مقاله پژوهشی

لیزرپزشکی؛ ۱۳۹۰، دورهٔ ۸، شمارهٔ ۱، صفحات: ۳۴-۲۹.

فراصوت کم‌توان، تکثیر و اندیکس‌های رشد سلول‌های بنیادی بالغین

داریوش همراهی[۱]
حمید گورابی[۲]
محمدرضا باغبان اسلامی نژاد[۳]
محمدباقر شیران[۴]
لیلا روحی[۵]

[۱]کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی، پژوهشگاه رویان
[۲]پژوهشگاه رویان، گروه ژنتیک
[۳]دکترای علوم تشریح، پژوهشگاه رویان، گروه سلول‌های بنیادین بالغین
[۴]دکترای فیزیک پزشکی، گروه فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵]دکترای زیست‌شناسی‌تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

نویسندهٔ مسئول: محمدباقر شیران، گروه فیزیک و مهندس پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تلفن: ۸۸۶۲۲۶۴۷
پست الکترونیک: mshiran@tums.ac.ir

خلاصه

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی اثر فراصوت کم‌توان بر تکثیر و اندیکس‌های رشد در سلول‌های بنیادی جداشده از مغز استخوان رت در محیط آزمایشگاهی است.

روش بررسی: موج فراصوت در مد پیوسته با فرکانس ۳MHz و با شدت I_P/I_{Ave}=۳۵۵ mW/cm^2 تابانیده شد. مغز استخوان از استخوان‌های فمور و تیبای رت گرفته شد و در محیط حاوی سرم جنین گاوی کشت داده شد. سلول‌های خالص‌شدهٔ پاساژ سوم تحت تابش فراصوت قرار گرفت و در طی دورهٔ هفت‌روزهٔ کشت تکثیر شد و اندیکس‌های رشد آن‌ها به‌وسیلهٔ محاسبهٔ دوبرابرشدگی جمعیتی (PDN) و نیز رسم منحنی رشد مورد بررسی قرار گرفت. هر آزمایش سه بار و برای ده نمونه تکرار شد و میانگین نتایج به‌وسیلهٔ نرم افزار SPSS نسخهٔ ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: داده‌های منحنی رشد، افزایش معنی‌داری را در گروه فراصوت نسبت به کنترل نشان می‌دهد ($p<۰/۰۰۴$) داده‌های دوبرابر شدگی جمعیتی در گروه فراصوت ۱۷/۳۹±۵/۷۹ و در گروه کنترل ۱۴/۰۸±۴/۶۹ با $p<۰/۰۰۵$ بود. سلول‌های مورد استفاده به‌راحتی به رده‌های استخوانی و چربی تمایز داشتند که نمایانگر ماهیت بنیادی آن‌ها بود.

بحث و نتیجه گیری: درکل، پیشنهاد می‌شود که LIUS توانایی بهبود و پیشبرد تکثیر و اندیکس‌های رشد سلول‌های MSc را درشرایط آزمایشگاهی دارد.

واژه‌های کلیدی: فراصوت کم‌توان، سلول بنیادی مزانشیمی، تکثیر، اندیکس‌های رشد

مقدمه

نوسانات مکانیکی یکی از فاکتورهای اساسی در پیشبرد تکثیر، رشد و تمایز سلول‌ها در پیوند سلولی و بافت به‌شمار می‌آیند [۱]. روش‌های مختلفی برای نیل به این هدف مورد استفاده قرار گرفته‌اند که ازآن جمله می‌توان به اعمال بار مکانیکی، استفاده از لرزاننده‌ها و موج فراصوت کم‌توان اشاره نمود [۱و۲]. امواج فراصوت کم‌توان در مهندسی بافت به‌عنوان یک عامل مؤثر کاربردی نقش مهمی را ایفاء می‌کنند. این امواج توانایی افزایش بیان ژن‌های خاص وابسته به تکثیر، توان‌زیستی و تمایزی سلول‌های مختلف را دارا می‌باشند [۱، ۳و۴]. در برخورد با دیگر میکروارگانیسم‌ها نیز امواج فراصوت قابلیت خود را در افزایش تکثیر و رشد نشان داده‌اند[۵]. از امواج فراصوت به‌عنوان کمیت فیزیکی غیرتهاجمی در مصارف پزشکی نیز استفاده می‌شود [۶]. نشان داده شده است که امواج فراصوت کم توان توانایی ترمیم شکستگی‌های استخوانی را به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌دهند [۷]. آنچه که از مطالعهٔ برهمکنش فراصوت با رده‌های سلولی مختلف برمی‌آید این است که امواج، توانایی افزایش بیان ژن‌های مختلف نظیر پروتئوگلیکان‌ها، TGFها، انواع مختلف کلاژن و ... را دارا می‌باشند [۸-۱۲]. تحقیقات انجام شده در این زمینه توسط Chapman نشان داده است که فراصوت توانایی افزایش ورود و خروج یون پتاسیم را به درون سلول دارا می‌باشد[۱۳]. Ryaby و همکاران نشان داده‌اند که فراصوت باعث افزایش میزان کلسیم در فرآیندهای رشد و تمایز سلول‌های کشت‌شدهٔ غضروف و استخوان و نیز افزایش نرخ متابولیسم آن‌ها در محیط کشت می‌شود [۱۴-۱۶]. افزایش این پیامبر ثانویه در سلول باعث افزایش فعالیت آدنیلات سیکلاز و TGF-β و سنتز استئوبلاست‌ها خواهد شد [۱۶]. Wu و همکاران با اثر دادن فراصوت بر سلول‌های غضروف نشان دادند که موجب افزایش بیان و تنظیم ژن پروتئوگلیکان و افزایش نرخ ترمیم آن خواهد شد [۱۷]. از طرفی با پیشرفت روز افزون دانش زیست‌شناسی و پزشکی و کشف سلول‌های بنیادی، انقلابی در مهندسی بافت و طب ترمیمی به‌وجود آمده است [۱۸-۲۱و ۲۲]. سلول‌های بنیادی بالغین با توجه به در دسترس بودن، قابلیت کشت بالا و توان تمایزی مناسب به‌عنوان منبع مناسبی در طب ترمیمی به‌شمار می‌روند [۲۱ و ۲۲]. در این میان سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا تقریباً در تمام گونه‌ها

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

به‌وفور یافت می‌شوند و اولین کاندید برای جداسازی و استفاده در پیوند به ویژه بافت استخوان می‌باشند [۲۳]. توجه خاص به کوتاه نمودن پروسهٔ کشت در این سلول‌ها از دیرباز دغدغهٔ محققان بوده است. چنانکه در این مورد از مواد شیمیایی بسیاری کمک گرفته شده است [۲۳، ۲۴ و ۳۳-۲۵] در این راستا هدف از انجام این تحقیق استفاده از فراصوت به‌عنوان یک کمیت فیزیکی ارزان و در دسترس به‌عنوان عامل پیشبرندهٔ رشد و افزایندهٔ تکثیر با هدف کاهش مدت زمان دورهٔ کشت می‌باشد.

روش بررسی

کشت و جداسازی سلول‌های مزانشیمی:

تعداد ۱۰سر رت، نژاد Wistar، با سن تقریبی ۱۰-۸ هفته به‌وسیلهٔ کلروفرم بیهوش شدند و استخوان‌های فمور و تیبیا جدا گردید. بافت نرم اطراف آن‌ها پاک شد و داخل محیط DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium. Gibco. USA) محتوی ۱۵درصد FBS (Gibco) و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین الملل پنی‌سیلین (Gibco, Germany) قرار گرفت. مغز استخوان از چهار استخوان دراز تیبیا و فمور به‌روش Flashing جدا شد و در داخل یک لولهٔ حاوی ۱۳ میلی‌لیتر محیط DMEM و آنتی‌بیوتیک قرار گرفت. سلول‌های فوق پس از یک‌بار سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه به یک فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربع حاوی ۱۲ میلی‌لیتر محیط DMEM محتوی آنتی‌بیوتیک و ۱۵درصد FBS منتقل شدند و در شرایط ۵درصد CO2 و دمای ۳۵درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیرچسبنده با انجام تعویض محیط و شستشو با +PBS دور ریخته شدند و پس از آن محیط سلول‌ها ۲روز یک‌بار تعویض شد. ۱۰ روز پس از آغاز کشت، ۹۰- ۸۰درصد کف ظرف پر از سلول شد که در این زمان اولین پاساژ سلولی انجام گرفت. سلول‌ها تا سه پاساژ با هدف رسیدن به جمعیتی تقریباً خالص از rMSCs پیش برده شدند و از سلول‌های پاساژ سوم برای انجام طرح استفاده شد.

تابش فراصوت:

دستگاه فراصوت مدل (Phyaction 190i, Germany) با فرکانس ۳MHz برای کاهش و حذف پدیدهٔ حفره‌سازی انتخاب شد[۶]. کالیبراسیون منبع فراصوت با استفاده از روش فشار تابشی انجام شد. در این روش با استفاده از یک ترازوی با دقت بالا (حدود ۰/۰۰۱ گرم) فشار تابشی موج فراصوت اندازه‌گیری گردید. ناحیهٔ دورترین فاصلهٔ محوری با استفاده از کاغذ و رنگ به‌دست آمد و از شکل به‌دست آمده برای میدان فراصوت برای محاسبهٔ بیشترین شدت (PeakIntensity) استفاده شد [۳۳]. برای یافتن منطقهٔ دقیق آن از ترموکوپل نوع T با ضخامت حدود ۰/۵میلی‌متر استفاده شد. بعد از یافتن LAM (Last Axial Maximum) شدت و زمان مناسب برای آزمایش بر مبنای ثابت بودن دمای درون ظرف کشت در ناحیهٔ LAM و در پلیت ۱۲ چاهکی به‌دست آمد (کمتر از ۱ درجهٔ 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 (۳۵۵ mW.cm-2) به‌دست آمد[۹].

رسم منحنی رشد (Growth Curve):

سلول‌های تقریباً خالص از پاساژ دوم با تخلیهٔ محیط رویی دوبار به‌وسیلهٔ محلول PBS شسته شدند و سپس تحت اثر آنزیم تریپسین از کف ظرف جدا شدند. پس از شمارش سلولی توسط لام نئوبار، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از ظرف کشت ۱۲ چاهکی محتوی محیط کشت ۱۵درصد DMEM +FCS کشت داده شدند و در شرایط دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵درصد CO2 و رطوبت ۸۰درصد در انکوباتور نگهداری شدند. به سلول‌ها مدت ۲۴ ساعت فرصت داده شد تا به کف ظرف کشت خود بچسبند. برای هر نمونه، نمونهٔ روزکنترل نیز لحاظ شد و نمونهٔ مورد آزمایش تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفت. محیط سلول‌ها هر دو روز یک‌بار تا پایان آزمایش در هر دو گروه کنترل و شاهد تعویض شد و محیط تازه در اختیار سلول‌ها قرار گرفت. در اتمام هر روز و به‌مدت ۷ روز پی‌درپی سلول‌ها مجدداً تریپسینه شدند و به‌وسیلهٔ لام نئوبار شمارش می‌شدند.

دوبرابر شدگی جمعیتی و دوبرابر شدگی جمعیتی کل (Population Doubling and Total Population Doubling Number):

دوبرابر شدگی جمعیتی کمیتی است که نشان‌دهندهٔ تعداد دفعات دوبرابر شدن یک سلول در یک دورهٔ کشت می‌باشد [۳۵]. برای به‌دست آوردن مقدار آن با استفاده از داده‌های یک دورهٔ کشت محدود و دانستن تعداد اولیه و تعداد سلول‌ها در انتهای دوره با فرمول ریاضی:

$$PD = Ln\frac{N}{N_0} \times 3.31$$

به‌دست می‌آید. که در آن N0 تعداد اولیهٔ سلول‌ها در ابتدای دورهٔ کشت و N تعداد شمارش شدهٔ سلول‌ها در هر روز شمارش کشت خواهد بود. دوبرابر شدگی جمعیتی کل با استفاده از فرمول فوق و تنها با جایگذاری N به‌عنوان تعداد کل نهایی سلول‌ها به‌دست خواهد آمد.

بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌ها:

سلول‌های پاساژ سوم برای بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی به دو ردهٔ استخوان و چربی در محیط‌های القاء تمایزی به مدت ۲۱ روز تمایز داده شدند. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و تکنیک RT-PCR برای ژن‌های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین برای بررسی تمایز به

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

Primers of Osteogenic genes	Osteopontin	Forward	5´-GATTATAGTGACACAGAC-3 287 bp
		Reverse	5´-AGCAGGAATACTAACTGC -3´
	Osteocalcin	Forward	5´-GTCCCACACAGCAACTCG -3´ 381bp
		Reverse	5´-CCAAAGCTGAAGCTGCCG-3´
	Alkaline phosphatase	Forward	5´-CGGACCCTGCCTTACCAACTCATTTGTGCC-3´
		Reverse	5´- CGCACGCGATGCAACACCACTCAGG -3´ 396 bp
Primers of adipogenic genes	PPAR-alpha	Forward	5´-CCCTGCCTTCCCTGTGAACTGAC-3´ 363 bp
		Reverse	5´-GGGACTCATCTGTACTGGTGGGG-3´
	PPAR-gamma2	Forward	5´-GGTGAAACTCTGGGAGATCCC -3´ 400 bp
		Reverse	5´-CTCCATCTCTGCCACGGGCT-3´
	C/EBP-alpha	Forward	5´-ACGTGGAGACGCAGCAGAA-3´ 340 bp
		Reverse	5´-AGGCGGTCATTGTCACTGG-3´
Housekeeping gene	GAPDH	Forward	5'-TCGGTGTGAACGGATTTG-3'
		Reverse	5'ACTCCACGACATACTCAGCAC-3' 612 bp

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در طرح

استخوان و رنگ‌آمیزی اویل رد و تکنیک RT-PCR برای ژن‌های PPAR-α, PPAR-γ, C/EBP-α، برای بررسی تمایز به چربی استفاده شد [۳۵]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در طرح در جدول ۱ آمده است.

آزمون آماری و حجم نمونه:

تعداد ۱۰ نمونه در سلول در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت و هر نمونه دارای سه تکرار بود. درنهایت میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون آماری t-test مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. نرم‌افزار مورد استفاده SPSS نسخهٔ ۱۶ بود.

نتایج

منحنی رشد:

اختلاف معنی‌داری میان میزان رشد سلول‌ها در دو گروه فراصوت و کنترل وجود دارد ($p\leq$ ۰/۰۰۵). در این پاساژ سلول‌های گروه فراصوت دارای فاز lag تقریباً مشابهی بودند. فاز log در گروه فراصوت با شیب تندتری نسبت به گروه کنترل نشان داده شد و تقریباً از روز ششم به فاز platue رسید، این درصورتی بود که در گروه کنترل فاز log از شیب کمتری برخوردار بود و نیز دیرتر به فاز platue رسید (شکل۱).

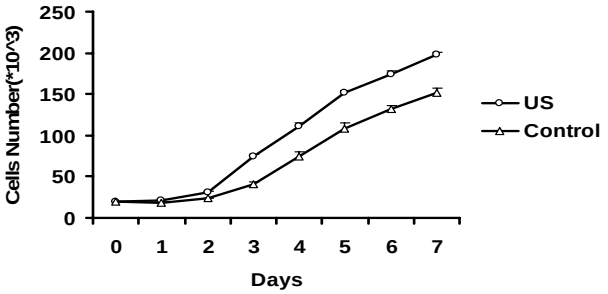
دوبرابر شدگی جمعیتی:

مقدار PD برای نمونهٔ کنترل ۰/۰۰۶±۵/۶۳ و برای نمونهٔ فراصوت ۰/۱۶ ± ۶/۷۱، اختلاف آن‌ها نیز معنی‌دار بود ($p\leq$ ۰/۰۰۵) (شکل۲).

و مقدار PD کل در نمونهٔ فراصوت ۵/۷۹ ±۱۷/۳۹۲۴و برای نمونهٔ کنترل مقدار آن برابر ۴/۶۹±۱۴/۰۷۸۱۹ بود ($p\leq$۰/۰۰۴) (شکل ۳).

بررسی ماهیت تمایزی سلول‌های بنیادی:

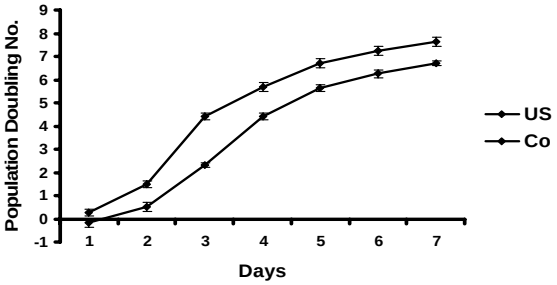
رنگ آمیزی Oil-Red برای نمایش تمایز به چربی و رنگ‌آمیزی



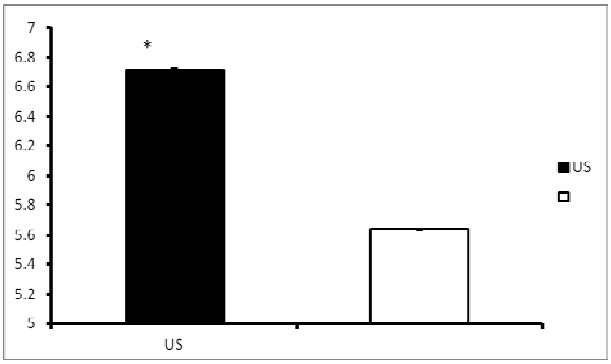
شکل۱: منحنی رشد سلول‌های بنیادی تحت تأثیر فراصوت در دورهٔ ۷ روزهٔ کشت
(I=355mW/cm^2, Frequency=3MHz)

Alizarin-Red برای بررسی تمایز به استخوان مؤید ماهیت بنیادی سلول‌های مورد استفاده در طرح بود (شکل الف و ب۴). نتایج RT-PCR مکمل قطعیت تمایز به دو ردهٔ استخوان و چربی بود (شکل۵).

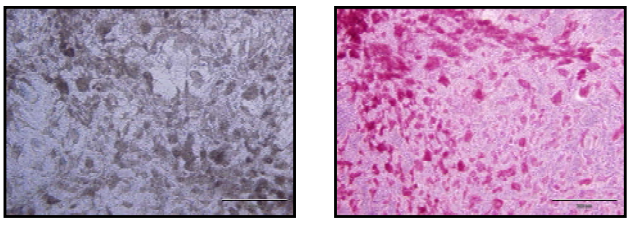
[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]



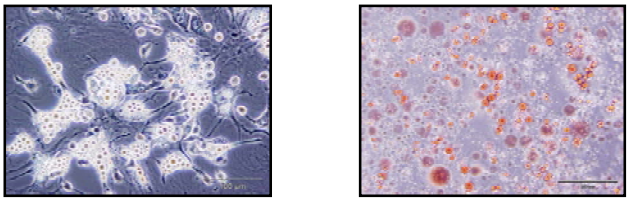
شکل۲: دوبرابر شدگی جمعیتی سلول‌های بنیادی تحت تأثیر فراصوت در دورهٔ ۷ روزهٔ کشت
(I=355mW/cm2, Frequency=3MHz)



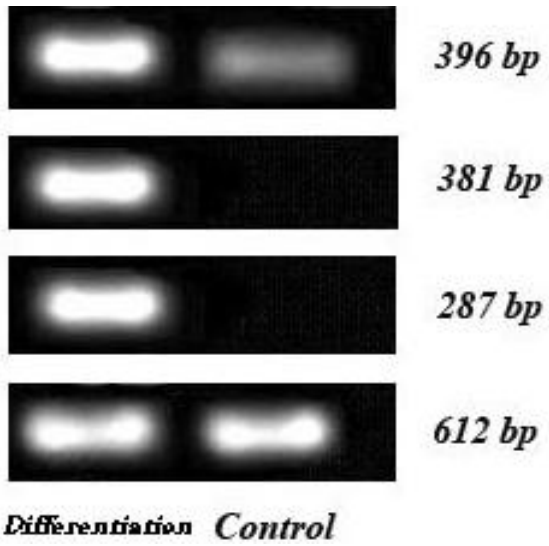
شکل ۳: دوبرابر شدگی جمعیتی کل سلول‌های بنیادی تحت تأثیر فراصوت در دورهٔ ۷ روزهٔ کشت
(I=355mW/cm2, Frequency=3MHz)
=*P<0.004



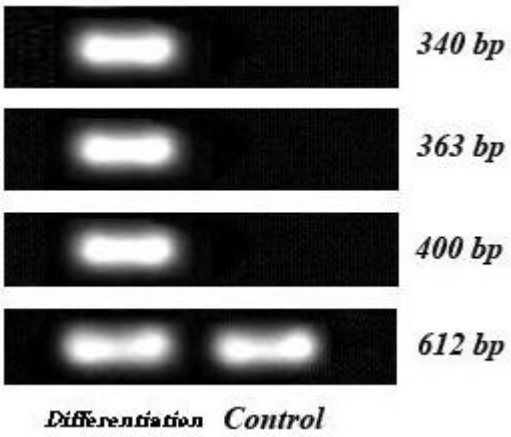
شکل۴: الف) تمایز Osteogenic و رنگ‌آمیزی Alizarin-Red



شکل۴: ب) تمایز Adipogenic و رنگ‌آمیزی Oil-Red



شکل۵: الف) نتایج RT-PCR نمایانگر تمایز به استخوان



شکل۵: ب) نتایج RT-PCR نمایانگر تمایز به چربی

بحث و نتیجه گیری

استفاده از امواج فراصوت در شرایط آزمایشگاهی و تحقیقات در مورد شکستگی‌ها برروی مدل‌های حیوانی مختلف نشان‌دهندهٔ اثرهای برانگیزشی انرژی این امواج بر فعالیت‌های درون سلولی، آزاد شدن سایتوکان‌ها و افزایش سرعت بهبود در شکستگی‌ها می‌باشد[۳۶ و ۳۷]. فراصوت کم‌توان با افزایش مقدار کلسیم درون‌سلولی اثر مستقیم خود را بر فرآیندهای فیزیولوژیک سلول خواهد گذاشت که اثر ویژهٔ افزایش کلسیم درون سلولی راه‌اندازی مسیرهای سیگنالی بیان ژن‌های تکثیری است [۶،۷، ۳۸ و ۳۹]. در این تحقیق با توجه به حذف اثر حرارتی LIUS، سعی بر بررسی اثر خالص موج فراصوت بر سلول‌ها بوده است. این اثر را به نام micro streaming گویند [۶، ۳۳، ۴۰ و ۴۱]. این اثر باتوجه به توانایی انتقال انرژی به‌وسیلهٔ LIUS در محیط

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

بیولوژی و in vitro و ایجاد تغییر در ساختارهای فضایی مولکول‌های حیاتی، افزایش میزان کلسیم درون‌سلولی، افزایش مقدار درون‌برد و برون‌ریز یون‌های دیگر در نهایت باعث افزایش توان تکثیر و اندیکس‌های رشد در سلول‌های بنیادی شده است. در مطالعات قبلی LIUS با شرایط مشابه نشان داده است که توانایی برانگیزش مسیرهای تمایزی به استخوان را در شرایط محیط کشت بدون حضور مواد شیمیایی دارا می‌باشد [۹]. به‌نظر می‌رسد با استفاده از LIUS در پروسهٔ کشت و مهندسی بافت استخوان، می‌توان علاوه بر کوتاه نمودن دورهٔ کشت به سلول‌های دارای ژن‌های بیان‌شده در مقیاس mRNA و افزایش بهره در مهندسی بافت استخوان دست یافت.

پیشنهادها

در مهندسی بافت استخوان معضل توان زیستی سلول‌های پیوند شده در محل همواره باعث القای آپپتوز و کاهش بهره‌وری پیوند شده است. به‌نظر می‌رسد در صورت بررسی اثر LIUS بر توان زیستی MSCs بتوان به نتایجی دست یافت که شاید افزایش‌دهندهٔ میزان بهره‌وری از پیوند باشد.

References

1. Takeuchi R. Low-intensity pulsed ultrasound activates the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in three-dimensional cultures: a basic science study. Arthritis Research & Therapy 2008; 10.
2. Meng QQ. Enhanced antitumor effects of low-frequency ultrasound combined with adriamycin on human leukemia multidrug resistance cell line K562/A02. Chinese Journal of Cance 2008; 27(11): 436-9.
3. Tsai WC. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. J Orthop Res 2006; 24(6): 1310-6.
4. Iwashina T. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. Biomaterials 2006; 27(3): 354-61.
5. Pitt WG, Ross SA. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. Biotechnol Prog 2003; 19(3): 1038-44.
6. Wells PNT, Biomedical Ultrasonics. Academic Press 1977.
7. Harle J, Olsen FM, Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-b genes in bone cells. European Cells and Materials 2005; 10: 70- 7.
8. Ding Y. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone formation during mandible distraction osteogenesis in a canine model--a preliminary study. J Oral Maxillofac Surg 2009; 67(11): 2431-9.
9. Hamrahi D, Shiran MB, Bagheban Eslaminegad MR, Gourabi H, Rohi 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.
10. Kobayashi Y. Low- intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor related genes in human nucleus pulposus cell line. European Cells and Materials 2009; 17: 15-22.
11. Chan CW. Dose-dependent effect of low-intensity pulsed ultrasound on callus formation during rapid distraction osteogenesis. J Orthop Res 2006; 24(11): 2072-9.
12. Eberson CP. Effect of low-intensity ultrasound stimulation on consolidation of the regenerate zone in a rat model of distraction osteogenesis. J Pediatr Orthop 2003; 23(1): 46-51.
13. Chapman IV MN, 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.
14. Ryaby JT BE, Bendo JA, Dalton PF, Tannenbaum S, Pilla AA. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. Trans Orthop Res Soc 1989; 14.
15. RyabyJT MJ, 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.
16. RyabyJT MJ, Duarte-Alves P. Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase activity and TGF-b synthesis in osteoblastic cells. Trans Orthop Res Soc 1992; 7.
17. WuCC LD, Bolander ME, Bronk J, Kinnick R, Greenleaf JF. Exposure to low intensity ultrasound stimulates aggrecan gene expression by cultured chondrocytes. Trans Orthop Res Soc 1996; 21: 622.

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

18. Bruedigam C. Basic techniques in human mesenchymal stem cell cultures: differentiation into osteogenic and adipogenic lineages, genetic perturbations, and phenotypic analyses. Curr Protoc Stem Cell Biol 2011; 1: 3.

19. Catelas I. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. Tissue Eng 2006; 12(8): 2385-96.

20. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. Society for Experimental Biology and Medicine 2001; 0037-9727/01- 0507-2266: 507-20.

21. Wang S. Stem-cell-activated organ following ultrasound exposure: better transplant option for organ transplantation. Med Hypotheses 2010; 74(1): 147-9.

22. Fickert S. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation during long-term ex vivo cultivation is not age dependent. J Bone Miner Metab 2011; 29(2): 224-35.

23. Thibault RA. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. Tissue Eng Part A 2010; 16(2): 431-40.

24. Zhang P. Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. Eur J Pharmacol, 2009; 607(1-3): 1-5.

25. Gong Z. Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Tissue Eng Part A 2009; 15(2): 319-30.

26. McClure SR. The effect of variable waveform low-intensity pulsed ultrasound in a fourth metacarpal osteotomy gap model in horses. Ultrasound Med Biol 2010; 36(8): 1298-305.

27. Narita Y. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. Cell Tissue Res 2008; 333(3): 449-59.

28. Qian Z, Stoodley P, Pitt WG. Effect of low-intensity ultrasound upon biofilm structure from confocal scanning laser microscopy observation. Biomaterials 1996; 17(20): 1975-80.

29. Saito M. Effect of low- and high-intensity pulsed ultrasound on collagen post-translational modifications in MC3T3-E1 osteoblasts. Calcif Tissue Int 2004; 75(5): 384-95.

30. Jaiswal RK. 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.

31. Hildebrandt C, Buth 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.

32. Costa-Pinto AR. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds. Tissue Eng Part a 2008; 14(6): 1049-57.

33. MQK, SM B, WD J. 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 1992; 3: 222-7.

34. Gordanove. Stem Cell Culture Method Mac Grow Hill Press 2008.

35. Eslaminejad NS, Hosseini RH. Expression of the 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period. Dev Growth Differ 2007; 49: 351-64.

36. Malizos KN. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: An overview. Injury, Int. J. Care Injured 2006; 37: S56-62.

37. Zhou S. Molecular Mechanisms of Low Intensity Pulsed Ultrasound in Human Skin Fibroblasts. The journal of biological chemistry 2004; 279(52): 54463–9.

38. Yang KH, Wang SJ. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res 1996; 14: 802-9.

39. Chapman IMN, Tucker S. Ultrasound-induced changes in the rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. Ultrasound Med Biol 1980; 6: 47-58.

40. 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.

41. Deyne PGD, Kirsch-Volders M. In Vitro Effects of Therapeutic Ultrasound on the Nucleus of Human Fibroblasts. Physical Therapy 1995; 75(7): 629- 34.

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]