

Effects of electromagnetic field (50 Hz) on mouse embryonic tissue differentiation

Anissian A^{1*}, Valiollahi S²

1- Department of Pathology, Islamic Azad University- Abhar branch, Abhar, I. R. Iran

2- Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

Received April 11, 2010; Accepted August 21, 2010

Abstract:

Background: Electricity expenditure in modern societies is extremely spreading out world wide. Since scant information is available about the side effects of this type of energy on body tissues, the aim of present study was to assess the possible effects of electromagnetic field (EMF) on undifferentiated tissues.

Materials and Methods: The undifferentiated tissues obtained from 10-day fetal mesenchymal cells of mouse were divided into two groups, each included 10. The tissues were exposed to the EMF (50 Hz, 80 G) for 8 hours. After a 24 hour incubation, the samples were fixed, processed, sectioned (5 μ m thickness) and stained with hematoxiline and eosin method. Then, they were studied using light microscopy.

Results: Our findings indicated that while the undifferentiated tissues were converted to cartilage in the EMF exposed group they left unchanged in the control group.

Conclusion: The EMF may induce the differentiation of tissues in undifferentiated cells.

Keywords: Electromagnetic fields, Cell differentiation, Cartilage

* Corresponding Author.

Email: anissian@iau-abhar.ac.ir

Tel: 0098 912 605 0999

Fax: 0098 21 882 87341

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Autumn, 2010; Vol. 14, No 3, Pages 223-228

بررسی اثر میدان الکترومغناطیسی ۵۰ هرتز بر القای تمایز در بافت جنینی موش

علی انیسیان^{۱*}، سعیده ولی الهی^۲

خلاصه

سابقه و هدف: افزایش روز افزون استفاده از انرژی الکتریکی در جوامع مدرن باعث شده است که مردم به طور بی‌سابقه‌ای در معرض میداین الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار کم قرار گیرند. از آنجا که اطلاعات کمی در مورد تاثیرات این نوع انرژی بر بافت‌های زنده بدن در دست است، هدف از مطالعه حاضر، مشخص کردن اثرات میدان الکترومغناطیسی ۵۰ هرتز بر بافت‌های تمایز نیافته جنینی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از بافت پیوندی تمایز نیافته (مزانشیمی) جنین موش استفاده شد. بافت‌ها از جنین‌های موش ۱۰ روزه جدا شده و در دو گروه ۱۰ تایی مورد و شاهد قرار داده شدند. در گروه مورد بافت تمایز نیافته جنین موش در محیط کشت نوترینت آگار و در معرض تابش الکترومغناطیسی ۵۰ هرتز به مدت ۸ ساعت قرار گرفت، در حالی که گروه شاهد در معرض تابش قرار نگرفت. پس از اعمال روندهای بافت‌شناسی روی بافتها از آنها برش‌های ۵ میکرونی تهیه شده و به روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی گردیدند.

نتایج: در بافت‌هایی که در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار گرفته بودند، نشانه‌هایی از تبدیل بافت تمایز نیافته به بافت غضروفی و از دست رفتن بافت پوششی روی آن مشاهده شد. در مقایسه، موارد شاهد فاقد بافت غضروفی بوده و بافت پوششی روی آنها سالم باقی مانده بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد میدان الکترومغناطیسی می‌تواند بدون وجود محرک‌های دیگر محیطی، از قبیل گرما، باعث القای تمایز در بافت تمایز نیافته جنینی گردند.

واژگان کلیدی: میدان الکترومغناطیسی، تمایز سلولی، غضروف

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۲۲۸-۲۳۳

مقدمه

خطوط انتقال برق فشار قوی، امواج راداری، بی‌سیم‌ها و غیره، از مصادیق مواجهه با این پدیده می‌باشند [۴]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که مواجهه با میداین الکترومغناطیسی تا حدی که منجر به بالا رفتن دما در بافت شود، می‌تواند به عنوان یک عامل سرطان زا محسوب گردد [۵]. مواجهه به مدت ۲ ساعت در روز با میدان الکترومغناطیسی با شدت ۳ میلی تسلا باعث کاهش میزان کورتیزول و انسولین و کاهش میزان T_4 ، T_3 در خون موش‌های مورد تابش قرار گرفته، شده است [۱]. همین طور گزارش شده که مواجهه کوتاه مدت موش باردار با میدان الکترومغناطیسی باعث ایجاد اثرات تراژوژنیک در جنین در حال تکامل گردیده [۶] و بر اساس آزمایشی دیگر بر روی بی‌مهرگان، مواجهه با میدان الکترومغناطیسی باعث کاهش باروری در آنها شده است [۷]. تحقیقات نشان داده است که القای تکثیر در استئوبلاست‌های کشت شده و مهار استئوکلاستوژنز توسط میدان الکترومغناطیسی ایجاد شده است [۸]. در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شد که میدان الکترومغناطیسی باعث تخریب ساختمان DNA شده است. گرچه در این خصوص هنوز اختلاف نظر وجود دارد [۹]. ولی افزایش پایداری رادیکال‌های آزاد به واسطه قرار گرفتن سلول در مواجهه با میدان الکترومغناطیسی مورد تأیید قرار گرفته است [۱۰، ۱۱]. قرار

در دهه‌های اخیر استفاده از جریان الکتریسته در جهان گسترش چشم‌گیری یافته و به عنوان یکی از شاخص‌های جوامع پیشرفته درآمده است. به همین خاطر محققین توجه خود را بر اثرات جانبی میداین الکترومغناطیسی بر بدن، متمرکز نموده‌اند [۱]. افزایش روز افزون استفاده از انرژی الکتریکی و وسایل مرتبط با آن از قبیل تلفن همراه، دستگاه‌های تولید کننده امواج مایکروویو و غیره در جوامع مدرن باعث شده که مردم در سطح بی‌سابقه‌ای از میداین الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار کم زندگی کنند. مردم در جوامع صنعتی در فضایی آکنده از میداین‌های الکترومغناطیسی طبیعی و مصنوعی زندگی می‌کنند. برخی مطالعات اپیدمیولوژیک نتایج مثبتی را در خصوص ارتباط بین در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار گرفتن و وقوع چندین نوع سرطان به اثبات رسانده‌اند [۴-۲].

^۱ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر

^۲ پزشک عمومی، دانش آموخته دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نشانی نویسنده مسئول:

اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر

تلفن: ۰۹۱۲۶۰۵۰۹۹۹

دورنویس: ۰۲۱ ۸۸۲۸۷۳۴۱

پست الکترونیک: anissian@iau-abhar.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۹/۵/۳۰

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۲

گوساله، ۶ درصد عصاره جنین مرغ، ۵ میکرولیتر در میلی لیتر پنی-سیلین و استرپتومایسین بود. بافت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. پس از طی دوره کشت، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده شده و پس از ۴۸ ساعت با آب مقطر شستشو داده شده و عملیات فرآوری بر روی آن‌ها انجام گردید. سپس بافت‌ها، قالب گیری شده و به وسیله میکروتوم، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون گرفته شد. این برش‌ها با رنگ‌های هماتوکسیلین و انوزین (H&E) (ساخت شرکت مرک آلمان) رنگ آمیزی شده و با میکروسکپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. تغییرات حاصل در بافت‌ها امتیاز دهی شده و داده‌های به دست آمده با آزمون t و توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ مقایسه شدند.

نتایج

نمونه‌های شاهد دارای بافت پوششی یکپارچه بر روی سطح بافت پیوندی مزانشیمی بودند. بافت مزانشیمی نمونه‌های شاهد از سلول‌های دوکی شکل و چند وجهی تمایز نیافته تشکیل شده بود. فضاهای خارج سلولی در این بافت کاملاً مشهود بودند؛ در حالی که در نمونه‌های مورد آزمایش بافت پوششی از بین رفته و سلول‌های تمایز نیافته زیر آن به شدت به هم فشرده شده و تعداد زیادی سلول‌های تمایز نیافته نکروتیک که تیره رنگ شده بودند و فضای خارج سلولی بسیار کمی داشتند، مشاهده می‌شدند. در تمام نمونه‌های مورد آزمایش، در بافت تمایز نیافته، بافت غضروفی مشاهده می‌شد که به وسیله لایه‌ای از سلول‌های سنگ-فرشی احاطه شده بودند. کندروسیت‌ها حاوی سیتوپلاسمی کف آلود بودند که توسط ماده زمینه‌ای بی شکل احاطه شده بودند (تصویر شماره ۲). نتایج به دست آمده، پس از امتیازبندی از صفر یعنی بدون تغییر تا ۳ (تغییرات شدید) با استفاده از آزمون t در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین شدت تغییرات بافتی در دو گروه مطالعه وجود دارد ($P=0/04$).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میدان الکترومغناطیسی می‌تواند باعث القای تمایز در سلول‌های تمایز نیافته گردد و در نتیجه آن، بافت‌های تمایز نیافته جنینی به راحتی توسط تحریکات محیطی تغییر شکل دادند. تمایز سلول‌های تمایز نیافته که در این مطالعه به وقوع پیوست، نمونه‌ای از این تغییرات بوده است که به وسیله تحریک سلول‌های بنیادی موجود در بافت پیوندی

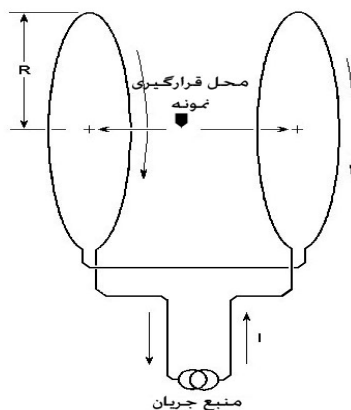
دادن جنین تخم مرغ‌های در حال گذراندن دوره انکوباسیون در مجاورت یک تلفن موبایل که هر ۳ دقیقه یک بار با آن تماس گرفته می‌شد، باعث مرگ و میر جنین‌ها در روزهای ۹ تا ۱۲ انکوباسیون گردید [۱۲]. گزارشی دیگر حاکی از آن است که میدان مغناطیسی، باعث اختلال در روند اتصال گامت‌ها به یکدیگر می‌شود [۱۳]. همچنین قرار دادن موش‌های آبستن در مواجهه با میدان الکترومغناطیسی در روزهای ۱ تا ۱۹ آبستنی باعث کاهش تعداد سلول‌های هرمی در شاخ آمون مغز جنین‌ها گردید [۱۴]. اگرچه اطلاعات کمی در مورد تأثیرات این نوع انرژی که باعث اختلالاتی از جمله ایجاد سرطان بر بافت‌های جنینی در حال تکامل می‌شود، در دست است، با این حال، بعضی دیگر از محققین، ضمن رد کردن این موضوع، هیچ ارتباطی بین قرار گرفتن در معرض امواج الکترومغناطیسی و ایجاد سرطان، قایل نیستند. و حتی در بعضی موارد، میدان الکترومغناطیسی را عاملی در جهت سرعت بخشیدن به روند درمان ذکر می‌نمایند [۱۳]. این مسئله، اختلاف نظر جدی را بین دانشمندان ایجاد نموده است که مطالعه حاضر بر این اساس و به منظور مشخص کردن اثرات این نوع انرژی بر بافت‌های تمایز نیافته جنینی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

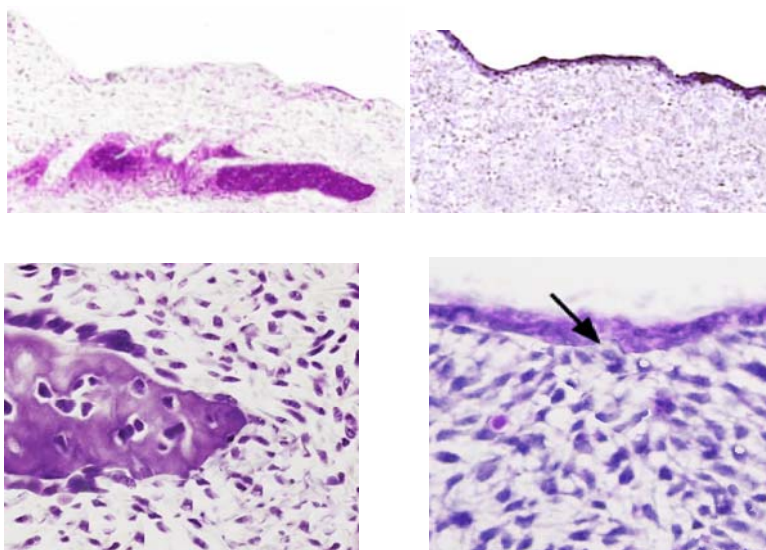
دستگاه ایجاد کننده امواج الکترومغناطیسی بر اساس سیم پیچ هلمهولتز بود که جریانی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۸۰ گوس ایجاد می‌نمود. دو سیم پیچ به فاصله ۳۰ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داشته و بین آن‌ها فضایی استوانه‌ای به قطر ۱۵ سانتی‌متر قرار داشت که نمونه‌های بافتی مورد آزمایش درون آن قرار داده می‌شد (تصویر شماره ۱). بافت‌های تمایز نیافته از بافت پیوندی مزانشیمی جنین‌های موش ۱۴ روزه جدا شده و در ۲۰ شیشه ساعت مختلف، تقسیم شده به دو گروه ۱۰ تایی مورد و شاهد، حاوی سرم اسب قرار داده شد [۱۵]. سپس به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض تابش امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز قرار گرفتند [۱۶]. در مورد بافت‌های شاهد نیز همین روند به اجرا درآمد؛ با این تفاوت که فقط مورد تابش قرار نگرفتند. در طول آزمایش هم در نمونه مورد آزمایش و هم در نمونه شاهد، دمای نهایی سرمی که بافت‌ها در آن قرار داشتند ۳۷ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد. پس از انجام تابش، نمونه‌ها بر روی فیلتری با روزهایی به قطر ۰/۴۵ میکرومتر و ضخامت 25 ± 5 میکرومتر قرار داده شدند. سپس این فیلترها، روی محیط کشت نوترینت آگار گذاشته شدند. محیط‌های کشت، حاوی ۱ درصد آگار، ۱ درصد گلوتامین، ۱۰ درصد سرم

نیز ایجاد اثرات ترانوژنیک در جنین موش، که در دو مطالعه مشابه دیگر مورد بررسی قرار گرفته است، همین تغییرات بوده باشد [۱۲،۱۷]. همچنین شواهدی در خصوص تبدیل سلول‌های تمایز نیافته به استئوبلاست [۱۸]، آدیپوسیت [۱۹]، و هیستوسیت [۲۰] در دست است.

مزانشیمی اتفاق می‌افتد. به نظر می‌رسد که این اتفاق به علت تقویت ساخت ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. بنابراین سنتز ماده زمینه‌ای غضروفی می‌تواند زودتر از روند طبیعی تکامل سلول‌های مزانشیمی القا شده و مقدار بیشتری پروتئوگلیکان در بافت تجمع یابد. شاید علت مرگ و میر در جنین تخم مرغ‌های انکوبه شده و



تصویر شماره ۱- شکل شماتیک دستگاه تولید کننده میدان مغناطیسی



تصویر شماره ۲- تصاویر سمت راست بالا (بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر) و پایین (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر)، نمونه شاهد را نشان می‌دهد. بافت پوششی (پیکان) و بافت مزانشیم در زیر آن بدون تغییر باقی مانده‌اند؛ در حالی که در تصاویر سمت چپ بالا و پایین (بزرگ‌نمایی‌های ۴۰ و ۴۰۰ برابر)، نمونه مورد آزمایش مشاهده می‌شود که در آن تمایز سلول‌های مزانشیمی به بافت غضروفی، به طور مشخص دیده می‌شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین).

تزریق هورمون‌های رشد صورت گرفت، دوره غضروف زایی در مواجهه با میدان الکترومغناطیسی طولانی نشد. پیدایش غضروف در اثر میدان الکترومغناطیسی و تجمع بیشتر ماده زمینه‌ای و به وجود آمدن کندروسیت‌ها نشان می‌دهد تمایز، در سلول‌های تمایز نیافته القا شده است؛ همچنین در مطالعه‌ای مشخص شده بود که امواج الکترومغناطیسی کم انرژی می‌توانند ترمیم استخوان را

در یک مطالعه، دانشمندان نقش ویژه‌ای برای افزایش دما در محیط، جهت القای سرطان و تغییرات متابولیک قائل شده‌اند [۲۱]؛ ولی از آن جا که در این آزمایش با این که نمونه تحت تاثیر تابش قرار گرفته بود هیچ تغییری در درجه حرارت محیط به وجود نیامد و دما ثابت نگه داشته شده بود، تغییرات نئوپلاستیک مشاهده نگردید. برخلاف مشاهداتی که در نتیجه تحریک بافت مزانشیمی با

گیرنده‌های مربوط به آن‌ها یکی دیگر از علل احتمالی القای تمایز در اثر میداين الکترومغناطیسی شناخته شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شده است، میداين الکترومغناطیسی که موجب افزایش کلاژن در زخم‌های پوستی شده بودند، قادر به افزایش بیان گیرنده β -TGF در فیبروبلاست‌های پوستی هستند [۲۸]. همین طور ممکن است این میداين، مکانیسم‌های سیگنالی انتقال غشایی، که مربوط به سایتوکین‌های مرتبط به تمایز سلولی می‌باشند را تحت تأثیر قرار داده و در نهایت بتواند باعث تغییر در روند انتقال سیگنال‌های تنظیمی و تغییر در فعالیت‌های نسخه برداری و ساخت و ساز سلولی شوند.

نتیجه گیری

از این مطالعه نتیجه می‌گردد، میدان الکترومغناطیسی ضعیف هم در مدت زمان طولانی می‌تواند بدون وجود محرک‌های دیگر محیطی، از قبیل گرما، باعث القای تمایز در بافت تمایز نیافته جنینی گردد. همچنین، مشخص شد که سلول‌های مزانشیمی توانایی پاسخ به تعدادی از تحریکات خارجی را داشته و می‌توانند در اثر آن، به سایر سلول‌های بافت پیوندی تمایز یابند.

تشکر و قدردانی

این مقاله از بودجه پژوهشی مصوب طرح‌های پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر حاصل گردیده است که بدین وسیله از معاونت پژوهشی آن دانشگاه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

- [1] Anselmo CW, Pereira PB, Catanho MT, Medeiros MC. Effects of the electromagnetic field, 60 Hz, 3 microT, on the hormonal and metabolic regulation of undernourished pregnant rats. *Braz J Biol* 2009; 69(2): 397-404.
- [2] Batellier F, Couty I, Picard D, Brillard JP. Effects of exposing chicken eggs to a cell phone in "call" position over the entire incubation period. *Theriogenology* 2008; 69(6): 737-45.
- [3] Belyaev IY, Grigoriev YG. Problems in assessment of risks from exposures to microwaves of mobile communication. *Radiat Biol Radioecol* 2007; 47(6): 727-32.
- [4] Blackman CF. Can EMF exposure during development leave an imprint later in life? *Electromagn Biol Med* 2006; 25(4): 217-25.
- [5] Juutilainen J. Developmental effects of electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2005; 7: 107-15.
- [6] Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming

growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 1990; (250): 261-76.- [7] Bojjawar T, Jalari M, Aamodt E, Ware MF, Haynie DT. Effect of electromagnetic nanopulses on *C. elegans* fertility. *Bioelectromagnetics* 2006; 27(7): 515-20.
- [8] Tamma R, Dell'endice S, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Patella V, et al. Extracorporeal Shock Waves Stimulate Osteoblast Activities. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35(12): 2093-100.
- [9] Luo Q, Yang J, Zeng QL, Zhu XM, Qian YL, Huang HF. 50-Hertz electromagnetic fields induce gammaH2AX foci formation in mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod* 2006; 75(5): 673-80.
- [10] Eleuteri AM, Amici M, Bonfili L, Cekarini V, Cuccioloni M, Grimaldi S, et al. 50 Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance protein carbonyl groups content in cancer cells: تحریک کنند [۲۲] که شاید به علت افزایش جریان کلسیم داخل بافتی باشد. این مطالعه نشان داد که مجموعه‌ای از سلول‌ها در بافت تمایز نیافته، مستعد پاسخ به تحریک توسط میدان الکترومغناطیسی می‌باشند. همین طور، مشخص شده که سلول‌های مزانشیمی توانایی پاسخ به تعدادی از تحریکات خارجی را داشته و می‌توانند به استئوبلاست و کندروبلاست تبدیل شوند [۲۳]. مثال روشنی از این موضوع تحریک سلول‌های تمایز نیافته به وسیله β -TGF (Transforming growth factor- beta) و تمایز آن‌ها به سلول‌های غضروف ساز می‌باشد [۲۴-۲۷]. مطالعات نشان داده‌اند، که تحریک الکتریکی باعث افزایش تیمیدین و ریپلیکاسیون سلولی می‌شود؛ بنابراین تمایز این سلول‌ها می‌تواند به وسیله تحریکات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی ایجاد شود. چگونگی مکانیسم پاسخ سلول‌های تمایز نیافته به میداين الکترومغناطیسی هنوز به خوبی روشن نشده است، ولی چندین نظریه در این خصوص وجود دارد که در زیر آورده شده است: این پدیده، می‌تواند به دلیل هم‌پوشانی فعالیت‌های سلولی با سلول‌های مزانشیمی مقیم در بافت باشد، یا آنکه میدان الکترومغناطیسی توانسته در ساخته شدن پروتئوگلیکان به وسیله سلول‌های مزانشیمی مؤثر واقع شود. همچنین ممکن است اختلال در ساختار DNA، منجر به بیان ژن‌ها به صورت نا به جا شده باشد [۹] و یا ممکن است، جریان کلسیم داخل بافتی موجب این پدیده شده باشد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که یونفورهای کلسیم می‌توانند بعضی از اثرات گزارش شده برای امواج الکترومغناطیسی را تقلید نمایند. تحریک سنتز سایتوکین‌ها و افزایش ساخت

- effects on proteasomal systems. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 834239.
- [11] No authors listed. Medium formulations. *Curr Protoc Cell Biol* 2001; Appendix 2: Appendix 2B.
- [12] Okano H, Onmori R, Tomita N, Ikada Y. Effects of a moderate-intensity static magnetic field on VEGF-A stimulated endothelial capillary tubule formation in vitro. *Bioelectromagnetics* 2006; 27(8): 628-40.
- [13] Drozdov KA, Khlistun OA, Drozdov AL. [The influence of ultrasound and constant magnetic field on gametes, zygotes, and embryos of the sea urchin]. *Biofizika* 2008; 53(3): 513-8.
- [14] Koyu A, Ozguner F, Yilmaz H, Uz E, Cesur G, Ozcelik N. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health* 2009; 25(6): 429-34.
- [15] Sainsus N, Cattori V, Lepadatu C, Hofmann-Lehmann R. Liquid culture medium for the rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 5: 47-55.
- [16] Liu LM, Cleary SF. Absorbed energy distribution from radiofrequency electromagnetic radiation in a mammalian cell model: effect of membrane-bound water. *Bioelectromagnetics* 1995; 16(3): 160-71.
- [17] Saito K, Suzuki H, Suzuki K. Teratogenic effects of static magnetic field on mouse fetuses. *Reprod Toxicol* 2006; 22(1): 118-24.
- [18] Staphylococcal enterotoxin C injection in combination with ascorbic acid promotes the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 9-20.
- [19] Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Gio YL, Lue TF, et al. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells Dev* 2008; 2: 12-21.
- [20] Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008; 3(4): e1886.
- [21] Sun J, Liao JK. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(12): 2238-44.
- [22] Zati A, Gnudi S, Mongiorgi R, Giardino R, Fini M, Valdrè G, et al. Effects of pulsed magnetic fields in the therapy of osteoporosis induced by ovariectomy in the rat. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1993; 69(7-8): 469-75.
- [23] Caplan AL, Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5):641-50.
- [24] Niki M, Toyoda M, Nomura E, Shinohara H, Nakamura M, Nishiguchi K, et al. Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta) may contribute, in part, to the variations in histogenesis and the prevalence of peritoneal dissemination in human gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2000; 3(4): 187-92.
- [25] Sasse J, Haase B, Cory A, Koss A, Smale G: Cartilage-derived growth factors. In: Bone Grafts und Bone Substitutes, p 53. Ed by MB Habal and AH Reddi. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992.
- [26] Zalutskaya AA, Cox MK, Demay MB. Phosphate regulates embryonic endochondral bone development. *J Cell Biochem* 2009; 108(3): 668-74.
- [27] Milazzotto MP, Feitosa WB, Coutinho AR, Goissis MD, Oliveira VP, Assumpção ME, et al. Effect of chemical or electrical activation of bovine oocytes on blastocyst development and quality. *Reprod Domest Anim* 2008; 43(3): 319-22.
- [28] Sannino A, Di Costanzo G, Brescia F, Sarti M, Zeni O, Juutilainen J, et al. Human fibroblasts and 900 MHz radiofrequency radiation: evaluation of DNA damage after exposure and co-exposure to 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5h)-furanone (MX). *Radiat Res* 2009; 171(6): 743-51.