

## مقایسه‌ی اثرات میدان الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین و بتایین بر تمایز

## استخوانی سلول‌های بنیادی چربی انسانی در شرایط کشت آزمایشگاهی

طیبه سادات طباطبایی<sup>۱</sup>، مریم حاجی قاسم کاشانی<sup>۱\*</sup>

۱. گروه علوم سلولی - ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

## چکیده

زمینه و هدف: میدان الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین و بتایین از عوامل بی‌خطر در ترمیم شکستگی - استخوان می‌باشند. هدف از این پژوهش مقایسه‌ی اثرات این دو محرک بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی چربی انسانی (hADSCs) بود.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی از چربی شکم پس از کسب رضایت کتبی، استخراج و تا پاساژ ۳ کشت داده شدند. گروه‌های مورد مطالعه، سلول‌های کشت شده در محیط  $\alpha$ -MEM و سرم (کنترل)، در محیط تمایز استخوان حاوی بتایین 10mM (BET+OD)، در محیط  $\alpha$ -MEM حاوی بتایین (BET)، در محیط تمایز استخوان و موج با فرکانس 50Hz و شدت 1mT (OD+EMF) و در موج به تنهایی (EMF) بود. تمایز استخوانی با مشاهده مورفولوژی سلول‌ها، رنگ‌آمیزی کمی و کیفی آلیزارین رد و ارزیابی میزان فعالیت آلكالین فسفاتاز بررسی شد. همچنین میزان بیان ژن‌های استئوژنیک (RUNX2 و OCN) با Real time PCR ارزیابی شد.

نتایج: افزایش معنی‌داری در میزان رسوبات کلسیمی، فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز و همچنین بیان ژن‌های RUNX2 و OCN در گروه OD+BET نسبت به گروه‌های BET و OD+EMF مشاهده شد. در پایان روز 7 کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز در گروه EMF نسبت به گروه OD+EMF و گروه BET دیده شد. همچنین کاهش معنی‌داری در میزان بیان ژن OCN در گروه EMF نسبت به گروه BET مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق اثر سینرژیک بتایین و محیط تمایز استخوانی در تمایز استئوژنیک hADSCs تأیید شد و روش مناسبی است که می‌تواند در ترمیم شکستگی و مهندسی بافت کاربرد داشته باشد.

## کلید واژه‌ها:

سلول‌های بنیادی  
مزانیمی چربی انسانی،  
بتایین، میدان  
الکترومغناطیس، تمایز  
استئوژنیک

تمامی حقوق نشر برای  
دانشگاه علوم پزشکی  
تربت حیدریه محفوظ  
است.

## مقدمه

استخوان، درمان آرتروز و ... استفاده شده است (۳-۷). گزارش شده است که قرار گرفتن در معرض PEMF باعث افزایش تکثیر و سرعت تمایز استئوبلاست‌ها، افزایش سرعت ایجاد ماتریکس خارج سلولی، معدنی شدن استخوان و کاهش تخریب ماتریکس می‌گردد (۸-۱۰).

در دهه‌ی ۱۸۶۰ Scheibler یک ماده‌ی آلی جدید به نام Beta vulgaris را از چغندر قند استخراج نمود او آن را بتایین (BET) نامید. در حال حاضر این ترکیب "glycine betaine"

سلول‌های بنیادی چربی انسانی کاربرد فراوانی در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی دارند (۱، ۲). گزارشات حاکی از این است که عوامل تحریک‌کننده قادرند تکثیر و تمایز استخوانی hADSCs را بهبود بخشند، از جمله این عوامل میدان الکترومغناطیس و بتایین می‌باشند، که احتمالاً تکثیر و تمایز hADSCs را به استئوبلاست و یا دیگر سلول‌های بنیادی تحریک می‌نماید. میدان الکترومغناطیس پالسی (PEMF) از سال ۱۹۷۹ با تأیید ایالت متحده آمریکا برای درمان پوکی

موجب کشته شدن سلول‌ها می‌گردد. از این رو تریپسین/EDTA با حجمی برابر از محیط  $\alpha$ -MEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاو غیرفعال شد. سوسپانسیون سلولی به لوله فالكون استریل منتقل و سانتریفیوژ ( $1000 \text{ rpm}$  دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه و زمان ۵ دقیقه) شد تا پلاک سلولی تشکیل گردد. پاساژ سلول‌ها به همین ترتیب ادامه داده شد و در نهایت پس از سه پاساژ مکرر، سلول‌های استرومایی یکدست در کف فلاسک باقی ماندند (۱۷).  
**طرز ساخت و کالبراسیون مولد میدان مغناطیسی:** از آنجائی که در این پروژه قصد بر این است که اثر میدان مغناطیسی با بسامد ۵۰ هرتز و شدت ۱ میلی تسلا بر نمونه‌های سلولی مطالعه شود، لازم است که میدان مغناطیسی متمرکز شده و درعین حال خطوط شار آن موازی بماند. بدین منظور از هسته مغناطیسی از جنس استالوی (آلیاژ آهن سیلیسیم‌دار) ترانسفورماتور تغذیه استفاده نمودیم.

**گروه‌های مورد مطالعه:** ۱- گروه کنترل: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی که در محیط کشت  $\alpha$ -MEM و سرم کشت داده می‌شوند. ۲- گروه BET + OD: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی که در محیط تمایز استخوانی و بتایین با دوز ۱۰ mM کشت داده می‌شوند. ۳- گروه BET: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی که در محیط کشت  $\alpha$ -MEM و سرم و بتایین کشت داده می‌شوند. ۴- گروه OD+EMF: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی که در محیط تمایز استخوانی کشت داده شده و سپس در معرض امواج الکترومغناطیس قرار داده شدند. ۵- گروه EMF: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی که در محیط کشت  $\alpha$ -MEM و سرم کشت داده شده و سپس در معرض امواج الکترومغناطیس قرار داده شدند.

قابل ذکر است که در این مطالعه سلول‌های گروه OD+EMF و گروه EMF به مدت ۲۱ روز (روزانه ۸ ساعت) در معرض امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱mT قرار داده شدند. همچنین فرکانس و شدت انتخاب شده در این پژوهش مطابق با تحقیقات Luo و همکارانش می‌باشد (۱۸).

نامیده می‌شود (۱۱). بتایین اثرات تأثیرگذار بر رشد عضله در شرایط متابولیک یا استرس تغذیه‌ای دارد (۱۲، ۱۳). شواهد حاکی از این است که بتایین ممکن است در درمان بیماری‌هایی مانند نارسایی مزمن کلیه، اختلالات درمانی لیبیدها، اختلالات چربی، هموسیستینوری ژنتیکی، سندرم متابولیک و اختلالات استخوانی تأثیرگذار باشد (۱۴، ۱۵). BET باعث تحریک تمایز استئوبلاست‌ها از طریق عامل رشد شبه انسولینی (IGF-I) می‌گردد. بتایین موجب افزایش تولید و تمایز استئوبلاست‌های جدید شده و همچنین بیان ژن و پروتئین IGF-I را در استئوبلاست‌های جدید افزایش می‌دهد (۱۶). لذا باتوجه به مشخص شدن اثرات میدان الکترومغناطیس و بتایین در تمایز استئوبلاست‌ها، هدف از این پژوهش مقایسه‌ی اثرات این دو محرک در میزان تمایز استخوانی hADSCs می‌باشد.

#### روش‌ها

**جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی چربی انسانی (hADSCs):** قطعات بافت چربی (بافت چربی زیر جلدی شکم) پس از هضم مکانیکی با استفاده از تیغ اسکالپل، به قطعات کوچک‌تری تبدیل شده و سپس هضم آنزیمی توسط کلاژناز (۰/۲ درصد) انجام شد. کلاژناز با حجمی برابر، از محیط  $\alpha$ -MEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو غیرفعال شده و سپس در سانتریفیوژ ( $1200 \text{ rpm}$  ۵ min و دمای  $37^\circ\text{C}$ ) قرار داده شدند. سپس بعد از دور ریختن دو فاز بالایی، مواد ته‌نشین زیر را با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت پیتاژ کرده تا محلول یکدستی به دست آید. سوسپانسیون سلولی داخل فلاسک  $\text{cm}^2$  ۲۵ در معرض  $\alpha$ -MEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و ۵٪  $\text{CO}_2$  قرار داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی تعویض شد. هنگامی که سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰٪ فلاسک را پر کردند، پاساژ داده شدند، بدین منظور ابتدا سلول‌ها با PBS شست‌وشو داده شدند. در ادامه ۱ml از محلول تریپسین/EDTA بر روی سلول‌ها ریخته شد و سپس حدود ۲-۵ دقیقه فلاسک را در داخل انکوباتور قرار داده، از آنجائی که محلول تریپسین/EDTA

داده شدند. در مرحله‌ی بعد حدود ۱ ml از محلول ALP داخل میکروتیوپ‌ها ریخته و میزان بیان آنزیم ALP سلول‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری خواهد شد (۲۱).

**تست اندازه‌گیری محتوای کلسیم:** ابتدا محتویات پتری دیش‌ها را با PBS شسته و حدود ۵۰۰ μl HCL ۰/۶ مولار داخل پتری دیش‌ها ریخته، سپس پتری دیش‌ها را روی دستگاه شیکریلیت (۱۲۰۰۰ دور، ۲ ساعت و ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و پس از افزودن معرف‌های کلسیم (محلول بافر، معرف رنگزا، استاندارد کلسیم)، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری خواهد شد و نهایتاً طبق فرمول زیر میزان کلسیم نمونه‌ها را محاسبه می‌نماییم (۲۱، ۲۲).

$$\text{Calcium (mg/dI)} = \text{A sample} \div \text{A Std. or cal} \times \text{conc. or cal (mg/dI)}$$

**واکنش Real Time PCR:** میزان بیان ژن‌های RUNX2 و OCN با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق از ژن RPL13a به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است (۲۳، ۲۴).

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام

#### واکنش Real time PCR

Gene	Accession number	Primer sequence (5'↔3')	Amplicon size (bp)
RUNX2	NM_001015051	AATGCCTCTGCTGTTATGAA CTTCTGCTGTGCCCTCTG	192
BGLAP	NM_199173	ACCGAGACACCATGAGAG CCAGCCATTGATACAGGTAG	183
RPL13a	NM_012423	GATAAGAAACCTGCGACAAA AGAAAATTGCCAGAAATGTTGATG	193

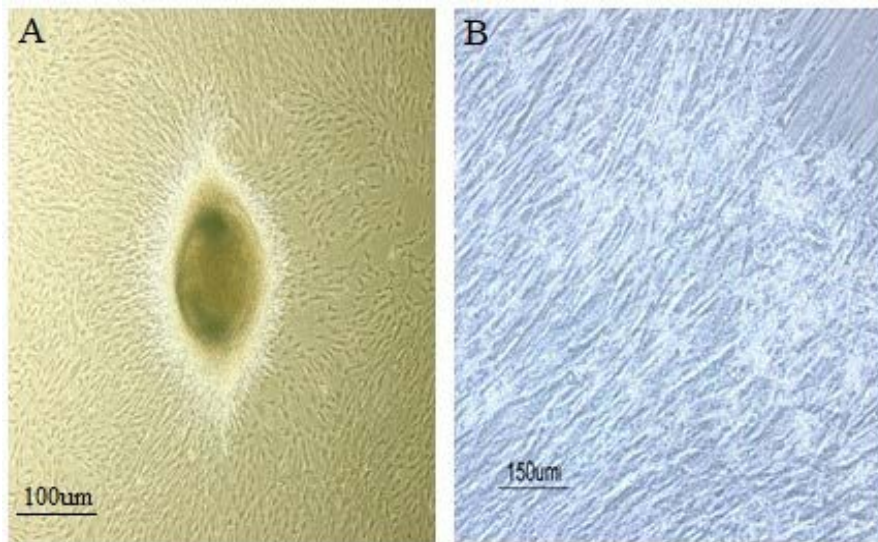
**آنالیز آماری:** برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS.26 استفاده شد. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام گرفت و سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. در نهایت نمودارهای مربوطه توسط

**رنگ‌آمیزی کیفی و کمی Alizarin Red:** پس از کشت سلول‌های پاساژ سوم و رسیدن به تراکم ۷۰ درصد، سلول‌ها در پلیت ۹ خانه حاوی محیط القاء کننده تمایز به استخوان (technology, BON 1008, Osteocyte Differentiation Medium) کشت داده شدند. پس از ۲۱ روز تمایز سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی آلزارین رد (Alizarin Red S. Sigma A5533-23G) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها توسط PBS شسته و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در معرض محلول فیکساتیو فرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها را به مدت ۲ دقیقه در معرض محلول رنگی آلزارین رد (۵ درصد) قرار داده و در نهایت با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مشاهده و عکس برداری شد (۱۹). پس از عکس برداری از سلول‌ها، ابتدا حدود ۳۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۱۰٪ روی پتری دیش‌ها ریخته شد. پس از ۳۰ دقیقه محتویات پتری دیش‌ها را در میکروتیوپ‌ها خالی نموده، میکروتیوپ‌ها را ورتکس کرده تا محتویات میکروتیوپ‌ها به‌طور کامل حل شوند. سپس میکروتیوپ‌ها را حدود ۵ دقیقه توسط دستگاه ترموبلاک گرم نموده و سپس میکروتیوپ‌ها را حدود ۵ دقیقه در یخچال قرار داده تا سرد شوند، گرم و سرد شدن محتویات میکروتیوپ‌ها به حل شدن کامل آن‌ها کمک می‌نماید. در مرحله‌ی بعد میکروتیوپ‌ها را در سانتی‌فیوژ (۱۲ هزار دور، ۵ دقیقه) قرار داده، سپس هم‌حجم محتویات میکروتیوپ‌ها سدیم هیدروکسید ریخته تا اثر اسید خنثی شود، و نهایتاً میزان دقیق رسوبات کلسیمی در طول موج ۵۰۴ نانومتر توسط دستگاه (BioTek) اندازه‌گیری خواهد شد (۲۰).

**اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز:** در پایان

روزهای ۷ و ۱۴ سلول‌ها توسط PBS شسته شده و سپس توسط تریپسین جدا شده و به میکروتیوپ‌های ۲ ml انتقال داده، میکروتیوپ‌ها را در سانتی‌فیوژ (۲۰۰۰ دور، ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده، در مرحله‌ی بعد حدود ۳۰ میکرولیتر triton ۰/۴٪ داخل میکروتیوپ‌های حاوی سلول اضافه نموده و حدود ۳۰ دقیقه میکروتیوپ‌ها در یخچال قرار

تمایز استخوانی، EMF, Betain ما شاهد تغییر مورفولوژی دوکی مانند hADSC به مورفولوژی مثلثی و یا چندضلعی و همچنین شاهد تشکیل رسوبات کلسیمی و مواد گرانولوزی ماتریکس می‌باشیم، که البته این رسوبات معدنی در گروه OD+BET افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است (شکل B: ۱). در حالیکه تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان تشکیل رسوبات کلسیمی بین سایر گروه‌ها مشاهده نمی‌گردد.



شکل ۱. مورفولوژی سلول‌های گروه کنترل و گروه تیمار شده با محیط تمایز استخوانی و بتایین

A: در این تصویر مورفولوژی دوکی و فیبروبلاست مانند، سلول‌های گروه کنترل که با کمک زوائد خود به کف فلاسک کشت چسبیده‌اند، مشاهده می‌گردد. B: مورفولوژی مثلثی و چند ضلعی مانند سلول‌های گروه OD+BET همراه با رسوبات کلسیفیه در این تصویر قابل رؤیت می‌باشد.

گروه BET ( $0/0473 \pm 0/00318$ ) و گروه OD+EMF ( $0/053 \pm 0/00473$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ )، در حالی که میزان تولید فسفات کلسیم در گروه EMF ( $0/0363 \pm 0/00384$ ) نسبت به گروه OD+EMF و گروه BET تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0/05$ ).

#### اندازه‌گیری میزان بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز hADSCs

میزان بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز گروه‌های مورد مطالعه پس از ۷ و ۱۴ روز اندازه‌گیری شد. نتایج در شکل ۴ آورده شده است. در پایان روز ۷ میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه OD+BET ( $1/2487 \pm 0/00786$ ) نسبت به گروه BET ( $0/0523 \pm 0/00882$ ) و گروه OD+EMF ( $0/0423 \pm 0/00033$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ )، همچنین کاهش

نرم افزار Excel 2013 رسم گردید. در هر مرحله از آزمایش ۳ مرتبه تکرار انجام شد.

#### نتایج

**مورفولوژی hADSCs** به دنبال پاساژهای مکرر hADSCs ظاهری دوکی شکل و فیبروبلاست از خود نشان می‌دهند که با کمک زوائد خود به کف فلاسک کشت چسبیده‌اند (شکل A: ۱). گویای این مطلب می‌باشد. پس از تیمار hADSCs توسط محیط

**رنگ‌آمیزی کیفی Alizarin Red** میزان تولید فسفات کلسیم گروه‌های مورد مطالعه در این پژوهش پس از ۲۱ روز توسط رنگ‌آمیزی Alizarin Red مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که میزان رسوبات معدنی رنگ‌آمیزی شده در گروه OD+BET نسبت به سایر گروه‌ها افزایش قابل توجهی داشته است (شکل A: ۲). در حالی که بین سایر گروه‌ها تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان تشکیل رسوبات کلسیمی مشاهده نشد (شکل B: ۲).

**رنگ‌آمیزی کمی Alizarin Red** نتایج رنگ‌آمیزی کمی گروه‌های مورد مطالعه پس از پایان روز ۲۱ سنجیده شد، نتایج در شکل ۳ آورده شده است. میزان تولید فسفات کلسیم در پایان روز ۲۱ در گروه OD+BET ( $0/1057 \pm 0/00352$ ) نسبت به

رسوبات کلسیمی بین گروه EMF و گروه BET مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

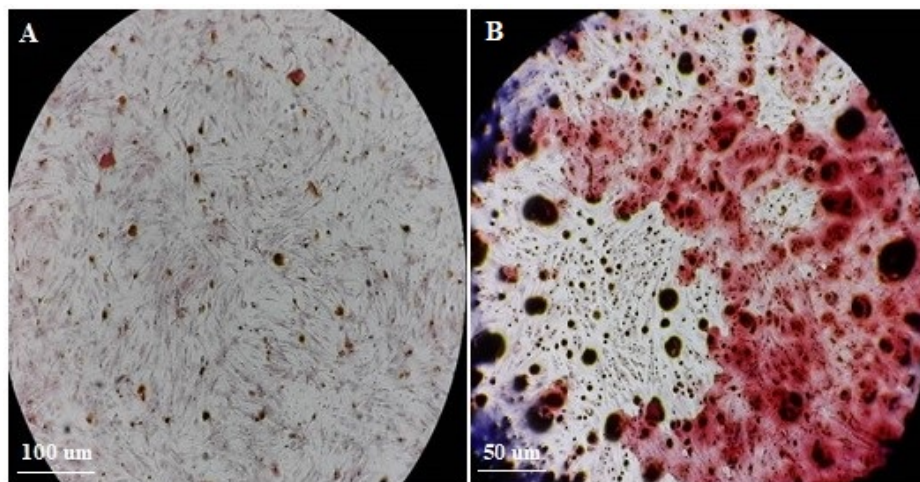
#### نتایج Real Time PCR میزان بیان ژن‌های RUNX2

سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی در گروه‌های مورد مطالعه پس از ۲۱ بررسی شد، نتایج در شکل ۶ آورده شده است. در پایان روز ۲۱ میزان بیان ژن RUNX2 در گروه OD+BET ( $2/07767 \pm 0/26023$ ) نسبت به گروه BET ( $0/8823 \pm 0/40126$ ) OD+EMF و گروه OD+EMF ( $0/52 \pm 0/16442$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ )، همچنین تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن RUNX2 در گروه EMF ( $0/3823 \pm 0/10269$ ) نسبت به گروه OD+EMF و گروه BET مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). میزان بیان ژن‌های OCN سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی در گروه‌های مورد مطالعه پس از ۲۱ بررسی شد، نتایج در شکل ۷ آورده شده است. در پایان روز ۲۱ میزان بیان ژن OCN در گروه OD+BET ( $2/8623 \pm 0/18233$ ) نسبت به گروه BET ( $0/92 \pm 0/16921$ ) و گروه OD+EMF ( $0/3167 \pm 0/10667$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ )، همچنین کاهش معنی‌داری در میزان بیان ژن OCN در گروه EMF ( $0/2767 \pm 0/0044$ ) نسبت به گروه BET مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). در حالی که تفاوت معنی‌داری بین گروه EMF و گروه OD+EMF مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

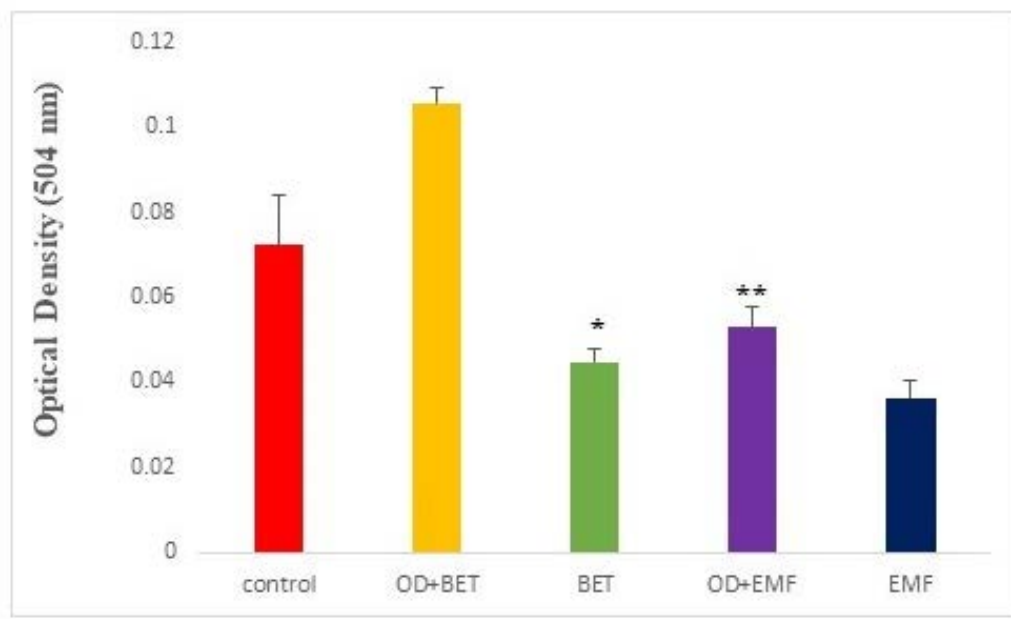
معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم آکالین فسفاتاز در گروه EMF ( $0/43 \pm 0/00642$ ) نسبت به گروه OD+EMF و گروه BET مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

در پایان روز ۱۴ میزان فعالیت آنزیم آکالین فسفاتاز در گروه OD+BET ( $0/4512 \pm 0/00176$ ) نسبت به گروه BET ( $0/3252 \pm 0/00689$ ) OD+EMF و گروه OD+EMF ( $0/3297 \pm 0/0109$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ )، در حالی که میزان فعالیت آنزیم آکالین فسفاتاز در گروه EMF ( $0/3267 \pm 0/01225$ ) نسبت به گروه OD+EMF و گروه BET تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $p < 0/05$ ).

**تست اندازه‌گیری محتوای کلسیم:** میزان رسوبات کلسیمی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی در گروه‌های مورد بررسی پس از ۲۱ روز ارزیابی گردید. نتایج در شکل ۵ آورده شده است. میزان تولید رسوبات کلسیمی در پایان روز ۲۱ در گروه OD+BET ( $23/33 \pm 0/12$ ) نسبت به گروه BET ( $1/9 \pm 0/12$ ) OD+EMF و گروه OD+EMF ( $1/173 \pm 0/11323$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ )، همچنین کاهش معنی‌داری در میزان تولید رسوبات کلسیمی در گروه EMF ( $0/2767 \pm 0/01452$ ) نسبت به گروه OD+EMF مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). در حالی که تفاوت معنی‌داری در میزان تولید

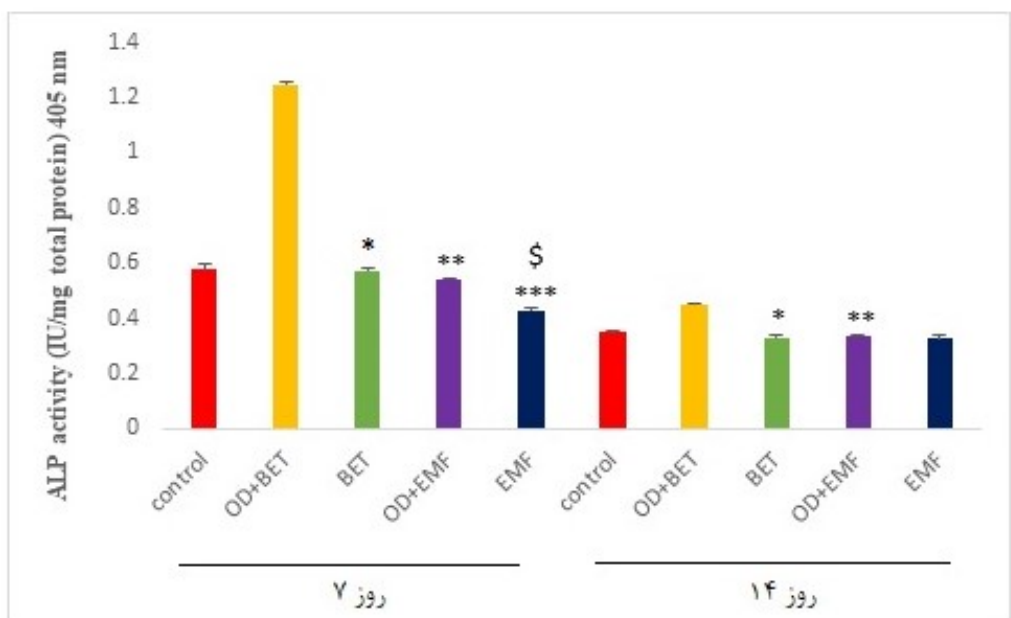


شکل ۲. ارزیابی میزان تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی چربی انسانی پس از رنگ‌آمیزی با محلول آلیزارین رد مناطق قرمز رنگ معرف تشکیل رسوبات کلسیفیه که از جمله شاخص‌های تمایز استئوژنیک است، می‌باشد. A: گروه OD+BET، سلول‌های این گروه با محیط تمایز استخوانی و بتایین تیمار شده‌اند B: گروه کنترل، سلول‌های این گروه در معرض محیط تمایز استخوانی قرار نگرفته‌اند.



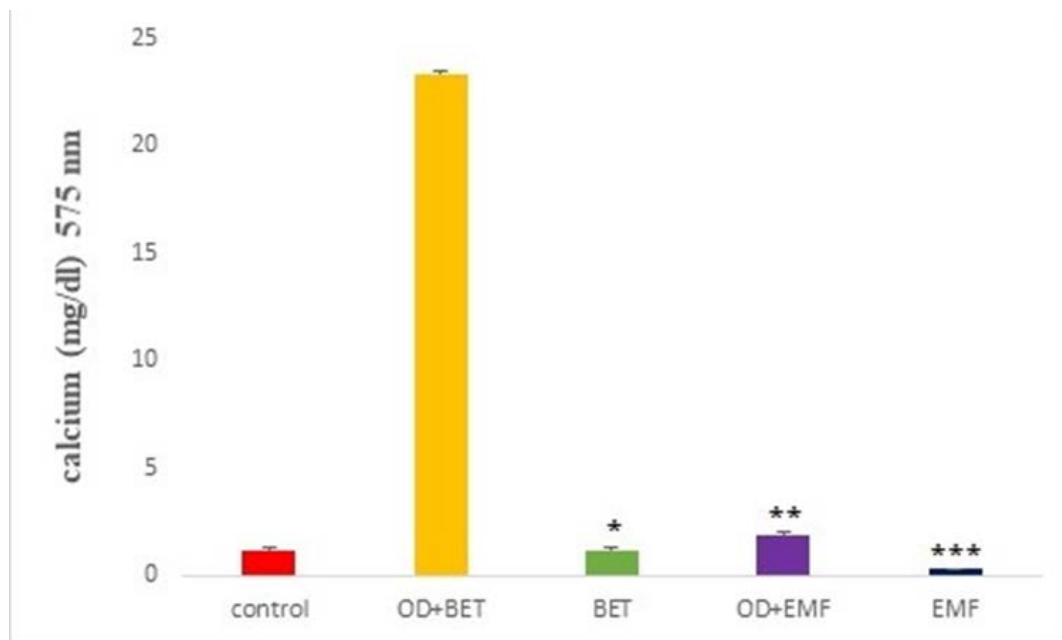
شکل ۳. نمودار میزان تولید فسفات کلسیم hADSCs از طریق رنگ‌آمیزی کمی Alizarin Red

گروه‌ها: گروه کنترل (سلول‌های کشت داده‌شده در محیط  $\alpha$ -MEM و سرم ۱۰٪)، گروه OD+BET (سلول‌های کشت داده‌شده در محیط تمایز استخوانی و بتایین)، گروه BET (سلول‌های کشت داده‌شده در محیط  $\alpha$ -MEM و سرم ۱۰٪ و بتایین)، گروه OD+EMF (سلول‌های کشت داده‌شده در محیط تمایز استخوانی که در معرض امواج قرار داده شدند)، گروه EMF (سلول‌های کشت داده‌شده در محیط  $\alpha$ -MEM و سرم ۱۰٪ که در معرض امواج قرار داده شدند). (علامت \* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد و  $P < 0.05$  است.)



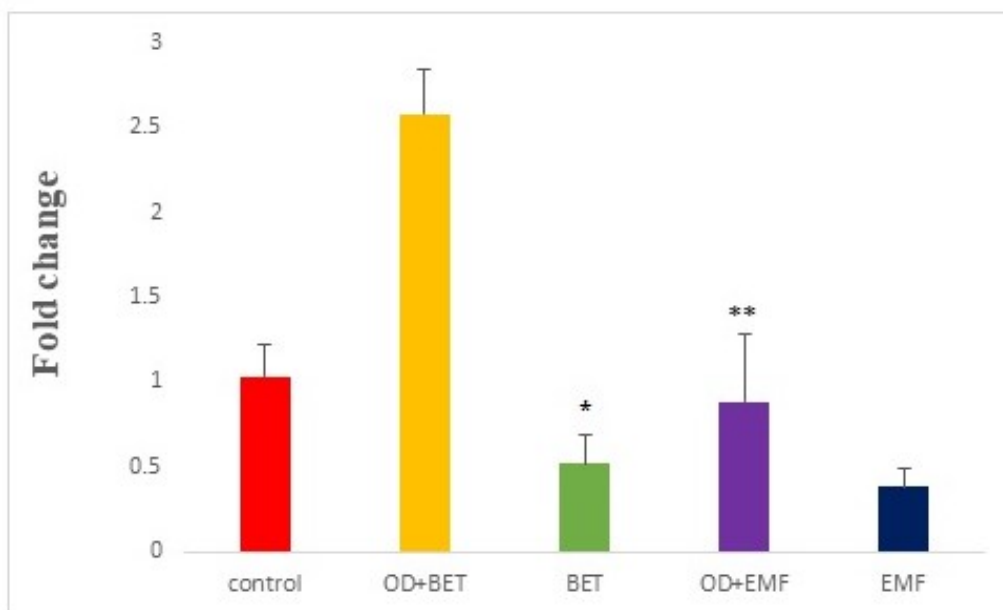
شکل ۴. نمودار میزان بیان آنزیم ALP گروه‌های مورد مطالعه پس از ۷ و ۱۴ روز

(علامت \* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+EMF می‌باشد، علامت \$ بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه BET می‌باشد و  $P < 0.05$  است.)



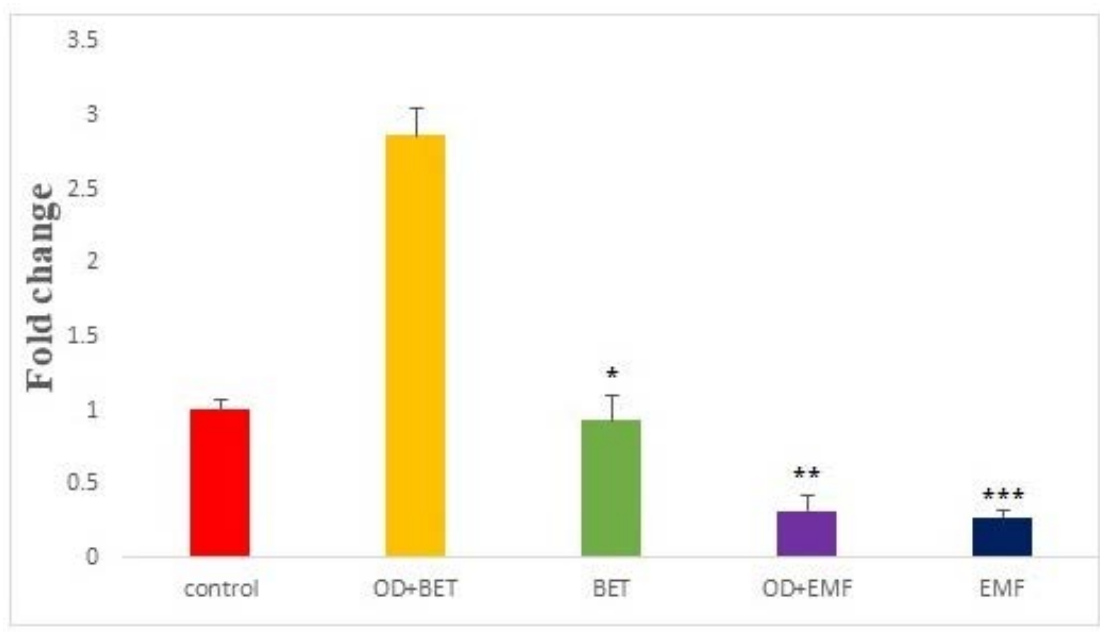
شکل ۵. نمودار میزان رسوبات کلسیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی پس از ۲۱ روز

(علامت \* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+EMF می‌باشد، و  $P < 0.05$  است.)



شکل ۶. نمودار میزان بیان ژن *RUNX2* سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی پس از ۲۱ روز

(علامت \* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+EMF می‌باشد، و  $P < 0.05$  است.)



شکل ۷. نمودار میزان بیان ژن *OCN* سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی پس از ۲۱ روز

(علامت \* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه OD+BET می‌باشد، علامت \*\*\* بیانگر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه BET می‌باشد و  $P < 0.05$  است.)

#### بحث

مسیر سیگنالینگ MAPK/RAS می‌تواند در تنظیم تمایز استئوبلاست‌ها شرکت نموده و در واقع نقش مهمی در تمایز استئوژنیک و کاهش تمایز آدیپوژنیک از BMSCs دارند (۲۶). همچنین شواهد و مدارک نشان داده است که فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Wnt/Bcatenin نقش مهمی در حفظ توده‌ی استخوانی و جلوگیری از تخریب میکروارگانسیم‌های استخوانی از طریق مکانیسم‌هایی از قبیل تحریک تکثیر سلول‌های پیش استئوبلاستی، القاء استئوژنیز و مهار آپوپتوز استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها دارد (۲۷، ۲۸).

گزارشات حاکی از این است که ۳ مسیر سیگنالینگ از جمله نفوذ کلسیم سیتوزول، فعال شدن مسیر ERK و تولید IGF-1 توسط بتایین در استئوبلاست‌های انسان افزایش یافته است. این مسیرها می‌تواند اثرات سینرژیک بر بیان ژن‌های استئوژنیک و سنتز پروتئین داشته باشد و به طور کلی منجر به افزایش استخوان‌سازی شود (۱۶). گزارش شده است که مسیر IGF-I به صورت ذاتی در حالت اتوکراین/پاراکراین منجر به ترمیم و بازسازی عضلات اسکلتی، افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی کاهش معنی‌دار در میزان تشکیل رسوبات کلسیمی، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و میزان بیان ژن‌های RUNX2 و OCN در گروه BET و گروه OD+EMF نسبت به گروه OD+BET می‌باشد. در واقع یافته‌های این پژوهش حاکی از اثر مهاری میدان الکترومغناطیس بر تمایز استخوانی hADSCs می‌باشد. با توجه به مطالب مذکور می‌توان گفت با وجود موفقیت بالینی PEMF برای درمان طیف گسترده اختلالات استخوانی، PEMF اثرات منفی نیز بر روی تکثیر، تمایز و تشکیل استخوان در شرایط آزمایشگاهی اعمال می‌نماید، در واقع می‌توان عنوان کرد که تأثیر محرک‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی در شکل‌گیری استخوان ممکن است تحریک‌کننده یا مهاری باشد و وابسته به مرحله‌ی بلوغ سلول‌های تحریک شده می‌باشد (۲۵).

تأثیر قرار گرفتن در معرض EMF بر افزایش  $Ca^{2+}$  داخل سلولی از طریق کانال VGCC نوع L (Voltage-Gated Ca Channels) بیش از ۲۰ سال است که شناخته شده است. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که تنظیم اتصال کالمودولین  $Ca^{2+}$  و همچنین



علت این نتایج متناقض به نوع سلول مورد استفاده در این پژوهش ارتباط داشته باشد. آنالیز داده‌های رنگ آمیزی کمی آلیزارین رد و اندازه‌گیری محتوای کلسیم hADSCs پس از ۲۱ روز نیز حاکی از این است که هم‌افزایی محیط تمایز استخوانی و بتایین منجر به افزایش رسوبات کلسیمی و در ادامه افزایش تمایز استئوژنیک hADSCs می‌گردد، این نتایج مشابه نتایج مطالعه Villa می‌باشد وی نشان داد که بتایین از طریق محور RUNX2-OSX منجر به فعال‌سازی پروتئین‌های مارکر استخوانی از قبیل کلاژن نوع ۱، BSP (Bone SialoProtein) و OPN (osteopontin) می‌گردد. بیان و فعال‌سازی این پروتئین‌ها منجر به تشکیل استخوان، معدنی شدن ماتریکس و بازسازی استخوان می‌گردد (۱۶). در حالی که بررسی نتایج حاکی از این است که تیمار hADSCs به تنهایی توسط بتایین منجر به کاهش تمایز استئوژنیک این سلول‌ها می‌گردد. همچنین آنالیز نتایج نشان می‌دهد که تیمار hADSCs به صورت همزمان توسط محیط تمایز استخوانی و میدان الکترومغناطیسی منجر به کاهش تمایز استخوانی hADSCs می‌شود. نتایج این مطالعه در راستای یافته‌های Yan و همکارانش می‌باشد. آن‌ها گزارش دادند ELF-EMF رشد و متابولیسم MSC را کاهش داده و همچنین ELF-EMF تمایز استئوژنیک MSC را کاهش می‌دهد (۳۳). همچنین Kaivosoja زمانی که BMSCs را در معرض PEMF (فرکانس ۱۵ هرتز و شدت ۰/۱ میلی تسلا) قرار داد تأثیر معنی‌داری بر القاء تمایز استئوژنیک این سلول‌ها مشاهده نکرد (۳۴). البته لازم به ذکر است که تیمار hADSC به تنهایی توسط میدان الکترومغناطیس اثرات استئوژنیک این سلول‌ها را با شدت بیشتری کاهش می‌دهد. نتایج مطالعه‌ی ما نشان می‌دهد پس از پایان روز ۷ و ۱۴ میزان بیان آنزیم ALP کل پروتئین سلول‌هایی که به صورت همزمان توسط محیط تمایز استخوانی و بتایین تیمار شده‌اند نسبت به سلول‌هایی که به صورت همزمان توسط محیط تمایز استخوانی و میدان الکترومغناطیس تیمار شده‌اند بیشتر می‌باشد؛ در واقع می‌توان گفت هم‌افزایی محیط تمایز استخوانی و بتایین اثرات استئوژنیک بیشتری نسبت به

ماهیچه‌ای و نهایتاً افزایش جرم عضله می‌گردد (۲۹). Apicella نشان داد که مکمل بتایین به‌طور قابل‌توجهی IGF-I و محتوای AKT (یک سرین/ترئونین است که در واقع هدف پایین‌دست سیگنال IGF-I است) را افزایش می‌دهد (۳۰). همچنین گزارش شده است که بتایین منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی به‌وسیله جریان یون کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی نوع L می‌شود و باعث دپلاریزاسیون غشاء می‌گردد (۱۶). با توجه به مطالب مذکور می‌توان گفت که میدان الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین و بتایین به عنوان دو عامل بی‌خطر برای ترمیم شکستگی‌های استخوان هر دو از طریق مسیرهای مشترکی همچون تأثیر بر نفوذ کلسیم موجب تمایز استخوانی سلول‌های BMSCs و ADSCs می‌گردد. با توجه به مورفولوژی سلول‌های مورد مطالعه در این پژوهش و تصاویر مربوط به رنگ آمیزی کیفی آلیزارین رد مشاهده می‌نماییم که هم‌افزایی بتایین و محیط تمایز استخوانی منجر به افزایش رسوبات معدنی و مواد گرانولوزی ماتریکس می‌گردد. نتایج این مطالعه در راستای پژوهش Villa می‌باشد (۱۶). همچنین بررسی تصاویر نشان می‌دهد که بین سایر گروه‌ها تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان تشکیل این رسوبات نمی‌باشد. در واقع می‌توان اظهار کرد که هم‌افزایی محیط تمایز استخوانی و میدان الکترومغناطیس تأثیری روی تمایز hADSCs نداشته است. نتایج مطالعه حاضر مشابه نتایج مطالعه Sun و همکاران می‌باشد. این محققان زمانی که BMSCs را در معرض PEMF (فرکانس ۱۵ هرتز و شدت ۱/۸ میلی تسلا) قرار دادند. افزایش در میزان تکثیر سلولی، تراکم سلولی و همچنین تغییراتی در چرخه‌ی سلول را مشاهده نمودند. اما آن‌ها هیچ تأثیری روی فنوتایپ سطحی یا پتانسیل تمایز چندگانه‌ی این سلول‌ها مشاهده نمودند (۳۱). در حالی که نتایج این مطالعه با نتایج گزارش‌های Luo و همکارانش متفاوت می‌باشد. Luo و همکاران بعد از قرار دادن BMSCs در معرض PEMF تغییراتی در مورفولوژی سلول و همچنین افزایش در بیان ALP و مارکرهای استخوانی را مشاهده کردند (۳۲) که البته ممکن است

کاهش رسوبات کلسیمی ماتریکس، کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، کاهش بیان ژن‌های RUNX2 و OCN و نهایتاً کاهش تمایز استخوانی hADSCs می‌شود. همچنین تیمار hADSCs به تنهایی توسط بتایین و میدان الکترومغناطیس اثرات استئوژنیک این سلول‌ها را با شدت بیشتری کاهش می‌دهد. در نتیجه می‌توان از هم افزایی محیط تمایز استخوانی و بتایین جهت درمان اختلالات استخوانی استفاده نمود

#### تشکر و قدردانی

از تمامی شرکت کنندگان در این پژوهش و دانشگاه دامغان و پژوهشکده علوم زیستی (گروه سلولی- مولکولی، دانشکده زیست شناسی) به پاس تأمین هزینه این تحقیق تشکر می‌گردد.

#### تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

#### مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: مریم حاجی قاسم کاشانی، طیبه سادات طباطبایی

(۲) تهیه پیش نویس مقاله: طیبه سادات طباطبایی

(۳) تایید دست نوشته پیش از ارسال به مجله: مریم حاجی قاسم کاشانی

هم افزایی محیط تمایز استخوانی و میدان الکترومغناطیس از خود نشان می‌دهد.

آنالیز داده‌های ریل تایم پس از ۲۱ روز نیز نشان دهنده‌ی اثر تحریکی هم افزایی محیط تمایز استخوانی و بتایین و اثر مهارتی محیط تمایز استخوانی و میدان بر روی بیان ژن‌های RUNX2 و OCN می‌باشد. این نتایج در تضاد با نتایج مطالعات زیر می‌باشد Sun و همکاران اثر PEMF روی تکثیر و تمایز hBMSCs را بررسی نمودند و مشاهده کردند که PEMF به‌طور قابل توجهی بیان ژن‌های استخوانی مانند Runx2 و ALP را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد (۳۱). Kaivosoja. زمانی که hBMSCs را در معرض PEMF با فرکانس (۱۵ هرتز و شدت ۱ میلی تسلا) قرار داد بیان مارکرهای استئوژنیک ALP، SMAD1، Runx2، Osteopontin، Osteocalcin در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (۳۴). با تجزیه و تحلیل این مطالب می‌توانیم احتمال دهیم که علت نتایج متناقض اثر میدان الکترومغناطیس در این پژوهش با مطالعات پیشین ممکن است با فرکانس و شکل موج متفاوت اعمال شده در این پژوهش ارتباط داشته باشد.

#### نتیجه‌گیری

هم‌افزایی بتایین و محیط تمایز استخوانی منجر به افزایش رسوبات کلسیمی ماتریکس، افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، افزایش بیان ژن‌های RUNX2 و OCN و در نهایت افزایش تمایز استئوژنیک hADSCs می‌گردد در حالی که هم افزایی میدان الکترومغناطیس و محیط تمایز استخوانی منجر به

**References**

1. Cheng K-H, Kuo T-L, Kuo K-K, Hsiao C-CJGM, Biomarkers., Sciences H. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. ELSEVIER, 2011;3(2):53-62.
2. Li X, Yao J, Wu L, Jing W, Tang W, Lin Y, et al. Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation in vivo. Artificial Organs, 2010;34(1):46-54.
3. De Mattei M, Pellati A, Pasello M, Ongaro A, Setti S, Massari L, et al. Effects of physical stimulation with electromagnetic field and insulin growth factor-I treatment on proteoglycan synthesis of bovine articular cartilage. Osteoarthritis and cartilage. 2004;12(10):793-800.
4. Varani K, Vincenzi F, Tosi A, Targa M, Masieri FF, Ongaro A, et al. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. British journal of pharmacology. 2010;160(1):101-15.
5. Bodamyali T, Bhatt B, Hughes F, Winrow V, Kanczler J, Simon B, et al. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. ELSEVIER, 1998;250(2):458-61.
6. Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, Chiu HT, Lu SF, Luo GH, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. Bioelectromagnetics, 2009;30(4):251-60.
7. Bassett CAL. Pulsing electromagnetic fields: A new method to modify cell behavior in calcified and noncalcified tissues. Calcified Tissue International, 1982.
8. Sollazzo V, Palmieri A, Pezzetti F, Massari L, Carinci F. Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblastlike cells (MG-63): a pilot study. Clinical orthopaedics and related research. 2010;468(8):2260-77.
9. do Nascimento C, Issa JPM, da Silva Mello AS, de Albuquerque Junior RFJG. Effect of electromagnetic field on bone regeneration around dental implants after immediate placement in the dog mandible: a pilot study. Gerodontology, 2012;29(2):e1249-e51.
10. Schwartz Z, Simon B, Duran M, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BJJOR. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. Journal of Orthopaedic Research September, 2008;26(9):1250-5.
11. Day CR, Kempson SAJBeBA-GS. Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease. ELSEVIER, 2016;1860(6):1098-106.
12. Cholewa JM, Guimaraes-Ferreira L, Zanchi NEJAA. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. Amino Acids, 2014;46(8):1785-93.
13. Senesi P, Montesano A, Vacante F, Villa I, Ferraretto A, Spinello A, et al., editors. Betaine promotes cell differentiation of human osteoblasts in primary culture. Journal of Translational Medicine, 2017.
14. Lever M, Slow SJCb. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. ELSEVIER, 2010;43(9):732-44.
15. Yang Q, Yin W, Chen Y, Zhu D, Yin J, Zhang C, et al. Betaine alleviates alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head via mTOR signaling pathway regulation. ELSEVIER, 2019;120:109486.
16. Villa I, Senesi P, Montesano A, Ferraretto A, Vacante F, Spinello A, et al. Betaine promotes cell differentiation of human osteoblasts in primary culture. Journal of translational medicine. Journal of Translational Medicine, 2017;15(1):132.
17. Wen L, Wang Y, Wang H, Kong L, Zhang L, Chen X, et al. L-type calcium channels play a crucial role in the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Biochemical and biophysical research communications. 2012;424(3):439-45.

18. Luo F, Hou T, Zhang Z, Xie Z, Wu X, Xu JJO. Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics*, 2012;35(4):e526-e31.
19. Wen L, Wang Y, Wang H, Kong L, Zhang L, Chen X, et al. L-type calcium channels play a crucial role in the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *ELSEVIER*, 2012;424(3):439-45.
20. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJAb. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *ELSEVIER*, 2004;329(1):77-84.
21. Seyedjafari E, Soleimani M, Ghaemi N, Shabani IJB. Nanohydroxyapatite-coated electrospun poly (l-lactide) nanofibers enhance osteogenic differentiation of stem cells and induce ectopic bone formation. *Biomacromolecules*, 2010;11(11):3118-25.
22. Arjmand M, Ardeshirylajimi A, Maghsoudi H, Azadian E. Osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells cultured on nanofibrous scaffold improved in the presence of pulsed electromagnetic field. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(2):1061-70.
23. Su CY, Fang T, Fang HW. Effects of Electrostatic Field on Osteoblast Cells for Bone Regeneration Applications. *BioMed research international*. 2017;2017:7124817.
24. Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, Chang WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(9):1169-74.
25. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito GJBJotBS, The Society for Physical Regulation in Biology, Medicine TEBA. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*, 2002;23(5):398-405.
26. Wang R, Wu H, Yang Y, Song M. Effects of electromagnetic fields on osteoporosis: A systematic literature review. *Electromagnetic biology and medicine*. 2016;35(4):384-90.
27. Zhou J, He H, Yang L, Chen S, Guo H, Xia L, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on bone mass and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in ovariectomized rats . *ELSEVIER*, 82-274:(4)43,2012
28. Jing D, Cai J, Wu Y, Shen G, Li F, Xu Q, et al. Pulsed electromagnetic fields partially preserve bone mass, microarchitecture, and strength by promoting bone formation in hindlimb-suspended rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2014;29(10):2250-61.
29. Senesi P, Luzi L, Montesano A, Mazzocchi N, Terruzzi I. Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation. *Journal of translational medicine*. *Journal of Translational Medicine*, 2013;11:174.
30. Apicella JM, Lee EC, Bailey BL, Saenz C, Anderson JM, Craig SA, et al. Betaine supplementation enhances anabolic endocrine and Akt signaling in response to acute bouts of exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 2013;113(3):793-802.
31. Sun LY, Hsieh DK, Lin PC, Chiu HT, Chiou TWJBJotBS, The Society for Physical Regulation in Biology, Medicine TEBA. Pulsed electromagnetic fields accelerate proliferation and osteogenic gene expression in human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Bioelectromagnetics*, 2010;31(3):209-19.
32. Luo F, Hou T, Zhang Z, Xie Z, Wu X, Xu J. Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics*. 2012;35(4):e526-31.
33. Yan J, Dong L, Zhang B, Qi NJEb, medicine. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2010;29(4):165-76.
34. Ceccarelli G, Bloise N, Mantelli M, Gastaldi G, Fassina L, Cusella De Angelis MG, et al. A comparative analysis of the in vitro effects of

pulsed electromagnetic field treatment on osteogenic differentiation of two different mesenchymal cell lineages. *BioResearch Open Access*, 2013;2(4):283-94.

## Comparison of the effects of extremely low-frequency Electromagnetic field and Betaine on in vitro osteogenic differentiation of human adipose tissue derived-mesenchymal stem cells

Tayebeh Sadat Tabatabai<sup>1</sup>, Maryam Haji Ghasem Kashani<sup>1\*</sup>

1. Department of Cellular and Molecular, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran

Corresponding author: [kashani@du.ac.ir](mailto:kashani@du.ac.ir)

### Abstract

**Background & Aim:** Extremely low-frequency electromagnetic field (ELF-EMF) and betaine are safe factors in bone fracture repair. This study aimed to compare the effects of these two stimuli on osteogenic differentiation of human adipose stem cells (hADSCs).

**Methods:** After obtaining written informed consent, cells were extracted from abdominal adipose tissue and then cultured in vitro until the third passage. Experimental groups were as follows: cells cultured in  $\alpha$ -MEM and serum (control), in osteogenesis differentiation medium containing 10 mM Betaine (BET + OD), in  $\alpha$ -MEM containing Betaine (BET), in OD and wave (50HZ and 1mT) (OD +EMF) and in the wave alone (EMF). Then, osteogenic differentiation was assessed by morphology, evaluating the qualitative and quantitative Alizarin red staining, alkaline phosphatase activity and real time PCR of RUNX2 and OCN genes.

**Results:** There was a significant increase in the formation of calcium deposits, alkaline phosphatase activity and also the expression of RUNX2 and OCN genes in OD + BET group compared to BET and OD + EMF groups. At the end of day 7, a significant decrease in alkaline phosphatase activity was observed in the EMF group compared to the OD + EMF and the BET groups. There was also a significant decrease in the expression of OCN gene in the EMF compared to the BET group.

**Conclusion:** In this study, synergistic effect of betaine and EMF on osteogenesis of hADSCs was demonstrated and this could be used for fracture repair and tissue engineering.

### Keywords:

Human adipose stem cells,  
Betaine,  
Electromagnetic field,  
Osteogenic differentiation

**How to Cite this Article:** Tabatabai TS, Haji Ghasem Kashani M. Comparison of the effects of extremely low-frequency Electromagnetic field and Betaine on in vitro osteogenic differentiation of human adipose tissue derived-mesenchymal stem cells. Journal of Torbat Heydaryeh University of Medical Sciences. 2020;8(3):23-36.