

تکثیر و تمایز ادونتوزنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به وسیله امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین

مریم موسی‌خانی^۱لیلا روحی^۲محمد باقر شیران^۳داریوش همراهی^۴

۱ کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
 ۲ استادیار زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
 ۳ استادیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
 ۴ کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی، مرکز پرتودرمانی صدها، قم، ایران

نویسنده مسئول: لیلا روحی، تلفن ۰۹۱۲۶۰۴۳۳۰۵
 پست الکترونیک: Rouhi_59@yahoo.com

خلاصه

مقدمه: بیماری‌های دندانی بر روی سلامت و کیفیت زندگی میلیون‌ها انسان در جهان مؤثر هستند. در این مطالعه تأثیرات امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های ادونتوبلاست‌ها که مسئول ساخت و ترمیم عاج هستند، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: سلول‌های مغز استخوان رت در محیط محتوی سرم جنین گاوی (FBS) قرار گرفتند و تا پاساژ ۳ کشت داده شدند. سلول‌ها به سه گروه (فراصوت، محیط تمایز و فراصوت و محیط تمایز) تقسیم شدند. سلول‌ها در معرض موج فراصوت در مد پیوسته با فرکانس ۱ مگاهرتز و با شدت 355 mW/cm^{-2} قرار گرفتند. توان زیستی، تکثیر و تمایز ادونتوزنیک سلول‌ها پس از تیمار با فراصوت ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتیجه تست MTT نشان داد که توان زیستی و تکثیر سلول‌ها هنگامی که در معرض تابش فراصوت قرار می‌گیرند به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($P < 0.05$). آنالیز بیان ژنی افزایش معنی‌داری را در بیان ژن‌های ادونتوزنیک در گروه محیط تمایز و فراصوت نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($P < 0.01$).

واژه‌های کلیدی: فراصوت پیوسته با شدت پایین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت، تمایز ادونتوزنیک

مقدمه

سلول‌های بنیادی بزرگسال با توانایی خودتجدیدی و تمایز چندگانه نقش مهمی را در تکوین بافت جنینی بازی می‌کنند و به‌عنوان یک منبع سلولی پیش‌ساز برای ترمیم بافت و پزشکی ترمیمی^۱ به کار می‌روند [۱]. ترمیم بافت به‌وسیله سلول‌های بنیادی در مدل‌های حیوانی برای بسیاری از بافت‌ها از قبیل غضروف مفصلی، استخوان، تاندون، ماهیچه و بافت چربی انجام شده است. مطالعاتی از قبیل پیوند مستقیم توده سلولی [۲] و یا ترمیم بافت به‌وسیله ترکیب سلول‌های بنیادی با اسکافولدهای سازگار [۳] ما را قادر می‌سازد که استراتژی‌های جدید و امیدبخشی را برای ترمیم بافت‌های سخت به‌ویژه برای بازسازی دندان به کار ببریم. سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs)^۲ که می‌توانند به چندین دودمان سلولی تمایز یابند، کاندیدای مناسبی برای

ترمیم بافت دندان و استخوان می‌باشند [۴]. تشکیل ساختارهای سخت (استخوان و دندان) و ترمیم آن‌ها با دخالت کموتاکسی، تکثیر سلولی، تمایز و سنتز ماتریکس خارج سلولی و در نتیجه برهمکنش بین سیگنال‌های بیوشیمیایی، بیومکانیکی، سلولی و هورمونی صورت می‌گیرد [۵]. طبق مطالعات گذشته، امواج فراصوت با شدت پایین بهبود شکستگی‌های استخوان را در مدل‌های حیوانی تسریع می‌کنند و سبب افزایش قدرت مکانیکی می‌شوند [۶ و ۷]. امواج فراصوت غیر تهاجمی هستند و کاربرد آسان دارند، همچنین به دلیل شدت پایین، اثرهای گرمایی و مخرب ندارند. بررسی تأثیر امواج فراصوت بر سلول‌های جداشده در محیط آزمایشگاهی نشان داد که تحریک فراصوت منجر به افزایش سنتز پروتئین می‌شود [۸ و ۹]. مطالعات گذشته در مورد تأثیر فراصوت بر تمایز کندروژنیک نشان دادند که این امواج می‌توانند سنتز پروتئوگلیکان‌ها، کندروئیتین سولفات [۱۰] و بیان

¹Regenerative medicine

²Bone marrow mesenchymal stem cells

بنیادی مزانشیمی و آنتی‌بادی CD34, Abcam, Cambridge, MA), مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک استفاده شد. سلول‌ها پس از شستشو به مدت ۲۰ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه متصل به FITC (MA) انکوبه شدند. پس از شستشو، سلول‌ها به وسیله دستگاه فلوسیتومتری (BD, FACSCalibur) آنالیز شدند.

تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک BMSCs: برای تمایز استئوژنیک پس از اینکه سلول‌های پاساژ ۲، ۸۰ درصد کف ظرف را پر کردند، محیط رشد سلولی با محیط القاء تمایز حاوی ۵۰ mg/m آسکوربیک اسید ۲ فسفات، ۱۰ nM دگزامتازون و ۱۰۰ Mm بتا گلیسرول فسفات به مدت ۳ هفته تعویض شد سپس سلول‌ها توسط رنگ آلیزارین رد رنگ آمیزی شدند. برای تمایز آدیپوژنیک، محیط حاوی ۱۰۰ nM دگزامتازون و ۵۰ mg/ml ایندومتاسین به مدت ۳ هفته استفاده شد سپس سلول‌ها توسط رنگ اوایل رد رنگ آمیزی شدند.

تابش فراصوت: دستگاه فراصوت مدل Phyaaction 190i, Germany با فرکانس ۱ مگاهرتز برای کاهش و حذف پدیده حفره‌سازی انتخاب شد. کالیبراسیون منبع فراصوت با استفاده از روش فشار تابشی انجام شد. در این روش با استفاده از یک ترازوی با دقت بالا فشار تابشی موج فراصوت اندازه‌گیری گردید. ناحیه دورترین فاصله محوری با استفاده از کاغذ و رنگ به دست آمد و از شکل به دست آمده برای میدان فراصوت، برای محاسبه بیشترین شدت^۶ استفاده شد. برای یافتن منطقه دقیق آن از ترموکوپل نوع T با ضخامت حدود ۰/۵ میلی‌متر استفاده گردید. بعد از یافتن LAM^۷ شدت و زمان مناسب برای آزمایش بر مبنای ثابت بودن دمای درون ظرف کشت در ناحیه LAM و در پلیت ۱۲ چاهکی به دست 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 دوطرف درون و بیرون چاهک و نیز در ۲ میلی‌متری کف آن در محیط آب برای شدت انتخاب شده (۳۵۵ mW/cm^۲) به دست آمد. برای تمامی آنالیزهای بررسی شده سلول‌ها به طور روزانه به مدت ۵ دقیقه تابش می‌دیدند.

تست MTT: برای تعیین توان زیستی سلول‌ها پس از تیمار با امواج فراصوت از تست MTT استفاده شد. بدین ترتیب که سلول‌های پاساژ ۲ از گروه کنترل (بدون فراصوت) و گروه فراصوت (US^۸) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی در تراکم ۱۰^۴ سلول/چاهک کشت داده شدند. پس از اتصال سلول‌ها به نسبت ۱:۵ محلول MTT به

اگریکان [۱۱] را افزایش دهند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که امواج فراصوت ممکن است سنتز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی را تحریک کنند. تحقیقات بسیاری نشان‌دهنده 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 فعال‌سازی 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 نتیجه آن بیان ژنی است [۱۲].

بنابراین هدف این مطالعه بررسی این فرضیه است که آیا امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین به عنوان یک عامل فیزیکی می‌تواند تکثیر و تمایز ادونتوژنیک BMSCs را پیش ببرد؟

روش بررسی

جداسازی و کشت BMSCs: پس از کشتن رت نژاد ویستار ۴-۶ هفته‌ای، استخوان‌های فمور و تیبیا جدا شدند و پس از پاک کردن آن‌ها از بافت نرم اطراف، داخل محیط کشت DMEM^۳ (Gibco, USA) حاوی FBS^۴ ۱۵ درصد (Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله‌ها به زیر هود منتقل گردید. دو انتهای استخوان‌ها قطع گردید و با استفاده از سر سوزن ۲۲ مغز استخوان‌ها به روش فلاشینگ^۵ در داخل محیط کشت قرار گرفت. سلول‌ها با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پلت سلولی در ظرف مناسب در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO₂ ۵ درصد و رطوبت اشباع انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌های غیرچسبنده با انجام تعویض محیط برداشته شدند و پس از آن محیط سلول‌ها هفته‌ای دوبار تعویض شد. زمانی که ۹۰-۸۰ درصد کف ظرف توسط سلول‌ها پر شد، سلول‌ها توسط Trypsin/EDTA ۰/۲۵ درصد جدا و پاساژ داده شدند. از سلول‌های پاساژ ۲ برای انجام آنالیزها استفاده شد.

آنالیز فلوسایتومتری: سلول‌ها پس از تیمار با Trypsin/EDTA در تراکم ۱۰^۵×۲ با آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. برای تعیین ماهیت سلول‌ها از آنتی‌بادی CD90 متصل به FITC (AbD Serotec, Raleigh, NC)، مارکر ویژه سلول‌های

^۶ Peak Intensity

^۷ Last Axial Maximum

^۸ Ultra sound

^۳ Duplecco's Minimum Essential Medium

^۴ Fetal bovine serum

^۵ Flushing

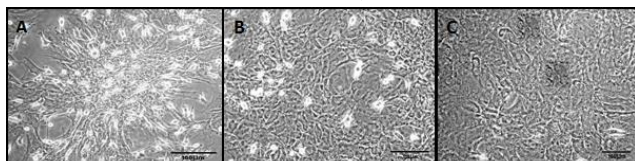
جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در آنالیز RT-PCR

	Official Name (gene)	Also known as (gene)	mRNA accession number	Primers	RNA	DNA
1	Ibsp	Bsp	NM_012587.2	F GTACCGGCC ACGCTACTT TC	20	110
				R TATCGCCAT CTCCATTTT CTTCC	23	
2	Bglap	Bgp Osteocalcin(Protein)	NM_013414.1	F AGTCTGACA AAGCCTTCA TGTC	23	170
				R AATGTGGTC CGCTAGCTC GT	20	
3	Dspp	Dsp	NM_012790.2	F AGCCAGGC AGAAGCAT GTC	19	138
				R ATGGTGTCC GTTGCTGTC TT	20	
4	Alpl	alkaline phosphatase(Protein)	NM_013059.1	F ACAACCTG ACTGACCCT TCC	20	105
				R CAATCCTGC CTCCTTCCA CT	20	
5	Gapdh		NM_017008.4	F AGTATGACT CTACCCACG GCAA	22	159
				R CGCCAGTA GACTCCACG ACA	20	
				R CGCCAGTA GACTCCACG ACA	20	

آنالیز آماری: مقادیر ذکر شده در مقاله به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشند. محاسبه آماری به وسیله آنالیزهای Student's t test و ANOVA انجام شد و تفاوت معنی‌دار به صورت $p < 0.05$ تعریف شد.

یافته‌ها

خصوصیات BMSCs کشت شده: سلول‌ها در کشت اولیه توانایی تشکیل کلونی را نشان دادند و بر روی کلونی‌ها سلول‌های خونی^{۱۲} قابل تشخیص بودند. از نظر مورفولوژی، اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بودند ولی در بین آن‌ها سلول‌های چندوجهی نیز قابل تشخیص بود. سلول‌ها در پاساژ ۲-۳ عاری از سلول‌های خونی و خالص می‌شدند. در طول مراحل تحقیق از سلول‌های پاساژ ۲-۳ برای انجام آنالیزها استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱: کشت اولیه (A)، پاساژ یک (B) و پاساژ دو (C) سلول‌های مغز استخوان رت

¹²Hematopoietic cells

هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. سپس کریستال‌های تشکیل شده توسط محلول^۹ DMSO حل شد و جذب آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوانده شد.

تمایز ادونتوژنیک در محیط آزمایشگاه^{۱۰}: برای القاء تمایز همراه با فراصوت، سلول‌ها در تراکم 2×10^4 سلول/سانتی‌متر در پلیت‌های ۱۲ چاهکی کشت داده شدند. بعد از اینکه سلول‌ها کف ظرف را پر کردند، برای القاء تمایز، سلول‌ها در معرض فراصوت و محیط تمایز حاوی $50 \mu\text{g/ml}$ آسکوربیک اسید، 10 mM بتاگلیسرول فسفات و 10^{-7} دگزامتازون قرار می‌گیرند.

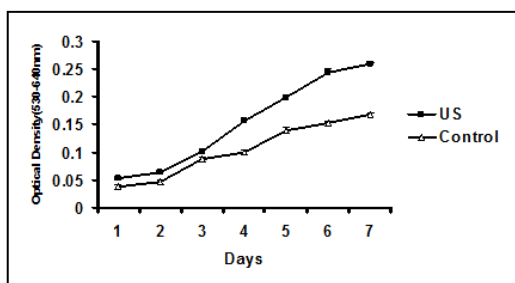
گروه‌های آزمایشی: گروه ۱، سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تنها تحت تأثیر فراصوت قرار گرفتند (US)، گروه ۲، سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تنها تحت تأثیر محیط تمایز ادونتوژنیک قرار گرفتند (Diff)، گروه ۳، سلول‌ها هم در معرض فراصوت و هم محیط تمایز قرار گرفتند (US+Diff) و گروه کنترل، سلول‌ها نه در معرض فراصوت و نه محیط تمایز بودند (Cont).

آنالیز RT-PCR نیمه کمی: سلول‌ها در تمام گروه‌های آزمایشی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ از لحاظ بیان ژن‌های ادونتوژنیک نظیر: آلکالین فسفاتاز (ALP)، استئوکالسین (OC)، دنتین سیالوفسفوپروتئین (DSPP)، بون سیالوپروتئین (BSP) بررسی شدند و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع^{۱۱} انتخاب شد. بدین منظور RNA کل سلول‌های مورد نظر با استفاده از کیت RNA-PLUS (Cinagen, Tehran) جداسازی شد سپس cDNA آن با استفاده از نسخه برداری معکوس توسط پرایمر oligo(dT) و کیت سنتز cDNA (Fermentas) ساخته شد. در ادامه، واکنش PCR توسط کیت PCR (Fermentas) و پرایمرهای طراحی شده (طبق جدول ۱) در ۳۵ سیکل انجام شد. در پایان، محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۷ درصد آگارز ریخته شد و اعمال ولتاژ صورت گرفت. میزان بیان کمی ژن‌ها در مقایسه با ژن مرجع توسط نرم افزار UV Band Map صورت گرفت.

⁹Dimethyl sulfoxide

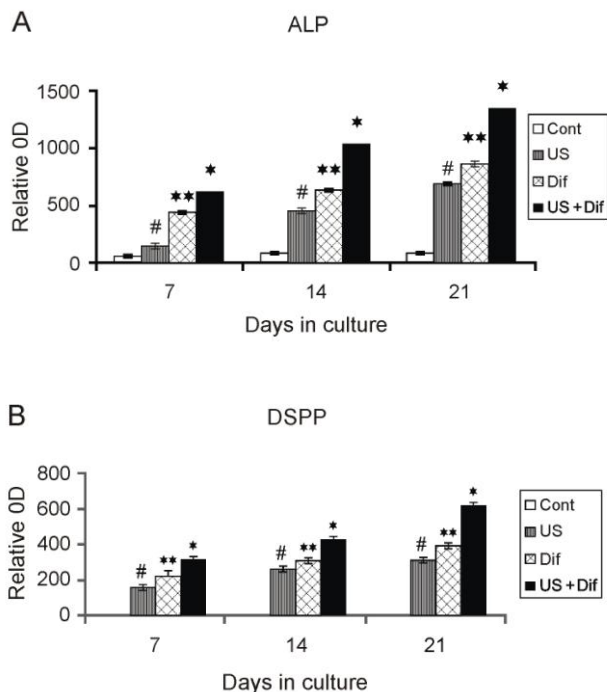
¹⁰In vitro odontogenic differentiation

¹¹glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

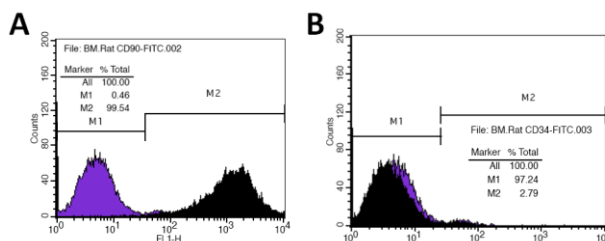


شکل ۴: توان زیستی BMSCs کشت داده شده در معرض تابش فراصوت و بدون فراصوت (کنترل).

RT-PCR نیمه کمی: نتایج نشان داد که بیان ژنهای ادونتوژنیک (ALP, OC, BSP, DSPP) در گروهی که سلولها هم در معرض تابش قرار داشتند و هم تحت تیمار محیط ادونتوژنیک بودند، (US +Diff)، نسبت به گروههای US و Diff به طور معنی داری بالاتر بود ($p < 0.05$). در حالی که در گروه کنترل به استثناء ژن ALP، بیانی مشاهده نشد (شکل ۵).

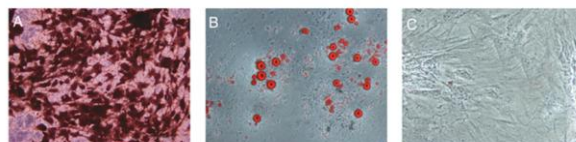


تعیین ماهیت سلولهای جدا شده فنوتیپ BMSCs: سلولها بر اساس ویژگی چسبندگی شان از مغز استخوان جدا شدند و به وسیله آنالیز فلوسایتومتری برای مارکر سطحی ویژه سلولهای بنیادی مزانشیمی مشخص شدند. نتایج نشان داد که اکثریت BMSCs در پاساژ دوم، مارکر CD90، مارکر سلولهای بنیادی مزانشیمی، بیان می کنند (۹۹/۵۴)، شکل (A.۲). در مقابل اکثریت سلولها، از نظر بیان مارکر CD34، مارکر سلولهای خونی، منفی بودند (۲/۷۹، شکل ۲. B).



شکل ۲: فنوتیپ BMSCs جدا شده از مغز استخوان رت به وسیله فلوسیتومتری. (A) بیان مارکر سطحی CD90، (B) بیان مارکر سطحی CD34.

پتانسیل تمایز: BMSCs در پاساژ دوم از نظر پتانسیل تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از القاء استئوژنیک، BMSCs شروع به ترشح ماتریکس معدنی کردند که توسط Alizarin Red به طور مثبت رنگ شدند همچنین به سلولهای آدیپوسیت تمایز یافتند و سپس قطرات چربی آنها توسط Oil Red رنگ شدند (شکل ۳).



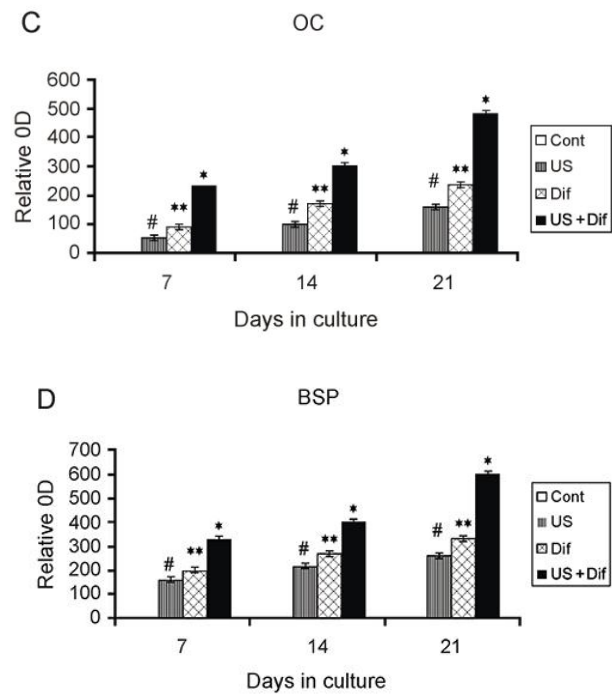
شکل ۳: پتانسیل تمایز BMSCs. تمایز استئوژنیک با Alizarin Red (A)، تمایز آدیپوژنیک با Oil Red (B) و کنترل (C). بزرگنمایی $20 \times$.

توان زیستی BMSCs بعد از تابش فراصوت: نتایج تست MTT نشان داد که میزان جذب نوری^{۱۳} (توان زیستی) سلولهایی که در معرض تابش فراصوت قرار گرفتند، در مقایسه با سلولهایی که تابش ندیده اند، به طور معنی داری بالاتر است ($p < 0.05$)، (شکل ۴).

¹³Optical density

فراصوت است که می‌تواند بر روی سلول‌های مختلف مؤثر باشد [۱۵].

در مطالعه حاضر، ما نشان دادیم که تابش فراصوت می‌تواند تکثیر و تمایز ادونتوژنیک را در BMSCs القاء کند. سلول‌های تمایز یافته توانستند ژن‌های ALP, OC, BSP, DSPP را بیان کنند (شکل ۴ و ۵). آنزیم آلکالین فسفاتاز که عامل استر^{۱۵} متصل به ترکیبات فسفات ارگانیک را در شرایط قلیایی هیدرولیز می‌کند، نقش مهمی را در کلسیفیه شدن استخوان بازی می‌کند. ما یافتیم که فعالیت ALP در حضور و فقدان امواج فراصوت و محیط تمایز (کنترل) به تدریج افزایش می‌یابد ولی به هر حال سطح فعالیت آن در گروه US+Diff به طور معنی داری نسبت به دو گروه دیگر و کنترل بالاتر بود که این پیشنهاد می‌کند تحریک امواج فراصوت پیوسته به طور روزانه ممکن است با افزایش فعالیت ALP سبب افزایش معدنی شدن شود. مطالعات قبلی که تأثیر امواج را بر روی سلول‌های ادونتوبلاست بررسی کردند، نشان دادند که این امواج می‌توانند اثر مشخصی بر تکثیر، توان زیستی و بیان ژنی آن‌ها داشته باشند [۱۴ و ۱۵]. تحقیقات نشان دادند که فراصوت با شدت پایین با افزایش مقدار کلسیم درون سلولی اثر مستقیم خود را بر فرآیندهای فیزیولوژیک سلول خواهد گذاشت. اثر ویژه افزایش کلسیم درون سلولی، راه اندازی مسیرهای سیگنالی بیان ژنی است [۱۷]. در این تحقیق با توجه به حذف اثر حرارتی فراصوت، سعی در بررسی اثر خالص موج فراصوت بر سلول‌ها بوده است. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که فراصوت توانایی برانگیزش مسیرهای تمایزی به استخوان را دارا می‌باشد [۱۸ و ۱۹]. بنابراین این مطالعه برای اولین بار گزارش می‌کند که امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین می‌توانند سبب تکثیر و تمایز ادونتوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی و ترشح ماتریکس خارج سلولی و معدنی شدن عاج دندان^{۱۶} شوند.



شکل ۵: تأثیر امواج فراصوت بر میزان بیان ژن‌های ادونتوژنیک. بیان mRNA برای (A) آلکالین فسفاتاز، (B) دنتین سیالوفسفوپروتئین، (C) استئوکالسن و (D) بون سیالوپروتئین. $p < 0.05^*$ برای گروه US+Diff در مقابل سایر گروه‌ها، $p < 0.01^{**}$ برای گروه Diff در برابر گروه US و Cont، $p < 0.05^{\#}$ برای گروه US در مقابل گروه Cont.

بحث

این مطالعه بر این اساس طراحی شد که آیا امواج فراصوت با شدت پایین که به طور معمول برای برداشتن تاج دندانی در دندان پزشکی، در بهبود شکستگی‌های استخوانی و همچنین در القاء تمایز استئوژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌تواند در ایجاد ادونتوبلاست‌های سلول دندانی که مسئول تشکیل و ترمیم عاج دندان هستند [۱۳] نیز مؤثر واقع شود. در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه تأثیر بیولوژی فراصوت بر بافت دندان در حال بررسی است و اینکه آیا فراصوت می‌تواند به عنوان یک ابزار درمانی برای ترمیم دندان استفاده شود [۱۶-۱۴]. مکانیسم‌های مؤثر در ایجاد اثرهای بیولوژیکی فراصوت هنوز به طور کامل شناخته نشده است ولی تصور می‌شود که این تأثیرات بیومکانیکی غیر حرارتی^{۱۴}

¹⁵Ester

¹⁶Dentin

¹⁴Nonthermal

References

1. Mimeault M, Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*, 2006. 24(11): p. 2319-45.
2. Iohara K, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A, Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*, 2004. 83(8): p. 590-5.
3. Rezwani K, Blaker JJ, Boccaccini AR, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006. 27(18): p. 3413-31.
4. Gronthos S, Akintoye, Wang, C.Y. and Shi, S, Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontol* 2000, 2006. 41: p. 188-195.
5. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992. 200(2): p. 165-70.
6. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 1983. 101: p. 153-159.
7. Wang SJ, Bolander ME, Chao EY, Ilstrup DM, Greenleaf JF, Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res*, 1994. 12(1): p. 40-7.
8. Harvey W, Pond JB, Grahame R, The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatol Rehabil*, 1975. 14(4): p. 237.
9. Webster DF, Dyson M, Harvey W, The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. *Ultrasound Med Bi*, 1978. 4(4): p. 343-51.
10. Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Kataoka H, Kawasaki K, Katsube K, Kuriwaka M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J. Biomed. Mater. Res*, 2002. 59(2): p. 201-206.
11. Parvizi J, 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(4): p. 488-94.
12. Johns, L., Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train*, 2002. 37(3): p. 293-9.
13. Smith AJ, Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001. 12(5): p. 425-37.
14. Scheven BA, Cooper PR, Lea SC, Walmsley AD, Smith AJ, Short-term in vitro effects of low frequency ultrasound on odontoblast-like cells. *Ultrasound Med Biol*, 2007. 33(9): p. 1475-82.
15. Man J, Cooper PR, Scheven BA, Low-intensity low-frequency ultrasound promotes proliferation and differentiation of odontoblast-like cells. *J Endod*, 2012. 38(5): p. 608-13.
16. Scheven BA, Millard JL, Cooper PR, Lea SC, Walmsley AD, Smith AJ, VEGF and odontoblast-like cells: stimulation by low frequency ultrasound. *Arch Oral Biol*, 2009. 54(2): p. 185-91.
17. Harle J, Olsen I, Salih V, Effects of ultrasound on transforming growth factor-beta genes in bone cells. *Eur Cell Mater*, 2005. 10: p. 70-76.
18. Ren L, Song J, Wang Z, Deng F, Li W, Involvement of p38 MAPK pathway in low intensity pulsed ultrasound induced osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Ultrasonics*, 2013. 53(3): p. 686-90.
19. Angle SR, Sumner DR, Viridi AS, Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasonics*, 2011. 51(3): p. 281-8.