

## جدا سازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی به سلول‌های عصبی

دکتر نوروز نجف زاده<sup>۱</sup>، دکتر ملیحه نوبخت<sup>۲،۳،۴\*</sup>، سارا آسالگو<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: 90/10/01 تاریخ پذیرش: 90/11/29

## چکیده

**پیش زمینه و هدف:** در طی دوران زندگی، سلول‌های بنیادی باعث ساخته شدن سلول‌های جدید در بافت‌های مختلف می‌شود. چندین سال است که ناحیه بالچ فولیکول مو به عنوان منبع سلول‌های بنیادی شناخته شده است. با این حال مطالعات کمی در مورد خصوصیات سلول‌های بنیادی مشتق از ناحیه بالچ فولیکول مو در موش صحرایی و در محیط آزمایشگاه انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه سلول‌های ناحیه بالچ فولیکول موی موش صحرایی جدا شد، کشت داده شد و خصوصیات تکثیری سلول‌های کشت یافته و تمایز آن‌ها به نوروئید مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه فولیکول موی موش‌های صحرایی در هفته‌های اول و سوم پس از کشت سلولی بررسی قرار گردید. **یافته‌ها:** نتیجه این مطالعه نشان داد که دو روز بعد از چسبیدن سلول‌ها به کف پلت، سلول‌ها شروع به تکثیر و مهاجرت کردند، منحنی رشد نشان داد که میزان تکثیر سلولی در روز هشتم به حداکثر خود می‌رسد و سلول‌ها بعد از یک هفته از کشت، قدرت تکثیری خوبی دارند اما بعد از تمایز، تکثیر سلولی محدود می‌شود و اغلب سلول‌ها در شرایط تراکم سلولی بالا و در محیط حاوی نوروتروفین نوع ۳ به رده سلولی نوروئیدی و گلیال متمایز می‌شوند. **نتیجه گیری:** نتایج نشان دادند که سلول‌های کشت یافته ناحیه بالچ فولیکول‌های موش صحرایی، پتانسیل تکثیری بالایی دارند و می‌توانند به سلول‌های شبه نوروئیدی و گلیال تبدیل شوند.

**کلید واژه‌ها:** فولیکول مو، سلول‌های بنیادی، فولیکول موی موش صحرایی، کشت سلولی، تمایز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره اول، ص ۷۲-۶۶، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۵۸۶۸۹

Email: manob@iums.ac.ir

## مقدمه

می‌روند توانایی ایجاد سلول جدید را دارند، اساساً توانایی ترمیم سلولی به سلول‌های بنیادی بالغین وابسته است (۲)، سلول‌های بنیادی علاوه بر این که می‌توانند خودشان را به وجود بیاورند بلکه می‌توانند به انواع سلول‌ها متمایز شوند، سلول‌های بنیادی بالغین در ناحیه‌ای که نیچه نامیده می‌شود قرار می‌گیرند این ناحیه توسط سلول‌های متمایز شده مجاور احاطه شده‌اند (۳).

پوست بزرگ‌ترین ارگان در بدن محسوب می‌شود و اعمال مهمی در بدن دارد که شامل تنظیم درجه حرارت، حفظ تعادل مایعات بدن و جلوگیری از رسیدن آسیب به بدن می‌باشد. پوست دارای ضمایم بافتی همچون اپیدرم، فولیکول مو و غدد سباسه می‌باشد (۱). در طی دوران زندگی، بسیاری از ارگان‌ها در بدن، بعد از این‌که سلول‌های آن‌ها به طور فیزیولوژیکی و یا در اثر آسیب از بین

<sup>۱</sup> بخش علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

<sup>۲</sup> بخش بافت شناسی و نوروساینس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات مقاومت میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۵</sup> بخش علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

حیوانات با اتر عمیقاً بیهوش می‌گردند. بعد از بیهوشی صورت و سر حیوانات توسط محلول ۱:۱ بتادین و پراکسید هیدروژن به مدت سه دقیقه شستشو می‌شوند و به دنبال آن ناحیه صورت شیو می‌شود و با الکل ۷۰ درصد تمیز و ضد عفونی می‌شود و بافت لب بالای که حاوی سبیل موش است بریده می‌شود.

بعد از برداشتن بافت لب بالا در زیر هود و محیط استریل، نمونه‌ها در DMEM/F12 (اینویترژن<sup>۷</sup>) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر- اینویترژن)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر- اینویترژن)، آمفوتریسین B (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر- سیگما<sup>۸</sup>) به مدت نیم ساعت قرار داده شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها در فسفات بافر، بافت‌های همبند اطراف فولیکول برداشته شد. نمونه به تکه‌های کوچک تقسیم شد و در محلول کلانژناز II/دیسپاز (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر-سیگما) و در درجه حرارت 37°C به مدت نیم ساعت انکوبه شدند.

بعد از نیم ساعت فولیکول‌های مو به وسیله پنس ظریف از بافت لب بیرون کشیده شدند و به پلیت‌های ۳۵ mm منتقل شدند و با استفاده از تیغ بیستوری کوچک برش عرضی از بالا و پایین ناحیه Bulge زده شد و ناحیه Bulge جدا شد بعد از برداشتن کپسول کلانژن اطراف ناحیه Bulge. این بخش با بافر فسفات شستشو داده شد و آماده کشت گردید.

#### کشت سلولی

برای کشت سلول‌های ناحیه بالچ این مراحل طی شد (۱۱،۱۳،۱۴).

ناحیه Bulge جدا شده در محلول ۰/۰۱ درصد اتیل دی آمین تترا اسیتیک اسید (EDTA) و ۰/۱۲۵ درصد تریپسین (گیبکو<sup>۹</sup>) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای 37°C انکوبه شد. سلول‌های جدا شده با سرعت ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و بعد از جداسازی، سلول‌ها در پلیت‌هایی که قبلاً با کلانژن نوع یک پوشیده شده بودند ریخته شدند.

سلول‌ها در محیط DMEM/F12 حاوی ال-گلوتامین (۴،۳ میلی‌مول)، آدنین (۰/۱۳۵ میلی‌مول)، انسولین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، کلراتوکسین (سیگما<sup>۹</sup> 10<sup>-9</sup>), هیدروکورتیزون (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، سیگما) و ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. کشت سلول‌ها به صورت کلونال

هفت روز بعد از کشت اولیه، قطعه‌های کوچک بالچ از پلت درآورده شدند، بعد از تریپسینه کردن، سوسپانسیون سلولی حاوی

در مرحله پسرقت<sup>۱</sup>، نیمه تحتانی فولیکول مو تخریب می‌شود و در مرحله رشد<sup>۲</sup>، پایلای درمی<sup>۳</sup> با سلول‌های ناحیه بالچ واکنش می‌دهد تا بخش تحتانی فولیکول مو را ایجاد شود.

در سال ۱۹۹۰، کوتسارلیس<sup>۴</sup> و همکارانش سلول‌های بنیادی را در فولیکول مو گزارش کردند، این سلول‌های بنیادی در یک ناحیه خاصی از فولیکول مو بنام بالچ قرار گرفته است. این ناحیه نزدیک اتصال عضله راست کننده مو و در زیر غده سباسه قرار گرفته است. سلول‌های بالچ خاصیت سلول‌های بنیادی اپیتلیال را دارد و سیکل تقسیم کندی دارند و می‌توانند به مدت طولانی در فولیکول باقی بمانند (۴، ۵). مطالعات محققان نشان داده است که سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش سوری می‌تواند در فرایندهای ترمیمی پوست، نخاع و عصب سیاتیک نقش داشته باشد (۶-۱۰).

مطالعات قبلی ما روی سلول‌های بنیادی بالچ نشان داد که این سلول‌ها می‌توانند مارکرهای نورونی و گلیال را بیان کنند (۱۱).

با توجه به این‌که آمار ضایعات نخاعی و ضایعات اعصاب محیطی و نیز سوختگی‌ها روز به روز بیشتر می‌شود و امروز سلول درمانی از جایگاه ویژه‌ای در ترمیم ضایعات عصبی برخوردار است و با توجه به این‌که سلول‌های بنیادی فولیکول مو دارای ظرفیت تکثیر بالا بوده و دسترسی به این سلول‌ها آسان می‌باشد لذا ما بر آن شدیم تا جداسازی و کشت این سلول‌ها را انجام داده و تمایز آن‌ها را به سلول‌های عصبی مورد مطالعه قرار دهیم.

## مواد و روش کار

### گروه‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نژاد ویستار<sup>۵</sup> نر به وزن ۱۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شده است. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری می‌شدند. اتناق نگهداری دارای نور و حرارت کافی بود. شرایط نوری حیوانات به صورت دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی بود. درجه حرارت اتناق در محدوده ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد. آب و غذای کافی برای حیوانات به صورت آزاد وجود داشت.

### جدا کردن ناحیه بالچ فولیکول مو

جهت جدا کردن فولیکول مو و ناحیه بالچ از روش تعدیل شده کوبایی‌اشی<sup>۶</sup> و همکاران استفاده شد (۱۱،۱۲).

<sup>1</sup> Catagen

<sup>2</sup> Anagen

<sup>3</sup> Dermal Papilla

<sup>4</sup> Cotsarelis

<sup>5</sup> Wistar

<sup>6</sup> Kobayashi

<sup>7</sup> Invitrogen

<sup>8</sup> Sigma

<sup>9</sup> gibco

بالج جدا شده و در حین تکثیر، مهاجرت هم می‌کنند (شکل A.۱). مقایسه تصاویر (شکل B.۱) و (شکل C.۱) نشان می‌دهد که این سلول‌ها از میزان رشد بالایی برخوردار هستند. همان طوری که مشاهده می‌شود سلول‌ها در محیط کشت حاوی کلراتوکسین<sup>۳</sup> و فاکتور رشد اپیدرم تکثیر زیادی دارند. در پلیت‌هایی که میزان کمی سلول وجود داشت، بعد از یک هفته کشت سلولی، پلیت‌ها از سلول‌های بنیادی پر شده‌اند.

#### تعیین منحنی رشد سلولی

تعداد سلول‌های کشت شده در دو روز اول بعد از کشت، تغییری پیدا نکرد، اما بعد از چند روز سلول‌ها شروع به تکثیر کردند به طوری که بیشترین میزان تکثیر سلولی در روز هشتم بعد از شروع کشت دیده شد. بعد از روز دهم، سلول‌ها تمایل کمتری به رشد سریع دارند (شکل ۳).

#### تمایز سلول‌ها به مورفولوژی نورونی و گلیال

در محیط کشت حاوی نوروتروفین نوع ۳، اغلب سلول‌ها به سلول‌های شبیه نورون تبدیل شدند که در شکل A.۲ و C مشاهده می‌شود و بعد از تمایز سلولی در شرایطی که تراکم سلولی زیاد بود بیشتر سلول‌ها مورفولوژی شبیه گلیال را بعد از تمایز از خود نشان می‌دهند (شکل B.۲, A).

۳۵-۲۰ سلول در دیش کشت سلولی پوشیده شده با کلاژن ریخته شد. سلول‌ها در مدت ۱۲۰-۴۵ دقیقه به کف پلت چسبیدند. سه ساعت بعد از پلت کردن، سلول‌ها در کف دیش با استفاده از مارکر علامت گذاری شدند به این ترتیب دایره‌ای به قطر پنج میلی‌متر کشیده شد. در مدت کشت هر دو روز نصف محیط کشت تعویض شد. از کلونی‌های سلولی که در مدت هفت روز کشت تشکیل شدند با دوربین دیژیتال (کانون جی ۱۹<sup>۱</sup> ۱۲.۱ مگا پیکسل) عکس گرفته شد.

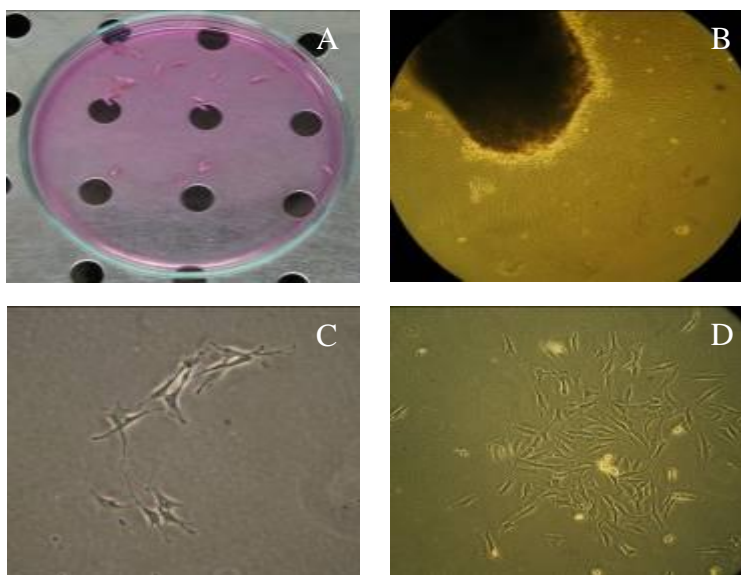
#### تعیین منحنی رشد

سلول‌ها در پلیت‌های ۶ ول<sup>۲</sup> و با تراکم  $1 \times 10^4$  سلول/در ول کشت داده شدند. بعد از ۲ روز، هفت فیلد به صورت تصادفی از هر ول انتخاب شد و سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ و در روزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ شمرده شدند و شمارش سلولی حداقل در سه ول انجام شد. منحنی رشد ترسیم شد و داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$ S.D.M بیان شد (۱۵).

## نتایج

### تکثیر سلولی

بعد از این که نواحی بالج فولیکول مو، به کف پلیت چسبیدند در طی یک هفته بعد از شروع کشت سلولی، سلول‌ها به تدریج از

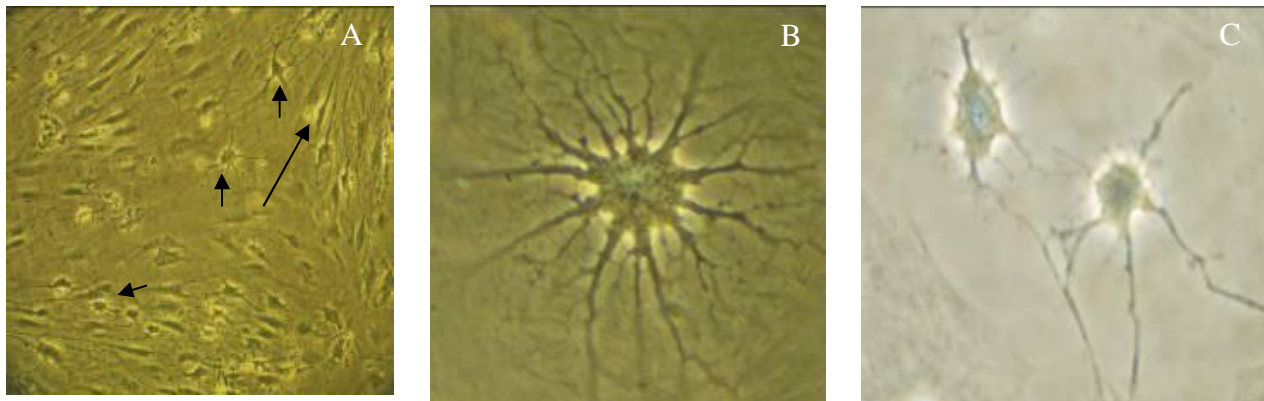


**شکل شماره (۱):** سلول‌های بنیادی Bulge فولیکول مو. پلیت حاوی فولیکول‌های سبیل موش صحرایی (A)، قطعه ای از Bulge که از سبیل موش صحرایی جدا شد و بعد از خرد شدن در پلیت پوشیده شده از کلاژن قرار داده شد (B)، تکثیر و مهاجرت سلولی بعد از یک هفته از کشت اولیه مشاهده می‌شود. سلول‌های مشتق از Bulge، ۴۸ بعد از کشت کلونال (C)، هفت روز بعد از کشت کلونال سلول‌های بنیادی Bulge در حال تکثیر و مهاجرت دیده می‌شوند (D).

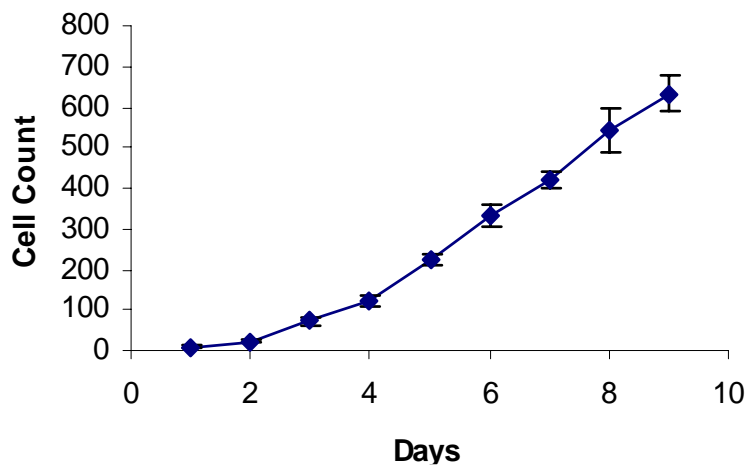
<sup>3</sup> Cholera toxin

<sup>1</sup> Canon G9 12.1 MP

<sup>2</sup> 6Well



**شکل شماره (۲):** تمایز سلولی. (A) نوک فلش های کوتاه سلول های شبیه رده سلولی گلیال را نشان می دهد و فلش بزرگ یک نورون دو قطبی را نشان می دهد. در تصویر (B) سلول شبیه به آستروسیت و در تصویر (C) دو سلول با مورفولوژی نورون های چند قطبی مشاهده می شود.



**شکل شماره (۳):** منحنی رشد سلولی. در این شکل تکثیر تدریجی سلول های ناحیه بالچ دیده می شود همان طوری که در شکل هم نشان داده شده است سرعت تکثیر در بین روزهای ششم تا روز هشتم زیاد است و بعد از آن تا روز دهم سرعت تکثیر سلولی کم می شود.

## بحث

موقع زخمی شدن پوست، تعدادی از سلول های ناحیه بالچ فعال می شوند و از نیچه خارج می شوند و به محل زخم مهاجرت پیدا می کنند یا (۱۸-۲۰)

ما در مطالعه قبلی نشان دادیم که نستین در سلول های بنیادی ناحیه بالچ فولیکول موی موش صحرائی نیز بیان می شود (۱۱). این نتیجه نشان می دهد که سلول های بنیادی بیان کننده نستین نه تنها در ناحیه بالچ فولیکول موی انسان و موش های ترنسژنیک قرار دارد (۹،۲۱)، بلکه این سلول ها در ناحیه بالچ فولیکول موی موش صحرائی قرار دارد. در این مطالعه ما خصوصیات تکثیری و مورفولوژی سلول های تمایز یافته از سلول های بنیادی فولیکول موی موش صحرائی را بررسی کردیم.

مطالعات اخیر نشان داده است که سلول های بنیادی در اغلب بافت های بدن همچون عضلات اسکلتی، قلب، سیستم عصبی، اپیدرم و فولیکول مو قرار دارد (۱۶، ۱۷). برای مطالعه سلول های بنیادی فولیکول مو، فولیکول های سبیل موش صحرائی به لحاظ این که به راحتی قابل دسترسی و به اندازه کافی بزرگ هست، بهترین بافت محسوب می شود. ناحیه بالچ فولیکول مو نزدیک محل اتصال عضله راست کننده مو و زیر غده چربی قرار دارد (۴، ۵). ناحیه بالچ فولیکول موی موش نوعی نیچه ذخیره ای محسوب می شود به طوری که در طی سیکل سلولی، سلول های ماتریکس فولیکول مو تکثیر پیدا می کنند و تولید مو می کنند همچنین در

نقش مهمی دارند (۲۶). جهت تحریک تمایز سلول‌های بالچ به رده گلیال از محیط راسک- اندرسون<sup>۴</sup> استفاده کردیم و همزمان سلول‌ها را در شرایط با تراکم سلولی بالا کشت دادیم (۲۷،۲۸) و جهت تحریک و القاء سلول‌ها به سلول‌های نورونی از بستر کلاژن نوع ۱ و از نوروتروفین نوع ۳ استفاده کردیم (۲۹).

مطالعات سایبر-بلوم<sup>۵</sup> و همکارانش روی سلول‌های بنیادی فولیکول مو نشان داد که این سلول‌ها می‌توانند در داخل بافت نخاعی زنده بمانند و به انواع نورون‌ها همچون نورون‌های گاباژیک<sup>۶</sup> و الیگودندروسیت تبدیل شوند (۸).

سلول‌های بنیادی چندتوان در فولیکول‌های پوست سر انسان و سبیل موش سوری مارکرهای نورال کرسست P75 و SOX10 را بیان می‌کنند و در محیط کشت پتانسیل ایجاد اسفر را دارند و می‌توانند در آزمایشگاه تکثیر پیدا کرده به نورون، سلول‌های شوان، سلول‌های عضله صاف، سلول‌های رنگ دانه دار، کندروسیت و سایر سلول‌ها تبدیل شوند (۶،۱۳،۲۱،۳۰) و این مسئله نشان دهنده این مطلب است که سلول‌های بنیادی فولیکول مو منبع ایجاد بافت‌های مختلف است.

در طی دو دهه گذشته، ما اطلاعات زیادی از بیولوژی سلول‌های بنیادی فولیکول مو کسب کرده‌ایم، خصوصیت تکثیری بالا و چند توان بودن این سلول‌ها اثبات شده است. با جداسازی اختصاصی سلول‌های بنیادی فولیکول موی انسان، موش سوری و موش صحرایی با استفاده از مارکرهای اختصاصی مثل CD34 و Nestin و CD200 می‌توان از رفتارهای بیولوژیک این سلول‌ها اطلاعات بیشتری کسب کرد و در پزشکی ترمیمی از این سلول‌ها استفاده کرد.

یکی از نتایج مطالعه ما نشان داد که سلول‌های بالچ موش صحرایی را می‌توان جدا کرد و در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد، کشت داد. آنالیز کلونی‌های تشکیل شده و تعداد سلول‌ها در این مطالعه نشان داد که پتانسیل تکثیری سلول‌های بالچ زیاد است که موید این یافته ما تعدادی از مطالعات است. کشت سلول‌های بنیادی فولیکول موی سبیل موش صحرایی برای اولین بار توسط کوبایاشی و همکاران انجام شد که نشان دادند سلول‌های این ناحیه، ۹۵ درصد کلونی‌ها را تشکیل می‌دهند (۱۲،۲۲). همچنین طبق مطالعات گرین و باراندون<sup>۱</sup> کراتینوسیت‌هایی که کلون‌های زیادی تشکیل می‌دهند و میزان تمایز نهایی کمی دارند به عنوان سلول‌های بنیادی مطرح می‌شوند (۲۳). مطالعات محققان دیگر نیز نشان داد که سلول‌های تشکیل دهنده کلونی از ناحیه بالچ منشأ می‌گیرند (۲۴).

سلول‌های بنیادی فولیکول مو خاصیت چند توانی دارند یعنی می‌توانند به فولیکول مو و سلول‌های اپیدرمی تبدیل شوند (۲۵). ما برای مطالعه پتانسیل تبدیل سلول‌های بنیادی فولیکول مو به نورون و گلیا، آن‌ها را در محیط تمایزی قرار دادیم. یکی دیگر از نتایج این مطالعه مشاهده سلول‌های شبه نورونی و گلیال بود که تحت تأثیر فاکتورهای تمایزی، این سلول‌ها حاصل شدند. البته ما در مطالعه قبلی با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی بیان مارکر نورونی بتا- تری توبولین<sup>۲</sup> و مارکر الیگودندروسیت ریپ<sup>۳</sup> را در سلول‌های بنیادی فولیکول مو نشان داده بودیم (۱۱).

فاکتورهای زیادی همچون ماتریکس کلاژن، تراکم سلولی بالا و فاکتورهای رشد همچون نوروتروفین نوع ۳ در تکامل و بقا نورون

## References

1. Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Jul; 19(4):405-13.
2. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol* 2003; 56(2):86-96.
3. Terskikh VV, Vasil'ev AV, Voroteliak EA. Stem cell niches. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2007 May-Jun (3):261-72.
4. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 1999 Aug 12; 341(7):491-7.
5. 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 29; 61(7):1329-37.
6. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoaka K, Penman S, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Dec 6; 102(49):17734-8.

<sup>4</sup> Rask-Anderson

<sup>5</sup> Seiber-blum

<sup>6</sup> GABAergic

<sup>1</sup> Green and Barrandon

<sup>2</sup>  $\beta$ III-Tubulin

<sup>3</sup> RIP

7. 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(12):1865-9.
8. Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, Hu YF, Schneider R, Schwab ME. Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32(1-2):67-81.
9. Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem Cells* 2006; 24(12):2692-702.
10. Hu YF, Gourab K, Wells C, Clewes O, Schmit BD, Sieber-Blum M. Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC)--mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury. *Stem Cell Rev* 2010; 6(2):186-98.
11. Nobakht M, Najafzadeh N, Safari M, Rahbar Roshandel N, Delaviz H, Joghataie M et al. Bulge cells of rat hair follicles: isolation, cultivation, morphological and biological features. *Yakhteh* 2010; 12(1):51-8.
12. 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(15):7391-5.
13. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn* 2004 Oct; 231(2):258-69.
14. Yang JS, Lavker RM, Sun TT. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. *J Invest Dermatol* 1993; 101(5):652-9.
15. Everett M, Miller W. Normal statistics applied to nondestructive cell counting techniques. *Method Cell Sci* 1980; 6(1):29-31.
16. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* 2008; 4(1):27-49.
17. Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res* 2007;313(16):3377-85.
18. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A. The stem cell niche: theme and variation. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:693-9.
19. Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004; 303:359-63.
20. Ohyama M. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 2007; 46(2):81-9.
21. Sieber-Blum M, Grim M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72(2):162-72.
22. Claudinot S, Nicolas M, Oshima H, Rochat A, Barrandon Y. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(41):14677-82.
23. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:2302-6.
24. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004; 118(5):635-48.
25. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; 102(4):451-61.
26. Avila MA, Varela-Nieto I, Romero G, Mato JM, Giraldez F, Van De Water TR. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 support the survival and neuritogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons. *Dev Biol* 1993; 159:266-75.
27. Anderson M, Bostrom M, Pfaller K, Glueckert R, Schrott-Fischer A, Gerdin B. Structure and

- locomotion of adult in vitro regenerated spiral ganglion growth cones-a study using video microscopy and SEM. *Hear Res* 2006;215: 97-107.
28. Ko JY, Lee JY, Park CH, Lee SH. Effect of cell-density on in-vitro dopaminergic differentiation of mesencephalic precursor cells. *Neuroreport* 2005; 16:499-503.
29. Mignone JL, Roig-Lopez JL, Fedtsova N, Schones DE, Manganas LN, Maletic-Savatic M et al. Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle* 2007; 6(17):2161-70.
30. Raposio E, Guida C, Baldelli I, Curto M, Fiocca R, Kunkl A et al. Characterization of multipotent cells from human adult hair follicles. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(2):320-3.