مقاله پژوهشی

لیزرپزشکی؛ ۱۳۸۷، دوره ۵، شماره ۲: صفحات ۱۱-۶.

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

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 سلول های بنیادین بالغین
[۳] پژوهشکده رویان- گروه ژنتیک
[۴] دانشجوی دکترای زیست شناسی 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

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 بوسیلهٔ القاء تمایز در rMSCs و پیشبرد آن به سمت استئوژنزیس 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 سلول ها 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 $۳۵۵mW.cm^{-2}$ و در مد پیوسته تا دو هفته دریافت کردند درحالی‌که گروه کنترل فراصوت دریافت نکرد. آنالیزهای سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و روش RT-PCR نیمه کمی برای بیان ژنهای آلکالین 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 آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت بطور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود (۱۲ ± ۸۸/۶ ٪ در مقابل ۲۳ ± ۳۰/۱۴ ٪) ($p\leq۰/۰۰۵$). نتایج RT-PCR نیمه کمی بیان ژن های تمایزی از تفاوت معنی‌داری را در دو گروه نشان داد ($p\leq۰/۰۰۵$).

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، سلول های بنیادی مزانشیمی رت (rMSCs)، تمایز استئوژنیک

مقدمه

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

همچنین فراصوت توانایی افزایش برانگیزش بیان فاکتورهای بسیاری را در انواع سلول ها از جمله IL-γ، IL-β، TGF-β و .. را دارا می باشد. نظریاتی نیز در این مورد وجود دارد که مبتنی بر فرضیهٔ تشدید فرکانسی فراصوت است. بر اساس این فرضیه فراصوت توانایی تغییر در شکل گیری سه بعدی پروتئین ها و آنزیم های درون سلولی و ایجاد مناطق Active Site و نیز برداشت مهارکننده‌ها را از ساختمان پروتئین ها و آنزیم ها دارا می باشد [۲، ۳ و ۴]. در سال ۱۹۹۹، Parvizi et al بیان ژن اگریکان و افزایش سنتز پروتوگلیکان را در سلول های 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 ردهٔ استخوانی MC3T3 موشی انجام شده، نشان داد که این امواج توانائی برانگیزش بیان PGE_2/COX-2 را دارا می باشند [۶]. در سال ۲۰۰۰، Ito و همکاران مطالعه‌ای را بر روی سلول های SaOs-2 از رده سلول های استئوبلاستی انجام دادند و افزایش آزاد شدن PDGF-AB را در این ردهٔ سلولی در اثر تیمار با شدت های پایین گزارش کردند [۷]. در سال ۲۰۰۵، Jui-Shong sun اثر امواج فراصوت پالسی با شدت پایین (فرکانس ۱MHz و شدت $۰/۰۶۸ W.cm^{-2}$) 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].

Archive of SID

www.SID.ir

از سوی دیگر، مطالعات بسیاری در مورد سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) بعنوان یک منبع جایگزین مناسب سلولی برای پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت‌های استخوان، بر اساس قابلیت تمایز آنها به رده‌های استخوانی و نیز پایداری فنوتیپی آنها در پاساژهای متوالی، انجام گرفته است. بر پایه این مطالعات استئوژنزیس درسلول‌های مزانشیمی نیازمند شرایط کشت خاص، همچون فاکتورهای رشد مختلف، مواد شیمیائی 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 سلول‌های 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 ۶-۴ هفته بوسیلهٔ 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 استرپتومایسین (Gibco,Germany) و ۱۰۰ واحد بین المللی پنی‌سیلین (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. 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 آنتی بیوتیک و ۱۵٪ FBS منتقل شده و در شرایط ۵٪ CO_2 و دمای ۳۵°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 درصدکف ظرف پر از سلول شد که در این زمان، اولین پاساژ سلولی با استفاده از Trypsin/EDTA 0.05% انجام گرفت. سلول‌ها 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 ردهٔ استخوان و چربی در پلیت‌های ۶ خانه به‌مدت ۲۱ روز تحت تأثیر محیط‌های القای تمایزی، قرار داده شدند. به‌منظور بررسی تمایز سلول‌ها به استخوان از رنگ آمیزی آلیزارین رد و تکنیک RT-PCR برای ژن های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئوپونتین و برای بررسی تمایز آن‌ها به چربی از رنگ آمیزی اویل رد 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 پدیدهٔ 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]. ناحیهٔ دورترین فاصلهٔ محوری با استفاده از کاغذ و رنگ بدست آمده و ازشکل بدست آمده برای میدان فراصوت برای محاسبهٔ بیشترین شدت (Peak Intensity) به روش ارائه شده توسط G.Kossof (1962) بدست آمد [۲۱]. برای یافتن منطقهٔ 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 ناحیهٔ LAM و در پلیت ۱۲ چاهکی بدست 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 ($mW.cm^{-2}$ ۳۵۵) بدست آمد.

برای جلوگیری از بوجود آمدن امواج ایستاده [1] 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 کیت سنجش آلکالین فسفاتاز (Product No.85 SIGMA–ALDRICH) استفاده شد. در این روش سلول ها ابتدا بوسیلهٔ 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 بوسیلهٔ میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی و شمارش بوسیلهٔ نرم افزار Image J قرار گرفت. میانگین نتایج با یگدیگر بوسیلهٔ 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 استئوپونتین استفاده شد. ژن مرجع [2] GAPDH انتخاب شد. برای این منظور RNA کل سلول‌های مورد نظر با استفاده از RNX- Plus (Cinagen, Tehran) و مطابق با

1- Standing Waves
2- House Keeping Gene

Archive of SID
www.SID.ir

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 ۴۵ ثانیه و 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 چرخهٔ PCR خارج شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۷درصد 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 آنها

Target cDNA	Primer Sequence(5'-3')	Size Product	Annealing temperature (C°)	PCR cycles
ALP	F:CGGACCCTGCCTTACCAACTCATTTGTGCC R: CGCACGCGATGCAACACCACTCAGG	396	72	35
Osteopontin	F: GATTATAGTGACACAGAC R: AGCAGGAATACTAACTGC	287	50	35
Osteocalcin	F: GTCCCAACAAGCAACTCG R: CCAAAGCTGAAGCTGCCG	381	56	35
C/EBP-alpha	F: ACGTGGAGACGCAGCAGAA R: AGGCGGTCATTGTCACTGG	340	61	35
PPAR-alpha	F: CCCTGCCTTCCCTGTGAACTGAC R: GGGACTCATCTGTACTGGTGGGGAC	363	70	35
PPAR-gama	F: GGTGAAACTCTGGGAGATCC R:TGAGGGAGTTTGAAGACTCTTC	400	57	35
GAPDH	F: TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC R: AAAGGTGGAAGAATGGGAG	380	53	24,35

یافته‌ها

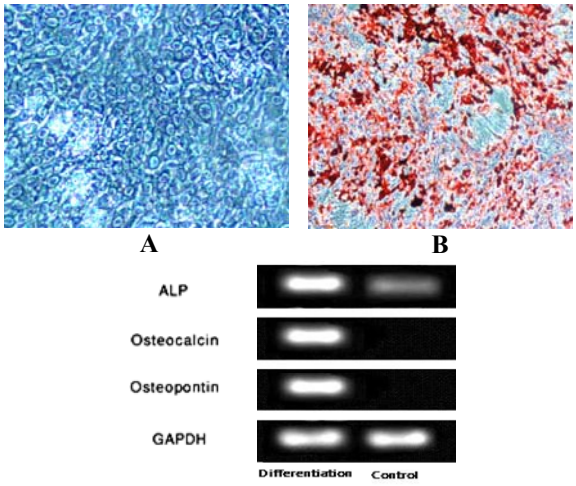
بررسی ماهیت سلول های مزانشیمی:

برای بررسی ماهیت سلول های مزانشیمی از تمایز آنها به دو ردهٔ 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:

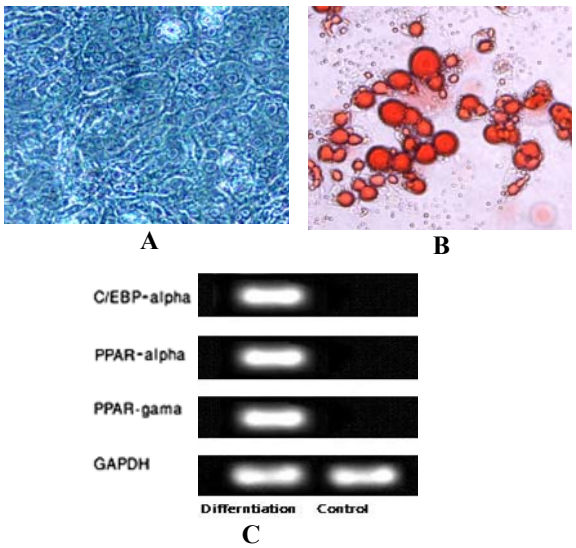
با استفاده از این روش سلول هایی که تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته بودند در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم، نهم، یازدهم و چهاردهم از نظر بیان آلکالین فسفاتاز بررسی شدند. نکته قابل توجه در



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 میکرمتر)

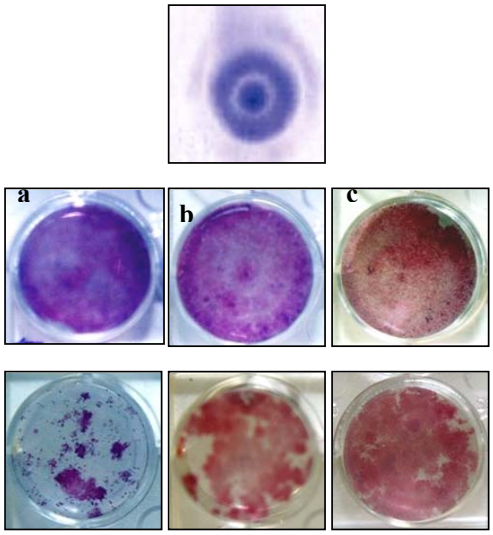
این مورد این است که در گروه آزمایشی در روز هفتم، الگوی رنگ‌شدگی سلول‌ها توسط آلکالین فسفاتاز در ظرف کشت، منطبق بر شکل میدان فراصوت بود. این شکل در روز یازدهم مشخص‌ترین حالت خود را داشت و در روز چهاردهم از بین رفت. در گروه کنترل رنگ‌پذیری سلول‌ها در طول کشت با افزایش روزهای کشت افزایش می یافت. در این 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 ($P\leq$ ۰/۰۰۵).



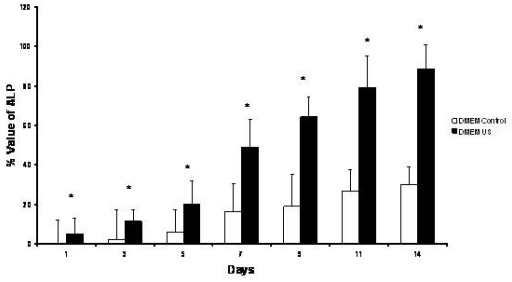
شکل ۲- تمایز سلول ها به چربی

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

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳- 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)



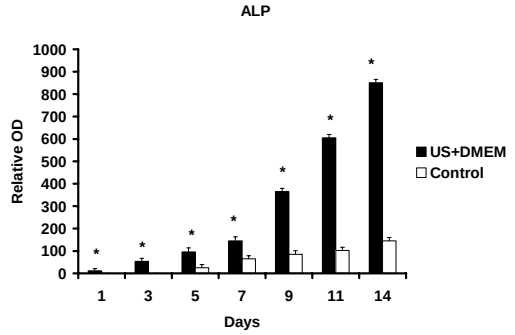
شکل ۴- بیان آلکالین فسفاتاز در دو گروه فراصوت و کنترل (*=P<0.005)

نتایج RT-PCR نیمه کمی:

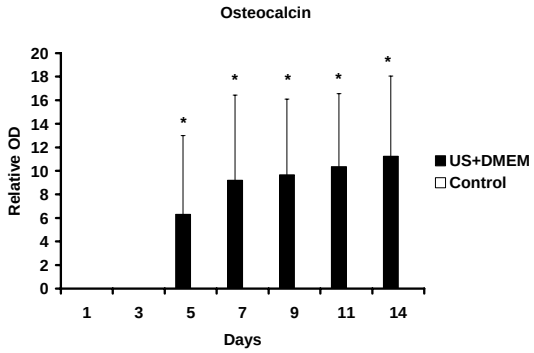
نتایج نشان داد که بیان ژن آلکالین فسفاتاز در گروه فراصوت بیشتر از این میزان در گروه کنترل بود. به طوری‌که اختلاف میان دو گروه در بیان این ژن معنی دار بود(P≤۰/۰۰۵). نتایج نشان دادند که در گروه کنترل تا پایان روز چهاردهم ژن استئوکلسین بیانی نداشت، اما در گروه فراصوت این ژن از روز سوم بیان داشت و تا روز چهاردهم بیان آن به صورت افزایشی بود. اختلاف میان دو گروه کنترل و فراصوت معنی دار بود (P≤۰/۰۰۱). 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 صورتی‌که در نمونهٔ کنترل فقط در روزهای پایانی بیان کمی داشت. اختلاف میان این دو گروه معنی دار بود (P≤۰/۰۰۵).

آنالیز آماری:

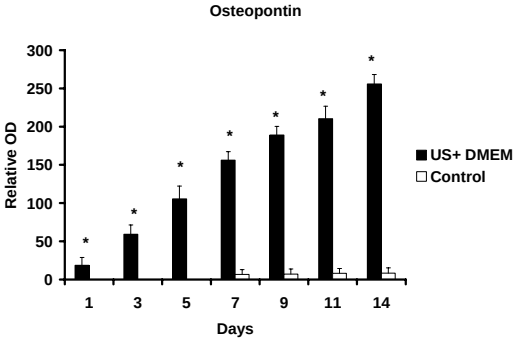
هر یک از قسمت های آزمایش برای ۱۰ نمونه، سه بار تکرار شده و میانگین نتایج با یگدیگر بوسیلهٔ آزمون آماری T-test از جهت معنی‌دار بودن یا نبودن نتایج با استفاده از نرم افزار SPPS 13.0 مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل۵- میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز در دو گروه فراصوت و کنترل (*=P<0.005)



شکل۶- میزان بیان استئوکلسین در دو گروه فراصوت و کنترل (*=P<0.005)



شکل۷- میزان بیان ژن استئوپونتین در دو گروه فراصوت و کنترل (*=P<0.005)

www.SID.ir

بحث

در سال ۲۰۰۱، Andrades با بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی به رده‌های استخوان و غضروف بیان آلکالین فسفاتاز و تولید استئوکلسین را عامل شناخت تمایز Chondro-Osteogenic برشمرد. او با استفاده از القاء تمایز با استفاده از موادی از قبیل دگزامتازون و بتاگلیسرول فسفات تمایز را در این ردهٔ 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 $30 mW.cm^{-2}$ 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 TGF-β1, 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 ($p\leq ۰/۰۰۵$).

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 دهندهٔ تمایز، بویژه استئوکلسین ($P\leq ۰/۰۰۵$)، 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 نظریهٔ تشدید فرکانسی فراصوت با تغییر در شکل برخی از پروتئین ها و ترکیبات ماکرو مولکولی در سلول باعث برانگیزش برخی پاسخ ها درسلول ـ از جمله بیان ژن های تمایز به استخوان ـ 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 استئوژنزیس rMSCs داشته باشد.

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. 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.
6. 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.
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 thy 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 Emberyol 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 subcultiration 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 ultrasounic 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 drived 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-1monocolonal 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.

Archive of SID

www.SID.ir