

تأثیر امواج فراصوت با شدت پائین بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت در محیط آزمایشگاهی

خلاصه

هدف: در این مطالعه تأثیر فراصوت با شدت پائین بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت. فرض بر امکان توانایی اثر برانگیزشی LIUS بر یک سیستم بیولوژیکی در محیط آزمایشگاهی بوسیله‌ی القاء تمایز در rMSCs و پیشبرد آن به سمت استئوژنیزس بود.

مواد و روش‌ها: دستگاه فراصوت با فرکانس ۳MHz با روش فشار تابشی کالیبره شد. rMSCs از کانال مرکزی استخوان‌های تیبیا و فمور رت جدا شده و در محیط کامل شده با سرم FBS کشت داده شد. کشت سلول‌ها تا پاساژ سوم با هدف خالص سازی آنها پیش برده شد. گروه آزمایش روزانه به مدت ۵ دقیقه فراصوت را با فرکانس ۳MHz و شدت 355 mW.cm^{-2} و در مد پیوسته تا دو هفته دریافت کردند درحالی که گروه کنترل فراصوت دریافت نکرد. آنالیزهای سنجش فعالیت آلكالین فسفاتاز و روش RT-PCR نیمه کمی برای بیان ژنهای آلكالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپوننتین در روزهای اول تا چهاردهم بعد از تحریک با فراصوت بصورت یکرز در میان انجام گرفت. نتایج: نشان داد که فعالیت آلكالین فسفاتاز در گروه فراصوت بطور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ($12 \pm 88/6\%$ در مقابل $23 \pm 30/14\%$) ($p \leq 0/005$). نتایج RT-PCR نیمه کمی بیان ژن‌های تمایزی از تفاوت معنی‌داری را در دو گروه نشان داد ($p \leq 0/005$).

نتیجه گیری: این مطالعه قویاً بیان می‌کند که فراصوت توانایی برانگیزش استئوژنیزس rMSCs را در محیط آزمایشگاهی دارد.

واژه‌های کلیدی: فراصوت با شدت پائین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت (rMSCs)، تمایز استئوژنیک

داریوش همراهی^۱

دکتر محمدباقر شیران^۱

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد^۲

دکتر حمید گورابی^۳

لیلا روحی^۴

^۱ گروه فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۲ پژوهشکده رویان - گروه سلول‌های بنیادین بالغین

^۳ پژوهشکده رویان - گروه ژنتیک

^۴ دانشجوی دکتری زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه آزاد

اسلامی واحد علوم تحقیقات فارس

نویسنده مسئول: دکتر حمید گورابی، بزرگراه رسالت، خیابان بنی هاشم شمالی، خیابان حافظ، پ ۱۲، پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک، تلفن: ۲۲۳۰۶۴۸۰ پست الکترونیک: gourabi@royaninstitute.org

مقدمه

تحقیقات بسیاری نشان دهنده‌ی این موضوع هستند که فراصوت توانایی تغییر در غشای سلول (چسبندگی سلولی، تأثیر در تراوایی غشاء، جریان کلسیم و توان تکثیر سلول‌ها) و نیز توانایی فعال سازی مسیرهای گذردهی سیگنالی که منجر به بیان ژنی می‌شود را دارا می‌باشد. تابش فراصوت باعث افزایش مقدار کلسیم درون سلولی می‌شود و سلول از آن به عنوان کوفاکتوری که می‌تواند مسیرهای گذردهی سیگنالی را فعال کند استفاده می‌کند و نتیجه‌ی آن بیان ژنی است [۱].

همچنین فراصوت توانایی افزایش برانگیزش بیان فاکتورهای بسیاری را در انواع سلول‌ها از جمله $\text{IL-}\beta$ ، $\text{IL-}\gamma$ ، $\text{TGF-}\beta$ و ... را دارا می‌باشد. نظریاتی نیز در این مورد وجود دارد که مبتنی بر فرضیه‌ی تشدید فرکانسی فراصوت است. بر اساس این فرضیه فراصوت توانایی تغییر در شکل گیری سه بعدی پروتئین‌ها و آنزیم‌های درون سلولی و ایجاد مناطق Active Site و نیز برداشت مهارکننده‌ها را از ساختمان پروتئین‌ها و آنزیم‌ها دارا می‌باشد [۲، ۳ و ۴]. در سال

۱۹۹۹، Parvizi et al بیان ژن آگریکان و افزایش سنتز پروتوگلیکان را در سلول‌های غضروف در حال تمایز نشان دادند [۵].

در سال ۱۹۹۹ در مطالعه‌ای که توسط Kokubu و همکاران در مورد اثر امواج فراصوت با شدت‌های پایین بر روی سلول‌های رده‌ی استخوانی MC3T3 موشی انجام شده، نشان داد که این امواج توانایی برانگیزش بیان $\text{PGE}_2/\text{COX-2}$ را دارا می‌باشند [۶]. در سال ۲۰۰۰، Ito و همکاران مطالعه‌ای را بر روی سلول‌های SaOs-2 از رده سلول‌های استئوبلاستی انجام دادند و افزایش آزاد شدن PDGF-AB را در این رده سلولی در اثر تیمار با شدت‌های پایین گزارش کردند [۷]. در سال ۲۰۰۵، Jui-Shong sun اثر امواج فراصوت پالسی با شدت پایین (فرکانس ۱MHz و شدت $0/068 \text{ W.cm}^{-2}$) را بر سلول‌های استخوانی رت بررسی کردند. آنها کاهش معنی‌دار استئوکلاستها و نیز افزایش برانگیزش TNF-alpha را گزارش کردند [۸].

در سال ۲۰۰۴، Lijk و همکاران آزاد شدن برخی از سیتوکاین‌ها مانند TGF-B1 را از سلول‌های استئوبلاست پس از قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت گزارش نمودند [۹].

و تکنیک RT-PCR برای ژنهای PPAR- α , PPAR- γ , C/EBP- α استفاده شد [۱۰].

تابش فراصوت:

دستگاه فراصوت مدل (Phyaction 190i-Germany) با فرکانس ۳MHz برای کاهش و حذف پدیده حفره سازی انتخاب شد [۱۹]. کالیبراسیون منبع فراصوت با استفاده از روش فشار تابشی انجام شد. در این روش با استفاده از ترازوی با دقت بالا (حدود ۰/۰۰۱ گرم) فشار تابشی موج فراصوت اندازه گیری شد [۲۰]. ناحیه دورترین فاصله محوری با استفاده از کاغذ و رنگ بدست آمده و از شکل بدست آمده برای میدان فراصوت برای محاسبه بیشترین شدت (Peak Intensity) به روش ارائه شده توسط (G.Kossof (1962 بدست آمد [۲۱]. برای یافتن منطقه دقیق آن از ترموکوپل نوع T با ضخامت حدود ۰/۵ میلیمتر استفاده شد. بعد از یافتن LAM (Last Axial Maximum) شدت و زمان مناسب برای آزمایش بر مبنای ثابت بودن دمای درون ظرف کشت در ناحیه LAM و در پلیت ۱۲ چاهکی بدست آمد (کمتر از ۱ درجه سانتیگراد افزایش دما مجاز بود). علت استفاده از ظرف کشت ۱۲ چاهکی انطباق آن با ابعاد میدان فراصوت بود. برای اطمینان از صحت آزمایش دما در دو طرف درون و بیرون چاهک و نیز در ۲ میلیمتری کف آن در محیط آب برای شدت انتخاب شده (355 mW.cm^{-2}) بدست آمد.

برای جلوگیری از بوجود آمدن امواج ایستاده^۱ چاهک از محیط کشت کاملاً پر شده و بر روی درب ظرف از ژل فراصوت استفاده شد و بر روی آن قطعه ای از پرسپکس با ضخامت ۵ سانتیمتر قرار داده شد. **سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز:**

در این روش از کیست سنجش آلکالین فسفاتاز (Product No.85 SIGMA-ALDRICH) استفاده شد. در این روش سلول ها ابتدا بوسیله محلول فیکساتیو سیترات- استن به مدت ۳۰ ثانیه فیکس شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول نمک دیازونیوم قرار گرفت. سپس سلولها را دو بار با آب مقطر شسته و به مدت ۳ دقیقه با محلول هوماتوکسیلین رنگ شد. سپس سلول ها بوسیله میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی و شمارش بوسیله نرم افزار Image J قرار گرفت. میانگین نتایج با یگدیگر بوسیله آزمون آماری T-test مقایسه شد.

آنالیز RT-PCR و RT-PCR نیمه کمی:

برای بررسی بیان ژنهای تمایز به استخوان از پرایمر ژنهای آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونین استفاده شد. ژن مرجع^۲ GAPDH انتخاب شد. برای این منظور RNA کل سلولهای مورد نظر با استفاده از RNX- Plus (Cinagen, Tehran) و مطابق با

از سوی دیگر، مطالعات بسیاری در مورد سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) بعنوان یک منبع جایگزین مناسب سلولی برای پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت های استخوان، بر اساس قابلیت تمایز آنها به رده های استخوانی و نیز پایداری فنوتیپی آنها در پاساژهای متوالی، انجام گرفته است. بر پایه این مطالعات استئوژنیز در سلول های مزانشیمی نیازمند شرایط کشت خاص، همچون فاکتورهای رشد مختلف، مواد شیمیایی و عوامل فیزیکی متنوع است [۱۰-۱۸]. این طرح، با تکیه بر مطالعات گذشته، با هدف استفاده از توانایی امواج فراصوت در القای تمایز استئوژنیک در سلول های بنیادی مزانشیمی، به عنوان یک عامل فیزیکی ایمن، ارزان و در دسترس انجام گرفت.

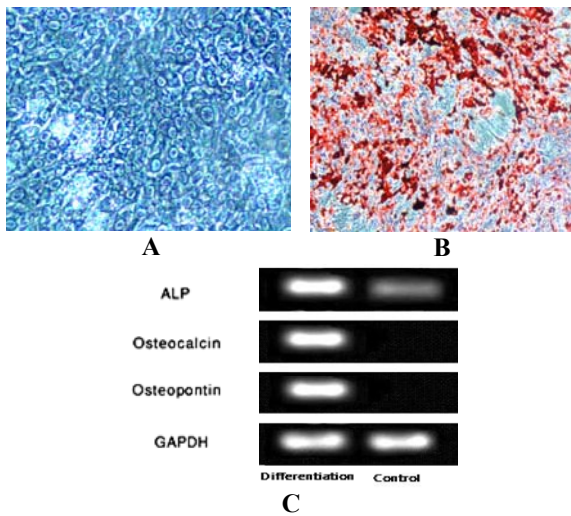
روش بررسی

کشت و جداسازی سلول های مزانشیمی:

تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر، نژاد Wistar، با سن تقریبی ۴-۶ هفته بوسیله CO_2 کشته شده، استخوانهای فمور و تیبیا جدا گردید. بافت نرم اطراف آنها پاک شد و داخل محیط DMEM (Dublecco's Minimum Essential Medium. Gibco. USA) محتوی ۱۵٪ FBS (Gibco) و ۱۰۰ واحد بین المللی استریپتومايسين (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین (Gibco, Germany) قرار گرفت. مغز استخوان از چهار استخوان دراز تیبیا و فمور به روش Flashing جدا شده و در داخل یک لوله حاوی ۱۳ میلی لیتر محیط DMEM و آنتی بیوتیک قرار گرفت. سلول های فوق پس از یکبار سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه به یک فلاسک ۷۵ سانتیمتر مربع حاوی ۱۲ میلی لیتر محیط DMEM محتوی آنتی بیوتیک و ۱۵٪ FBS منتقل شده و در شرایط ۵٪ CO_2 و دمای 35°C و رطوبت اشباع کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول های غیر چسبنده با انجام تعویض محیط و شستشو با PBS^+ دور ریخته شدند و پس از آن، محیط کشت سلولها، ۴ روز یکبار تعویض شد. ۱۰ روز پس از آغاز کشت، ۹۰-۸۰ درصد کف ظرف پر از سلول شد که در این زمان، اولین پاساژ سلولی با استفاده از ۰.۰۵٪ Trypsin/EDTA انجام گرفت. سلول ها تا سه پاساژ با هدف رسیدن به جمعیتی تقریباً خالص از rMSCs پیش برده شدند و از سلول های پاساژ سوم برای انجام آنالیزها استفاده شد. سلول های پاساژ سوم برای بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی به دو رده استخوان و چربی در پلیت های ۶ خانه به مدت ۲۱ روز تحت تأثیر محیط های القای تمایزی، قرار داده شدند. به منظور بررسی تمایز سلول ها به استخوان از رنگ آمیزی آلیزارین رد و تکنیک RT-PCR برای ژن های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونین و برای بررسی تمایز آنها به چربی از رنگ آمیزی اوایل رد

1- Standing Waves
2- House Keeping Gene

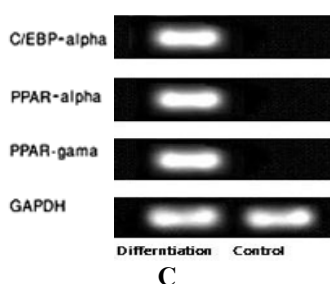
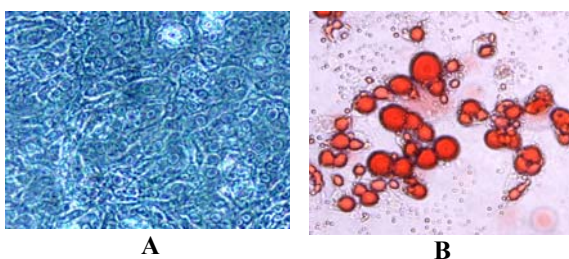
چهاردهم از نظر بیان آلکالین فسفاتاز بررسی شدند. نکته قابل توجه در



شکل ۱- تمایز به سلول های استخوانی

(A) سلول های تمایز یافته به سلول های استخوانی (B) رنگ آمیزی آلیزارین رد (C) نتایج RT-PCR (بار برابر ۵۰۰ میکرومتر)

این مورد این است که در گروه آزمایشی در روز هفتم، الگوی رنگ‌شدگی سلول‌ها توسط آلکالین فسفاتاز در ظرف کشت، منطبق بر شکل میدان فراصوت بود. این شکل در روز یازدهم مشخص‌ترین حالت خود را داشت و در روز چهاردهم از بین رفت. در گروه کنترل رنگ‌پذیری سلول‌ها در طول کشت با افزایش روزهای کشت افزایش می‌یافت. در این گروه کلون‌هایی با بیان آلکالین فسفاتاز مشاهده شدند. مقدار فعالیت آلکالین فسفاتاز در این گروه برای نمونه فراصوت بطور معنی داری از گروه کنترل بیشتر بود ($P \leq 0.05$).



شکل ۲- تمایز سلول ها به چربی

(A) سلول‌های تمایز یافته به آدیپوسیت (B) رنگ آمیزی اوایل رد (C) نتایج RT-PCR (بار برابر ۵۰۰ میکرومتر)

پروتکل این شرکت جداسازی شد. سپس cDNA تک زنجیره‌ای برای RT-PCR با استفاده از پرایمر (dt) oligo و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622, Fermentas, EU)] تهیه شد. در ادامه واکنش PCR در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای Annealing به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی و در ۳۵ سیکل انجام شد. ژن House Keeping در سیکل بیست و چهارم از چرخه PCR خارج شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۷ درصد آگاروز ریخته شده و پس از گذشت حدود نیم ساعت از اعمال ولتاژ ژن مرجع به هر یک از چاهک‌ها اضافه شده و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس ارزیابی شد. ارزیابی نیمه کمی با استفاده از نرم افزار UV Band Map انجام گرفت.

سلول‌ها در روز ۲۱ از لحاظ بیان ژن‌های استخوانی نظیر استئوکلسین، استئوپونتین و آلکالین فسفاتاز (ALP) و ژن‌های چربی از قبیل C/EBP-alpha, PPAR-alpha, PPAR-gamma مورد بررسی قرار گرفتند (جدول شماره ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در بررسی تمایز و دمای واسرشتگی

Target cDNA	Primer Sequence(5'-3')	Size Product	Annealing temperature (C°)	PCR cycles
ALP	F:CGGACCTGCCTTACCAACTCATTGTGCC R: CGCACGGGATGCAACCACTCAGG	396	72	35
Osteopontin	F: GATTATAGTGACACAGAC R: AGCAGGAATACTAAGTGC	287	50	35
Osteocalcin	F: GTCCCAACAAGCAACTCG R: CCAAAGCTGAAGCTGCCG	381	56	35
C/EBP-alpha	F: ACGTGGAGACGACAGAGAA R: AGGCGGTCATTGTCACTGG	340	61	35
PPAR-alpha	F: CCCTGCCTTCCCTGTGAAGTGC R: GGGACTCATCTGACTGGTGGGAC	363	70	35
PPAR-gama	F: GGTGAAACTCTGGGAGATCC R: TGAGGGAGTTTGAAGACTCTTC	400	57	35
GAPDH	F: TGCTGAGTATGCTGGGAGTC R: AAAGTGGGAAGATGGGAG	380	53	24,35

یافته‌ها

بررسی ماهیت سلول های مزانشیمی:

برای بررسی ماهیت سلول های مزانشیمی از تمایز آنها به دو رده استخوان و چربی استفاده شد. سلول های پاساژ سوم به راحتی به دو رده تمایز یافتند. نتایج رنگ آمیزی و RT-PCR مؤید این مطلب است.

بررسی شاخص‌های تمایز به استخوان پس از تأثیر امواج فراصوت

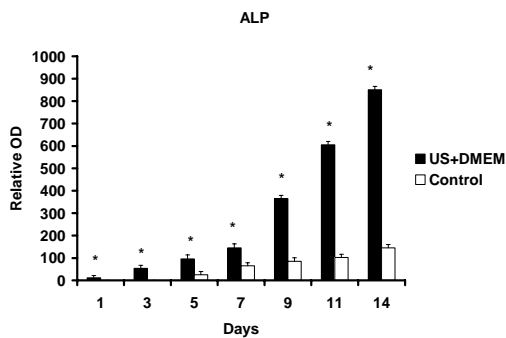
رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز:

با استفاده از این روش سلول‌هایی که تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته بودند در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم، نهم، یازدهم و

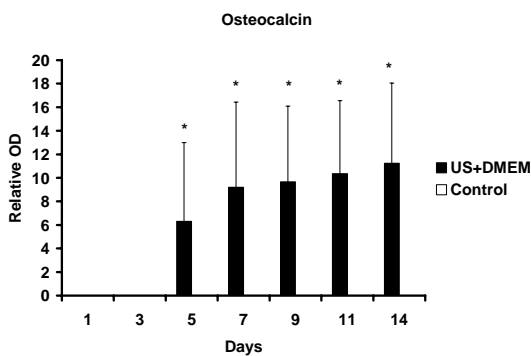
صورتی که در نمونه کنترل فقط در روزهای پایانی بیان کمی داشت. اختلاف میان این دو گروه معنی دار بود ($P \leq 0.05$).

آنالیز آماری:

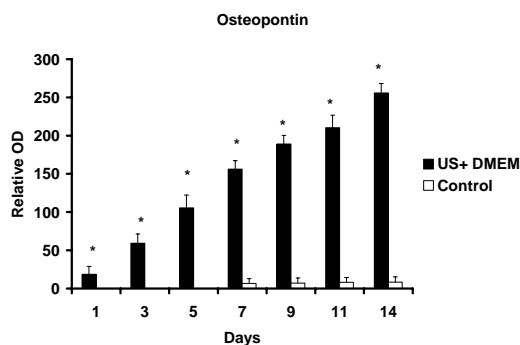
هر یک از قسمت های آزمایش برای ۱۰ نمونه، سه بار تکرار شده و میانگین نتایج با یگدیگر بوسیله آزمون آماری T-test از جهت معنی دار بودن یا نبودن نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 13.0 مورد بررسی قرار گرفتند.



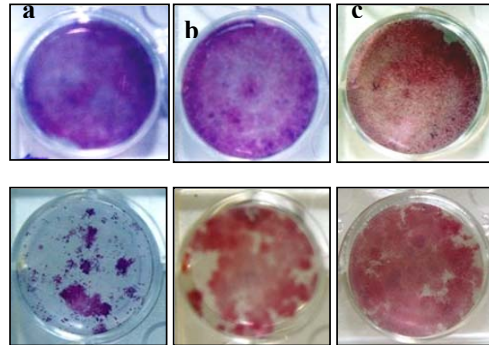
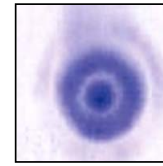
شکل ۵- میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز در دو گروه فراصوت و کنترل ($*=P<0.005$)



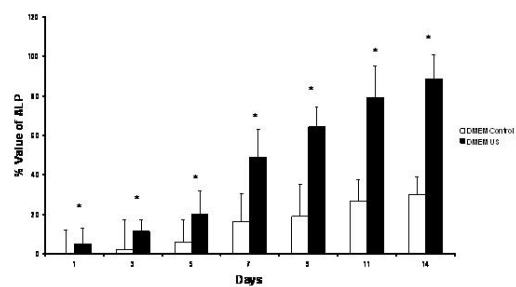
شکل ۶- میزان بیان استئوکلسین در دو گروه فراصوت و کنترل ($*=P<0.005$)



شکل ۷- میزان بیان ژن استئوپونتین در دو گروه فراصوت و کنترل ($*=P<0.005$)



شکل ۳- بیان آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت در روزهای نهم، یازدهم و چهاردهم (a, b, c) و گروه فراصوت. به شکل میدان فراصوت در پلیت توجه شود (A)



شکل ۴- بیان آلکالین فسفاتاز در دو گروه فراصوت و کنترل ($*=P<0.005$)

نتایج RT-PCR نیمه کمی:

نتایج نشان داد که بیان ژن آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت بیشتر از این میزان در گروه کنترل بود. به طوری که اختلاف میان دو گروه در بیان این ژن معنی دار بود ($P \leq 0.05$). نتایج نشان دادند که در گروه کنترل تا پایان روز چهاردهم ژن استئوکلسین بیانی نداشت، اما در گروه فراصوت این ژن از روز سوم بیان داشت و تا روز چهاردهم بیان آن به صورت افزایشی بود. اختلاف میان دو گروه کنترل و فراصوت معنی دار بود ($P \leq 0.01$). در مورد بیان ژن استئوپونتین نتایج نشان داد که این ژن از روز اول بیان شده و تا روز چهاردهم افزایش صعودی را در گروه فراصوت از خود نشان می داد. در

بحث

چنانچه مشاهده می شود در روز هفتم بعد از اعمال فراصوت، بیان آلکالین فسفاتاز، با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی، دقیقاً شکل میدان فراصوت را داشته و این شکل در روز یازدهم بیشترین وضوح خود را یافته و در روز چهاردهم رنگ پذیری به اندازه ای شدید است که اثر میدان محو می شود. این یافته حاکی از آن است که بخش فشار مثبت موج فراصوت نسبت به بخش فشار منفی در بیان آلکالین فسفاتاز مؤثرتر است. یافته‌های ما در مورد افزایش بیان ژن های تمایز به استخوان حاکی از این است که فراصوت به تنهایی به عنوان یک کمیت فیزیکی قادر به القاء بیان ژن‌های نشان دهنده تمایز، بویژه استئوکلسین ($P \leq 0.005$)، در سطح mRNA است که به نوبه خود با مواد شیمیایی قابل قیاس است. این امواج با افزایش میزان یون کلسیم درون سلولی در هنگام تابش به سلول، این پیامبر ثانویه را در سلول فعال می کند، که خود باعث بیان برخی ژن ها خواهد شد. البته چون کلسیم خود از عوامل شناسائی استخوان است ممکن است باعث جهت دادن تمایز به سمت سلول های استئوژنیکی شود. از طرفی بر طبق نظریه تشدید فرکانسی فراصوت با تغییر در شکل برخی از پروتئین ها و ترکیبات ماکرو مولکولی در سلول باعث برانگیزش برخی پاسخ ها در سلول - از جمله بیان ژن های تمایز به استخوان - خواهد شد.

نتیجه گیری

این مطالعه قویاً بیان می کند که این امکان برای فراصوت به عنوان یک کمیت فیزیکی ارزان، در دسترس و ایمن، وجود دارد که برخی تأثیرات برانگیزشی را در محیط آزمایشگاهی بر استئوژنیز rMSCs داشته باشد.

در سال ۲۰۰۱، Andrades بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی به رده‌های استخوان و غضروف بیان آلکالین فسفاتاز و تولید استئوکلسین را عامل شناخت تمایز Chondro-Osteogenic برشمرده. او با استفاده از القاء تمایز با استفاده از موادی از قبیل دگزامتازون و بتاگلیسرول فسفات تمایز را در این رده سلولی القاء کرد [۲۲]. تحقیقات محققین دیگر نیز حاکی از تأثیر مواد شیمیایی مختلف بر تمایز سلول‌های مزانشیمی است [۲۳-۲۵]. Hogan و همکاران در سال ۲۰۰۳ تأثیر فراصوت با شدت پایین را بر تمایز استئوبلاست ها بررسی کردند. آنها با تابش فراصوت با شدت 2 cm^{-2} و فرکانس ۱/۵MHz به مدت ۲۸ روز روزانه ۲۰ دقیقه در گروه‌های دو و سه بار در روز، افزایش بیان ALP را از روز چهاردهم گزارش کردند. همچنین نتایج آنها حاکی از این بود که هر چه دفعات تابش فراصوت روزانه بیشتر باشد تشکیل استخوان بیشتر خواهد بود [۲۶]. Harle et al در سال ۲۰۰۵ با بررسی اثر امواج فراصوت بر سلول های استخوانی افزایش بیان $\text{TGF-}\beta 1, 2, 3$ و نیز Uptake کلسیم را گزارش کردند. در سال ۲۰۰۴، Leung et al تأثیر افزایشی فراصوت را بر فعالیت استئوژنیک سلول های مزانشیم انسانی گزارش کردند. نتایج آنها حاکی از وابستگی به دوز فراصوت در این فرآیند بود [۲۷] در سال ۲۰۰۳ Qu et al گزارش کردند که دگزامتازون القاء کننده تمایز استئوبلاستی و باعث بیان ژن‌های تمایزی از جمله استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز می شود [۲۸]. در تحقیق حاضر رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز حاکی از تأثیر افزایشی فراصوت در بیان آن نسبت به گروه کنترل است ($p \leq 0.005$).

منابع

- Lennart D. Johns. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. J Athletic training 2002; 37(3): 293-9.
- Fischell TA, Abbas MA, Grant GW, Siegel RJ. Ultrasonic energy: effects on vascular function and integrity. Circulation 1991; 84: 1783-95.
- Maxwell L, Collecutt T, Gledhill M, Sharma S, Edgar S, Gavin JB. The augmentation of leucocytes adhesion to endothelium by therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol 1994; 20: 383-90.
- Steffen W, Cumberland D, Gaines P, et al. Catheter-delivered high intensity, low frequency ultrasound induces vasodilation in vivo. Eur Heart J 1994; 15: 369-76.
- Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, Bolander ME. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. J Orthop Res 1999; 17: 488-94.
- Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 1999; 256: 284-7.
- Ito M, Azuma Y, Ohta T, Komoriya K. Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. Ultrasound Med Biol 2000; 26: 161-6.
- Jui-Sheng Sun, Rue-Chain Hong. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells. J Biomed Mater Res 2005; 25(3): 449-56.
- Li J K, et al. Cytokine release from osteoblast in response to ultrasound stimulation 2003; 24(13): 2379-85.
- Eslaminejad MB, Nadri S, Hosseini RH. Expression of thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period. Dev Growth Differ 2007; 49: 351-364.
- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from

- bone marrow stroma: condition that maximizes the yields of early progenitors and evaluates their quality. *Stem Cells* 2002; 20:530-41.
12. Friedenstein AJ, Piatetzky- Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplant of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16:381-90.
 13. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
 14. Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92.
 15. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self renewal and the Osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell. Biochem* 1997; 64: 278-94.
 16. Prochop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue, *Science* 1997; 276: 71-4.
 17. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell physiol* 1999; 181: 67-73.
 18. Chokshi SK, Rongione AJ, Freeman I, Gal D, Gunwald AM, Alliger W. Ultrasonic energy produces endothelium dependent vasomotor-relaxation in vitro [abstract]. *Circulation* 1989; 80: 565-40
 19. P.N.T Wells. *Biomedical Ultrasonics*. Academic Press 1977.
 20. Quan KM, Shiran MB, Wathmough DJ. Effect of wave diffraction on the measurement of ultrasonic power output using the radiation force method with a plane reflecting target angled at 45°. *Meas Sci Technol* c3 1992; 222-7.
 21. Kossof G. Calibration of ultrasonic therapeutic equipment. *Acustica* vol 12, 1962.
 22. Andrades JA, Jeus AS, et al. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the Chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 686-93.
 23. Meirelles LDS, Nardi NB. Murine marrow driven mesenchymal stem cell: Isolation, invitro expansion, and characterization. *Brit J Hemat* 2003; 123: 702-11.
 24. Trophe P, Noel D, Platet N, Legrand P, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295: 395-406.
 25. Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 1994; 84: 753-63.
 26. Hogan K.A, An Y.H. The effect of low intensity ultrasound in in-vitro osreogenesis 2003. 30th Euro Symp Calcified tissues p-101.
 27. Harle J, Mayia F, Olsen I, Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-B genes in bone cells. *Europ Cell & Mat Vol* (10): 70-7.
 28. Qu Q, Wan X.H, Chen C.Z. CBFA1 expression in the differentiation of bone marrow-derived osteoblasts. 30th Euro Symp Calcified tissues p-82.