Optimizing a Calorimetric Method for Quantitative Assessment of Alkaline Phosphatase to Confirm the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cell

Samaneh Harimi [1,2], Fatemeh Zare [3], Farzaneh Fesahat [4], Mahdieh Mondanizadeh [5]

1.Master of Medical Biotechnology, Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran, Orchid ID: 0000-0002-8255-655X

2.Master of Medical Biotechnology, Reproductive Immunology Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran, Orchid ID: 0000-0002-8255-655X

3.Assistant Professor, Reproductive Immunology Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran, Orchid ID: 0000-0003-0436-9924

4.Assistant Professor, Reproductive Immunology Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran, (Corresponding Author), Tel: 03536285406, E-mail: farzaneh.fesahat@gmail.com, Orchid ID: 0000-0002-3743-4449

5.Associate Professor, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran, (Corresponding Author), Tel: 086-34173503, E-mail: m_mondanizadeh@yahoo.com, Orchid ID: 0000-0001-6221-8847

ABSTRACT

Background and Aim: Evaluation of the alkaline phosphatase expression is known as one of the diagnostic markers to confirm the stem cells differentiation into osteoblasts. Several methods, including immunocytochemistry, are used to measure alkaline phosphatase in different studies. Due to limitations of using this method, we decided to optimize the calorimetric method as an alternative, low cost and efficient method for quantitative assessment of alkaline phosphatase.

Materials and Methods: Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue were used. Cells were differentiated into osteoblasts using an induction medium. Alkaline phosphatase levels were assessed on the days 0 and 21 of differentiation using both immunocytochemistry and calorimetric methods.

Results: Immunocytochemistry findings demonstrated a significant increase (approximately 5-fold) in alkaline phosphatase expression level on the 21st day of differentiation compared to that on the day 0 ($p < 0.0001$). Also, statistical analysis of the results of the calorimetric test showed a significant increase (approximately 9-fold) in alkaline phosphatase expression level on the 21st day of differentiation compared to that on the day 0 ($p<0.0001$).

Conclusion: Comparison of the data between calorimetric and immunocytochemistry showed similar results. These findings suggested that colorimetric assay can be used as an alternative, quantitative, fast, and low cost method for determining the levels of alkaline phosphatase in osteoblasts differentiated from mesenchymal stem cells.

Keywords: Alkaline phosphatase, Differentiation, Stem cells, Osteoblast, Calorimetric method

Received: Jan 16, 2022 **Accepted:** June 21, 2022

How to cite the article: Samaneh Harimi, Fatemeh Zare, Farzaneh Fesahat, Mahdieh Mondanizadeh Optimizing a Calorimetric Method for Quantitative Assessment of Alkaline Phosphatase to confirm the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cell. SJKU 2023;27(6):25-36.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هفت / بهمن و اسفند ۱۴۰۱/۳۶-۲۵

بهینه سازی یک روش کالریمتری به منظور ارزیابی کمی آلکالین فسفاتاز برای تائید تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سمانه حریمی [۱،۲]، فاطمه زارع [۳]، فرزانه فصاحت [۴]، مهدیه موندنی زاده [۵]

۱.کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران ، کد ارکید: X۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۲۵۵-۶۵۵

۲.کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران، کد ارکید: X۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۲۵۵-۶۵۵

۳. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران، کد ارکید: ۹۹۲۴-۰۴۳۶-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۴.استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران، (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۳۵-۳۶۲۸۵۴۰۶، پست الکترونیک: farzaneh.fesahat@gmail.com ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۷۴۳-۴۴۴۹

۵. دانشیار، گروه زیست‌فناوری و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران، (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۸۶-۳۴۱۷۳۵۰۳، پست الکترونیک: m_mondanizadeh@yahoo.com، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۲۲۱-۸۸۴۷

چکیده

زمینه و هدف: ارزیابی میزان بیان آلکالین فسفاتاز جهت تائید تمایز سلول‌های بنیادی به استئوبلاست به عنوان یکی از مارکرهای تشخیصی شناخته شده است. روش‌های متعددی از جمله ایمونوسیتوشیمی جهت سنجش آلکالین فسفاتاز در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به محدودیت‌های استفاده از این روش، هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی روش کالریمتری به عنوان یک روش جایگزین، کم هزینه و کارآمد برای اندازه‌گیری کمی آلکالین فسفاتاز است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان گرفته شد. سلول‌ها با استفاده از محیط القایی به استئوبلاست تمایز داده شدند. سطوح آلکالین فسفاتاز در روز صفر و روز بیست و یک تمایز با دو روش ایمونوسیتوشیمی و روش کالریمتری بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌های ایمونوسیتوشیمی، افزایش معناداری (تقریباً ۵ برابر) در سطح بیان آلکالین فسفاتاز در روز بیست و یک تمایز در مقایسه با روز صفر نشان داد ($p < 0.0001$). همچنین نتایج آنالیز آماری تست کالریمتری، افزایش معناداری (تقریباً ۹ برابر) در سطح بیان آلکالین فسفاتاز در روز بیست و یک تمایز در مقایسه با روز صفر نشان داد ($p < 0.0001$).

نتیجه‌گیری: داده‌های مقایسه‌ای کالریمتری و ایمونوسیتوشیمی نتایج مشابهی را نشان داد. این یافته ها، استفاده از روش رنگ سنجی را به عنوان روش جایگزین، کمی، سریع و کم هزینه جهت تعیین سطح آلکالین فسفاتاز در استئوبلاست های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیشنهاد می‌کند.

کلمات کلیدی: آلکالین فسفاتاز، تمایز، سلول‌های بنیادی، استئوبلاست، روش کالریمتری

وصول مقاله:۱۴۰۰/۱۰/۲۶ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۳/۲۲ پذیرش:۱۴۰۱/۳/۳۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

مقدمه

استخوان از سلول‌های استئوبلاست، استئوسیت و استئوکلاست تشکیل شده است. از جمله روش‌های دسترسی به سلول‌های استئوبلاست و استئوسیت می‌توان به تمایز این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) اشاره کرد (۱). مطالعات بر روی سلول‌های استئوبلاست جدا شده از استخوان ترابکولار، کالواری جنینی و استئوسارکوما به ظهور مجموعه‌ای از مارکرهای مرتبط با فنوتیپ استئوبلاست کمک کرده است (۲). این مارکرها شامل بیان شدن آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase, ALP)، سنتز کلاژن نوع ۱، osteocalcin وosteopontin است (۳). از بین مارکرهای ذکر شده، ALP یکی از شناخته شده ترین مارکرهای بیوشیمیایی است که در مراحل اولیه فرآیند تمایز استخوانی بیان می‌شود و برای معدنی شدن استخوان ضروری است. سطوح این آنزیم در زمان رشد استخوان‌ها و یا فعالیت سلول‌های استخوانی افزایش می‌یابد و بر این اساس، ALP نقش مهمی در تشکیل استخوان دارد. به طور کل ALP گلیکوپروتئینی است که در لایه خارجی غشاء سلولی قرار دارد و استر فسفات‌های آلی را هیدرولیز کرده و در فضای بین سلولی آزاد می‌کند (۴, ۵). جالب توجه است که ALP های انسانی را می‌توان به ALP اختصاصی بافت و ALP غیر اختصاصی بافتی طبقه بندی کرد. از سویی دیگر ALP روده‌ای، ALP جفتی و ALP سلول‌های زایا جزء ALP های اختصاصی بافت هستند و بدان معنی است که آن‌ها فقط در بافت‌هایی یافت می‌شوند که در شرایط طبیعی بیان دارند و ALP غیر اختصاصی بافتی شامل ALP کبد، کلیه و استخوان است و عمدتاً در گردش خون مشاهده می‌گردند (۶). محصولات آنزیمی ALP غیر اختصاصی بافتی در انسان با انواع روش‌های ساختاری، بیوشیمیایی و ایمونولوژیک قابل تشخیص و شناسایی هستند (۴, ۷). یکی از روش‌های تشخیص ALP انجام تست ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry, ICC) است. ICC یک روش ایمونوفلورسانس است که به شناسایی انواع مختلفی از آنتی ژن‌ها در سلول‌های کشت داده شده در محیط آزمایشگاهی (in vitro) اشاره دارد. این تکنیک سریع و نسبتاً ساده است و به تجهیزات تخصصی که در اکثر آزمایشگاه‌های هیستوپاتولوژی یافت می‌شود، نیاز ندارد. روش ایمونوفلورسانس به دو صورت مستقیم (اولیه) یا غیرمستقیم (ثانویه) انجام شود. در روش مستقیم، برچسب فلوروفور مستقیماً به آنتی بادی اصلی متصل می‌شود که با اپی توپ هدف واکنش خواهد داد؛ اما روش غیر مستقیم شامل یک فرآیند دو مرحله‌ای است. بدین طریق که ابتدا یک آنتی‌بادی اولیه به اپی توپ هدف متصل می‌شود و سپس یک آنتی‌بادی ثانویه دارای برچسب فلوروفور، آنتی بادی اولیه را شناسایی و سپس به آن متصل خواهد شد. اگرچه روش مستقیم سریع تر است؛ اما روش غیر مستقیم به دلایل حساسیت بالا، تقویت سیگنال و توانایی آن در شناسایی چندین هدف در یک نمونه کارآمدتر است(۸). از جمله نقطه قوت ICC ارائه اطلاعات منحصر به فرد در مورد محل دقیق پروتئین‌های بافتی است، که با هیچ وسیله دیگری قابل دستیابی نیست. با این حال، ICC محدودیت‌هایی هم دارد و علاوه بر هزینه زیاد این تست، این روش زمانی که کمیت مطلق مورد نیاز است، نیز ارزش اندکی دارد (۹).

روشی دیگر برای تعیین میزان ALP، آزمایش آنزیمی بر مبنای کالریمتری (Deutsche Gesellschaft Fur Klinische Chemie, DGKC) است(۱۰). ALP در غلظت‌های کم در جفت، موکوس ایلیئوم، کلیه، استخوان و کبد وجود دارد. این در صورتی است که بیش از ۸۰ درصد این مقادیر عمدتاً از کبد و استخوان و در میزان کمتر از روده‌ها آزاد می‌شود و عمدتاً در سرم یافت می‌گردد. چندین روش بالینی برای تعیین سطح ALP سرم وجود دارد. تفاوت این روش‌ها در استفاده از سوبسترای مورد استفاده، pH بافر قلیایی و مقادیر«طبیعی» تولید شده است. اصولاً آزمایش‌ها به توانایی آنزیم در هیدرولیز استرهای فسفات متکی است (۶, ۱۰). در پرکاربردترین روش بین‌المللی، p-nitrophenol phosphate و ۴-

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

Nitrophenyl phosphate به ترتیب به عنوان سوبسترا و بافر استفاده می‌شود. طبق واکنش 4-Nitrophenyl phosphate (colorless)→ ^{ALP} → 4-Nitrophenol (yellow) میزان آزاد شدن p-nitrophenol از سوبسترا به عنوان نشانگر فعالیت ALP به صورت کمی قابل اندازه‌گیری بوده و نتایج به‌صورت واحد بین‌المللی / لیتر (IU / L) گزارش می‌شود (۱۰).

از این رو با توجه به محدودیت‌های کاربرد تکنیک ICC از جمله پر هزینه بودن (به دلیل نیاز به آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن هدف و کونژوگه کردن آن)، عدم قابلیت کمی سازی مطلق داده‌ها و همچنین به دلیل اینکه کیت‌های سنجش ALP با روش DGKC مختص سرم است و مقادیر ALP سرم با مقادیر ALP در تمایز متفاوت است، هدف ما در این مطالعه بهینه سازی پروتکلی برای اندازه‌گیری کمی ALP با روش DGKC برای تائید تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به استئوبلاست به عنوان یک روش جایگزین کمی سازی شده با صرف زمان کمتر و هزینه پایین‌تر بود.

روش بررسی

سلول بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی (Adipose-Derived Stem Cells, ASCs) در پاساژ سوم از انستیتو پاستور خریداری گردید. برای تائید ویژگی بنیادی بودن سلول‌ها، مارکرهای شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغین شامل CD73,CD90,CD105,CD44 CD34. با روش فلوسایتومتری بررسی شدند (۱۱, ۱۲). به منظور تمایز سلول‌های ASCs به استئوبلاست، ابتدا سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شده و سپس تعداد ۱۰۰ هزار سلول به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه حاوی محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (BIO-IDEA, BI-1003)، ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum, FBS) (Sigma, F7524-) 100ML پنی سیلین/استرپتومایسین (BIO-IDEA, BI-1203) $100\ U{\cdot}mL^{-1}$ و آمفوتریسین B, (Amphotericin) (AMP) $100\ U{\cdot}mL^{-1}$ (Sigma, 1397-89-3 اضافه گردید و سپس پلیت‌ها به انکوباتور(INCO2 Memmert) با دمای ۳۷ درجه و $5co_2$ درصد و ۹۵ درصد رطوبت منتقل گشت. بعد از رسیدن سلول‌ها به ۷۰-۶۰ درصد confluence محیط کشت با ۱ میلی لیتر محیط تمایز استخوان (Nano zist arayeh Co., Iran) جایگزین و سپس پلیت‌ها انکوبه شدند. پس از گذشت ۵-۴ روز نصف حجم از محیط پلیت دور ریخته و به همان مقدار محیط جدید به پلیت اضافه شد و این روند تا روز ۲۱ ادامه داشت (۱۳). سلول‌های کشت داده شده در پلیت‌ها در بازه‌های زمانی صفر و بیست و یک روز از هنگام شروع القای تمایز شیمیایی به استخوان جهت سنجش مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور اطمینان از تکرارپذیری داده‌ها، آزمایش به صورت ۳ تکرار انجام گرفت. بدین طریق که برای روز صفر ۳ چاهک سلولی، برای روز بیست و یک ۳ چاهک سلولی در تست ICC و برای روز صفر ۳ چاهک سلولی و برای روز بیست و یک ۳ چاهک سلولی در تست آنزیمی DGKC در نظر گرفته شد و در نهایت میانگین هر ۳ چاهک مورد تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین به منظور سنجش معدنی شدن ماتریکس سلولی در تائید تمایز، تست رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در دو زمان قبل از تمایز(روز صفر) و آخرین روز تمایز(روز بیست و یک) انجام شد (۱۴). در این روش ابتدا سلول‌ها با استفاده از فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و پس از شستشو با PBS با رنگ آلیزارین رد، رنگ‌آمیزی شدند. پس از یک ساعت رنگ از روی سلول‌ها برداشته شد و سلول‌ها چندین بار با PBS شسته شدند. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Nikon ECLIPSE 80i) مشاهده شدند (۱۵).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

تست تاییدی ICC:

بدین منظور، ابتدا محیط کشت روی چاهک‌های سلولی دور ریخته شد و سلول‌ها یک‌بار با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline, PBS)(Sigma, 806552) شسته شدند. سپس به منظور فیکس کردن سلول‌ها از فرمالین (Sigma, HT501128-4L) ۱۰ درصد استفاده شد و بعد از ۲۰ دقیقه کف چاهک با PBS شستشو داده شد. تریتون‌X-100 (Sigma, 9036-19-5) ۰,۳ درصد به منظور نفوذ پذیرکردن غشاء سلول‌ها به نمونه‌ها اضافه و سپس نمونه‌ها با PBS شستشو داده شدند. در ادامه سرم 10 درصد به مدت 45 دقیقه به منظور مسدود کردن واکنش آنتی‌بادی ثانویه به نمونه‌ها اضافه گردید. پس از خارج کردن سرم، آنتی‌بادی اولیه (Sc-365765, Santa Cruz Biotechnology) رقیق شده با PBS با نسبت ۱ به ۱۰۰ بر روی نمونه‌ها ریخته و نمونه به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال با دمای ۸ درجه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت از یخچال خارج و ۴ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد. سپس آنتی بادی ثانویه(Santa Cruz Biotechnology, Sc-542733) رقیق شده با PBS با نسبت ۱ به ۱۵۰ به نمونه‌ها اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه انکوبه شد. نمونه‌ها از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل و بعد از ۳ بار شستشو، سلول‌ها با رنگ داپی DAPI (Sigma, 28718-90-3) به منظور رنگ آمیزی هسته سلولی به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از ۲۰ دقیقه، نمونه‌ها با PBS شستشو داده شد و در نهایت، عکس برداری فلورسنت (با میکروسکوپ Olympus) با بزرگنمایی ۴۰× انجام شد. تصاویر با استفاده از نرم افزار Image J تجزیه و تحلیل و بر اساس بیان مارکر ALP نسبت به تعداد کل هسته‌های موجود گزارش شدند.

تست تأییدی آزمایش آنزیمی کالریمتری DGKC:

این روش با استفاده از پروتکل کیت سنجش ALP سرمی (Delta darman part, DDP-01157-S) با حساسیت اندازه‌گیری، ۵ واحد بین‌المللی در لیتر انجام شده است. در این کیت، محلول شماره ۱ حاوی 1mmol/l دی اتانول آمین و 0.5mmol/l منیزیم کلراید و محلول شماره ۲ حاوی p-nitrophenylphosphate 10mmol/l است. این تست با اعمال تغییراتی در مقادیر محلول‌ها، نمونه و زمان انکوباسیون قبل از خوانش جذب نوری انجام شد. روش انجام تست همراه تغییرات نهایی اعمال شده که به منظور بهینه سازی کیت و بعد از انجام چندین تست پایلوت به دست آمد، در زیر شرح داده شده است:

بدین منظور، ابتدا محیط روی چاهک دور ریخته و سلول‌ها یک‌بار با PBS شسته شدند و سپس ۱ میلی لیتر تریپسین/EDTA (BIO-IDEA, BI-1602) ۰,۲۵ درصد به منظور جداسازی سلول‌ها از کف به هر چاهک اضافه گردید و ۲ دقیقه در انکوباتور انکوبه شدند. بعد از آن با ضربه به پلیت سلول‌ها از کف چاهک کنده شده و در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بودند. سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم اضافه گردید تا فعالیت آنزیم متوقف شود. سپس محتویات فلاسک به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتر منتقل گردید و سانتریفیوژ در دور g۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. سوپرناتانت دور ریخته و به پلت سلولی ۲۵۰ میکرو لیتر تریتون X100 یک درصد رقیق شده با PBS در PH:7.4 و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید. سلول‌ها ۳ مرتبه با قرار دادن میکروتیوب درون نیتروژن مایع با دمای منفی هشتاد درجه سانتی‌گراد و انکوباتور۳۷ درجه به طور متناوب لیز شدند. جهت آماده‌سازی محلول معرف، طبق پروتکل کیت ۴ حجم از محلول شماره ۱ با مقدار ۱ حجم از محلول شماره ۲ از کیت سنجش ALP با هم مخلوط شد. مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول آماده شده با ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی مخلوط و به چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل و با دستگاه الایزاریدر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج nm۴۵۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خوانده شد. بعد از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت مجدداً اختلاف جذب نوری از ساعت قبل به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

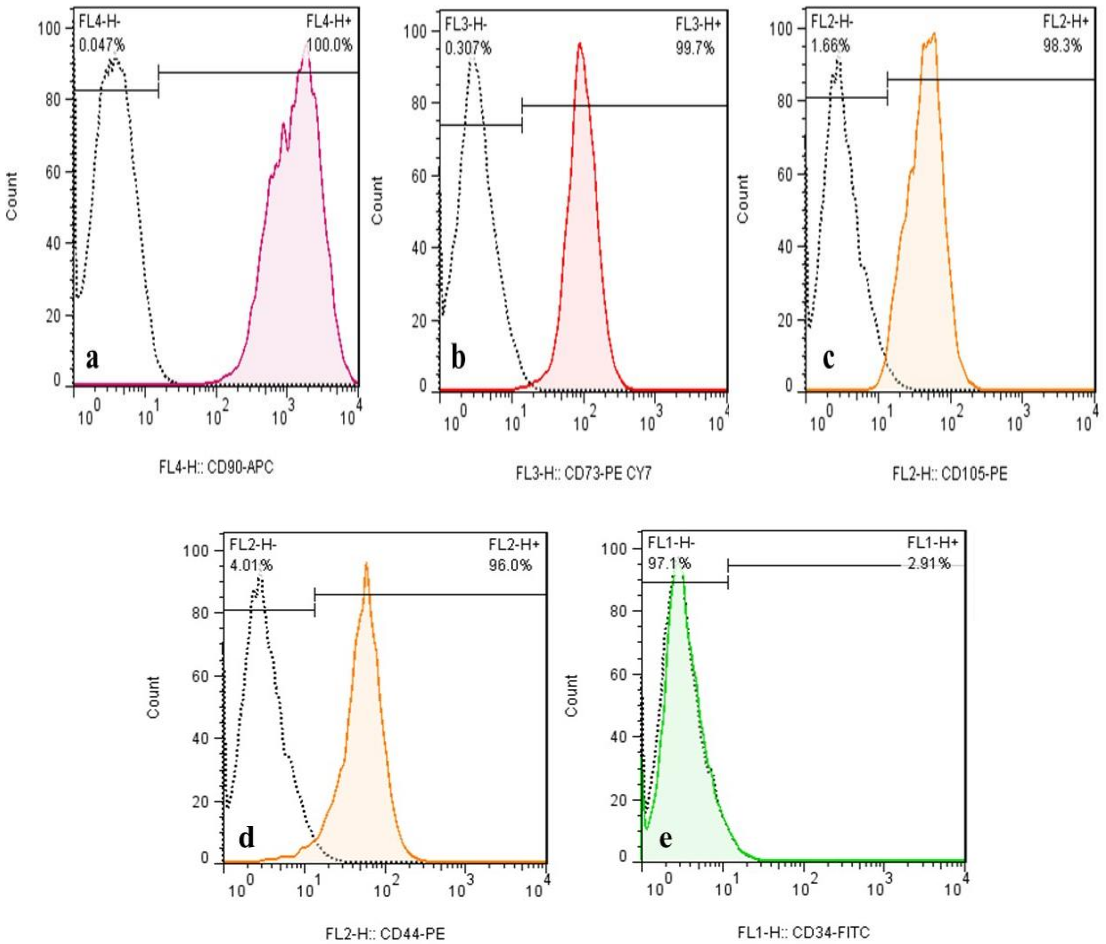
دست آمد. مقدار اختلافات نوری با هم جمع و بر عدد ۳ تقسیم شد و میانگین به دست آمده در ضریب ۳۳۰۰ ضرب گردید.

تجزیه و تحلیل آماری:

تصاویر گرفته شده در تست ICC با استفاده از نرم افزار Image J تجزیه و تحلیل شدند. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار graph pad prism 8 انجام شد و جهت مقایسه افزایش سطح ALP در روزهای مختلف در روش ICC از تست آماری Mann-whitney و در روش DGKC از تست آماری Unpaired t-student استفاده گردید و سطح معنی‌داری کمتر از ۰,۰۵ در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج این دو روش به صورت کیفی باهم مقایسه شدند.

یافته‌ها

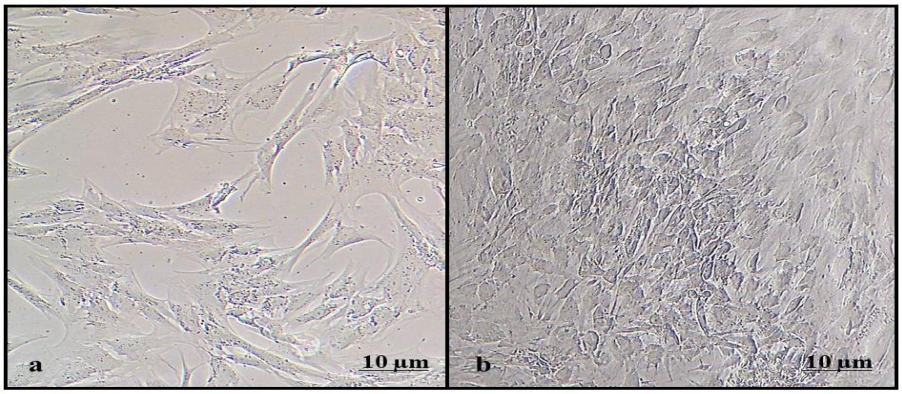
مارکرهای شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمی خریداری شده شامل مارکرهای مثبتCD73,CD90,CD105,CD44 و مارکر منفی CD34 با روش فلوسایتومتری بررسی و تائید شد(شکل۱). ASCs کشت داده شده در پلیت‌ها در بازه‌های زمانی صفر و بیست و یک روز از هنگام شروع القای تمایز شیمیایی به استخوان جهت سنجش مورد استفاده قرار گرفتند (شکل۲).



[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

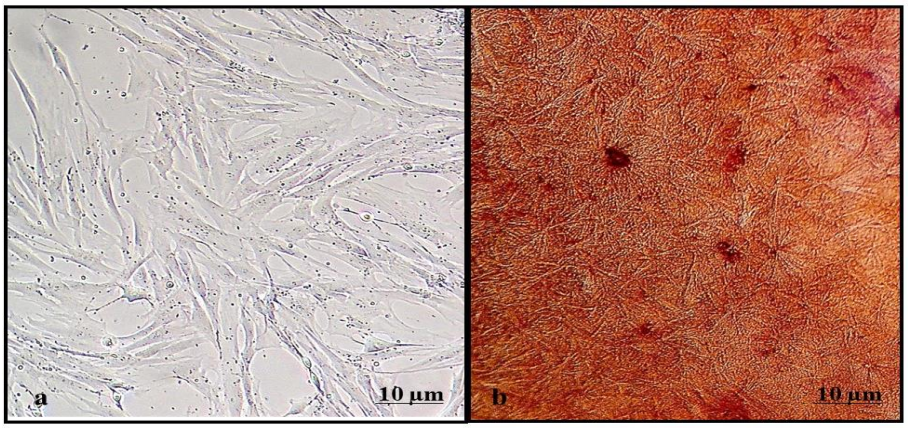
شکل ۱. نتایج فلوسایتومتری. a) نتایج مارکر مثبت CD90 با بیان ۱۰۰٪، b) نتایج مارکر مثبت CD73 با بیان ۹۹,۷٪، c) نتایج مارکر مثبت CD105 با بیان ۹۸,۳٪، d) نتایج مارکر مثبت CD44 با بیان ۹۶٪، e) نتایج مارکر منفی CD34 با بیان ۲,۹۱٪



شکل ۲. تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی چربی قبل و بعد از القای تمایز به استخوان. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت با محیط تمایزی، رشد و تکثیرشان متوقف شده و وارد فاز تمایز می‌شوند. در این مرحله شکل ظاهری سلول‌ها از حالت دوکی شکل به حالت گرد(سلول‌های استئوبلاست) تغییر می‌کند. a) سلول‌ها در روز صفر تمایز با بزرگنمایی ۱۰×، b) سلول‌ها در روز بیست و یک تمایز با بزرگنمایی ۱۰×.

تست رنگ آمیزی آلیزارین رد:

به منظور سنجش معدنی شدن ماتریکس سلولی در تائید تمایز، تست رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در دو زمان قبل از تمایز(روز صفر) و آخرین روز تمایز(روز بیست و یک)انجام شد (شکل۳).



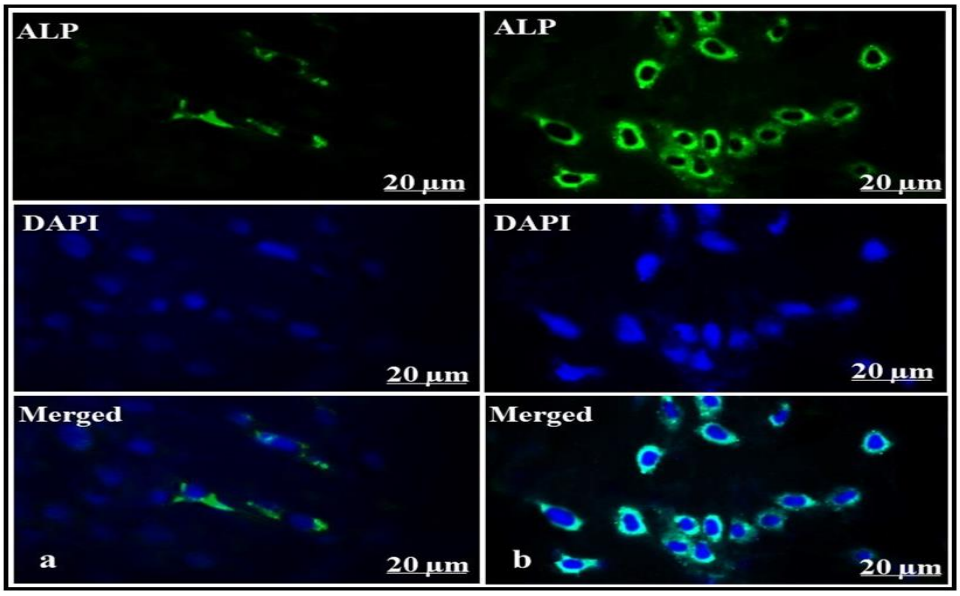
شکل ۳. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد. در روند تمایز سلول‌ها کلسیفه شده و کلسیم در سلول‌ها رسوب می‌کند. پس از رنگ آمیزی آلیزارین رد، هرچه رنگ قرمز در محیط بیشتر باشد نشان‌دهنده رسوب کلسیم بیشتر است. a) سلول‌ها در روز صفر تمایز با بزرگنمایی ۱۰×، b) سلول‌ها در روز بیست و یک تمایز با بزرگنمایی ۱۰×.

تست تأییدی ICC:

تصاویر گرفته شده در تست ICC با استفاده از نرم افزار Image J تجزیه و تحلیل شدند (شکل۴). نتایج آنالیز آماری تست تأییدی ICC، افزایش معناداری سطح بیان مارکر ALP را در روز بیست و یک تمایز در مقایسه با روز صفر تمایز نشان داد ($p < 0.0001$) (شکل۵). میانگین و انحراف از میانگین داده‌ها در روز صفر برابر با 9.92 ±1.1و در روز بیست و یک به میزان 51.34 ±1.95 تعیین شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

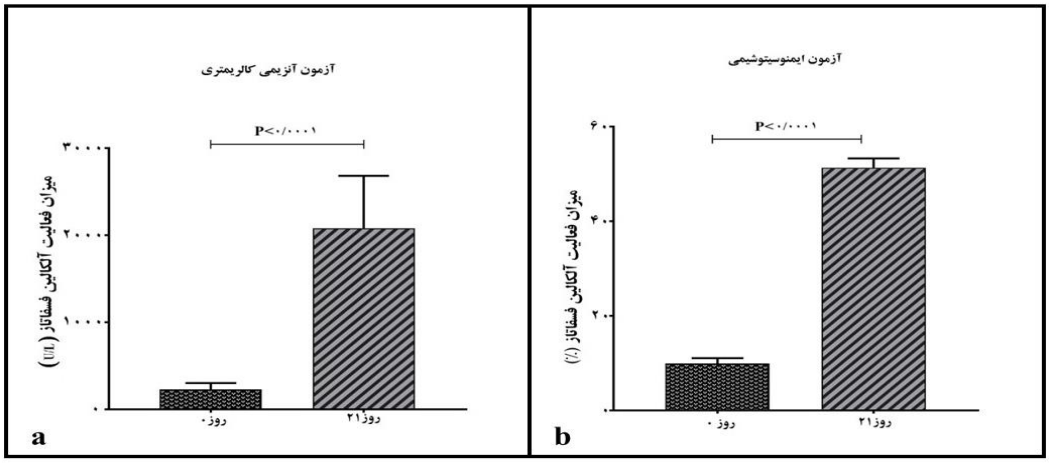


شکل ۴. تصاویر فلورسنت گرفته شده در تست ICC. a) تصاویر مربوط به روز صفر تمایز با بزرگنمایی ۴۰×، b) تصاویر مربوط به روز بیست و یک تمایز با بزرگنمایی ۴۰×.

تست تأییدی آزمایش آنزیمی کالریمتری DGKC:

نتایج آنالیز آماری تست تأییدی DGKC، افزایش معناداری سطح بیان مارکر ALP را در روز بیست و یک تمایز در مقایسه با روز صفر تمایز نشان داد ($p < 0.0001$) (شکل۵).

میانگین و انحراف از میانگین داده‌ها در روز صفر برابر با 23.38 ±227.7و در روز بیست‌ویک به میزان 2083 ±189 تعیین شد.



شکل ۵. نتایج آنالیز آماری تست‌های تأییدی تمایز استئوبلاست. a) نتایج آنالیز آماری تست DGKC را در روز بیست و یک تمایز در مقایسه با روز صفر تمایز ($p < 0.0001$)، b) نتایج آنالیز آماری تست تأییدی ICC در روز بیست و یک تمایز در مقایسه با روز صفر تمایز ($p < 0.0001$). نتایج به صورت میانگین±انحراف از میانگین، نشان داده شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

بحث

استخوان جزء سیستم اسکلتی است که در اثر آسیب‌های کوچک می‌تواند خود را ترمیم کند، این در حالی است که در جراحات بزرگ چالش‌هایی وجود دارد. اکثر روش‌های درمان موجود علی‌رغم نتیجه مطلوب یکسری مشکلات و عوارضی دارند (۱۶)؛ بنابراین به یک تکنیک جدید برای بازسازی استخوان نیاز است. اخیراً تحولات زیادی در زمینه سلول درمانی در بحث پزشکی بازساختی مشاهده شده است (۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی منبع مناسبی برای تمایز به بافت استخوانی هستند و در میان آن‌ها، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی به علت در دسترس بودن و جداسازی بی‌خطر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۷, ۱۸). در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی شکمی انسان، خریداری شد و به منظور تائید ویژگی بنیادی بودن، مارکرهای شاخص سلول‌های بنیادی شامل مارکرهای مثبت CD73, CD90,CD105, CD44 و مارکر منفی CD34 بررسی شد. بیان بالای مارکرهای مثبت و بیان اندک مارکر منفی، هم راستا با نتایج مطالعات پیشین و تأییدی بر بنیادی بودن سلول‌ها بود (۱۱). تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از دگزامتازون، آسکوربیک اسید و بتا گلیسرول فسفات القا می‌شود (۱۷). برای تائید تمایز استئوبلاست سلول‌های بنیادی، علاوه بر سنجش معدنی شدن ماتریکس سلولی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، مارکر ALP که یکی از شناخته شده ترین مارکرهای بیوشیمیایی است و در مراحل اولیه فرآیند تمایز استخوانی بیان می شود و سطوح آن در زمان رشد استخوان‌ها و یا فعالیت سلول‌های استخوانی افزایش می‌یابد، نیز بررسی می‌شود(۵, ۱۹). همچنین در سرم انسان ایزوآنزیم های متعددی از ALP وجود دارد که دو نوع عمده آن مربوط به استخوان و کبد است (۶). چندین روش بالینی برای تعیین سطح ALP سرم وجود دارد که از جمله پرکاربردترین آن‌ها، روش بین المللی DGKC است (۱۰). از آنجا که ALP یک آنزیم متصل به غشا است، قبل از هر اندازه‌گیری ابتدا باید به صورت محلول درآید. بدین ترتیب، به منظور بهینه‌سازی بافرهای مختلفی از جمله PBS، بافر RIPA(Radioimmunoprecipitation assay buffer) و تریتون در شرایط دمایی مختلف فریز/دفریز از جمله دمای منفی هشتاد درجه سانتی‌گراد و منفی بیست درجه سانتی‌گراد و همچنین استفاده/عدم استفاده از ورتکس بررسی شد. از روش‌های تست شده، روش تریتون/فریزدفریز در دمای منفی هشتاد درجه سانتی‌گراد بدین منظور انتخاب گردید. همچنین به دلیل اینکه مقادیر ALP سرم با مقادیر ALP در تمایز متفاوت است و کیت‌های سنجش ALP با روش DGKC مختص سرم است، در این مطالعه هدف ما بهینه سازی روش DGKC به عنوان روشی جایگزین، کم هزینه و کارآمد برای اندازه‌گیری کمی ALP به منظور تائید تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به استئوبلاست بود.

در مطالعات پیشین روش‌های متعددی برای تعیین سطوح این مارکر پیشنهاد شده است که از موارد آن می‌توان به تحقیق Lim و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اشاره کرد. در مطالعه مذکور، با ساخت یک نانوذره طلا کونژوگه به هیدروکسی آپاتیت فلورسنت (Gold nanoparticle-conjugated fluorescent hydroxyapatite, AuFHAp) روشی برای تعیین میزان بیان ALP معرفی شد. در این مطالعه سلول‌های MC3T3 را به سلول‌های استئوبلاست تمایز دادند و به منظور تائید این تمایز از AuFHAp استفاده نموده‌اند. در این مطالعه با پیشروی روند تمایز، میزان فعالیت ALP نیز بیشتر شد که نتایج حاصله در این بررسی هم راستا با نتایج مطالعات ما بود (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Osathanon و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به روی سلول‌های MC3T3 انجام شد، ALP به روی یک داربست فیبرینی به منظور تعیین توانایی این داربست‌ها در تمایز استئوبلاست در محیط in vitro و in vivo فیکس شد. در این مطالعه مذکور به منظور تائید تمایز، مارکر ALP را با انجام اصلاحاتی با روش Taylor سنجیدند. بدین صورت که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

داربست در مجاورت p-nitrophenol phosphate در بافر گلایسین قرار داده شد. پس از آن محلول از روی داربست برداشته و به بافر متوقف کننده (stop solution) اضافه گردید و جذب در nm۴۵۰ خوانده شد. میزان فعالیت ALP از طریق فرمول Activity = A405 (Vreaction=Valiquot)/b به دست آمد که نتایج حاصله از این مطالعه نیز هم‌راستا با نتایج مطالعه ما بود (۲۱). همچنین Jafary و همکارانش در سال ۲۰۱۷ به منظور تمایز استئوبلاست از سلول های بنیادی مزانشیمی رت، ابتدا سلول‌ها را به روی یک داربست کلاژنی به همراه ALP قرار دادند. در این مطالعه نیز به منظور تائید تمایز، مارکر ALP را با روش Taylor سنجیده شد، که نتایج آن نیز هم راستا با نتایج این مطالعه بود (۵).

یکی از روش‌های استاندارد و دقیق برای تعیین بیان مارکر ALP،ICC است. ICC یک روش ایمونوفلورسانس است که به شناسایی انواع مختلفی از آنتی‌ژن‌ها در سلول‌های کشت داده شده در محیط in vitro اشاره دارد (۸). در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای توسط Birmingham و همکارانش به روی تأثیر محیط‌های القایی و سیگنال‌های بیوشیمیایی سلول‌های استئوسیت و استئوبلاست بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از دو رده سلولی MLO-Y4 وMC3T3-E1 انجام شد، به منظور سنجش و مقایسه تأثیر این دو رده سلولی، سطح بیان مارکر ALP با روش ICC تعیین شد که مطابق این روش، سلول‌ها نیز باید در ابتدا به روی سطح فیکس شوند (۲۲). در این مطالعه به منظور تائید روش ارائه شده، تست ICC به عنوان تست کنترل انجام و نتایج با هم مقایسه شد. در روش DGKC نتایج، نشان دهنده افزایش تقریبی ۹ برابری در سطوح آنزیمیALP در روز بیست و یک در مقابل روز صفر بود که در مقایسه با نتایج ICC که نشان دهنده افزایش تقریبی ۵ برابری در سطوح آنزیمی ALP در روز بیست ویک در مقابل روز صفر است، قابل توجه بود. همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط Sabokbarو همکارانش انجام شد، سطح مارکر ALP در سلول‌های Saos-2 (Sarcoma osteogenic) با روشی تقریباً مشابه که در آن از Adenosine-5-Monophoshate به عنوان سوبسترا استفاده شده است، سنجیده شد. جالب توجه است که نتایج آن‌ها مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه ما بود (۱۰).

نتیجه گیری

ALP یک مارکر مهم در فرایند تمایز استئوبلاست است و آگاهی از عملکرد آن برای درک ما از زیست شناسی سلول‌های استخوانی مهم است. در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی گرفته شده از بافت چربی با استفاده از محیط القایی به سلول‌های استئوبلاست تمایز داده شد و برای تائید تمایز، علاوه بر سنجش معدنی شدن ماتریکس سلولی، مارکر ALP با روش بهینه شده DGKC با استفاده از کیت سنجش ALP سرمی با اعمال تغییراتی انجام شد. افزایش قابل توجه این مارکر در روز بیست ویک در مقایسه با روز صفر تأییدی بر تمایز بود. تست ICC نیز به عنوان کنترل و روش استاندارد انجام شد و نتایج به دست آمده در روش ارائه شده، مشابه نتایج ICC بود. همچنین با توجه به این که روش ارائه شده علاوه بر صرفه‌جویی در زمان، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است، می‌توان گفت استفاده از این روش ارجح‌تر است و می‌توان این روش را به عنوان جایگزینی برای تعیین بیان مارکر ALP در تائید تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های استئوبلاست معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، برگرفته از طرح تحقیقاتی است که در مورخ ۲۱/۰۷/۱۴۰۰ با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1400.235 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک تصویب گردیده است. لازم به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

ذکر است، هزینه این پژوهش به وسیله معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک تأمین شده است. بدین وسیله نویسندگان کمال قدردانی و امتنان را از این معاونت دارند. همچنین از کارکنان محترم مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولیدمثل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی که در این تحقیق ما را همراهی نمودند، تشکر می‌گردد و نویسندگان هیچ تضاد منافعی ندارند.

منابع:

1.Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. Biomed Environ. Sci. 2015;28(1):57-71.
2.Gong Y, Yang J, Li X, Zhou C, Chen Y, Wang Z, et al. A dissection of human primary osteoblasts in vivo at single-cell resolution. Aging (Albany NY). 2021;13(16):20629.
3.Asserson DB, Orbay H, Sahar DE. Review of the pathways involved in the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. J Craniofac Surg. 2019;30(3):703-8.
4.Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. Indian J Clin Biochem. 2014;29(3):269-78.
5.Jafary F, Hanachi P, Gorjipour K. Osteoblast differentiation on collagen scaffold with immobilized alkaline phosphatase. IJOTM. 2017;8(4):195.
6.Lowe D, Sanvictores T, John S. Alkaline phosphatase. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL);2017:95-97.
7.Sebastián-Serrano Á, de Diego-García L, Martínez-Frailes C, Ávila J, Zimmermann H, Millán JL, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase regulates purinergic transmission in the central nervous system during development and disease. Comput Struct Biotechnol J. 2015;13:95-100.
8.Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to performing immunofluorescence staining. Yong, W. (eds)Biobanking. Methods in Molecular Biology, vol 1897. Humana Press, New York, NY. 2019:299-311.
9.Burry RW. Controls for immunocytochemistry: an update. J Histochem Cytochem.2011;59(1):6-12.
10.Boghori M, Aghamaali M, Sariri R, Mohamadpour F, Ghafouri H. Salivary enzymes and flow rate: Markers of peptic ulcer. J Oral Biol Craniofac Res. 2014;4(1):24-9.
11.Folgiero V, Migliano E, Tedesco M, Iacovelli S, Bon G, Torre ML, et al. Purification and characterization of adipose-derived stem cells from patients with lipoaspirate transplant. Cell Med. 2010;1(1):3-14.
12.Arinzeh TL. Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. Foot Ankle Clin. 2005;10(4):651-65.
13.Arpornmaeklong P, Brown SE, Wang Z ,Krebsbach PH. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell–derived mesenchymal stem cells. Stem cells dev. 2009;18(7):955-68.
14.Subramani K, Pandruvada S, Puleo D, Hartsfield J, Huja S. In vitro evaluation of osteoblast responses to carbon nanotube-coated titanium surfaces. Prog Orthod. 2016;17(1):1-9.
15.Li W, Zhang S, Liu J, Liu Y, Liang Q. Vitamin K2 stimulates MC3T3-E1 osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction. Mol Med Rep. 2019;19(5):3676-84.
16.Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Current concerns regarding healing of bone defects. Hard tissue. 2013;2(2):1-12.
17.Rilianawati R, Bratakencana J, Harlim A. Differentiation Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast Cell in Early, Middle and Late Passages. Stem Cell Res Ther. 2018;8(5):2-7.
18.Grottkau BE, Lin Y. Osteogenesis of adipose-derived stem cells. Bone res. 2013;1(1):133-45.
19.Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):1-11.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]

20.OakáKeem J, HyunáChung B. Smart nanoprobes for the detection of alkaline phosphatase activity during osteoblast differentiation. ChemComm. 2015;51(15):3270-2.
21.Osathanon T, Giachelli CM, Somerman MJ. Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2009;30(27):4513-21.
22.Birmingham E, Niebur G, McHugh PE. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. Eur Cells Mater. 2012;23:13-27.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.25]