

بررسی تأثیر سینرژیک دگزامتازون و امواج فراصوت با شدت پایین در تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش

خلاصه

مقدمه: در این مطالعه تأثیر سینرژیک دگزامتازون (Dexa) و فراصوت با شدت پایین (LIUS) بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش (rMSCs) مورد بررسی قرار گرفت. فرضیه تحقیق، امکان وجود اثر سینرژیک دو عامل فوق بر القای تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: دستگاه فراصوت با فرکانس ۳ MHz کالیبره شد. از استخوان‌های ران و ساق پای موش جدا شده و کشت داده شدند. سلول‌ها با هدف خالص‌سازی تا پاساژ سوم پیش‌برده شدند. سلول‌های خالص‌شده پاساژ سوم در دو گروه حاوی دگزامتازون با غلظت 10^{-8} میلی‌مول و دگزامتازون و فراصوت با شدت $355 \text{ cm} / \text{mW}$ در مد پیوسته و در زمان ۵ دقیقه به صورت روزانه و تا ۱۴ روز قرار گرفتند در حالی که گروه کنترل فقط دگزامتازون داشت و هیچ فراصوتی دریافت نکرد. آنالیزهای سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و روش RT-PCR نیمه کمی برای بیان ژن‌های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین به ترتیب در روزهای اول، دوم، سوم، پنجم، هفتم، نهم، یازدهم و چهاردهم بعد از تحریک انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت و دگزامتازون به طور معنی‌داری بیشتر از دگزامتازون بود ($p \geq 0.05$) و آنالیز RT-PCR نیمه کمی تفاوت معنی‌داری را در بیان ژن‌های تمایزی در دو گروه نشان داد ($p \geq 0.05$).

نتیجه‌گیری: این تحقیق بیان می‌کند که دگزامتازون و فراصوت کم‌توان در تمایز استئوژنیک MSCها یک اثر سینرژیک می‌باشد و امکان بقای سلولی را نیز افزایش خواهد داد.

واژه‌های کلیدی: دگزامتازون، فراصوت کم‌توان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز استئوژنیک، اثر سینرژیک

داریوش همراهی^۱

محمد باقر شیران^۲

لیلا روحی^۳

محسن خواجه جشوقانی^۴

سپیده سعادت‌مند^۵

دانیال آشیانی^۶

۱. کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. دانشیار فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه فیزیک پزشکی، تهران، ایران.

۳. استادیار زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴. کارشناس ارشد آموزش پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پیراپزشکی، مرکز مطالعات و توسعه آموزش (EDC)، تهران، ایران.

۵. کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، مرکز پرتودرمانی صدا، قم، ایران.

۶. کارشناس ارشد نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، گروه نانوبیوتکنولوژی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: داریوش همراهی، تلفن ۰۹۱۲۵۳۰۴۲۱۷، پست الکترونیک: dariushhamrahi@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) با هدف مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرند. موفقیت استفاده از این سلول‌ها برای نیل به این هدف در گرو بهینه‌سازی مسیر تکوینی تمایزی و زیستی این سلول‌ها قبل از استفاده آن‌ها برای پیوند است [۱]. بسیاری از تحقیقات بنیادی و کلینیکی انجام شده در این زمینه با استفاده از مواد، داروها، فاکتورهای رشد و دیگر کمیت‌های فیزیکی و شیمیایی نشان‌دهنده توانایی این سلول‌ها برای تمایز به رده‌های مختلف سلولی و از جمله مهم‌ترین آن‌ها بافت استخوانی و نقش هریک از کمیت‌ها در پیشبرد و بهینه‌سازی مهندسی بافت استخوان بوده است [۱۴-۲]. محققان از مواد شیمیایی زیادی برای القای تمایز در MSC ها استفاده نموده‌اند که از آن جمله می‌توان اسکوربیک اسید، گلیسرول فسفات، انسولین، دگزامتازون و ... را نام برد [۶، ۷، ۱۰، ۱۵ و ۱۶]. در این میان مشکلی که همواره تحقیقات را تحت تأثیر خود قرار داده است، مرگ‌ومیر سلول‌ها در اثر شوک شیمیایی ناشی از محیط القای تمایزی استفاده شده بوده است [۱۹-۱۷]. از سوی دیگر براساس تحقیقات، دگزامتازون یک داروی شیمیایی کلیدی گزارش شده است که تأثیری پارادوکسی بر تمایز و قدرت بقای سلول‌ها دارا بوده است [۴، ۵، ۲۳-۲۰]. علاوه بر آن، این ماده شیمیایی بر تحریک استخوان‌سازی، سنتز پروتئین‌های مختلف استخوانی و از همه مهم‌تر القای گلیکوکورتیکوئیدها بسیار مؤثر گزارش شده است [۲۴]. با توجه به محدودیت‌های ذکر شده دست‌یابی به روش‌هایی که بازدهی تمایز را افزایش دهد و نیز توانایی حفظ جمعیت سلولی در آن‌ها حفظ شود، از ارزش بالایی در مهندسی بافت و طب ترمیمی برخوردار خواهد بود. از سوی دیگر، فراصوت به‌عنوان یک کمیت فیزیکی پرکاربرد، توانایی‌های خاصی را در القای مسیرهای زیستی، افزایش توان زیستی و تکثیر رده‌های مختلف سلولی، پیشبرد و القای تمایز در سلول‌های مختلف دارا می‌باشد [۱۳، ۱۴ و ۲۷-۲۵]. این ابزار و کمیت فیزیکی ارزان، دردسترس و تقریباً ایمن گزارش شده است [۲۸] که آن را به ابزاری مطمئن در مهندسی بافت تبدیل می‌کند. این تحقیق با هدف بررسی اثر امواج فراصوت و دگزامتازون بر القای تمایز استئوژنیک در سلول‌های MSCs طرح‌ریزی شده است.

روش بررسی

حیوان آزمایشگاهی:

تعداد ۱۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی (Rat) از نژاد Wistar، جنس نر، با سن تقریبی ۸ تا ۱۲ هفته، از پژوهشکده پاستور خریداری شد. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی و در حیوانخانه با غذای دام و گرما و رطوبت کنترل شده نگهداری شدند.

کشت و جداسازی سلول‌های مزانشیمی:

حیوانات با استفاده از کلروفورم کشته شدند و با استفاده از ست جراحی مخصوص حیوانات، استخوان‌های فمور و تیبیا جدا گردید. بافت نرم اطراف آن‌ها در شرایط استریل پاک شد. سپس سلول‌های مغز استخوان هر چهار استخوان با هم مخلوط شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco' Minimum Essential Medium. Gibco, Germany) محتوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, Germany)، ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین، (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Gibco, Germany) قرار گرفت. مغز استخوان از چهار استخوان دراز تیبیا و فمور به روش Flashing جدا شد و در یک لوله حاوی ۱۳ میلی‌لیتر محیط DMEM و آنتی‌بیوتیک قرار گرفت. سلول‌های فوق پس از یک‌بار سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سوسپانس شدند و در فلاسک 75Cm^2 حاوی ۱۲ میلی‌لیتر محیط DMEM و آنتی‌بیوتیک و ۱۵ درصد سرم جنین گاوی منتقل شدند و در شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای 37°C سانتی‌گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیرچسبیده با انجام تعویض محیط و شستشو با PBS دور ریخته شدند و پس از آن محیط سلول‌ها هر ۲ روز یک‌بار با محیط تازه به مدت ۱۰ روز تعویض شد. سلول‌ها پس از این دوره زمانی به منظور افزایش جمعیت سلولی پاساژ داده شدند.

پاساژدهی سلول‌ها:

پس از رسیدن جمعیت سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰ درصد از سطح ظرف کشت، آن‌ها به وسیله محلول PBS شستشو داده شدند سپس با استفاده از آنزیم تریپسین (Trypsin/EDTA, Gibco, Germany) سلول‌ها از کف ظرف جدا شدند. سلول‌ها به نسبت ۱ به ۳ مجدداً کشت داده شدند. تابش فراصوت:

دستگاه فراصوت مدل (Phyaction 190i, Germany) با فرکانس ۳MHz برای کاهش و حذف پدیده حفره‌سازی انتخاب شد [۲۹]. کالیبراسیون منبع فراصوت با استفاده از روش فشار تابشی انجام شد. شدت $2355\text{ cm} / \text{mW}$ برای انجام طرح براساس تحقیقات قبلی محققان انتخاب شد [۱۳ و ۱۴].

بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌ها:

به علت اینکه تا به حال برای سلول‌های مزانشیمی موش مارکر خاصی شناسایی نشده است، در نتیجه برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی بودن سلول‌ها از قابلیت تمایز آن‌ها به استخوان و چربی استفاده شد. سلول‌های پاساژ سوم برای بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی به دو رده استخوان و چربی در محیط‌های القاء تمایزی به مدت ۲۱ روز تمایز داده شدند.

و فراصوت) دریافت نکردند، به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

سنجش بیان آلکالین فسفاتاز:

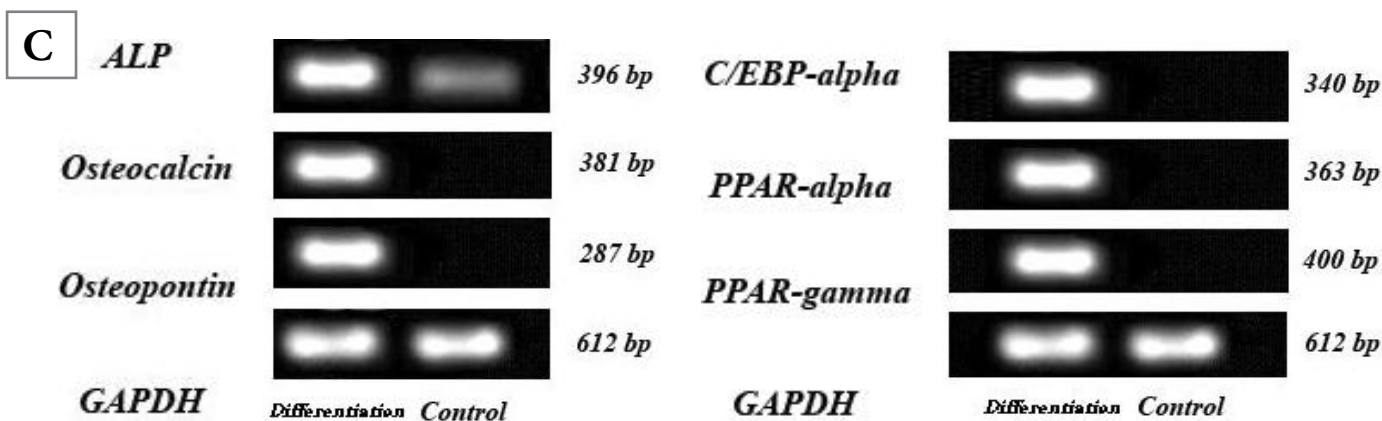
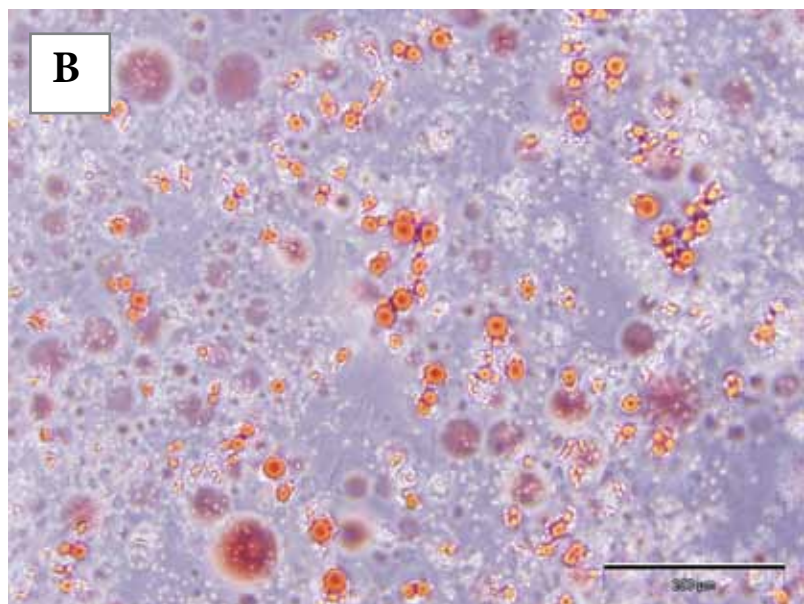
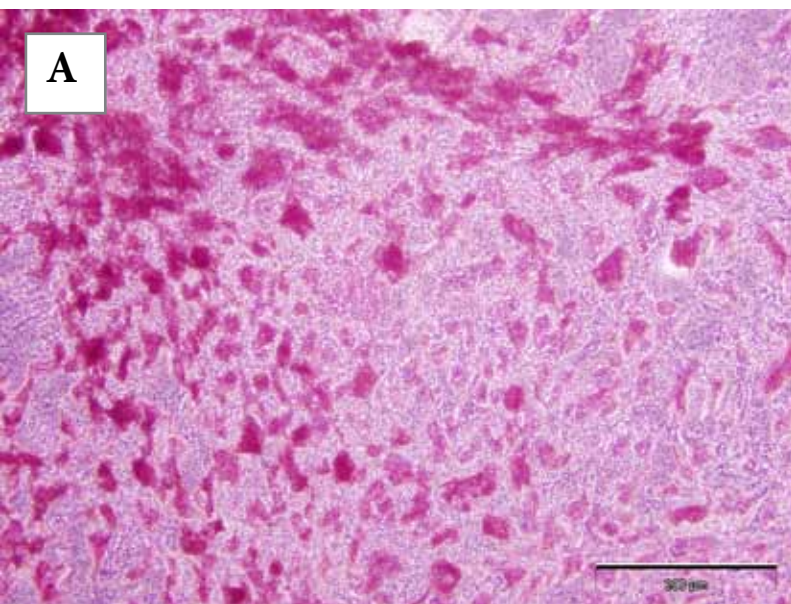
در این روش از کیت سنجش آلکالین فسفاتاز (Product No.85 (SIGMA-ALDRICH) استفاده شد. در این روش سلول‌ها ابتدا به‌وسیلهٔ محلول فیکساتیو سیترات‌استن به‌مدت ۳۰ ثانیه فیکس شدند و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول نمک دیازونیوم قرار گرفتند. سپس سلول‌ها دوبار با آب مقطر شسته و به‌مدت ۳ دقیقه با محلول همتوکسیلین رنگ شدند. سپس سلول‌ها به‌وسیلهٔ میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی و شمارش به‌وسیلهٔ نرم‌افزار Image J قرار گرفتند. میانگین نتایج با یکدیگر به‌وسیلهٔ آزمون آماری T-test مقایسه شد. تست RT-PCR نیمه‌کمی:

برای بررسی بیان ژن‌های تمایز به استخوان از پرایمر ژن‌های

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و تکنیک RT-PCR برای ژن‌های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپوننتین برای بررسی تمایز به استخوان و رنگ‌آمیزی اوایل قرمز و تکنیک RT-PCR برای ژن‌های C/EBP- α ، PPAR- α و PPAR- γ برای بررسی تمایز به چربی استفاده شد [۱۴ و ۳۰].

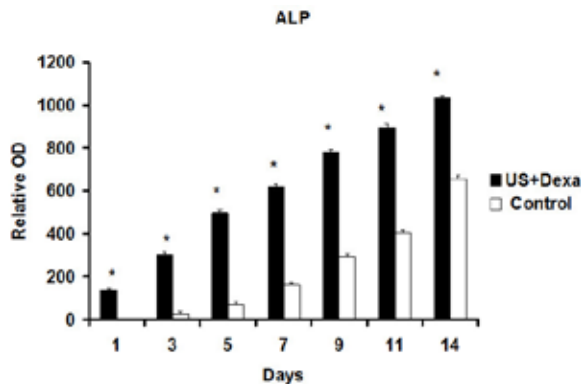
فراصوت و دگزامتازون:

در این تحقیق سلول‌های با محیط حاوی دگزامتازون 10^{-8} mM کامل شده با ۱۵ درصد سرم FCS تحت تابش امواج فراصوت با شدت 355 mW.cm^{-2} و فرکانس ۳MHz در زمان تابش روزانه ۵ دقیقه قرار گرفتند. این فرآیند به‌مدت ۱۴ روز ادامه داشت و بررسی‌های سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و RT-PCR نیمه‌کمی برای بیان ژن‌های تمایز به استخوان در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۴ مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعهٔ حاضر سلول‌هایی که هیچ‌گونه تیماری (دگزامتازون

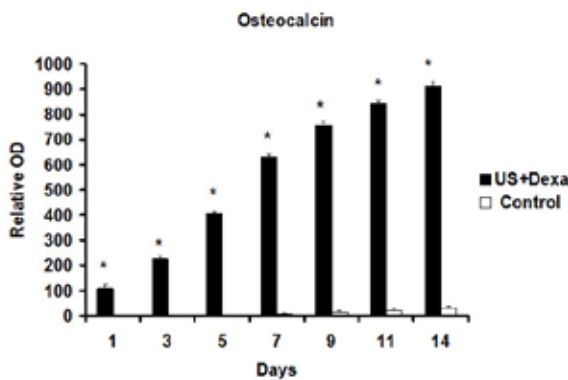


شکل ۱: (A) رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز (B) رنگ‌آمیزی اوایل قرمز (C) نتایج RT-PCR

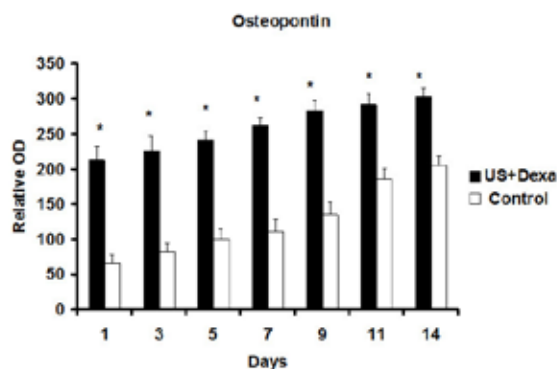
اختلاف معنی‌داری در میزان بیان است (p≤۰/۰۰۵). مقایسه میزان بیان ژن استئوکلسین در دو گروه حاکی از این مطلب بود که فراصوت باعث افزایش معنی‌داری در بیان این ژن نسبت به گروه کنترل می‌شود (p≤۰/۰۰۵). بیان ژن استئوپونتین نیز تحت تأثیر امواج فراصوت افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در این گروه آزمایشی از خود نشان داد (p≤۰/۰۰۵).



نمودار ۲: میزان بیان آلکالین فسفاتاز در بین گروه‌های آزمایشی (p≤۰/۰۰۵)



نمودار ۳: میزان بیان استئوکلسین در بین گروه‌های آزمایشی (p≤۰/۰۰۵)



نمودار ۴: میزان بیان استئوپونتین در بین گروه‌های آزمایشی (p≤۰/۰۰۵)

آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین استفاده شد. ژن مرجع GAPDH انتخاب شد. سلول‌ها در روزهای مورد بررسی از کف ظرف جدا شدند و RNA کل سلول‌های مورد نظر با استفاده از RNX- Plus (Cinagen, Tehran) و مطابق با پروتکل این شرکت جداسازی شد. سپس cDNA تک زنجیره‌ای برای RT-PCR با استفاده از پرایمر oligo (dt) و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622, Fermentas, EU)] تهیه شد و در ادامه واکنش PCR انجام گرفت [۱۴].

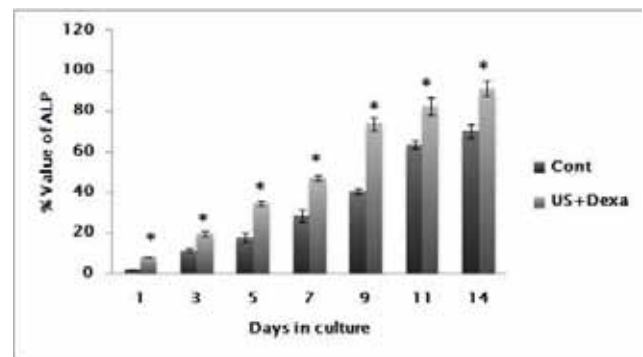
یافته‌ها

بررسی ماهیت سلول‌های مزانشیمی:

برای بررسی ماهیت سلول‌های مزانشیمی از تمایز آن‌ها به درده استخوان و چربی استفاده شد. سلول‌های پاساژ سوم به راحتی به دو رده تمایز یافتند. نتایج رنگ‌آمیزی و RT-PCR مؤید این مطلب است (شکل ۱).

بررسی شاخص‌های تمایز به استخوان پس از تأثیر امواج فراصوت سنجش بیان آلکالین فسفاتاز:

مقایسه نتایج رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در دو گروه نشان داد که میزان بیان آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت در تمامی روزها اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل دارد. تشکیل ندول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت در گروه فراصوت زودتر، تقریباً در همان روز اول شروع می‌شد و این در صورتی است که تشکیل این ندول‌ها در گروه کنترل تقریباً از روز پنجم شروع می‌شود. مقایسه دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (p≤۰/۰۰۵).



نمودار ۱: بیان آلکالین فسفاتاز در اثر فراصوت و دگزامتازون (p≤۰/۰۰۵)

نتایج RT-PCR نیمه کمی

مقایسه نتایج در گروه فراصوت و کنترل در مورد تمامی ژن‌ها اختلاف معنی‌داری را میان دو گروه فراصوت و کنترل نشان می‌دهد. ژن آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت در مقایسه با گروه کنترل دارای

بحث و نتیجه‌گیری

دگزامتازون یک هورمون گلوکوکورتیکوئید است که می‌تواند تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان را تنظیم کند و سبب افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌گردد. مقادیر پایین دگزامتازون، استئوژنز را القاء می‌کند در حالی که مقادیر بالای آن عملکرد استخوان‌سازی را مهار می‌کند [۳۱]. تغییرات سلولی از قبیل تغییراتی در حرکت و تحریک سنتز و ترشح می‌تواند به وسیله امواج فراصوت با شدت پایین که در اصل یک اثر غیر حرارتی می‌باشد، القاء شود. به نظر می‌رسد که این تغییرات با تغییراتی در نفوذپذیری غشاء پلاسمایی سلول‌ها و انتقال یون‌ها و مولکول‌ها در عرض آن همراه است. همچنین در تحقیقاتی نشان داده شده است که نه تنها مسیرهای انتقال غشاء سلولی بلکه مسیرهای خارج سلولی نیز تحت تأثیر این امواج قرار می‌گیرند. البته باید در نظر داشت که اگرچه تغییرات غشایی از نظر درمانی ارزشمند هستند، ولی اگر این تغییرات در طول تکوین رخ دهند ممکن است اثرهای معکوس داشته باشند. معمولاً تعیین شدن به دنبال بیان انتخابی ژن‌ها و تمایز رخ می‌دهد که سبب افزایش پیچیدگی در ساختار می‌گردد. اثر سینرژیک دگزامتازون و امواج فراصوت با شدت پایین برای تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است.

در تحقیق حاضر، بیان آلکالین فسفاتاز در هر دو گروه نشان‌دهنده توانایی دگزامتازون به تنهایی در پیشبرد تمایز استئوژنیک در MSC ها می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند که با افزودن فراصوت در تمامی روزها بیان آلکالین فسفاتاز چه در مقیاس سلولی و چه در سطح ژنی افزایش معنی‌داری را در پی خواهد داشت. این فرآیند را می‌توان به عنوان یک اثر سینرژیک دانست زیرا در تحقیق دیگری که انجام گرفته است، فراصوت به تنهایی توانایی برانگیزش بیان آلکالین فسفاتاز را در سطح سلولی و ژنی دارا می‌باشد [۱۴]. بیان دیگر ژن‌های مسیر تمایزی استئوژنیک در این طرح تأییدی بر توانایی دگزامتازون به عنوان فاکتور کلیدی تمایز می‌باشد و نیز اثر سینرژیک فراصوت با آن را در این فرآیند خاطر نشان می‌کند. جالب توجه است که با افزایش القای تمایز در اثر این سینرژیک، سلول‌ها از کف ظرف کنده نشدند و مرگ‌ومیر سلولی در تمام طرح مشاهده نشد. در سال ۱۹۹۸، BRUDER و همکاران نشان دادند که سلول‌های

MSC قابلیت تمایز به رده‌های مزودرمی از جمله استخوان، غضروف، تاندون، عضله و چربی را دارا می‌باشند [۳۲]. یکسال پس از وی در سال ۱۹۹۹، Kim و همکاران در مقاله‌ای اثر داروی دگزامتازون را بر تکثیر، فعالیت و ترشح سایتوکاین‌ها در سلول‌های استرومال استخوانی بررسی نمودند و نشان دادند که دگزامتازون مکانیسم گلوکوکورتیکوئیدها را فعال می‌کند و عامل اساسی ساخت ماتریس خارج سلولی استخوانی خواهد شد [۲۲]. در همان سال، Mori و همکاران توانایی دگزامتازون را در دیگر تمایزهای MSC ها نشان دادند [۲۳]. غلظت بهینه دگزامتازون برای القای تمایز توسط Walsh در سال ۲۰۰۱ انتشار یافت ولی غلظت‌های اشباع این ماده را ممانعت‌کننده تمایز عنوان نمود [۱۵]. تحقیقات محققان دیگر نشان‌دهنده تأثیر کلیدی دگزامتازون در فرآیندهای تمایزی سلول‌های بنیادی می‌باشند [۱۱-۷، ۱۶ و ۳۵-۳۳]. بنابراین بدون دگزامتازون تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت دودمان استئوژنیک به سختی انجام خواهد شد که این نتیجه به وسیله کاهش فعالیت ALP نشان داده شد (نمودار ۲). این مشاهده‌ها پیشنهاد می‌کند دگزامتازون یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی در تمایز استئوژنیک می‌باشد.

در سال ۱۹۸۰، Chapman و همکاران نشان دادند که فراصوت توانایی افزایش ترشح سایتوکاین‌ها را دارا می‌باشد [۳۶]. Ryaby و همکاران گزارش نمودند که فراصوت در مد پالسی توانایی افزایش کلسیم درون سلولی را دارا می‌باشد و بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ سلولی را پیش می‌برد [۳۹-۳۷]. تحقیقات دیگر محققان بیانگر توانایی فراصوت کم‌توان در القاء و پیشبرد تمایز در سلول‌های بنیادی می‌باشد [۱۴ و ۴۴-۴۰].

به نظر می‌رسد این فرآیند که با دو عامل یکی فیزیکی و دیگری شیمیایی رخ داده علاوه بر القای تمایز بر قابلیت بقای MSCs نیز مؤثر بوده است که خود دستاورد بزرگی در مهندسی بافت به شمار می‌آید. در نهایت این تحقیق قویاً بیان می‌کند که اثر سینرژیک دگزامتازون و فراصوت کم‌توان در تمایز استئوژنیک MSCs یک اثر سینرژستیک می‌باشد و امکان بقای سلولی را نیز افزایش خواهد داد.

References:

1. Mostafa NZ, Fitzsimmons R, Major PW, Adesida A, Jomha N, Jiang H, Uludağ H. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2. *Connect Tissue Res* 2012; 53(2): 117-31.
2. Tekkate C, Kapadia NK, Verma RS. Enhancement of adipogenic and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by supplementation with umbilical cord blood serum. *Cell Tissue Res* 2012; 347(2): 383-95.
3. Grigoriadis AE, Aubin JE. Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone. *J Cell Biol* 1988; 106: 2139-51.
4. Hanada K, Caplan AI. Stimulatory Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1606-14.
5. Jaiswal N, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64(2): 295-312.
6. Jaiswal RK, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation to the Osteogenic or Adipogenic Lineage Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(13): 9645-52.
7. Lee HS, Chiou LL, Tsai KS, Jiang CC, Yang PC, Yang PM, Huang GT. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myeloproliferative disorders. *J Formos Med Assoc* 2002; 101(2): 124-8.
8. Mendes SC, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, Oner FC, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA. Bone Tissue-Engineered Implants Using Human Bone Marrow Stromal Cells: Effect of Culture Conditions and Donor Age. *Tissue Eng* 2002; 8(6): 911-20.
9. Kitamura S, Hirose M, Funaoka H, Takakura Y, Ito H. Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. *Artif Organs* 2004; 28(1): 72-82.
10. Beloti MM. Osteoblast Differentiation of Human Bone Marrow Cells Under Continuous and Discontinuous Treatment with Dexamethasone. *Braz Dent J* 2005; 16(2): 156-61.
11. Friedman MS, Hankenson KD. Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Is Regulated by Bone Morphogenetic Protein-6. *J Cell Biochem* 2006; 98: 538-54.
12. Haasper C, Hesse E, Krettek C, Zeichen J, Jagodzinski M. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (hBMSC) by cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone. *Z Orthop Unfall* 2008; 146(5): 636-43.
13. Hamrahi D, Bagheban Eslaminegad MR, Gourabi H, Rohi L. Low Intensity Ultrasound, Proliferation & Growth Indexes in Adult Stem Cell. *Lasers in Medicine* 2011; 8(1): 29-34.
14. Hamrahi D, Bagheban Eslaminegad MR, Gourabi H, Rouhi L. Effect of low- Intensity Ultrasound on Osteogenic Differentiation of Rat Bone- Marrow Mesenchymal Stem Cell: An in vitro study. *Lasers in Medicine* 2008; 5(2): 6-11.
15. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentration of

dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology* 2001; 40: 74-83.

16. Temenoff JS, Park H, Jabbari E, Sheffield TL, LeBaron RG, Ambrose CG, Mikos AG. In vitro osteogenic differentiation of marrow stromal cells encapsulated in biodegradable hydrogels. *Biomed Mater Res* 2004; 70A: 235-44.

17. de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, van Blitterswijk C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 2004; 34(5): 818-26.

18. Xiao J, Wu Y, Chen R, Lin Y, Wu L, Tian W, Liu L. Expression of Pcp4 gene during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Cell Biochem* 2008; 309(1-2): 143-50.

19. Hildebrandt C, Büth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 2009; 191(1): 23-32.

20. McCulloch CA. Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec* 1986; 215(4): 397-402.

21. Kamalia N, Tenebaum HC, Limeback H. Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures. *Blood* 1992; 79: 320-6.

22. Kim CH, Kim GS. Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *J Endocrinol*

1999; 162: 371-9.

23. Mori K, Jono S, Nishizawa Y, Morii H. Dexamethasone Enhances In Vitro Vascular Calcification by Promoting Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2112-8.

24. Yamanouchi K, Gotoh Y, Nagayama M. Dexamethasone enhances differentiation of human osteoblastic cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 1997; 15(1): 23-9.

25. Selivanov VA, Zinchenko VP, Sarvazian AP. [Mechanism of low intensity ultrasound effect on mitochondria]. *Biofizika* 1982; 27(4): 653-6.

26. Shakouri K, Eftekharsadat B, Oskuie MR, Soleimanpour J, Tarzamni MK, Salekzamani Y, Hoshyar Y, Nezami N. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on fracture callus mineral density and flexural strength in rabbit tibial fresh fracture. *J Orthop Sci* 2010; 15(2): 240-4.

27. Tsai MT, Lin DJ, Huang S, Lin HT, Chang WH. Osteogenic differentiation is synergistically influenced by osteoinductive treatment and direct cell-cell contact between murine osteoblasts and mesenchymal stem cells. *Int Orthop* 2012; 36(1): 199-205.

28. Walsh WR, Langdown AJ, Auld JW, Stephens P, Yu Y, Vizesi F, Bruce WJ, Pounder N. Effect of low intensity pulsed ultrasound on healing of an ulna defect filled with a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 86(1): 74-81.

29. Wells PN. Ultrasonics: a window into biomedical science. *Ultrasonics* 1992; 30(1): 3-7.

30. Eslaminejad MB, Hosseini RH. Expression of thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal

stem cells cultivation period. *Dev Growth Differ* 2007; 49: 351-64.

31. Liu YC, Huang WK, Lin KY, Wu SC, Hsu SC, Schuyler SC, Li LY, Leigh Lu F, Lu J. CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone. *Biosci Trends* 2014; 8(3): 138-43.

32. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. Mesenchymal Stem Cell Surface Antigen SB-10 Corresponds to Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and Is Involved in Osteogenic Differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 655-63.

33. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003; 123: 702-11.

34. Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. Dexamethasone-functionalized gels induce osteogenic differentiation of encapsulated hMSCs. *J Biomed Mater Res* 2005; 76A: 183-95.

35. Chapman IV, MacNally NA, Tucker S. Ultrasound-induced changes in rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1980; 6: 47-58.

36. Ryaby JT, Bendo JA. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc* 1989; 14: 15.

37. Ryaby JT, Pilla AA, Duarte-Alves P. Low-intensity pulsed ultrasound modulates adenylate cyclase activity and transforming growth factor beta synthesis. Brighton CT, Pollack SR, editors. *Electromagnetics in medicine and biology*. San

Francisco: San Francisco Press 1991; 95-100.

38. Ryaby JT, Duarte-Alves P. Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase activity and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. *Trans Orthop Res Soc* 1992; 7.

39. Wu C-C, Bolander ME. Exposure to low intensity ultrasound stimulates aggrecan gene expression by cultured chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* 1996; 21: 622.

40. Guzmán HR, Nguyen DX, Khan S, Prausnitz MR. Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. I. Quantification of molecular uptake and cell viability. *J Acoust Soc Am* 2001; 110(1): 588-96.

41. Shimazaki A, Inui K, Azuma Y, Nishimura N, Yamano Y. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. *British Editorial Society of Bone and Joint Surgery* 2000; 82-B(7): 1077-82.

42. El-Bialy. Low Intensity Pulsed Ultrasound: A Laboratory and Clinical Promoter in Tissue Engineering. *Tissue Engineering* 2005; 58.

43. Kobayashi Y, Sakai D, Iwashina T, Iwabuchi S, Mochida J. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell line. *Eur Cell Mater* 2009; 17: 15-22.

44. Angle SR, Sena K, Sumner DR, Viridi AS. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasonics* 2011; 51: 281-8.