

تأثیر امواج فراصوت با شدت پائین بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی بنيادی مزانشيمى جدا شده از مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت. فرض بر امكان توانایي اثر برانگيزشی LIUS بر يك سیستم بیولوژیکی در محیط آزمایشگاهی بوسیله القاء تمایز در rMSCs و پیشبرد آن به سمت استئوژنزیس بود.

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 امكان توانایي اثر برانگيزشی LIUS بر يك سیستم بیولوژیکی در محیط آزمایشگاهی بوسیله القاء تمایز در rMSCs و پیشبرد آن به سمت استئوژنزیس بود.

مواد و روش‌ها: دستگاه فراصوت با فرکانس MHz^۳ با روش فشار تابشی کالیبر شد. کشت سلول‌ها تا پاساز استخوان‌های تیبیا و فمور رت جدا شده و در محیط کامل شده با سرم FBS کشت داده شد. کشت سلول‌ها با هدف خالص سازی آنها پیش برده شد. گروه آزمایش روزانه به مدت ۵ دقیقه فراصوت را با فرکانس ۳MHz و شدت ۳۵۵W.cm² و در مدد پیوسته تا دو هفته دریافت کردند درحالی که گروه کنترل فراصوت دریافت نکرد. آنالیزهای سنجش فعالیت آنکالین فسفاتاز و روش RT-PCR نیمه کمی برای بیان ژنهای آنکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین در روزهای اول تا چهاردهم بعد از تحریک با فراصوت بصورت یکروز در میان انجام گرفت. نتایج: نشان داد که فعالیت آنکالین فسفاتاز در گروه فراصوت بطور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.005$). نتایج RT-PCR نیمه کمی بیان ژنهای تمایزی از تفاوت معنی داری را در دو گروه نشان داد ($p < 0.005$).

نتیجه گیری: این مطالعه قویاً بیان می کند که فراصوت توانایی برانگیزش استئوژنزیس rMSCs را در محیط آزمایشگاهی دارد.

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

داریوش همراهی^۱
دکتر محمد باقر شیران^۱
دکتر محمدرضا باغان 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 داشجویی دکترای زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات فارس

نویسنده مسئول: دکتر حمید گورابی، بزرگراه رسالت، خیابان پیش‌هاشم شمالی، خیابان حافظ، ب، ۲، پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک، تلفن: ۰۳۰۱۶۴۸۰، پست الکترونیک: gourabi@royaninstitute.org

Parvizi et al, ۱۹۹۹ بیان ژن اگریکان 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 رده استخوانی MC3T3 موشی انجام شده، نشان داد که این امواج توانایی برانگیزش بیان PGE₂-COX-2 را دارا می باشند [۶]. در سال ۲۰۰۰، Ito و همکاران مطالعه‌ای را بر روی سلول‌های r-2 از 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 MHz) و شدت W.cm^{-۲} ۰/۰۶۸ را بر سلول‌های استخوانی رت بررسی کردند. آنها کاهش معنی دار 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].

مقدمه

تحقیقات بسیاری نشان دهنده این موضوع هستند که فراصوت توانایی تغییر در غشاء 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 می شود را دارا می باشد. تابش فراصوت باعث افزایش مقدار کلسیم درون سلولی می شود و سلول از آن به عنوان کوفاکتوری که می تواند مسیرهای گذردهی سیگنالی را فعال کند استفاده می‌کند و نتیجه آن بیان ژنی است [۱].

همچنین فراصوت توانایی افزایش برانگیزش بیان فاکتورهای بسیاری را در انواع سلول‌ها از جمله IL-6، IL-β، TGF-β و .. را دارا می باشد. نظریاتی نیز در این مورد وجود دارد که مبتنی بر فرضیه تشديد فرکانسی فراصوت است. بر اساس این فرضیه فراصوت توانایی تغییر در شکل گیری سه بعدی پروتئین‌ها و آنژیم‌های درون سلولی و ایجاد مناطق Active Site و نیز برداشت مهارکننده‌ها را از ساختمان پروتئین‌ها و آنژیم‌ها دارا می باشد [۳، ۲، ۴]. در سال

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

تابش فرا صوت:

دستگاه فرا صوت مدل Phyaction 190i-Germany (Phyaction 190i-Germany) با فرکانس ۳MHz برای کاهش و حذف پدیده حفره سازی انتخاب شد [۱۹]. کالیبراسیون منبع فرا صوت 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 فرا صوت اندازه گیری شد [۲۰]. ناحیه دورترین فاصله محوری با استفاده از کاغذ و رنگ بدست آمده و از شکل بدست آمده برای میدان فرا صوت برای محاسبه بیشترین شدت G.Kossof (1962) (Peak Intensity) به روش ارائه شده توسط (Peak Intensity) بدست آمد [۲۱]. برای یافتن منطقه دقیق آن از ترموموپل نوع T با ضخامت حدود ۰/۵ میلیمتر استفاده شد. بعد از یافتن 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 فرا صوت 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 $mW.cm^{-2}$ (۳۵۵) بدست آمد.

برای جلوگیری از بوجود آمدن امواج ایستاده ۱ چاهک از محیط کشت کاملاً بر شده و بر روی درب ظرف از ژل فرا صوت استفاده شد و بر روی آن قطعه ای از پرسپکس با ضخامت ۵ سانتیمتر قرار داده شد.

سنجهش فعالیت آلکالین فسفاتاز:

در این روش از کیت 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 هماتوکسیلین رنگ شد. سپس سلول ها بوسیله میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی و شمارش بوسیله نرم افزار J Image قرار گرفت. میانگین نتایج با یگدیگر بوسیله آزمون آماری T-test مقایسه شد.

آنالیز RT-PCR و RT-PCR نیمه کمی:

برای بررسی بیان ژن های تمایز به استخوان از پرایمر ژن های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین استفاده شد. ژن مرجع GAPDH انتخاب شد. برای این منظور RNA کل سلول های 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 پژوهشی ترمیمی و مهندسی بافت های استخوان، بر اساس قابلیت تمایز آنها به رده های استخوانی و نیز پایداری فنتیپی آنها در پاساژ های متوالی، انجام گرفته است. بر پایه این مطالعات استئوپونتیس در سلول های مزانشیمی نیازمند شرایط کشت خاص، همچون فاکتور های رشد مختلف، مواد شیمیائی و عوامل فیزیکی متنوع است [۱۸-۲۰]. این طرح، با تکیه بر مطالعات گذشته، با هدف استفاده از توانایی امواج فرا صوت در القای تمایز استئوپونتیک در سلول های بنیادی مزانشیمی، به عنوان یک عامل فیزیکی این، ارزان و در دسترس انجام گرفت.

روش بررسی

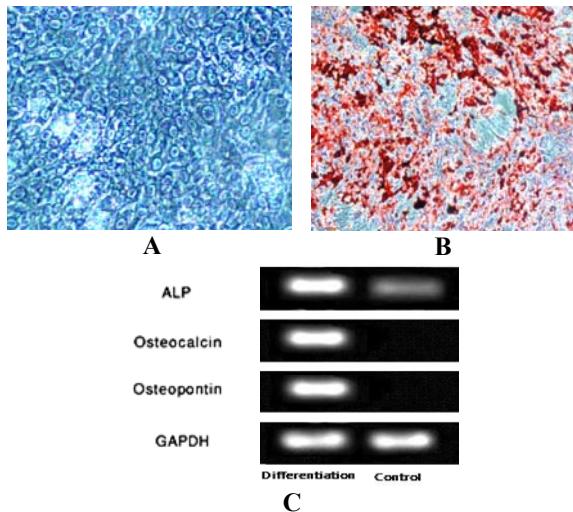
کشت و جداسازی سلول های مزانشیمی:

تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر، نژاد Wistar، با سن تقریبی ۴-۶ هفته بوسیله CO_2 کشته شده، استخوانهای فمور و تibia جدا گردید. بافت نرم اطراف آنها پاک شد و داخل محیط (Dublecco's Minimum Essential Medium. Gibco. USA) محتوی ۱۵٪ FBS (Gibco) و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین (Gibco,Germany) و ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین (Gibco,Germany) قرار گرفت. مغز استخوان از چهار استخوان دراز تبیبا 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 سانتریفیوژ 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 $35^{\circ}C$ و دمای $80-90$ 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، درصد کف ظرف پر از سلول شد که در این زمان، اولین پاساژ سلولی با استفاده از Trypsin/EDTA ۰.۰۵٪ 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 آبیزارین رد و تکنیک RT-PCR برای ژن های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین و برای بررسی تمایز آن ها به چربی از رنگ آمیزی اویل رد

1- Standing Waves

2- House Keeping Gene

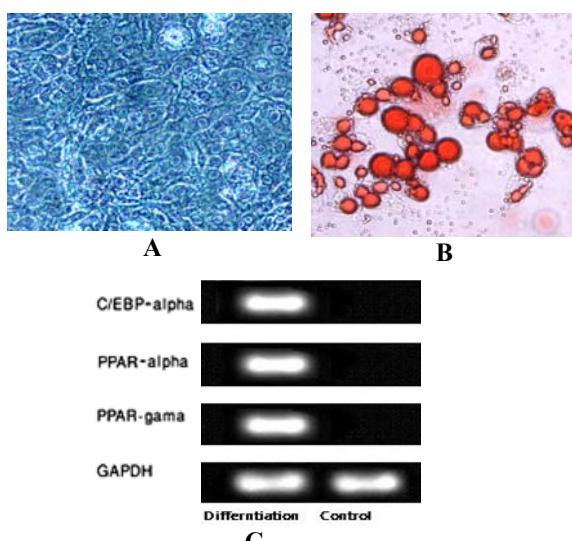
چهاردهم از نظر بیان آلکالین فسفاتاز بررسی شدند. نکته قابل توجه در



شکل ۱- تمایز به سلول های استخوانی

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

این مورد این است که در گروه آزمایشی در روز هفتم، الگوی رنگ شدگی سلول ها توسط آلکالین فسفاتاز در ظرف کشت، منطبق بر شکل میدان فراصوت بود. این شکل در روز یازدهم مشخص ترین حالت خود را داشت و در روز چهاردهم از بین رفت. در گروه کنترل رنگ پذیری سلول ها در طول کشت با افزایش روزهای کشت افزایش می یافت. در این گروه کلون هایی با بیان آلکالین فسفاتاز مشاهده شدند. مقدار فعلیت 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) سلول های تمایز یافته به آدیپوسیت (B) رنگ آمیزی اویل رد (C) نتایج RT-PCR (بار برابر ۵۰۰ میکرومتر)

پروتکل این شرکت جداسازی شد. سپس cDNA تک زنجیره ای برای RT-PCR با استفاده از پرایمر (dt) oligo و آنزیم ترانسکرپتاز [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622, Fermentas, EU)] معکوس 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 چاهک های ژل ۱/۷ درصد آگاروز ریخته شده و پس از گذشت حدود نیم ساعت از اعمال ولتاژ ژن مرجع به هر یک از چاهک ها 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.

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

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

Target cDNA	Primer Sequence(5'-3')	Size Product	Annealing temperature (C°)	PCR cycles
ALP	F:CGGACCCCTGCCCTAACCAACTCATTTGTGCC R: CGCACGGATGCAACACCACTCAGG	396	72	35
Osteopontin	F: GATTATAGTGACACAGAC R: AGCAGGAATACTAACTGC	287	50	35
Osteocalcin	F: GTCCCACAAAGCAACTCG R: CCAAAGCTGAAGCTGCCG	381	56	35
C/EBP-alpha	F: ACCTGGAGACGGAGCAGAA R: AGGGGGTATTGTCACTGG	340	61	35
PPAR-alpha	F: CCCTGCTTCCCCCTGTGAAGTC R: GGGACTCATCTGTACTGGTGGGGAC	363	70	35
PPAR-gama	F: GGTGAAACTCTGGGAGATCC R: TGAGGGAGTTGAAGACTCTC	400	57	35
GAPDH	F: TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC R: AAAGGTGAAATGGGAG	380	53	24,35

یافته ها

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.

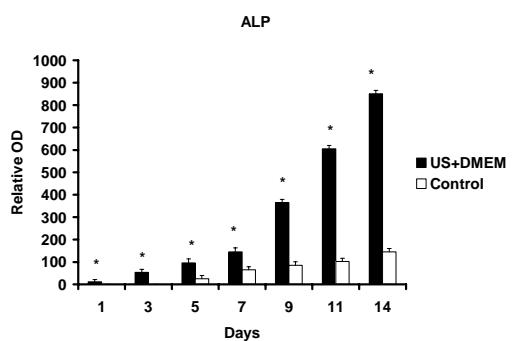
بررسی شاخص های تمایز به استخوان پس از تأثیر امواج فراصوت رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز:

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

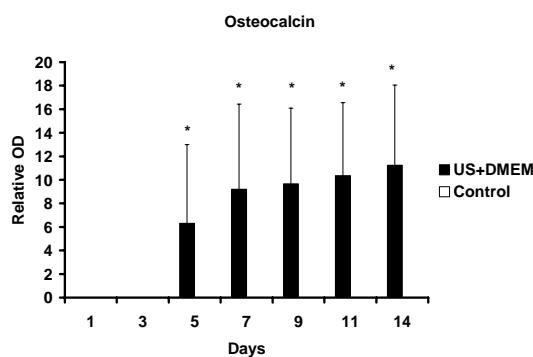
صورتی که در نمونه کنترل فقط در روزهای پایانی بیان کمی داشت. اختلاف میان این دو گروه معنی دار بود ($P \leq 0.005$).

آنالیز آماری:

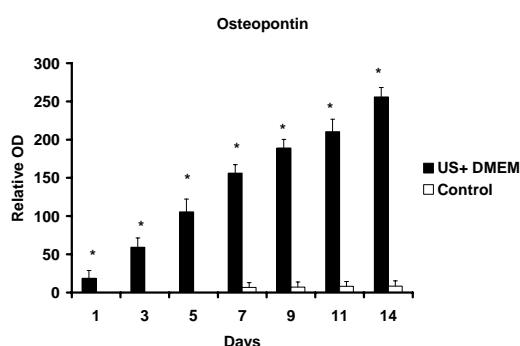
هر یک از قسمت های آزمایش برای ۱۰ نمونه، سه بار تکرار شده و میانگین نتایج با یگدیگر بوسیله آرمون آماری T-test از جهت معنی دار بودن یا نبودن نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 13.0 مورد بررسی قرار گرفتند.



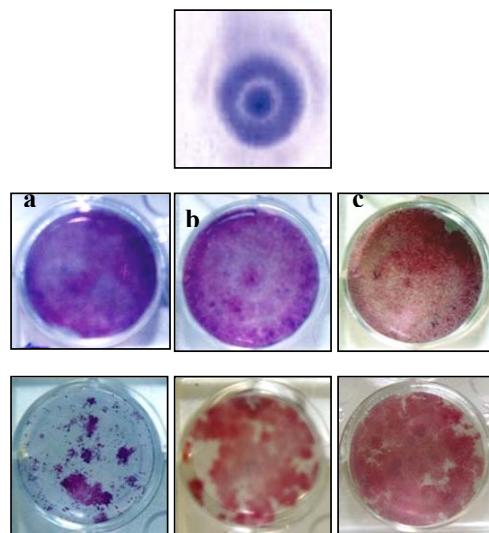
شکل ۵- میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز در دو گروه فراصوت و کنترل ($*=P<0.005$)



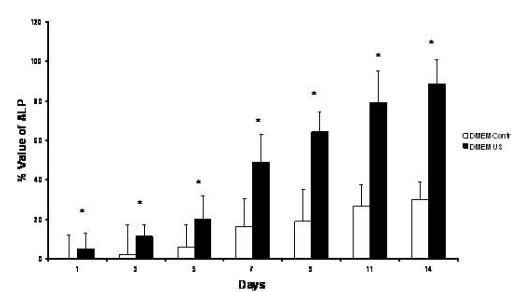
شکل ۶- میزان بیان استئوکلسین در دو گروه فراصوت و کنترل ($*=P<0.005$)



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 (A) به شکل میدان فراصوت در پلیت توجه شود



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 ($P \leq 0.005$). 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 ($P \leq 0.001$). 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. یافته های ما در مورد افزایش بیان ژن های تمایز به استخوان حاکی از این است که فراصوت به تنها یابه عنوان یک کمیت فیزیکی قادر به القاء بیان ژن های نشان دهنده تمایز، بویژه استئوکلسین $P \leq 0.005$ ، در سطح mRNA است که به توجه 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 استئوژنیک 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 استئوژنیس rMSCs داشته باشد.

در سال ۲۰۰۱ Andrades با بررسی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی به رددهای استخوان و غضروف بیان آلکالین فسفاتاز و تولید استئوکلسین را عامل شناخت تمایز Chondro-Osteogenic پرشمرد. او با استفاده از القاء تمایز با استفاده از موادی از قبیل دگرامتازون و بتاگلیسیرون فسفات تمایز را در این رده سلولی القاء کرد [۲۲]. تحقیقات محققین دیگر نیز حاکی از تأثیر مواد شیمیایی مختلف بر تمایز سلول های 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 20 mW.cm^{-2} و فرکانس 15 MHz به مدت ۲۸ روز روزانه 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 $TGF-\beta 1$, ۲, ۳ و نیز Leung et al در سال ۲۰۰۴ Uptake کلسیم را گزارش کردند. در سال ۲۰۰۴ این فرآیند بود [۲۷] در سال ۲۰۰۳ Qu et al گزارش کردند که دگرامتازون القاء کننده تمایز استئوبلاستی و باعث بیان ژن های 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

1. Lennart D, Johns. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *J Athletic training* 2002; 37(3): 293-9.
2. Fischell TA, Abbas MA, Grant GW, Siegel RJ. Ultrasonic energy: effects on vascular function and integrity. *Circulation* 1991; 84: 1783-95.
3. 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.
4. 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.
5. Parviz 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.
6. Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K.
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.
8. Jui-Sheng Sun, Rue-Chain Hong. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells. *J Biomed Materi Res* 2005; 25(3): 449-56.
9. Li J K, et al. Cytokine release from osteoblast in response to ultrasound stimulation 2003; 24(13): 2379-85.
10. Eslaminejad MB, Nadri S, Hosseini RH. Expression of the 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period. *Dev Growth Differ* 2007; 49: 351-364.
11. 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. Conger PA, Minguez 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. Trople 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.