

Received: 2011.11.28
Accepted: 2012.03.06
Published: 2012.04.16

Mieszki włosowe nowym źródłem komórek macierzystych

Hair follicle as a novel source of stem cells

Romana Joachimiak¹, Anna Bajek¹, Tomasz Drewa^{1,2}

¹ Zakład Inżynierii Tkankowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK Toruń

² Kliniczny Dział Urologii, Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce

Streszczenie

Inżynieria tkankowa jako prężnie rozwijająca się dziedzina nauki stwarza nadzieję na zastosowanie jej produktów w praktyce lekarskiej. Jednym z komponentów substytutów tkanek są różne typy komórek, zwłaszcza komórki macierzyste. Obiecującym źródłem somatycznych komórek macierzystych są mieszki włosowe. Mieszki włosowe rozwijają się jeszcze w trakcie trwania życia płodowego. Powstają na skutek oddziaływania komórek epidermalnych i mezenchymalnych. Dalsze etapy powstawania mieszka odbywa się pod kontrolą licznych czynników. Mieszki włosowe są siedliskiem różnych populacji komórek macierzystych i stanowią główne źródło komórek odpowiedzialnych za regenerację włosów, gruczołów łojowych i naskórka. Określenie „komórki macierzyste mieszków włosowych” najczęściej używane jest do komórek nabłonkowych. Badania nad komórkami macierzystymi włosa komplikuje to, iż komórki macierzyste mieszków włosowych dzielą się stosunkowo rzadko.

Celem pracy jest przedstawienie charakterystyki komórek wyizolowanych z mieszka włosowego w świetle najnowszych badań.

Słowa kluczowe:

mieszek włosowy • komórki macierzyste • inżynieria tkankowa

Summary

Tissue engineering as a rapidly developing branch of science offers hope for the use of its products in medical practice. Among the components of tissue substitutes are different types of cells, especially stem cells. A promising source of adult stem cells is hair follicles. Development of follicles in the skin takes place even during fetal life. They arise due to the impact of epidermal and mesenchymal cells. The next steps in the formation of hair follicles are under the control of many factors. Hair follicles are the niche of various stem cell populations and are a major source of cells responsible for regeneration of the hair, sebaceous glands and epidermis. The term „hair follicle stem cells” is most often used in relation to the epithelial cell population. Hair follicle stem cell studies are complicated by the fact that these stem cells divide relatively rarely.

The aim of this study is to present the characteristics of cells isolated from the hair follicle in the light of recent research.

Key words:

hair follicle • stem cells • tissue engineering

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=991445>

Word count: 2641
Tables: –
Figures: –
References: 70

Adres autorki: dr n. med. Anna Bajek, Zakład Inżynierii Tkankowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, UMK Toruń, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: a_bajek@wp.pl

WSTĘP

Według definicji Międzynarodowego Instytutu Zdrowia inżynieria tkankowa to dziedzina nauki, której głównym celem jest odtworzenie, utrzymanie lub poprawa funkcji tkanek czy narządów, które uległy uszkodzeniu [44]. Obecnie inżynieria tkankowa jest szybko i prężnie rozwijającą się dziedziną nauki, dzięki której powstała nowa gałąź medycyny klinicznej – medycyna regeneracyjna. Dotychczasowe osiągnięcia w dziedzinie inżynierii tkankowej stwarzają nadzieję na ich przyszłe zastosowanie w praktyce klinicznej wielu schorzeń degeneracyjnych, a także chorób przewlekłych [67].

W celu wytworzenia działających substytutów tkanek niezbędne jest właściwe połączenie takich elementów jak: biomateriał, macierz zewnątrzkomórkowa oraz czynniki wzrostu tak, aby ich kompozycja była wsparciem dla rosnących komórek [21,38]. Końcowym etapem przygotowania konstruktów tkankowych jest zaopatrzenie go w odpowiednią populację komórek. Idealnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie komórek nieimmunogennych, o dużym potencjale proliferacyjnym, zdolnych do różnicowania się w różne typy wyspecjalizowanych komórek oraz do stworzenia w konstrukcie nisze komórek macierzystych zdolnych do regeneracji odtworzonej tkanki. Wszystkie użyte komponenty powinny się przyczyniać do adhezji, proliferacji i różnicowania zastosowanych komórek oraz prowadzić do odbudowy uszkodzonej tkanki [8,24].

Rozwój zagadnień związanych z biologią komórek macierzystych w ostatnich latach sprawił, że są one w centrum zainteresowania badań prowadzonych w ramach inżynierii tkankowej, prowadząc tym samym do wytworzenia w warunkach laboratoryjnych, takich tkanek jak kość, chrząstka czy mięśnie [9]. Ponadto unikalne właściwości komórek macierzystych sprawiają, że są one niezwykle atrakcyjnym materiałem badawczym dla takich dziedzin jak medycyna regeneracyjna, toksykologia *in vitro* czy embriologia doświadczalna. Coraz więcej uwagi poświęca się metodom izolacji oraz hodowli somatycznych komórek macierzystych w warunkach *in vitro* [8,10,21,25].

MIESZKI WŁOSOWE JAKO NISZA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Komórki macierzyste zajmują odpowiednie miejsca, tzw. nisze, w tkankach organizmu. Pogląd o istnieniu swoistych anatomicznie miejsc, w których znajdują się komórki macierzyste powstał ponad 40 lat temu podczas przeszczepiania hematopoetycznych komórek progenitorowych. Wciąż jednak wiedza na temat nisz, ich struktury, właściwości oraz wpływu na komórki macierzyste jest niewielka [48,56]. Nisza zapewnia odpowiednie środowisko komórkom macierzystym, w którym mogą przebywać przez czas

nieograniczony. Jednocześnie sprawia, że zasiedlającą ją komórki macierzyste stanowią pulę komórek niezbędnych do utrzymania homeostazy podczas procesów gojenia i regeneracji tkanek [6]. Uważa się, że nisza to nie tylko lokalne mikrośrodowisko komórki macierzystej, lecz także sąsiadujące z nią komórki oraz macierz zewnątrzkomórkowa. We wzajemne interakcje między komórkami, niszą i macierzą zewnątrzkomórkową zaangażowane są liczne cząsteczki adhezyjne [56]. Ponadto nisza jako zewnętrzne otoczenie komórki macierzystej, dostarcza wiele czynników kontrolujących ich liczbę, proliferację decydujących o ich końcowym zróżnicowaniu. Do czynników tych należą m.in. cząsteczki sygnałowe, takie jak: Wnt, Notch, hh, BMP [34]. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach sugerują istnienie wyraźnych różnic w budowie i funkcjonowaniu nisz komórek macierzystych. Wiele z nich, umiejscowionych głównie w tkankach nabłonkowych, ma nieskomplikowaną strukturę. Prawidłowe funkcjonowanie takiej niszy oparte jest na powstaniu połączeń przylegających między komórką macierzystą i kilkoma właściwymi jej komórkami podścieliska. Tak bliskie sąsiedztwo sprawia, że komórka macierzysta znajduje się w odpowiedniej pozycji do otrzymywania głównych sygnałów międzykomórkowych [48]. Do nisz mających bardziej skomplikowaną organizację należy strefa podkomorowa zasiedlana przez neuronalne komórki macierzyste. Otaczające je astrocyty, komórki wyściółkowe (ependyma), neuroblasty czy komórki śródbłonna dostarczają dużo więcej sygnałów i czynników kontrolujących ich proliferację i różnicowanie [34].

POWSTAWANIE MIESZKÓW WŁOSOWYCH PODCZAS EMBRIOGENEZY

Mieszki włosowe w skórze rozwijają się jeszcze w trakcie trwania życia płodowego w 8–12 tygodniu ciąży. Powstają na skutek oddziaływania dwóch głównych typów komórek: epidermalnych i mezenchymalnych. Proces kontrolowany jest przez wiele białek m.in. białka szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina, Sonic Hedgehog, a także transformujący czynnik wzrostu (TGF- β), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) czy czynnik martwicy nowotworów (TNF). Powstanie zawiązka włosa jest możliwe dzięki aktywacji szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina. Komórki skóry właściwej poprzez białka Wnt pobudzają keratynocyty naskórka do intensywnej proliferacji i przekształcenia się w komórki włosa.

W rezultacie komórki nabłonkowe wnikają do mezodermy formując zawiązek włosa. Brak ekspresji β -kateniny lub obecność inhibitora szlaku Wnt - Dkk1 skutkuje zahamowaniem tworzenia się mieszka włosowego [11]. Następnie komórki epitelialne poprzez białka szlaku Shh wysyłają do mezenchymy sygnał indukcji powstawania brodawki włosa. Dalsze etapy rozwoju mieszka włosowego obejmują



organogenezę, a także proces dojrzewania mieszka włosowego. Powstawanie poszczególnych struktur mieszka włosowego, takich jak zewnętrzna osłonka włosa (ORS – outer root sheath), wewnętrzna osłonka włosa (IRS – inner root sheath), włos, a także zaopatrzenie go w naczynia krwionośne czy gruczoł łojowy odbywa się pod kontrolą licznych czynników działających na poziomie molekularnym [58].

BUDOWA ANATOMICZNA MIESZKA WŁOSOWEGO

Mieszki włosowe różnią się znacząco między sobą wielkością i kształtem w zależności od umiejscowienia. Wszystkie jednak mają podobną budowę anatomiczną. Dojrzałe mieszki włosowe znajdujące się w fazie wzrostu (anagenie), to struktury wielowarstwowe zbudowane z co najmniej 8 różnych populacji komórek. Do elementów mieszka włosowego zalicza się brodawkę włosa, włos wraz z osłaniającymi go warstwami komórek pochodzenia nabłonkowego, torebkę włóknistą, gruczoł łojowy oraz mięsień przywłosowy.

W budowie mieszków włosowych można wyróżnić dwa fragmenty: powyżej i poniżej przyczepu mięśnia przywłosowego. Tylko dolna część mieszka (znajdująca się poniżej przyczepu mięśnia przywłosowego, obejmująca brodawkę włosa) podlega przemianom w czasie kolejnych faz cyklu wzrostu włosa.

Brodawka włosa o gruszkowatym kształcie, znajduje się u podstawy mieszka włosowego. Stanowi źródło gęsto upakowanych fibroblastów, a także mezenchymalnych komórek macierzystych. Tuż nad nią znajduje się grupa komórek macierzy (niskozróżnicowanych keratynocytów), które na skutek interakcji z komórkami brodawki włosa, aktywują szlak sygnalizacyjny Wnt. W rezultacie komórki macierzy zaczynają intensywnie proliferować dając początek m.in. komórkom wewnętrznej osłonki włosa (IRS) oraz komórkom kory włosa (cortex) [11,28,50]. Wraz z kolejnymi podziałami powstające komórki powodują przesuwanie się ku górze komórek starszych, które stopniowo ulegają różnicowaniu, ostatecznie formując włos. Wytworzony włos otoczony jest przez warstwę skeratynizowanych, obumarłych komórek zwaną kutikulą, a jego rdzeń (medulla) zbudowany jest z luźno upakowanych komórek. Trzon wytworzonego włosa otaczają dwie osłonki: zewnętrzna (ORS) i wewnętrzna (IRS). W zewnętrznej osłonce włosa (ORS), która powstała na skutek wpuklenia naskórka do skóry właściwej zlokalizowano region 'wybrzuszenia' (bulge region). Rejon ten stanowi miejsce przyczepu mięśnia przywłosowego, a jednocześnie niszę epitelialnych komórek macierzystych. Komórki te przez całe życie organizmu stanowią pulę komórek służących do odbudowy nie tylko włosa, ale i gruczołu łojowego oraz naskórka. W osłonce zewnętrznej włosa (ORS) znajdują się również melanocyty, komórki Langerhansa oraz komórki Merkela [5,12,28,60].

LOKALIZACJA KOMÓREK MACIERZYSTYCH W DOJRZAŁYM MIESZKU WŁOSOWYM

Mieszki włosowe są siedliskiem różnych populacji komórek macierzystych, co sprawia, że stanowią niezwykle obiecujące źródło multipotentjalnych, somatycznych komórek macierzystych. Jako samoodnawiające się miniarządy umiejscowione w skórze, stanowią głównie źródło multipotentnych epitelialnych komórek macierzystych

odpowiadających za regenerację m.in. włosów, gruczołów łojowych i naskórka. W warunkach fizjologicznych w regeneracji naskórka uczestniczą komórki macierzyste warstwy podstawnej naskórka, dzięki którym naskórek utrzymuje zdolność do odnowy. Jednakże w przypadku wystąpienia jakichkolwiek urazów czy oparzeń całkowicie uszkodzony naskórek regenerują nabłonkowe komórki macierzyste mieszków włosowych [13,41,47,63,65]. W wielu badaniach potwierdzono, iż w obrębie mieszka włosowego znajdują się także inne populacje komórek macierzystych. Drugą ważną grupą komórek macierzystych są mezenchymalne komórki macierzyste, które zlokalizowano w torebce włóknistej i w brodawce włosa. Mają one potencjał do regeneracji nie tylko komórek hematopoetycznych, lecz mogą także różnicować się w komórki tłuszczowe, mięśniowe czy kostne [14,30,54]. Kumamoto i wsp. potwierdzili możliwość uzyskania dojrzałych komórek tłuszczowych z komórek torebki włóknistej włosa [29]. W obrębie mieszka włosowego obecne są również komórki o potencjale zbliżonym do komórek embrionalnych – są to komórki wywodzące się najprawdopodobniej z grzebienia nerwowego. Komórki te wykazują ekspresję nestyny i są zdolne do regeneracji m.in. neuronów, komórek glejowych jak i melanocytów [39,43,45,64].

CYKL WZROSTU WŁOSA

Mieszki włosowe są miniarządami o złożonej budowie, które przez całe życie podlegają cyklicznej regeneracji. W procesie tym wyróżniamy trzy fazy: szybkiego wzrostu komórek (anagen), zaniku mieszka włosowego (katagen), fazę spoczynku (telogen) oraz wypadnięcie włosa (egzogen). Ów cykl świadczy nie tylko o zdolności mieszka włosowego do regularnej samoodnowy, lecz także sugeruje obecność populacji komórek macierzystych w jego obrębie [49,58]. Odbudowa włosa rozpoczyna się w fazie anagenu i prawdopodobnie uwarunkowana jest takimi samymi procesami jakie zachodzą podczas tworzenia się mieszków w czasie rozwoju embrionalnego. To właśnie w tej fazie cyklu wzrostu włosa komórki macierzyste mieszków włosowych różnicują się do wielu typów komórek; formują m.in. zewnętrzną i wewnętrzną osłonkę włosa (ORS i IRS), trzon włosa wraz z rdzeniem, korą i kutikulą. Nowo powstałe komórki wnikają coraz głębiej do skóry właściwej, powodując tym samym stopniowe odsunięcie brodawki włosa od regionu wybrzuszenia mieszka włosowego. Dochodzi do odtworzenia struktury mieszka włosowego. Mieszek włosowy przechodzi w kolejną fazę – katagen. Jest to moment, kiedy komórki wewnętrznej oraz zewnętrznej osłonki włosa, a także keratynocyty macierzy ulegają apoptozie, podczas gdy komórki brodawki włosa i komórki z regionu wybrzuszenia mieszka są przed nią chronione, m.in. poprzez ekspresję genu supresorowego *bcl-2* [28,58]. W efekcie brodawka włosa ulega obkurczeniu i przesuwa się w kierunku rejonu wybrzuszenia mieszka włosowego, który przechodzi w stadium telogenu, tzw. fazę spoczynku. Charakterystyczną cechą tej fazy wzrostu włosa jest spowolnienie aktywności biochemicznej oraz proliferacyjnej komórek. Z kolei w następstwie zdarzeń w katagenie, bliskie sąsiedztwo komórek brodawki włosa i komórek macierzystych z rejonu wybrzuszenia umożliwia ich bezpośrednie oddziaływanie, a tym samym stanowi sygnał do rozpoczęcia nowego cyklu wzrostu włosa. Ostatnią fazą przemian jakim

ulega mieszek jest egzogen, w którym dochodzi do wypadnięcia włosa [28,58].

NABŁONKOWE KOMÓRKI MACIERZyste MIESZKÓW WŁOSOWYCH

Określenie 'komórki macierzyste mieszków włosowych' najczęściej używane jest do komórek nabłonkowych. Początkowo sądzono, że komórki macierzyste mieszków włosowych znajdują się we wtórnym zawiązku włosa, u podstawy mieszka włosowego w fazie telogenu [5,18,53]. Przyjęto, że wtórny zawiązek włosa podczas anagenu wędruje w dół mieszka – do cebulki włosa, gdzie stanowi pulę komórek niezbędnych do budowy nowego włosa. Następnie w katagenie wraz z brodawką włosa przesuwa się w górę, gdzie przechodzi w stan spoczynku u podstawy telogenowego mieszka włosowego [5]. Teoria ta została poddana w wątpliwość, gdy Tang i wsp. udowodnili, iż to górna część mieszka włosowego, która nie ulega degeneracji jest w stanie odtworzyć całą jego strukturę [61]. Umiejscowienie niszy komórek macierzystych w mieszku włosowym pozostawała nieznana i wymagała dalszych badań. Badania nad identyfikacją niszy komórek macierzystych włosa komplikowało to, iż komórki macierzyste mieszków włosowych, tak jak inne somatyczne komórki macierzyste, dzielą się stosunkowo rzadko. Wydłużony cykl komórkowy minimalizuje liczbę błędów DNA podczas replikacji oraz zachowuje ich utrzymujący się potencjał proliferacyjny w ciągu życia organizmu. Klasyczna teoria podziału komórki macierzystej zakłada, iż dzieli się ona asymetrycznie, dając jedną komórkę potomną (macierzystą) oraz jedną komórkę przejściowo namnażającą się (TAC – transient amplifying cell). Komórka TAC ma ograniczony potencjał proliferacyjny, po wyczerpaniu którego ulega końcowemu różnicowaniu [37,42]. Jedną z głównych metod identyfikacji komórek macierzystych dojrzałego organizmu jest wykorzystanie technik z użyciem bromodeoksyrydyny (BrdU) bądź znakowanej radioaktywnie tymidyny (3H-T). Substancje te służą do znakowania komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego. Po dwutygodniowym podawaniu zwierzętom doświadczalnym tych znaczników izotopowych, szybko dzielące się komórki będą traciły wbudowany BrdU czy 3H-T. Tylko komórki macierzyste, ze względu na swe rzadkie podziały komórkowe, będą zawierały ten znacznik. Jednym z pierwszych doświadczeń tego typu był eksperyment przeprowadzony przez Cotsarelisa i wsp. w 1990 r. Potwierdzili oni tezę Tanga [61], że komórki macierzyste mieszków włosowych znajdują się, nie jak dotąd sądzono w dolnej części mieszka włosowego z brodawką włosa, lecz w rejonie wybrzuszenia mieszka włosowego [4,5,31,63]. Morris i Potten również potwierdzili występowanie macierzystych komórek w rejonie wybrzuszenia mieszka włosowego myszy w 14 miesięcy po podaniu znacznika izotopowego.

To, że komórki macierzyste regenerują tkankę w warunkach fizjologicznych sprawia, iż powinny się charakteryzować dużym potencjałem proliferacyjnym. W przypadku keratynocytów, ich zdolności proliferacyjne można zbadać w warunkach *in vitro* wykonując test oceniający klonogenność lub oznaczając wydajność tworzenia kolonii (CFE – colony forming efficiency). W 1993 r. Kobayashi opublikował dane wskazujące, iż 95% wszystkich kolonii utworzonych z różnych fragmentów szczerzego mieszka włosowego pochodzi z regionu jego wybrzuszenia [22].

Badania z wykorzystaniem ludzkich mieszków włosowych także dowodzą, iż komórki o najwyższym potencjale klonogennym znajdują się w regionie wybrzuszenia mieszka włosowego [55]. Takie umiejscowienie komórek macierzystych mieszków włosowych doskonale tłumaczy teorię odbudowy mieszka przedstawioną przez Tanga i wsp. [61]. Jednocześnie usytuowanie niszy komórek macierzystych w głębi jego struktury jest logiczne z punktu jej ochrony przed uszkodzeniami mechanicznymi i fizycznymi (np. promieniowanie UV).

MARKERY NABŁONKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH MIESZKÓW WŁOSOWYCH

Potencjalne możliwości wykorzystania komórek macierzystych mieszków włosowych (HFSC – hair follicle stem cells) do celów klinicznych sprawiają, że wciąż poszukuje się swoistych markerów, które umożliwiłyby ich identyfikację i izolację. Dotąd nie opracowano uniwersalnego zbioru antygenów charakterystycznego tylko dla komórek macierzystych mieszków włosowych. Duża różnorodność populacji komórek macierzystych skupionych w jego obszarze nastrocza wiele problemów na etapie izolacji komórek [6]. Obecnie stosowane manualne metody izolacji HFSC, a także metody laserowego pozyskiwania skrawków LCM (laser capture microdissection) nie dają zadowalających rezultatów ze względu na trudność w otrzymaniu homogennej populacji komórek. Coraz częściej do izolacji HFSC stosuje się cytometr sortujący komórki (FACS – fluorescent-activated cell sorter) [3].

Fenotyp wyizolowanych komórek HFSC opisywany jest na podstawie ekspresji różnych markerów, które po wielu analizach zaczęto powszechnie stosować do ich identyfikacji. Obecnie wykorzystywane są dwie grupy markerów nabłonkowych komórek macierzystych mieszków włosowych: białka wewnątrzkomórkowe (cytokeratyny) oraz białka powierzchniowe. Do najczęściej stosowanych 'potencjalnych' markerów HFSC gryzoni (myszy i szczurów) należą: keratyna 15 i 19, $\alpha 6$ -integryna, $\beta 1$ -integryna, CD34, p63 oraz CD71 [20,23,37,59,70].

Należy jednak pamiętać, że na zmiany ekspresji poszczególnych markerów może wpływać hodowla komórek *in vitro* oraz różnice międzygatunkowe [6]. Jednym z najwcześniej wykorzystanych markerów do identyfikacji HFSC była keratyna 15 oraz keratyna 19. Ekspresję cytokeratyny 15 w ludzkich HFSC po raz pierwszy opisał Lyle i wsp. w 1998 r. Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że komórki LRC (zatrzymujące znacznik, LRC – label-retaining cells) umiejscowione w regionie wybrzuszenia mieszka jednocześnie wykazują ekspresję cytokeratyny 15 i 19. Nie obserwowano zaś ekspresji cytokeratyny 19 w komórkach naskórka międzymieszkowego [36,59]. Podobne wyniki uzyskano dla mysich komórek mieszków włosowych [35]. W odróżnieniu od komórek macierzystych mieszków włosowych, przejściowo namnażające się keratynocyty HFSC pochodzące z hodowli anagenowych mieszków włosowych nie wykazywały obecności cytokeratyny 15 [57].

CD34 to powierzchniowa glikoproteina występująca na wczesnych hematopoetycznych komórkach progenitorowych człowieka. Marker ten jest powszechnie używany do



selekcji komórek macierzystych stosowanych w transplantacji szpiku kostnego [26,27]. Obecność CD34 potwierdzono w satelitarnych komórkach mięśniowych czy komórkach śródbłonkowych [32,68]. W pracy Trempusa i wsp. potwierdzono współwystępowanie CD34 i CK15 w mysich nabłonkowych komórkach macierzystych mieszków włosowych [65]. Jednocześnie Ohya i wsp. wykazali, że CD34 nie jest markerem swoistym dla ludzkich HFSC. Populacja komórek wyizolowanych z regionu wybrzuszenia mieszka włosowego człowieka, mimo braku ekspresji CD34, wciąż zachowuje właściwości komórek macierzystych [2,37,46].

Integryny to powierzchniowe białka adhezyjne umożliwiające komórce oddziaływanie z innymi komórkami oraz składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej. Działają jak przezbłonowe łączniki pośredniczące w interakcjach między cytoszkieletem a macierzą zewnątrzkomórkową, przez co wpływają na kształt, orientację i ruch komórki. Ich udział w takich procesach jak proliferacja czy różnicowanie służy do wykorzystania tej grupy cząsteczek powierzchniowych jako potencjalnego znacznika do selekcji komórek macierzystych. Jones i Watt z użyciem FACS'a podzielili keratynocyty na grupy w zależności od wielkości ekspresji powierzchniowych integryn. Komórki z najwyższym stężeniem β 1-integryn wykazywały większą wydajność tworzenia kolonii aniżeli komórki z ich niższym stężeniem. Poziom ekspresji odpowiednich integryn może stanowić marker dla różnych subpopulacji różnicujących się keratynocytów [37]. Nabłonkowe komórki macierzyste mieszków włosowych, podobnie jak komórki macierzyste naskórka, wykazują dużą ekspresję β 1-integryny. To, że komórki wykazujące ekspresję β 1-integryny mają dużo wyższy współczynnik wydajności tworzenia kolonii aniżeli komórki niewykazujące ekspresji β 1-integryny również sugeruje możliwość wykorzystania tego markera do izolacji komórek

macierzystych [66]. Uważa się, że glikoproteina ta jest odpowiedzialna m.in. za odpowiednie rozmieszczenie i silną adhezję do podłoża komórek macierzystych [36,51,69]. Li i wsp. oraz Trempus i wsp. zasugerowali, że również α 6-integryna może być wykorzystana jako marker do izolacji HFSC, bowiem ulega ekspresji tylko w keratynocytach warstwy podstawnej [33,65]. Wielokrotnie marker ten stanowił dodatkowy czynnik selekcyjny podczas izolacji HFSC, np. z wykorzystaniem cytometrii przepływowej [3,33,41,62].

PODSUMOWANIE

Komórki macierzyste mieszków włosowych wyizolowane z regionu wybrzuszenia stanowią niezwykle atrakcyjną pulę komórek do celów regeneracji tkanek. Obecne w obrębie mieszka włosowego różne populacje komórek macierzystych i ich właściwości do wielokierunkowego różnicowania, stwarzają możliwość wykorzystania mieszków włosowych jako alternatywnego źródła komórek macierzystych w dojrzałym organizmie.

Dostępność mieszków włosowych sprawia, że mogą być dogodnym źródłem komórek macierzystych, które oprócz szpiku kostnego czy krwi pepowinowej mogą w przyszłości mieć większe znaczenie w medycynie regeneracyjnej. Dużą zaletą mieszków włosowych jest możliwość mało-inwazyjnego sposobu pobierania materiału do izolacji komórek macierzystych [1,14,16,40,49,52]. Badania w zakresie izolacji oraz biologii komórek macierzystych mieszków włosowych trwają już od ponad 20 lat i prowadzone są głównie na modelu mysim i ludzkim [17,19,22,63,70]. Nie opracowano jednak standardowej procedury izolacji nabłonkowych komórek macierzystych z mieszków włosowych, co jest spowodowane brakiem dla tych komórek zbioru swoistych markerów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aakiyama M., Dale B.A., Sun T.T., Holbrook K.A.: Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin; the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 1995; 105: 844–850
- [2] Albert M.R., Foster R.A., Vogel J.C.: Murine epidermal label-retaining cells isolated by flow cytometry do not express the stem cell markers CD34, Sca-1, or Flk-1. *J. Invest. Dermatol.*, 2001; 117: 943–948
- [3] Blanpain C., Fuchs E.: Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2006; 22: 339–373
- [4] Cotsarelis G.: Epithelial stem cells: A folliculocentric view. *J. Invest. Dermatol.*, 2006; 126: 1459–1468
- [5] Cotsarelis G., Sun T.T., Lavker R.M.: Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell.*, 1990; 61: 1329–1337
- [6] Drewa T.: Hodowle komórek macierzystych, zróżnicowanych i ustalonych linii, w wybranych chorobach układu moczowo-płciowego. Badania eksperymentalne. Rozprawa habilitacyjna, 2009
- [7] Drewa T., Szmytkowska K., Włodarczyk Z., Sir J., Kierzenkowska-Miła C.: Does the presence of unwanted dermal fibroblasts limit the usefulness of autologous epidermal keratinocyte grafts? *Transplant. Proc.*, 2006; 38: 3088–3091
- [8] Evans N.D., Gentelman E., Polak J.M.: Scaffolds for stem cells. *Materials Today*, 2006; 9: 26–33
- [9] Fröhlich M., Grayson W.L., Wan L.Q., Marolt D., Drobic M., Vunjak-Novakovic G.: Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2008; 3: 254–264
- [10] Hodgkinson T., Yuan X.F., Bayat A.: Adult stem cells in tissue engineering. *Expert. Rev. Devices*, 2009; 6: 621–640
- [11] Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Gotsarelis G., Birchmeier W.: β -catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 2001; 105: 533–545
- [12] Ito M., Kizawa K., Hamada K., Cotsarelis G.: Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation*, 2004; 72: 548–557
- [13] Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R.J., Cotsarelis G.: Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.*, 2005; 11: 1351–1354
- [14] Jahoda C.A., Reynolds A.J.: Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing. *Lancet*, 2001; 358: 1445–1448
- [15] Jahoda C.A., Whitehouse C.J., Reynolds A.J., Hole N.: Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.*, 2003; 12: 849–859
- [16] Jaks V., Kasper M., Toftgard R.: The hair follicle—a stem cell zoo. *Exp. Cell Res.*, 2010; 316: 1422–1428
- [17] Kamimura J., Lee D., Baden H.P., Brissette J., Dotto G.P.: Primary mouse keratinocyte cultures contain hair follicle progenitor cells with multiple differentiation potential. *J. Invest. Dermatol.*, 1997; 109: 534–540
- [18] Kligman A.M.: The human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.*, 1959; 33: 307–316
- [19] Klima J., Smetana K., Motlik J., Plzakova Z., Liu F.T., Stork J., Kaltner H., Chovanec M., Dvorankova B., Andre S., Gabius H.J.: Comparative phenotypic characterization of keratinocytes originating from hair follicles. *J. Mol. Histol.*, 2005; 36: 89–96
- [20] Kloepper J.E., Tiede S., Brinckmann J., Reinhardt D.P., Meyer W., Faessler R., Paus R.: Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful *in situ* markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp. Dermatol.*, 2008; 17: 592–609

- [21] Knight M.A., Evans G.R.: Tissue engineering: progress and challenges. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2004; 114: 26E–37E
- [22] 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: 7391–7395
- [23] Kobayashi T., Shimizu A., Nishifuji K., Amagai M., Iwasaki T., Ohyama M.: Canine hair follicle keratinocytes enriched with bulge cells have the highly proliferative characteristics of stem cells. *Vet. Dermatol.*, 2009; 20: 338–346
- [24] Koch T.G., Berg L.C., Betts D.H.: Current and future regenerative medicine—Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.*, 2009; 50: 155–165
- [25] Koh C.J., Atala A.: Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004; 15: 1113–1125
- [26] Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S.: CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 1996; 87: 1–13
- [27] Krause D.S., Ito T., Fackler M.J., Smith O.M., Collector M.I., Sharkis S.J., May W.S.: Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.*, 1994; 84: 691–701
- [28] Krause K., Foitzik K.: Biology of the hair follicle: the basics. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2006; 25: 2–10
- [29] Kumamoto T., Shalhevet D., Matsue H., Mummert M.E., Ward B.R., Jester J.V., Takashima A.: Hair follicles serve as local reservoir of skin master cell precursors. *Blood.*, 2003; 102: 1654–1660
- [30] Lako M., Armstrong L., Cairns P.M., Harris S., Jahoda C.A.: Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J. Cell. Sci.*, 2002; 115: 3967–3974
- [31] Lavker R.M., Miller S., Wilson C., Cotsarelis G., Wei Z.G., Yang S.H., Sun T.T.: Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle and involvement in skin tumor formation. *J. Invest. Dermatol.*, 1993; 101: 16S–26S
- [32] Lee J.Y., Qu-Petersen Z., Cao B., Kimura S., Jankowski R., Cummins J., Usas A., Gates C., Robbins P., Werning A., Huard J.: Clonal isolation muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J. Cell. Biol.*, 2000; 150: 1085–1100
- [33] Li A., Simmons P.J., Kaur P.: Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 3902–3907
- [34] Li L., Neaves W.: Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4553–4557
- [35] Liu Y., Lyle S., Yang Z., Cotsarelis G.: Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 121: 963–968
- [36] Lyle S., Christofidou-Solomidou M., Liu Y., Elder D.E., Albelda S., Cotsarelis G.: The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytoke-ratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J. Cell. Sci.*, 1998; 111: 3179–3188
- [37] Ma D.R., Yang E.N., Lee S.T.: A review: the location, molecular characterisation and multipotency of hair follicle epidermal stem cells. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 2004; 33: 784–788
- [38] Metcalfe A.D., Ferguson M.W.: Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface.*, 2007; 4: 413–437
- [39] Mignone J.L., Roig-Lopez J.L., Fedtsova N., Schones D.E., Manganas L.N., Maletic-Savatic M., Keyes W.M., Mills A.A., Gleiberman A., Zhang M.Q., Enkolopov G.: Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell. Cycle*, 2007; 6: 2161–2170
- [40] Miyashita H., Hakamata Y., Kobayashi E., Kobayashi K.: Characterization of hair follicles induced in implanted, cultured rat keratinocyte sheets. *Exp. Dermatol.*, 2004; 13: 491–498
- [41] Morris R., Liu Y., Marles L., Yang Z., Trempus C., Cotsarelis G.: Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 411–417
- [42] National Institutes of Health. www.nih.gov (14.10.2011)
- [43] Nishimura E.K., Granter S.R., Fisher D.E.: Mechanism of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science*, 2005; 307: 720–724
- [44] Nishimura E.K., Jordan S.A., Oshima H., Yoshida H., Osawa M., Moriyama M., Jackson I.J., Barrandon Y., Miyachi Y., Nishikawa S.I.: Dominant role of the niche in melanocyte stem cell fate determination. *Nature*, 2002; 416: 854–860
- [45] Ohlstein B., Kai T., Decotto E., Spradling A.: The stem cell niche: theme and variations. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2004; 16: 693–699
- [46] Ohyama M.: Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J. Dermatol. Sci.*, 2007; 46: 81–89
- [47] Ohyama M., Terunuma A., Tock C.L., Radonovich M.F., Pise-Masison C.A., Hopping S.B., Brady J.N., Udey M.C., Vogel J.C.: Characterization and isolation of stem cells-enriched human hair follicle bulge cells. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 249–260
- [48] Oshima H., Rochat A., Kedzia C., Kobayashi K., Barrandon Y.: Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 2001; 104: 233–245
- [49] Paus R., Cotsarelis G.: The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341: 491–497
- [50] Piłkuła M., Trzonkowski P.: Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 449–456
- [51] Poulosom R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002; 197: 441–456
- [52] Reynolds A.J., Jahoda C.A.: Hair follicle stem cells? A distinct germinative epidermal cell population is activated *in vitro* by the presence of hair dermal papilla cells. *J. Cell. Sci.*, 1991; 99: 373–385
- [53] Richardson G.D., Arnott E.C., Whitehouse C.J., Lawrence C.M., Reynolds A.J., Hole N., Jahoda C.A.: Plasticity of rodent and human hair follicle dermal cells: implications for cell therapy and tissue engineering. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 2005; 10: 180–183
- [54] Rochat A., Kobayashi K., Barrandon Y.: Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell*, 1994; 76: 1063–1073
- [55] Roeder I., Lorenz R.: Asymmetry of stem cell fate and the potential impact of the niche. *Stem Cell Reviews*. 2006; 2: 171–180
- [56] Roh C., Tao Q., Photopoulos C., Lyle S.: *In vitro* differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J. Invest. Dermatol.*, 2005; 125: 1099–1105
- [57] Schneider M.R., Schmidt-Ullrich R., Paus R.: The hair follicle as a dynamic mini organ. *Curr. Biol.*, 2009; 19: R132–R142
- [58] So P.L., Epstein E.H.: Adult stem cells: capturing youth from a bulge? *Trends Biotechnol.*, 2004; 22: 493–496
- [59] Stenn K.S., Cotsarelis G.: Bioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005; 16: 493–497
- [60] Tang L., Madani S., Lui H., Shapiro J.: Regeneration of a new hair follicle from the upper half of a human hair follicle in a nude mouse. *J. Invest. Dermatol.*, 2002; 119: 983–984
- [61] Tani H., Morris R.J., Kaur P.: Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Medical Sciences*, 2000; 97: 10960–10965
- [62] Taylor G., Lehrer M.S., Jensen P.J., Sun T.T., Lavker R.M.: Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, 2000; 102: 451–461
- [63] Tiede S., Kloeppe J.E., Bodo E., Tiwari S., Kruse C., Paus R.: Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2007; 86: 355–376
- [64] Trempus C.S., Morris R.J., Bortner C.D., Cotsarelis G., Faircloth R.S., Reece J.M., Tennant R.W.: Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 120: 501–511
- [65] Walgenbach K., Voigt M., Riabikhin A.W., Andree C., Schaefer D.J., Galla T.J., Stark G.B.: Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat. Rec.*, 2001; 263: 372–378
- [66] Waters J.M., Richardson G.D., Jahoda C.A.: Hair follicle stem cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2007; 18: 245–254
- [67] Watt F.M.: Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1998; 353: 831–837
- [68] Young P.E., Baumhueter S., Lasky L.A.: The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*, 1995; 85: 96–105
- [69] Zhang Y., Xiang M., Wang Y., Yan J., Zeng Y., Yu J., Yang T.: Bulge cells of human hair follicles: segregation, cultivation and properties. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2006; 47: 50–56
- [70] Zhou J., Jia L., Yang Y., Peng S., Cao Y., Duan E.: Enrichment and characterization of mouse putative epidermal stem cells. *Cell. Biol. Int.*, 2004; 28: 523–529

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

