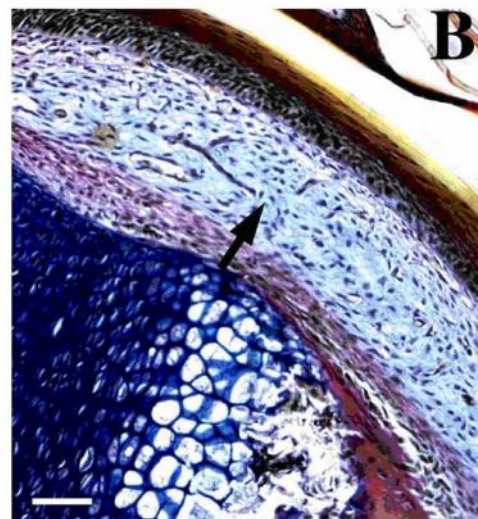
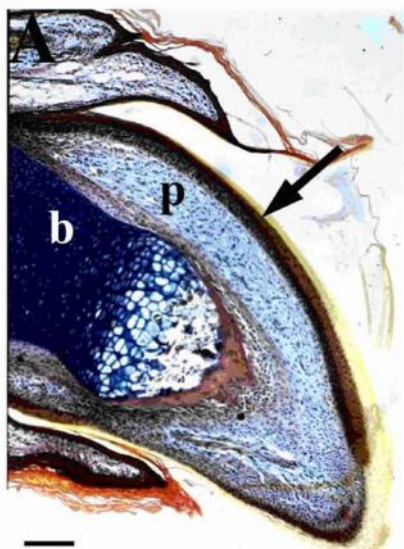
نتایج

بافت شناسی

چنگال در نتیجه برهم‌کنش‌های مداوم و پیوسته‌ای که در انتهای پستی انگشتان اتفاق می‌افتد تولید می‌شود. بخش درمی یا پاپیلای چنگال با ماتریکس اپی‌درمی (مکان تولید سلول) که در بالای انتهای دیستال آخرین بند انگشت قرار دارد برهم‌کنش می‌کند. پاپیلای درمی چنگال ویژگی‌ها و مشخصاتی را به نمایش می‌گذارد که در سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول موی در حال رشد دیده می‌شود. به این ترتیب که پاپیلا با سلول‌های شبه فیبروبلاستی اشغال می‌شود که در یک ماتریکس خارج سلولی فراوان پراکنده‌اند (شکل ۲). ماتریکس خارج سلولی این پاپیلا به خوبی با آبی آلسین رنگ می‌گیرد که نشانه این است که این ماتریکس غنی از ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکان می‌باشد. درست در بالای این پاپیلای درمی اپی‌تلیومی قرار دارد که در واقع ادامه‌ای از اپی‌درم پوست است که لایه‌های سلولی آن همچنان که به طرف سطح حرکت می‌کنند دچار تمایز می‌شوند. این سلول‌ها در مسیر حرکت به سطح بزرگتر، پهن‌تر و طویل‌تر شده و هسته خود را از دست می‌دهند. آن‌ها سرانجام صفحه ضخیم چنگال را می‌سازند که از سلول‌های متراکم کراتینه شده تشکیل می‌گردد.

پیوند زدن سلول‌های رنگ آمیزی شده با 1,1'-Diocetyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI) به داخل زخم‌های ایجاد شده در لاله

گوش: تعداد ۳ موش بالغ با کمک فلوتن به طور سبک بی‌هوش شده و لاله گوش‌های آن‌ها با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. سپس با در دست گرفتن گوش‌ها با کمک یک تیغه اسکالپل شماره ۱۱ یک زخم طولی کوچکی به طول ۳ تا ۴ میلی‌متر در مرکز گوش ایجاد شد. سپس یک سر سوزن سرنگ از طریق این زخم به داخل درم عبور داده شد تا فضای لازم برای سلول‌های پیوندی را ایجاد کند. حال هر گونه خون و ترشحات دیگر زخم و اطراف آن با کمک دستمال استریل پاک شد تا کار برای پیوند سلول‌های درمی رنگ شده با DiI آماده گردد. برای پیوند زدن این سلول‌ها دوباره به همان طریقی که در قسمت قبل شرح داده سلول‌ها از کف ظروف تراشیده شده و توده سلولی به دست آمده با کمک پنس ظریفی به داخل فضای ایجاد شده در زخم گوش جاسازی شد. حال محل زخم برای چند دقیقه به حال خود رها شد تا لایه سطحی سلول‌های پیوندی و ترشحات خونی پوست خشک شود. سپس به موش‌ها اجازه داده شد تا به هوش آیند و به قفس‌های خود منتقل شوند. ۷ تا ۱۰ روز بعد از پیوند زدن، حیوانات مذکور کشته شده و بافت محل زخم بعد از جدا سازی به روش آن چه برای فولیکول‌ها ذکر شد برای بررسی‌های بافتی آماده شد.

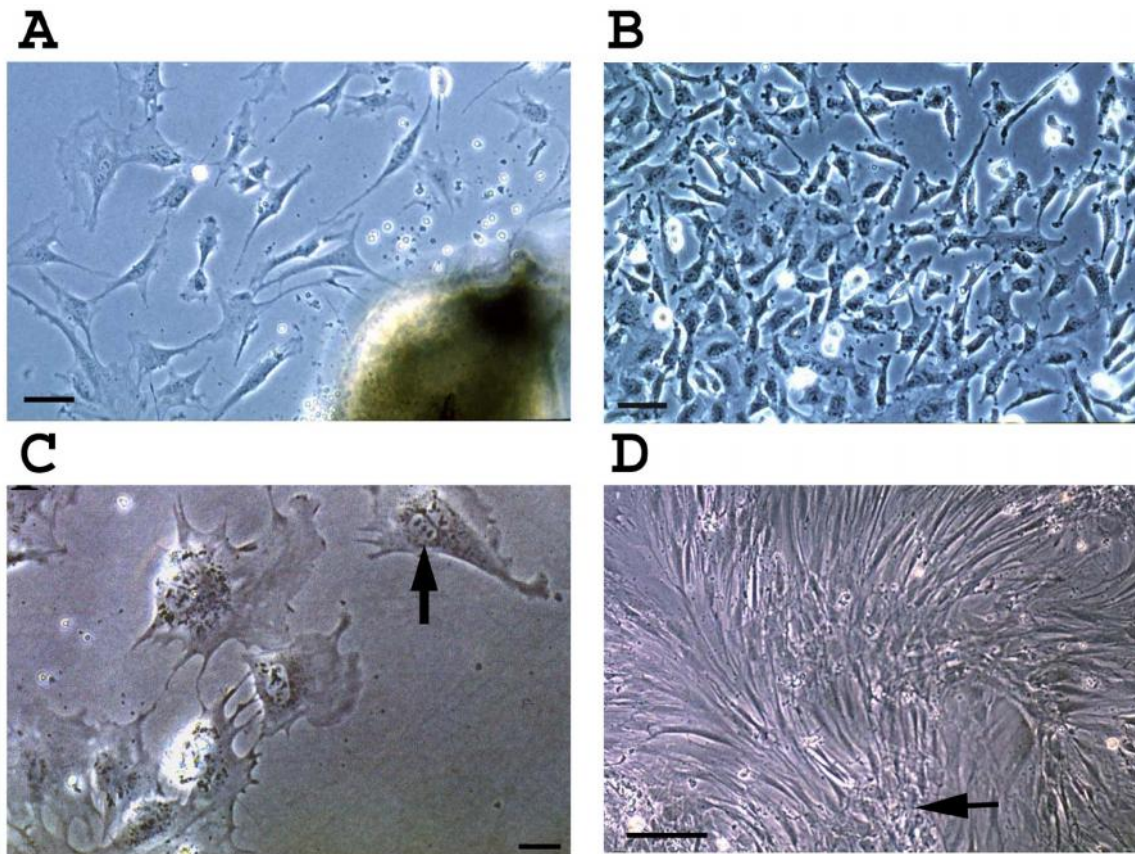


شکل ۲: ساختار بافت شناسی چنگال موش صحرائی ۴ روزه: (A) بزرگنمایی پائین از انتهای انگشت. چنگال به طور اساسی از ۲ بخش اپی‌درمی (پیکان) و درمی (d) تشکیل می‌شود. استخوان آخرین بند انگشت (b) هنوز استخوانی نشده و شامل سلول‌های غضروفی است. (B) بزرگنمایی بالاتر از همان ناحیه. بافت درمی یا پاپیلای چنگال (پیکان) از سلول‌هایی که در ماتریکس غنی از گلیکوزآمینوگلیکان قرار دارند تشکیل می‌شود. از این بافت درمی برای کشت سلولی استفاده شد. رنگ آمیزی: آبی آلسین-هماتوکسیلین-پونسوای S کورتیس. خط نشانه در A برابر با ۱۰۰ میکرومتر و در B برابر ۵۰ میکرومتر.

کشت سلولی

حال تقسیم به فراوانی در محیط کشت دیده می‌شدند (شکل ۳C). در نتیجه این سرعت تکثیر بالا و مهاجرت فعال سلول‌ها، فرآیند گسترش سلولی در اطراف قطعات بافتی سریع بود و به تبع آن سلول‌ها در زمان کوتاهی (طی دو هفته) تمام فضای کف ظروف کشت را می‌پوشاندند (شکل ۳D). این ویژگی حتی بعد از پاساژ سلول‌ها در آن‌ها حفظ می‌شد به طوری که آن‌ها طی فقط چند روز بعد از پاساژ به حالت تک لایه پیوسته یا کانفلوئنت (confluent) می‌رسیدند. در حالت کانفلوئنت، سلول‌ها مجتمع شده و توده‌های سلولی متراکم (clumps) ایجاد می‌کردند ولی این توده‌های سلولی از لحاظ بزرگی به اندازه آن‌چه در مورد توده‌های سلول‌های پاپیلای فولیکول مو دیده شده (۲۱) نمی‌رسیدند (شکل ۳D).

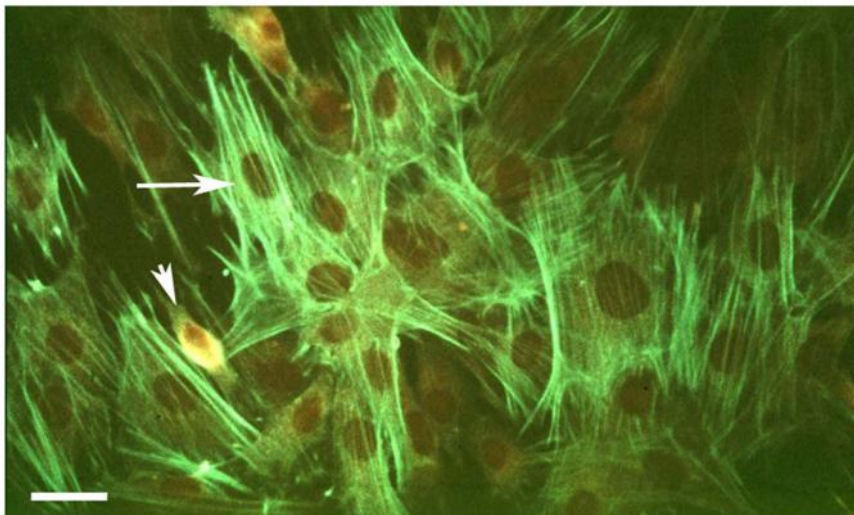
ظروف کشت سلول‌های پاپیلای درمی چنگال سه روز بعد از انجام کشت مورد مشاهده قرار گرفتند. در این زمان سلول‌ها از تمام جهات شروع به خروج از پیرامون قطعه‌های بافتی (tissue explants) کرده بودند. با وجود بعضی تغییرات، این سلول‌ها در حالت کلی کوچک و دوکی شکل بودند. در ابتدا هیچ تفاوتی از نظر اندازه و تراکم بین سلول‌های مجاور قطعه‌های بافتی و سلول‌های حاشیه‌ای وجود نداشت (شکل ۳A). با این حال، بعد از گذشت ۲ تا ۳ روز، سلول‌های مجاور بافت‌ها متراکم‌تر از سلول‌های نواحی حاشیه‌ای ظاهر می‌شدند (شکل ۳B). سلول‌های حاشیه‌ای دارای پاهای تیغه‌ای متعددی بودند که اشاره به این داشت که فعالانه در حال حرکت و مهاجرت هستند. قابلیت تکثیر سلول‌های پاپیلای درمی بالا بود و سلول‌های در



شکل ۳: میکروگراف‌های فاز-کنتراست از سلول‌های پاپیلای درمی چنگال در محیط کشت. (A) سلول‌های درمی خارج شده از قطعه‌های بافتی ۴ روز پس از شروع کشت. سلول‌ها عمدتاً دوکی شکل بوده و دارای پاهای تیغه‌ای مشخص هستند. (B) بعد از ۷ روز از شروع کشت سلول‌های مجاور قطعه‌های بافتی متراکم‌تر از سلول‌های پیرامونی مشاهده می‌شوند. (C) سلول‌های در حال تقسیم متعددی (پیکان) در میان سلول‌های درمی محیط کشت وجود داشت. (D) در مرحله کانفلوئنت سلول‌های درمی تشکیل مجتمع‌ها و توده‌های کوچکی از سلول‌ها (پیکان) را می‌دادند. خط نشانه در A، B و C برابر ۲۵ میکرومتر، در D برابر با ۱۵۰ میکرومتر.

سیتوپلاسمی بیان گردید (شکل ۴). با این وجود شدت رنگ گرفتن فیلامنت‌های موجود در پاهای تیغه‌ای بیشتر از بقیه سیتوپلاسم بود. همچنین این آنتی‌بادی در سلول‌های پهن و پراکنده با شدت بیشتری نسبت به سلول‌های کوچک و متراکم ظاهر می‌شد.

نشان‌دار کردن سلول‌های کشت شده یا آنتی‌بادی ASMA
برای آشکار کردن سایر ویژگی‌های سلول‌های پاپیلای درمی چنگال، این سلول‌ها بعد از پاساژ ۲ و ۳ با آنتی‌بادی ASMA نشان‌دار شدند. تقریباً ۸۵ تا ۹۰ درصد این سلول‌ها با این آنتی‌بادی نشان‌دار و این ترکیب در تمام میکروفیلامنت‌های



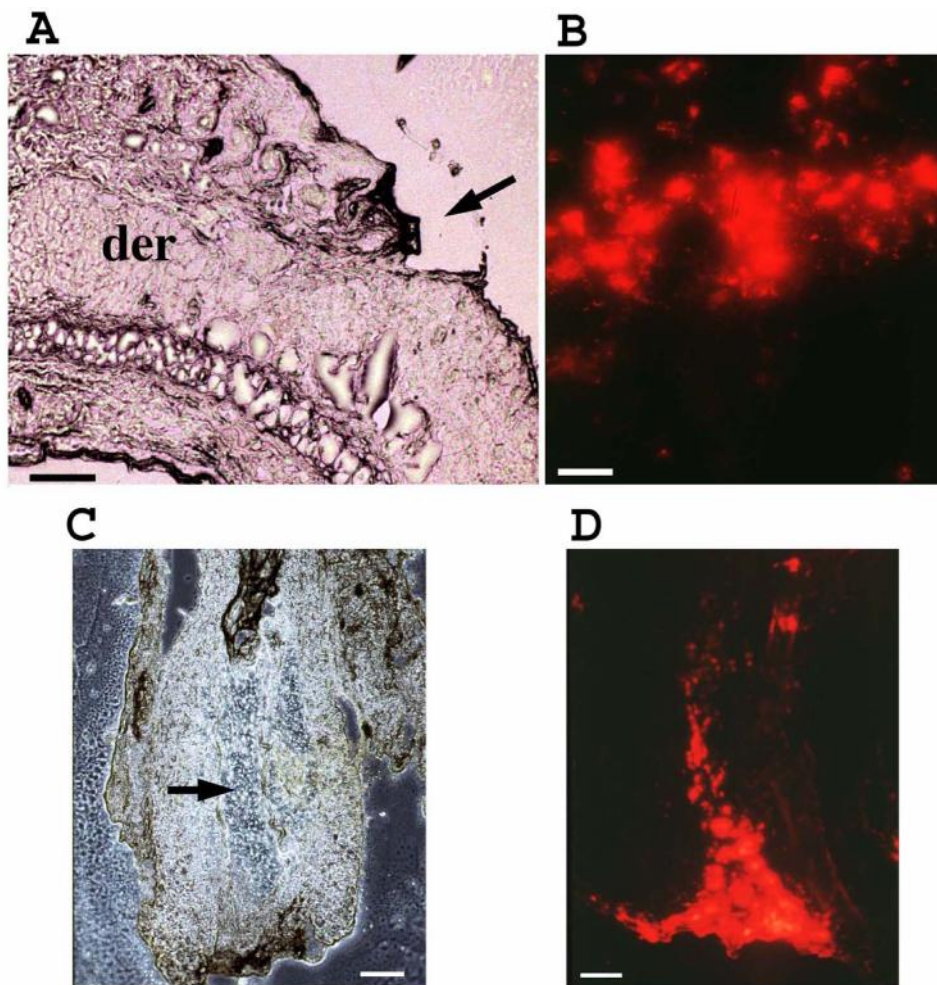
شکل ۴: رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس از سلول‌های درمی چنگال در محیط کشت با آنتی‌بادی ASMA اکثریت سلول‌ها این پروتئین اسکلت سلولی را در سیتوپلاسم (به‌ویژه در پاهای تیغه‌ای) بیان می‌کنند ولی بیان این پروتئین در سلول‌های پهن (پیکان بزرگ) شدیدتر از سلول‌های کوچک و متراکم (نوک پیکان) است. خط نشانه برابر ۵۰ میکرومتر.

علاوه بر این، هیچ اثری از سلول‌های درمی وارد شده در ساختار بافت‌های میزبان و ضمام آن مشاهده نشد.

همچنین بررسی نیمه فولیکول‌های ویریسای دریافت کننده سلول‌های پاپیلای چنگال بعد از ۲۰ روز از آزمایش مشخص کرد که قسمت تحتانی این نیمه فولیکول‌ها ظاهراً با کمک همکاری سلول‌های پیوندی التیام یافته و یک بافت جوش‌گاهی در این ناحیه شکل گرفته است. اما از این نیمه فولیکول‌ها هیچ ساختاری (از قبیل رشته مو و ...) منشا نگرفته بود (شکل ۵C). مشاهدات بافت‌شناسی نیز نشان داد که هیچ نشانه‌ای از ترمیم فولیکول و ایجاد مو یا تشکیل یک زائده پوستی دیگر در این نیمه فولیکول‌ها مشاهده نمی‌شود. بررسی برش‌های تهیه شده از این نیمه فولیکول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس تایید کرد که هر چند تعدادی از سلول‌های رنگ شده به‌طور پراکنده در بخش فوقانی این فولیکول‌ها دیده می‌شوند لیکن بخش اصلی سلول‌های پیوند شده هنوز در انتهای تحتانی فولیکول‌ها، یعنی همان جایی که سلول‌ها به آن وارد شدند، باقی مانده‌اند (شکل ۵D).

توانایی برهم‌کنشی سلول‌های درمی پاپیلای چنگال

به‌منظور ارزیابی قابلیت‌های برهم‌کنشی، سلول‌های کشت شده چنگال ابتدا با DiI رنگ شده و سپس به‌داخل زخم‌های ایجاد شده در لاله گوش و یا نیمه بالایی فولیکول ویریسای موش صحرایی وارد شد. بررسی‌های بافت‌شناسی گوش‌های دریافت کننده سلول در ۷ تا ۱۰ روز پس از وارد نمودن سلول‌ها نشان داد که ناحیه پذیرنده سلول به‌دلیل گسیختگی بافت‌ها به‌راحتی از نواحی اطراف قابل تشخیص است (شکل ۵A). اما هیچ‌گونه ساختار بافتی در محل سلول‌های وارد شده مشاهده نشد. برای پی بردن به موقعیت و مکان سلول‌های کاشته شده، برش‌های بافتی تهیه شده از گوش میزبان زیر میکروسکوپ فلورسانس مجهز به فیلتر رودامین مورد مشاهده قرار گرفتند. سلول‌های کاشته شده پاپیلای چنگال عمدتاً به‌صورت توده‌های مجتمعی در عمق بافت گوش وجود داشتند، هر چند که تعدادی از این سلول‌ها نیز به‌طور پراکنده در پیرامون محل زخم دیده می‌شدند (شکل ۵B). اما، این سلول‌ها در ساختمان و یا در ارتباط با هیچ ساختار بافتی (از قبیل فولیکول مو و یا غیره) مشاهده نشدند.



شکل ۵: میکروگراف‌های فاز-کنتراست و فلورسنس از بافت‌های دریافت‌کننده سلول‌های پاپیلا درمی کشت شده. (A) برش بافتی از ناحیه‌ای از گوش که سلول‌های درمی رنگ شده با Dil را دریافت کرده بود. هیچ نشانه‌ای از تشکیل ساختار پوستی در محل پیوند دیده نمی‌شود. محل وارد کردن سلول‌ها (der)، موقعیت زخم ایجاد شده (پیکان). (B) تصویر گرفته شده از محل پیوند با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس. همان‌طور که مشاهده می‌شود سلول‌های درمی چنگال (رنگ قرمز) هنوز هم در محل پیوند مشاهده می‌شوند. (C) نیمه فولیکول دریافت‌کننده سلول‌های درمی نیز نشانه‌ای از ایجاد برهم‌کنش بین سلول‌های پیوندی و اپی‌درم بافت میزبان (پیکان) در آن دیده نمی‌شود. (D) مشاهده نیمه فولیکول دریافت‌کننده سلول نیز نشان داد که بعد از گذشت ۲ روز هنوز نیز سلول‌های درمی (رنگ قرمز) در محل پیوند مشاهده می‌شوند. خط نشانه در A برابر ۲۵ میکرومتر، در B و C برابر ۱۰۰ میکرومتر و در D برابر با ۵۰ میکرومتر.

بحث

نشان داده است. این فاکتور همچنین در ایجاد قطبیت پشتی-شکمی اندام حرکتی در حال نمو نقش دارد (۲۶). چنین تصور می‌رود که LIM 1B نقش خود را از طریق مسیر اسپوندین به‌انجام می‌رساند. اسپوندین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که در ارتباطات درون سلولی مشارکت دارند. نشان داده شده که برای مثال، اسپوندین ۴ در تعیین فعالیت سیستم پیام‌رسانی Wnt/بتا کتینین دخالت دارد و این مسیر نیز به‌نوبه خود در شروع فرآیند تشکیل چنگال نقش بازی می‌کند (۲۷ و ۲۸). موش‌هایی که در تولید اسپوندین دارای نقص هستند انواعی از ناهنجاری‌ها از جمله نداشتن چنگال را به نمایش می‌گذارند

در این پژوهش بررسی بافت‌شناسی چنگال نشان داد این ساختار نیز همچون سایر ضمام پوستی از دو بخش درمی و اپی‌درمی تشکیل می‌شود و در نتیجه برهم‌کنش همین دو بخش است که به‌طور ممتد صفحه کراتینی چنگال و یا ناخن در طول عمر حیوان رشد می‌کند. این برهم‌کنش نه تنها در دوره جنینی که در تمام دوره بلوغ ادامه دارد. فاکتورهای متعددی شناسایی شده که در این برهم‌کنش میان درم و اپی‌درم دخالت دارند (۲۵). تحقیقات انجام شده اهمیت نقش فاکتور رونویسی LIM 1B را در تشکیل چنگال (و همچنین اندام حرکتی) در جنین موش

نشان می‌دهند. آنتی‌بادی مذکور به‌طور اختصاصی به اکتین متصل می‌شود. پروتئین اکتین به‌همراه سایر پروتئین‌ها ضمن فراهم آوردن حمایت مکانیکی برای سلول در اعمال مختلف سلولی همچون انقباض، چسبندگی و حرکت دخالت دارد (۳۸). در بافت‌های یوکاریوت‌ها سه نوع ایزوفرم اکتین (آلفا، بتا، گاما) وجود دارد. در حالی که اکتین بتا به‌طور غیرافتراقی در تمام سلول‌های یوکاریوت وجود دارد، اکتین آلفای قلبی، اکتین آلفای اسکلتی و اکتین آلفای ماهیچه صاف (ASMA) به‌عنوان اکتین خاص-بافت در نظر گرفته می‌شوند. البته باید توجه داشت که علاوه بر سلول‌های ماهیچه صاف ASMA در سایر سلول‌ها نظیر میوفیبروبلاست، میوایپ‌تلیال و فیبروبلاست و سایر سلول‌هایی که خاصیت انقباضی دارند یافت می‌شود (۳۹ و ۴۰). بیش از چند دهه است که مشخص شده سلول‌های فیبروبلاست بافت همبند نیز فعالیت انقباضی شبه ماهیچه‌ای از خود نشان می‌دهند. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد انقباض فیبروبلاست‌ها در بافت همبند یک نقش کلیدی در بسته شدن زخم‌ها در جریان التیام جراحات پوست بازی می‌کند و تایید شده که این رفتار انقباضی فیبروبلاست‌ها ناشی از وجود ASMA در آن‌ها می‌باشد (۴۱). نقش ASMA در سلول‌های درمی بستر چنگال احتمالاً اعمال نیروی انقباضی در جهت آرایش و سازمان‌بندی سلول‌های کراتینی چنگال یا ناخن و همچنین راندن بافت ساخته شده به سمت بیرون می‌باشد، چیزی مشابه وظیفه‌ای که برای این پروتئین در دیگر ساختار پوستی یعنی غده پستانی مشخص شده است. گزارشی وجود دارد که ASMA موجود در سلول‌های میوایپ‌تلیال غده پستانی در انقباض این سلول‌ها و آزاد سازی شیر از سلول‌های لومینال دخالت دارد (۴۲). ولی اینکه این پروتئین در چنگال نیز دقیقاً نقش انقباضی دارد یا در اعمال دیگر نیز مشارکت دارد یا خیر احتیاج به شواهد و مدارک بیشتری دارد.

نتایج حاصل از کشت سلولی در این مطالعه نشان داد که سلول‌های درمی چنگال از لحاظ ویژگی‌های رشد مشخصات فیبروبلاست‌ها را به نمایش می‌گذارند. اما اینکه آن‌ها برخلاف فیبروبلاست‌ها (که معمولاً تجمع سلولی تشکیل نمی‌دهند) همچون سلول‌های پاپیلای درمی تجمع سلولی (aggregation) مختصری در مرحله کانفلوئنس را به‌نمایش می‌گذارند (۲۱) این احتمال را مطرح کرد که سلول‌های درمی چنگال ممکن است ویژگی‌های مشابهی با سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول مو داشته باشند. با بهره‌گیری و اتکا به این احتمال در این تحقیق

(۲۹). عقیده بر این است که در ضمام پوستی اسپوندین موجود در سلول‌های درمی در القا پی‌درم رویی و شروع فرآیند نمو این ضمام نقش دارد و نشان داده شده که سلول‌های درمی که فاقد اسپوندین هستند (فیبروبلاست) این خاصیت القایی را بروز نمی‌دهند (۳۰). علاوه بر اسپوندین ژن Akt نیز در تشکیل چنگال اهمیت دارد. موش‌های ترنسژنیک که واجد تغییراتی در این ژن هستند فاقد چنگال می‌باشند. محصول ژن Akt یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین است که در پیام‌رسانی سلولی نقش دارد (۳۱). برخلاف اسپوندین که در بافت مزانشیمی وجود دارد و مسئول برهم‌کنش بین مزانشیم و اکتودرم است، Akt در اپی-تلیال قرار دارد و تصور می‌شود یک نقشی در عمل‌کرد پروتئین ریخت زای استخوان یا Bone morphogenetic protein (BMP) بازی می‌کند. این پروتئین علاوه بر اینکه در تشکیل چنگال دخالت دارد یک نقش حمایتی در نمو چنگال بازی می‌کند، ضمن اینکه در قابلیت ترمیم آخرین بند انگشت انسان در دوره نوزادی نیز نقش دارد (۳۲). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که این ارتباطات دوجانبه (اپی‌درم-درم) لازمه تشکیل چنگال است و اگر اختلالی در این ارتباطات به‌وجود آید نتیجه آن ایجاد عدم تشکیل چنگال و یا ناهنجاری‌های همچون هیپوپلاستیک چنگال می‌شود (۳۳).

مطالعات ایمونوهیستوشیمی انجام شده وجود ترکیبات متعددی را در بخش اپی‌درمی و درمی چنگال نشان داده است. انواعی از کراتین‌های نرم (soft)، کراتین ۱۰-۱، و کراتین‌های سخت (hard)، کراتین ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۳۱، ۳۲، ۸۱، ۸۵ و ۸۶ در بخش اپی‌درمی چنگال یافت شده است (۳۴ و ۳۵). همچنین در بخش درمی نیز مولکول‌های مختلفی بیان می‌شود. در این تحقیق نشان داده شد که سلول‌های درمی در یک ماتریکس غنی از گلیکوز‌آمینوگلیکان (جزئی از ساختار پروتئوگلیکان‌ها) وجود دارند. گزارش شده که سلول‌های مزانشیمی بستر چنگال واجد ورسیکان (versican) هستند و این یک پروتئوگلیکان کوندروئیتین سولفات است که عضوی از خانواده لکتیکان‌ها (lecticans) می‌باشد (۳۶). همچنین مشخص شده که در بخش درمی ویمنتین، دسمین و مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن نوع ۲ (plasminogen activator inhibitor type 2) به‌شدت بیان می‌شود (۲۶ و ۳۷). در این پژوهش نشان داده شد که سلول‌های درمی چنگال در محیط کشت پروتئین ASMA بیان می‌کنند و این مشاهده در راستای مطالعه‌ای است که نشان داده سلول‌های درمی با آنتی‌بادی HHF35 به‌شدت واکنش

منابع

1. Marionnet C, Pierrard C, Vioux-Chagnoleau C, Sok J, et al. Interaction between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J. Invest. Dermatol.* 2006; 26(5): 971-979.
2. Watt FM, Fujiwara H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Col Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2011; 3(4): 1-15.
3. Sawyer RH, Rogers L, Washington L, Glenn TC. Evolutionary origin of feather epidermis. *Developmental Dynamics.* 2005; 232: 256-267.
4. Thangapazhan RL, Darling TN, Meyerle J. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(5): 8407-8427.
5. Mackenzie IC. Epithelial-mesenchymal interactions in the development and maintenance of epithelial tissues. In *The Keratinocyte Handbook*, Edited by IM. Leigh, EB. Lane & FM. Watt. 1994; Cambridge University Press, pp. 243-257.
6. Olivera-Martinez I, Viallet JP, Michon F, Pearton DJ, et al. The different steps of skin formation in vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 107-115.
7. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 1995; 172(1): 126-138.
8. Fuchs, E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007; 445(7130): 834-842.
9. Sennett R, Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012; 23(8): 917-927.
10. Paus R, Foitzik K, Welker P, Bulfone-Paus S, et al. Transforming growth factor- β receptor type I and II expression during murine hair follicle development and cycling. *J. Invest. Dermatol.* 1997; 109: 518-526.
11. Liu S, Zhang H, Duan E. Epidermal development in mammals; Key regulators, signals from beneath and stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(6): 10869-10895.
12. Sakakura T. Epithelial-mesenchymal interactions in mammary gland development and its perturbation in relation to tumorigenesis. In *Understanding breast cancer*. Edited by M. A. Rich, J. C. Hager & P. 1983; Furmanski, Marcel-Dekker Inc., New York, pp. 261-284.
13. Fusenig NE. Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro. In *The Keratinocyte Handbook*. Edited by I. M. Leigh, E. B. Lane and F. کشت شده بستر چنگال در برهم‌کنش با سلول‌های اکتودرمی ضمایم دیگر (هتروتوپیک) مورد بررسی قرار گرفت، چرا که قبلاً نشان داده شده بود که سلول‌های پاپیلای درمی و غلاف درمی فولیکول مو قادر به القای درمی اکتوپیک هستند (۴۳ و ۴۴). لیکن نتایج حاصل از پیوند سلول‌های درمی چنگال به مجاورت درمی اکتوپیک در مطالعه حاضر حاکی از این بود که قطع نظر از تعداد دفعات پاساژ، سلول‌های کشت شده درمی چنگال قادر به القای درمی در سایر ضمایم پوستی نیستند و به‌نظر می‌رسید فاقد قدرت القایی هستند. به‌علاوه این مشاهده که توده سلول‌های پیوند شده حتی تا موقع برداشت هنوز هم در محل پیوند وجود داشتند تایید می‌کرد که عدم القای درمی هتروتوپیک ناشی از پراکنده شدن سلول‌ها و عدم وجود تعداد کافی از سلول‌ها برای القا نبوده است. بنابراین، در مقایسه با ویژگی‌های القایی پاپیلای درمی فولیکول مو که در مطالعات قبلی نشان داده شده است (۴۵)، مطالعه حاضر مشخص کرد که این ویژگی سلول‌های درمی به‌طور فراگیر در تمام ضمایم پوستی دیده نمی‌شود یا اگر بخواهیم دقیق‌تر صحبت کنیم حداقل در مورد سلول‌های درمی چنگال دیده نمی‌شود. گزارش شده که آنچه باعث هویت سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول مو و قابلیت آن‌ها برای شروع مورفوژنز مو می‌شود فاکتور shh است که از طریق حلقه تنظیمی نوگین/shh نقش خود را باز می‌کند (۴۶). از فاکتورهای مطرح دیگر در اعطای قابلیت القایی به سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول مو BMP، TGF- β 2 و wnt است (۵۰-۴۷). اینکه آیا دلیل عدم قابلیت القایی در سلول‌های درمی چنگال به‌دلیل فقدان این فاکتورها است دقیقاً مشخص نیست چرا که تاکنون تحقیقی در این رابطه بر روی این سلول‌ها انجام نگرفته است و انتظار می‌رود که در پژوهش‌های آینده این موضوع آشکار گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که سلول‌های پاپیلای درمی چنگال از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی، کشت سلولی و بیان اکتین آلفای عضله صاف شباهت‌هایی را با سلول‌های پاپیلای درمی فولیکول مو نشان می‌دهند. لیکن با وجود این شباهت‌ها، این سلول‌ها مانند هم‌تایان خود در فولیکول مو و بافت همبند گوش قادر به القای درمی هتروتوپیک و ایجاد یک زائده پوستی جدید نمی‌باشند.

- M. Watt, 1994; Cambridge University Press, pp. 71-94.
14. Villone D, Fritsch A, Koch M, Bruncker-Tuderman L, et al. Supramolecular interactions in dermo-epidermal junction zone. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(36): 24506-24513.
 15. Dhouailly D. Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous in amniotes. *Front. Matrix. Biol.* 1977; 4: 86-121.
 16. Coulombre JL, Coulombre AJ. Metaplastic induction of scales and feather in the corneal anterior epithelium of the chick embryo. *Dev. Biol.* 1971; 25: 464-478.
 17. Kollar EJ. The induction of hair follicles by embryonic dermal papillae. *J. Invest. Dermatol.* 1970; 55: 374-378.
 18. Dhouailly D. Dermo-epidermal interactions between birds and mammals: differentiation of cutaneous appendages. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1973; 30(3): 587-603.
 19. Sengel P. Epidermal-dermal interactions. In *Biology of the integument. II. Vertebrates*. Edited by J. Bereiter-Hahn, AG. Maltoltsy & KS. Richarts, 1986; Springer Verlag, Berlin, pp. 374-408.
 20. Cohen J. Transplantation of hair papillae. *Sympos. Zool. Soc. Lond.* 1964; 12: 83-96
 21. Jahoda CAB, Oliver RF. The growth of vibrissa dermal papilla cells in vitro. *Br. J. Dermatol.* 1981; 105: 623-627.
 22. Dawber RPR, De Berker D, Baran R. Science of the nail apparatus. In *Diseases of the nails and their management*, Edited by R. Baran & RPR. Dawber, 1994; Blackwell Scientific Publications, pp 1-34.
 23. Oliver RF. Whisker growth and regeneration in the hooded rat. Ph.D. thesis, 1965; University of Birmingham, UK.
 24. Gharzi A. Comparison of Structural, Cell Culture and Inductive Features of Feather and Hair Follicles Components. *J. Cell & Tissue (JCT)*, 2013; 4(2); 205-216.
 25. Chen D, Jarrell A, Guo C, Lang, R, et al. Dermal beta-catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. *Development.* 2012; 139(8): 1522-1533.
 26. De Berker DAR, Baran, R. Science of nail apparatus. In *Baran's and Dawker's of the nails and their management*, fourth edition, Edited by R. Baran, DAR. De Berker, 2012, John Wiley and Sons, Ltd, pp.1-50.
 27. Blyndon DC, Ishii YO, Toole EA, Unsworth HC, et al. The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited onychia. *Nat Genet.* 2006; 38(11): 1245 – 1247.
 28. Ishii Y, Wajid M, Bazzi H, Fantauzzo KA, et al. Mutations in R-spondin 4 (RSPO4) underlie inherited onychia. *J. Invest. Dermatol.* 2008; 128(4): 867 – 870.
 29. Aoki M, Kiyonari H, Nakamura H, Okamoto H. R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development. *Dev Growth Differ.* 2008; 50(2): 85– 95.
 30. Blyndon DC, Philpott MP, Kellsell DP. R-spondins in cutaneous biology: nails and cancer. *Cell Cycle.* 2007; 6(8): 895 – 897.
 31. Segrelles C, Moral M, Lorz C, Santos M, et al. Constitutively active Akt induces ectodermal defects and impaired bone morphogenetic protein signaling. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(1): 137 – 49.
 32. Han M, Yang X, Lee J, Allan CH, Muneoka K. Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev Biol.* 2008; 315(1): 125 -135.
 33. Baran R, Juhlin L. Bone dependent nail formation. *Br J Dermatol.* 1986; 114(3): 371-375.
 34. De Berker D, Wojnarowska F, Sviland L, Westgate GE, et al. Keratin expression in the normal nail unit: markers of regional differentiation. *Br. J. Dermatol.* 2000; 142(1): 89 -96.
 35. Okazaki M, Yoshimura K, Fujiwara H, Suzuki Y, et al. Induction of hard keratin expression in non-nail-matrix keratinocytes by nail-matrix fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003; 111: 286-290.
 36. Lee DY, Yang JM, Mun GH. Onychofibroblasts induce hard keratin in skin keratinocytes in vitro. *Br. J. Dermatol.* 2009; 161(4): 960-962.
 37. Lavker RM, Risse B, Brown H, Ginsburg D, et al. Localisation of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) in hair and nail: implications for terminal differentiation. *J Invest Dermatol.* 1998; 110: 917 – 922.
 38. Furumura M, Ishikawa H. Actin bundles in human hair follicles as revealed by confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 1996; 283: 425-434.
 39. Kinner B, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Spector M. Expression of Smooth Muscle Actin in Connective Tissue Cells Participating in Fracture Healing in a Murine Model. *Bone.* 2002; 30(5): 738-745.
 40. Bello IO, Alanen K, Salo T. Alpha-smooth muscle actin within epithelial islands is predictive of

ameloblastic carcinoma. *Oral oncology*. 2009; 45(9): 760-765.

41. Martin P. Wound healing- aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309): 75-81.

42. Widelitz RB, Velmaat JM, Mayer JA, Foley J, et al. Mammary glands and feathers: Comparing two skin appendages which help define novel classes during vertebrate evolution. *Semin. Cell Develop. Biol.* 2007; 18(2): 255–266.

43. Horne KA, Jahoda CAB, Oliver RF. Whisker growth induced by implantation of cultured dermal papilla cells in the adult rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986; 97: 111-114.

44. Horne KA, Jahoda CAB. Restoration of hair growth by surgical implantation of follicular dermal sheath. *Development*. 1992; 116(3): 563-571.

45. Jahoda CAB, Oliver RF. Dermal papilla and the growth of hair. In *Hair and hair diseases*. Edited by CE. Orfanos and R. Happle, 1990; Springer-Verlag, Berlin, pp. 19-44.

46. Woo WM, Zhen HH, Oro AE. Shh maintains dermal papilla identity and hair morphogenesis via a Noggin-Shh regulatory loop. *Genes Dev.* 2012; 26: 1235–1246.

47. Inoue K, Aoi N, Yamauchi Y, Sato T, et al. TGF- β 2 is specifically expressed in human dermal papilla cells and modulates hair folliculogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 2009; 13: 4643–4656.

48. Enshell-Seijffers D, Lindon C, Kashiwagi M, Morgan BA. beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. *Dev. Cell.* 2010; 18: 633–642.

49. Kishimoto J, Burgeson E, Morgan BA. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.* 2000; 14: 1181–1185.

50. Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes Dev.* 2008; 22: 543–557.

Investigating the Properties and Capabilities of Rat's Claw Dermal Cells on Interacting with Heterotopic Epidermis

Gharzi A, PhD.*

- Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah

* Email corresponding author: ahgharzi@yahoo.com

Received: 4 Feb. 2015

Accepted: 23 Jun. 2015

Abstract

Aim: In this research morphological, cell culture, immunochemical and inductive properties of rat's claw dermal cells were investigated.

Material and Methods: First, the toes and fingers of rat were amputated at the point of the last joint and the amputated parts were processed for histological studies. Moreover, the dermal tissue located beneath the claw's plate was dissected and cultured in vitro. Cultured cells at passage two or three were transferred on the slide and treated with α -smooth muscle actin (ASMA) antibody. Finally the cultured cells were stained with DiI and implanted into the vibrissae semi-follicles and ears.

Results: The rat's claw dermal cells in terms of morphological, cell culture and expression of ASMA demonstrated similarity with dermal papilla cells of hair follicles. These cells showed a bipolar spindle-shaped morphology having an extracellular matrix rich in glycosaminoglycans. Majority of the cells expressed ASMA in cytoplasm with a higher intensity in lamelopodia. However, with respect to hair follicular dermal papilla cells, the claw dermal cells were not able to induce an ectopic epidermis to form the skin appendage.

Conclusion: The inductive capability which has been seen in hair follicle's dermal papilla cells can not be generalized to dermal cells present in other skin appendages, including claw. Based on the results presented here, the inductive factors exist in hair follicle dermal papilla cells is not expressed in the claw dermal cells.

Keywords: Cell culture, Histology, Immunochemistry, Induction, Rat