لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۲، دوره ۱۰، شماره ۲، ۳ و ٤، صفحات: ۱۵-۸ .

مقاله پژوهشی

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

داریوش همراهی [۱]
محمد باقر شیران [۲]
لیلا روحی [۳]
محسن خواجه جشوقانی [٤]
سپیده سعادتمند [٥]
دانیال آشیانی [٦]

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

۲. *دانشیار فیزیک‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه فیزیک‌پزشکی، تهران، ایران.*

۳. *استادیار زیست شناسی تکوین جانوری، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ، شهرکرد، ایران.*

۴. *کارشناس ارشد آموزش پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکدهٔ پیراپزشکی، مرکز مطالعات و توسعهٔ‌آموزش(EDC)، تهران، ایران.*

۵. *کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، مرکز پرتودرمانی صدرا، قم، ایران.*

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

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

خلاصه

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

روش بررسی: دستگاه فراصوت با فرکانس MHz۳ کالیبره شد. rMSCs از استخوان‌های ران و ساق پای موش جدا شده و کشت داده شدند. سلول‌ها با هدف خالص‌سازی تا پاساژ سوم پیش‌برده شدند. سلول‌های خالص‌شدهٔ پاساژ سوم در دو گروه حاوی دگزامتازون با غلظت $۱۰^{-۸}$ میلی‌مول و دگزامتازون و فراصوت با شدت $۳۵۵\ cm^{۲}/mW$ در مد پیوسته و در زمان ۵ دقیقه به‌صورت روزانه و تا ۱۴ روز قرار گرفتند درحالی‌که گروه کنترل فقط دگزامتازون داشت و هیچ فراصوتی دریافت نکرد. آنالیزهای سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و روش RT-PCR نیمه‌کمّی برای بیان ژن‌های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین به‌ترتیب 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 به‌طور معنی‌داری بیشتر از دگزامتارون بود ($p/۰۰۵\geq۰$) و آنالیز RT-PCR نیمه‌کمّی تفاوت معنی‌داری را در بیان ژن‌های تمایزی در دو گروه نشان داد ($p/۰۰۵\geq۰$).

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

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 استفادهٔ آن‌ها برای پیوند است[۱]. بسیاری از تحقیقات بنیادی و کلینیکی انجام‌شده در این زمینه با استفاده از مواد، داروها، فاکتورهای رشد و دیگر کمیت‌های فیزیکی و شیمیایی نشان‌دهندهٔ توانایی این سلول‌ها برای تمایز به رده‌های مختلف سلولی و ازجمله 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 آن‌جمله 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 [۹و۱۹-۱۷]. ازسوی‌دیگر براساس تحقیقات، دگزامتازون یک داروی شیمیایی کلیدی گزارش شده است که تأثیری پارادوکسی بر تمایز و قدرت بقای سلول‌ها دارا بوده است[۴، ۵ و۲۳-۲۰]. علاوه برآن، این مادهٔ شیمیایی بر تحریک استخوان‌سازی، سنتز پروتئین‌های مختلف استخوانی و از همه مهم‌تر القای گلیکوکورتیکوئیدها بسیار مؤثر گزارش شده است[۲۴]. باتوجه به محدودیت‌های ذکرشده 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. ازسوی‌دیگر، فراصوت به‌عنوان یک کمّیت 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، ۱۴و ۲۷-۲۵]. این ابزار و کمّیت 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 پژوهشکدهٔ پاستور خریداری شد. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی و در حیوانخانه با غذای دام و گرما و رطوبت کنترل‌شده نگه‌داری شدند.

کشت و جداسازی سلول‌های مزانشیمی:

حیوانات با استفاده از کلروفرم 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 ۱۵درصد سرم جنین گاوی FBS (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 به‌روش Flashing جدا شد و در یک لولهٔ حاوی ۱۳ میلی‌لیتر محیط DMEM و آنتی‌بیوتیک قرار گرفت. سلول‌های فوق پس از یک‌بار سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سوسپانس شدند و در فلاسک $۷۵Cm^2$ حاوی ۱۲ میلی‌لیتر محیط DMEM و آنتی‌بیوتیک و ۱۵ درصد سرم جنین گاوی منتقل شدند و در شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجهٔ 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 هر ۲ روز یک‌بار با محیط تازه به‌مدت ۱۰ روز تعویض شد. سلول‌ها پس از این دورهٔ زمانی به‌منظور افزایش جمعیت سلولی پاساژ داده شدند.

پاساژدهی سلول‌ها:

پس از رسیدن جمعیت سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰ درصد از سطح ظرف کشت، آن‌ها به‌وسیلهٔ محلول PBS شستشو داده‌شدند 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 پدیدهٔ حفره‌سازی انتخاب شد[۲۹]. کالیبراسیون منبع فراصوت با استفاده از روش فشار تابشی انجام شد. شدت $۳۵۵\ cm\ /\ mW^{۲}$ برای انجام طرح براساس تحقیقات قبلی محققان انتخاب شد[۱۳و۱۴].

بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌ها:

به‌علت اینکه تابه‌حال برای سلول‌های مزانشیمی موش مارکر خاصی شناسایی نشده است، درنتیجه 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 ردهٔ استخوان و چربی در محیط‌های القاء تمایزی به‌مدت ۲۱ روز تمایز داده شدند.

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و تکنیک RT-PCR برای ژن‌های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین برای بررسی تمایز به استخوان و رنگ‌آمیزی اویل قرمز و تکنیک RT-PCR برای ژن‌های C/EBP-α، PPAR-α، PPAR-γ برای بررسی تمایز به چربی استفاده شد[۱۴و۳۰].

فراصوت و دگزامتازون:

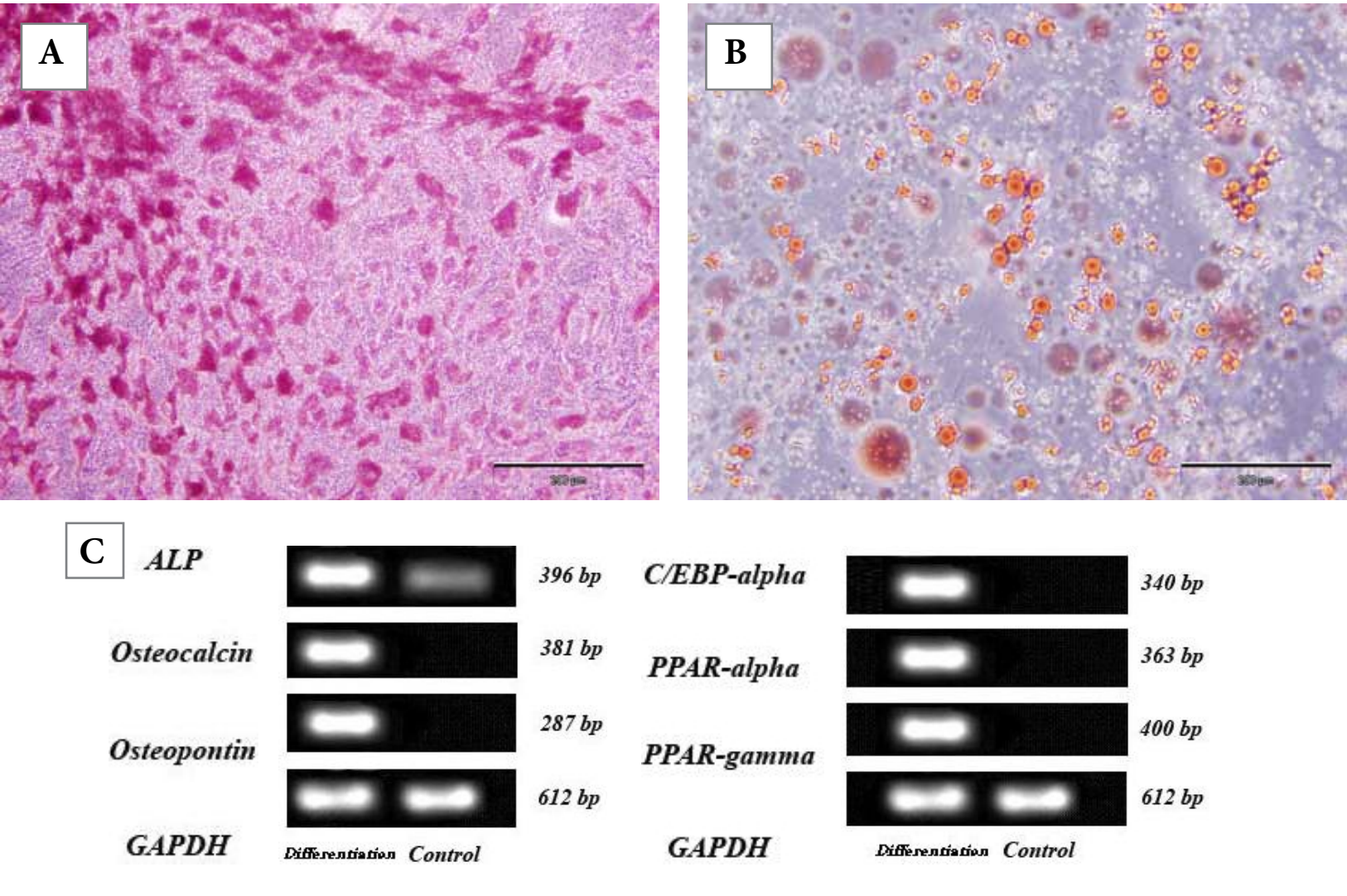
در این تحقیق سلول‌های با محیط حاوی دگزامتازون 10^{-8} mM کامل‌شده با ۱۵درصد سرم FCS تحت تابش امواج فراصوت با شدت ۳۵۵ mW.cm-2 و فرکانس ۳MHz در زمان تابش روزانه ۵ دقیقه قرار گرفتند. این فرآیند به‌مدت ۱۴ روز ادامه داشت و بررسی‌های سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و RT-PCR نیمه‌کمّی برای بیان ژن‌های تمایز به استخوان در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۴ مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعهٔ حاضر سلول‌هایی که هیچ‌گونه تیماری (دگزامتازون و فراصوت) دریافت نکردند، به‌عنوان گروه کنترل درنظر 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 هماتوکسیلین 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 نیمه‌کمّی:

برای بررسی بیان ژن‌های تمایز به استخوان از پرایمر ژن‌های



شکل ۱: A) رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز B) رنگ‌آمیزی اویل قرمز C) نتایج RT-PC

آلکالین‌فسفاتاز، 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 ترانس‌کریپتاز معکوس [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622, Fermentas, EU)] تهیه شد و در ادامه واکنش PCR انجام گرفت [۱۴].

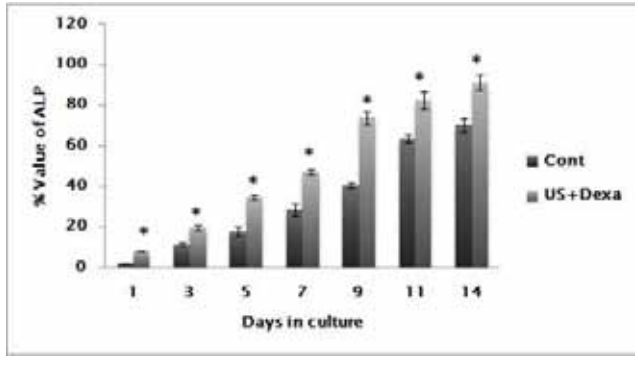
یافته‌ها

بررسی ماهیت سلول‌های مزانشیمی:

برای بررسی ماهیت سلول‌های مزانشیمی از تمایز آن‌ها به دو ردهٔ استخوان و چربی استفاده شد. سلول‌های پاساژ سوم به‌راحتی 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 آلکالین‌فسفاتاز:

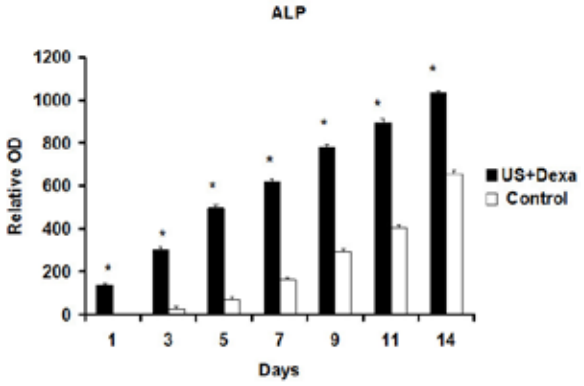
مقایسهٔ نتایج رنگ‌آمیزی آلکالین‌فسفاتاز در دو گروه نشان داد که میزان بیان آلکالین‌فسفاتاز در گروه فراصوت در تمامی روزها اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل دارد. تشکیل ندول‌های آلکالین‌فسفاتاز مثبت در گروه فراصوت زودتر، تقریباً در همان روز اول شروع می‌شد و این درصورتی‌است که تشکیل این ندول‌ها در گروه کنترل تقریباً از روز پنجم شروع می‌شود. مقایسهٔ دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p\leq ۰/۰۰۵$).



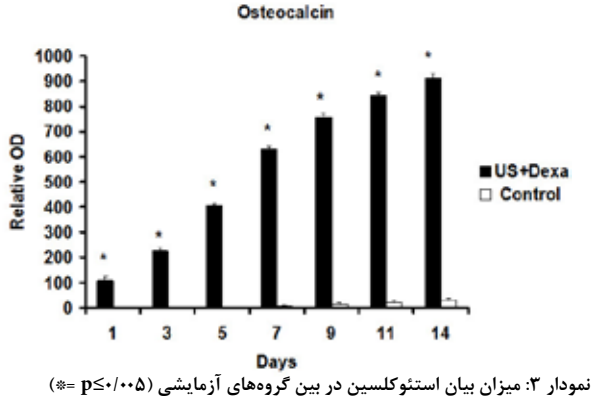
نمودار ۱: بیان آلکالین‌فسفاتاز در اثر فراصوت و دگزامتازون ($p\leq ۰/۰۰۵$ =*)

نتایج RT-PCR نیمه‌کمّی

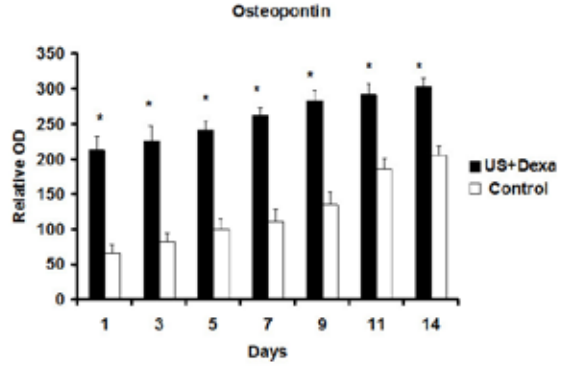
مقایسهٔ نتایج در گروه فراصوت و کنترل در مورد تمامی ژن‌ها اختلاف معنی‌داری را میان دو گروه فراصوت و کنترل نشان می‌دهد. ژن آلکالین‌فسفاتاز درگروه فراصوت در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری در میزان بیان است ($p\leq ۰/۰۰۵$). مقایسهٔ میزان بیان ژن استئوکلسین در دو گروه حاکی از این مطلب بود که فراصوت باعث افزایش معنی‌داری در بیان این ژن نسبت به گروه کنترل می شود($p\leq ۰/۰۰۵$). بیان ژن استئوپونتین نیز تحت تأثیر امواج فراصوت افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در این گروه آزمایشی از خود نشان داد($p\leq ۰/۰۰۵$).



نمودار ۲: میزان بیان آلکالین‌فسفاتاز در بین گروه‌های آزمایشی ($p\leq ۰/۰۰۵$ =*)



نمودار ۳: میزان بیان استئوکلسین در بین گروه‌های آزمایشی ($p\leq ۰/۰۰۵$ =*)



نمودار ۴: میزان بیان استئوپونتین در بین گروه‌های آزمایشی ($p\leq ۰/۰۰۵$ =*)

بحث و نتیجه‌گیری

دگزامتازون یک هورمون گلوکوکورتیکوئید است که می‌تواند تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان را تنظیم کند و سبب افزایش فعالیت آلکالین‌فسفاتاز می‌گردد. مقادیر پایین دگزامتازون، استئوژنزیز را القاء می‌کند درحالی‌که مقادیر بالای آن عملکرد استخوان‌سازی را مهار می‌کند[۳۱]. تغییرات سلولی ازقبیل تغییراتی در حرکت و تحریک سنتز و ترشح می‌تواند به‌وسیلهٔ امواج فراصوت با شدت پایین که دراصل یک اثر غیر حرارتی می‌باشد، القاء شود. به‌نظر 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 نه‌تنها 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 به‌دنبال 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 آلکالین‌فسفاتاز در هر دو گروه نشان‌دهندهٔ توانایی دگزامتازون به‌تنهایی در پیشبرد تمایز استئوژنیک در MSC ها می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند که با افزودن فراصوت در تمامی روزها بیان آلکالین‌فسفاتاز چه در مقیاس سلولی و چه در سطح ژنی افزایش معنی‌داری را درپی خواهد داشت. این فرآیند را می‌توان به‌عنوان یک اثر سینرژیک دانست زیرا در تحقیق دیگری که انجام گرفته است، فراصوت به‌تنهایی توانایی برانگیزش بیان آلکالین‌فسفاتاز را در سطح سلولی و ژنی دارا می‌باشد[۱۴]. بیان دیگر ژن‌های مسیر تمایزی استئوژنیک در این طرح تأییدی بر توانایی دگزامتازون به‌عنوان 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.

درسال ۱۹۹۸، BRUDER و همکاران نشان دادند که سلول‌های MSC قابلیت تمایز به رده‌های مزودرمی ازجمله استخوان، غضروف، تاندون، عضله و چربی را دارا می‌باشند[۳۲]. یکسال پس از وی در سال ۱۹۹۹، Kim و همکاران در مقاله ای 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 خواهدشد[۲۲]. در همان سال، Mori و همکاران توانایی دگزامتازون را در دیگر تمایزهای MSC ها نشان دادند[۲۳]. غلظت بهینهٔ دگزامتازون برای القای تمایز توسط Walsh در سال ۲۰۰۱ انتشار یافت ولی غلظت‌های اشباع این ماده را ممانعت‌کنندهٔ تمایز عنوان نمود[۱۵]. تحقیقات محققان دیگر نشان‌دهندهٔ تأثیر کلیدی دگزامتازون در فرآیندهای تمایزی سلول‌های بنیادی می‌باشند [۱۱-۷، ۱۶و ۳۵-۳۳]. بنابراین بدون دگزامتازون تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌سمت دودمان استئوژنیک به‌سختی انجام خواهد شد که این نتیجه به‌وسیلهٔ کاهش فعالیت ALP نشان داده شد(نمودار ۱و۲). 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 درون‌سلولی 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[۱۴و ۴۴-۴۰].

به‌نظر 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 به‌شمار می‌آید. درنهایت 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. Tekkatte 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. JJ 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 differentaition or further maturation of human osteoblat precursors in vitro: relevance to glucocoticoid-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-b 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, Virdi AS. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. Ultrasonics 2011; 51: 281-8.