بررسی القاء رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در میدان مغناطیسی

نغمه عزتی[1]؛ شیوا ایرانی[1]؛ سیدمحمد اطیابی[2]*

چکیده

زمینه: مهندسی بافت به‌معنی توسعه و تغییر رشد آزمایشگاهی مولکول‌ها و سلول‌ها در بافت و یا عضو، برای جایگزینی یا ترمیم قسمت آسیب‌دیده بدن است. هدف این پژوهش استفاده از روش فیزیکی الکترومغناطیسی برای تحریک رشد سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده می‌باشد.

روش‌ها: ابتدا یک سیم‌پیچ هسته هوا تهیه شد به‌گونه‌ای که ظرف کشت سلول به‌راحتی درون قالب این سیم‌پیچ قرار گرفت سپس ظرف حاوی محیط کشت و سلول فیبروبلاست انسانی به‌همراه قالب هسته هوادرون انکوباتور قرار گرفته و به منبع تغذیه وصل شد. بدین‌ترتیب نمونه در زمان‌های متفاوت تحت تأثیر میدان مغناطیسی قرار گرفت و در زمان‌های مختلف میزان رشد و تکثیر سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپی نشان داد که سلول‌هایی که تحت میدان مغناطیسی قرار گرفته‌اند در محدوده مشخصی از تحریک (0/35 آمپر) افزایش رشد معناداری نسبت به گروه شاهد داشتند.

نتیجه‌گیری: تحریک رشد سلول با روش فیزیکی در محدوده مشخص، موجب افزایش رشد سلول می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور مثبت جهت مهندسی بافت استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: مهندسی بافت، سلول فیبروبلاست، تحریک الکتریکی

«دریافت: 1393/5/20 پذیرش: 1393/10/30»

1. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

2. گروه پایلوت نانو بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

***عهده‌دار مکاتبات:** تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش فناوری های نوین، گروه پایلوت نانوبیوتکنولوژی. تلفن: 021-64112165

Email: atyabi@pasteur.ac.ir

مقدمه

استفاده از مهندسی بافت در درمان ضایعات پوستی، استخوانی و غضروفی مورد توجه است. زیرا این بافت‌ها توانایی ترمیم خودبه‌خودی ندارند و از طرف دیگر امکان انجام پیوند از یک فرد به فرد دیگر، به‌علت ایمنی‌زایی مقدور نیست. استفاده از مهندسی بافت و طراحی ساختارهایی مشابه بافت‌های آسیب‌دیده نیازمند به‌کارگیری ابزارهای اصلی نظیر داربست سلولی، سلول‌ها و مولکول‌های فعال زیستی در شرایط آزمایشگاهی است که در این میان، یافتن سلول‌های مناسب که با وجود توانایی تقسیم و تمایز، فاقد ویژگی‌هایی نظیر ایمنی‌زایی و تومورزایی باشند، اهمیت دارد (1).

پوست به‌عنوان بزرگ‌ترین ارگان در بدن انسان 16 درصد از وزن بدن را تشکیل داده و سطحی در حدود 1/8 سانتی‌متر مربع را پوشانده است (2). پوست شامل روپوست یا اپی‌درم (epidermis) و میان‌پوست (dermis) است. روپوست لایه‌ای اپی‌تلیال با منشأ اکتودرمی و درم لایه‌ای از بافت همبند با منشأ مزودرمی است. بر اساس مقایسه ضخامت اپی‌درم، پوست ضخیم (thick) و نازک (thin) را می‌توان از هم تمیز داد (3).

پوست برای بقای حیات ارگانیسم، همانند حصاری در برابر محیط بیرون از بدن بوده و برای تنظیمات حرارتی و حفاظت از وضعیت مایعات بدن عملکرد حیاتی دارد. در کنار انجام این عملکردهای حیاتی،

پوست به‌طور پیوسته در حال جوان‌سازی خود و انجام فرآیندهای ترمیم زخم‌های ایجاد شده است (4).

مهندسی بافت پوست، راه‌کار جدیدی جهت درمان زخم‌ها و بیماری‌های پوستی می‌باشد (5).

فیبروبلاست، فراوان‌ترین سلول در بافت همبند است که همه انواع رشته‌های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه‌ای را سنتز می‌کند. فیبروبلاست، سلولی است با هسته بیضوی و روشن و دارای کروماتین ظریف که حاوی یک یا دو هستک واضح می‌باشد. اندامک‌های دخیل در پروتئین‌سازی در فیبروبلاست به‌طور گسترده دیده می‌شوند. در مواردی که فعالیت سلول کاهش می‌یابد، ندازه سلول کوچک‌تر شده و هسته آن به‌صورت پررنگ دوکی دیده می‌شود که در این حالت فیبروسیت نیز نامیده می‌شود. فیبروسیت‌ها درصورت تحریک قابل‌برگشت به حال فعال فیبروبلاست می‌باشند. فیبروبلاست‌ها بسته به محل استقرار و میزان فعالیت، به اشکال مختلفی دیده می‌شوند. فیبروبلاست‌هایی متعلق به بافت‌های دیگر، اگر به بافت جدیدی پیوند زده شوند تا چندین نسل خاطرات مربوط به بافتی را که به آن تعلق داشته‌اند حفظ خواهند کرد گرچه ممکن است از نظر ریخت‌شناسی این تغییرات محسوس نباشد (6).

میدان‌های الکترومغناطیسی ترکیبی از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی است که در حالت طبیعی وجود دارد و بر روی سلول‌ها و بافت‌های بدن تأثیرگذار است. اما این تأثیر به‌حدی نیست که باعث آسیب گردد به‌عبارتی اثر این میدان‌ها وابسته به شدت و فرکانس آن‌ها می‌باشد (7).

در این تحقیق رفتار سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی بستر پلی‌استایرن تحت میدان‌های الکتریکی ثابت بررسی شده است.

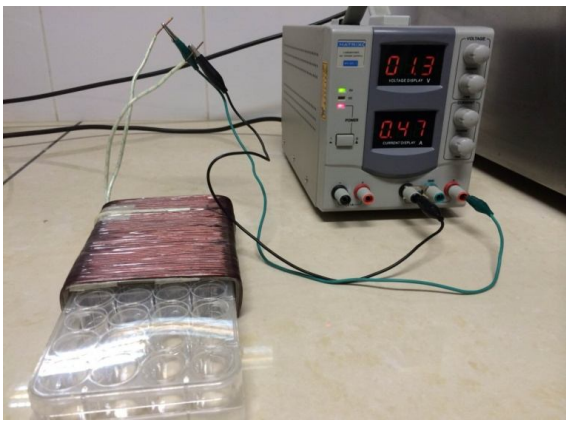
مواد و روش‌ها

کشت سلول: در این پژوهش سلول‌های فیبروبلاست انسانی (HF) از مؤسسه بن یاخته تهیه‌گردید. این سلول‌ها در محیط RPMI که حاوی 10 درصد سرم (FBS) بود در انکوباتور با قابلیت تزریق Co_2 به‌مقدار 5 درصد و رطوبت 95 درصد در دمای 37°C نگه‌داری شدند.

چینش دستگاه تحریک فیزیکی: برای این منظور کاغذ روغنی مخصوص ساخت سیم لوله به ابعاد یک پلیت کشت سلولی تهیه شد. در ادامه سیم مسی روکش‌دار لاکی به‌قطر 0/6 میلی‌متر به‌طول 235 سانتی‌متر به دور این کاغذ روغنی پیچیده شد. این سیستم به‌گونه‌ای ساخته شد که ظرف کشت سلول به‌راحتی به‌صورت کشویی درون آن قرار گیرد و خارج کردن آن نیز به‌منظور ارزیابی سلول‌های زیر کشت راحت باشد (تصویر 1).

سپس پلیت حاوی سلول درون این سیم لوله قرار داده شد. سیم لوله به منبع تغذیه وصل شد و به این صورت نمونه‌ها تحت تحریک میدان با شدت‌های مختلف قرار گرفتند.

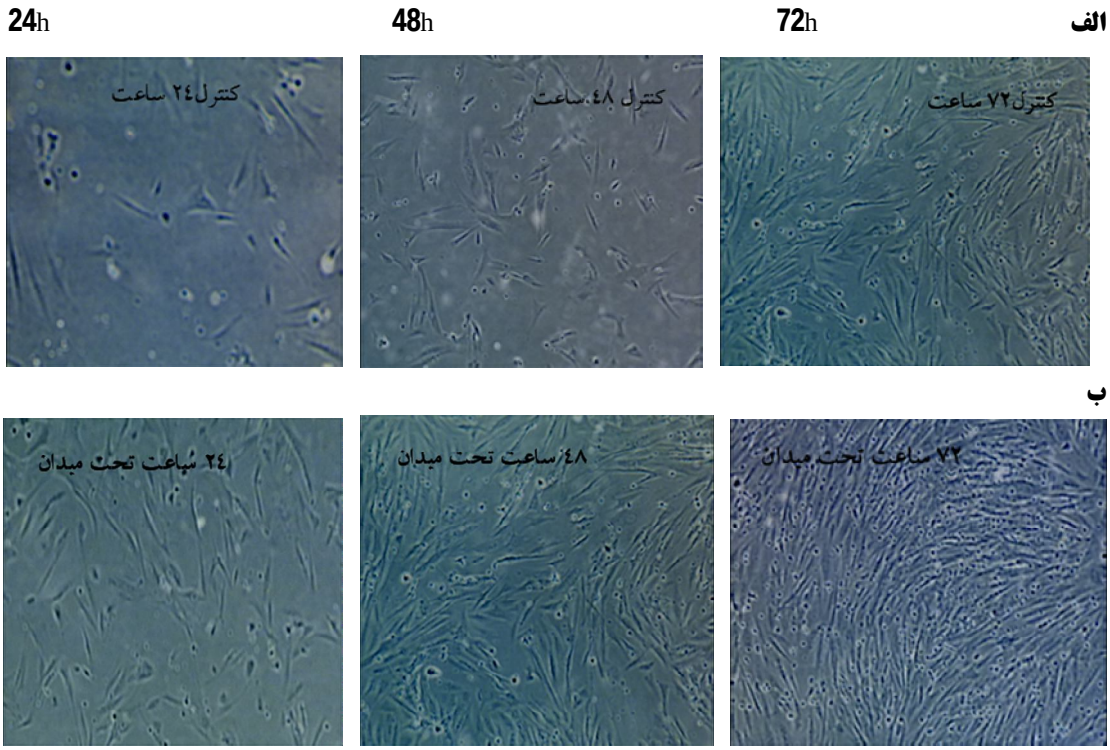
بررسی چسبندگی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری: اولین رفتاری که یک سلول در مواجه با ریزمحیط قرارگرفته در آن نشان می‌دهد، چسبندگی است که معمولاً در 24 ساعت اول پس از کشت اتفاق می‌افتد و پس از آن با جایگزینی پروتئین‌های دخیل در چسبندگی محکم‌تر با پروتئین‌های کوچک و ضعیف‌تر، اتصال قوی‌تری با سطح کشت برقرار می‌گردد. تست چسبندگی سلول، در واقع تعیین‌کننده بخشی از سلول است که با سطح ماتریکس خود در تماس است و در برابر شستشوی



تصویر 1- تصویر سیم لوله ساخته‌شده به‌همراه منبع ایجاد جریان

ملایم مقاومت می‌کند. از سلول‌های فیبروبلاستی، به تعداد 10^4 سلول در هر چاهک، در پلیت 24 خانه کاشته شدند و در ادامه بررسی چسبندگی سلول‌ها انجام شد. پس از گذشت 24، 48 و 72 ساعت از کشت، از سلول‌های رشدکرده بر روی بستر، هم تحت تأثیر محرک فیزیکی و هم در غیاب آن با میکروسکوپ معکوس (BELL) مشاهده و عکسبرداری شده و در وضعیت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون بررسی فعالیت و میزان زنده ماندن سلول بر روی داربست: در این آزمون، میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌هایی که زنده و فعال هستند مورد مطالعه قرار می‌گیرند. MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl(-2, 5 diphenyltetrazolium bromide)، نمک محلول در آب تترازولیوم برماید است. محلول بافر MTT تحت تأثیر آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده احیاء شده و به فورمازون نامحلول بنفش رنگ تبدیل می‌گردد. این ترکیب در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) محلول می‌شود. از آن‌جایی که سلول‌های مرده قادر به تبدیل MTT به فورمازان نیستند، سطح فورمازان ایجادشده متناسب با تعداد سلول‌های زنده می‌باشد. شدت رنگ ایجادشده توسط یک آزمون رنگ‌سنجی ساده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 630 نانومتر خوانده می‌شود. به این منظور، از سلول‌های فیبروبلاست انسانی، به‌تعداد 4×10^4 سلول در هر چاهک، پلیت 24 خانه قرار داده شد. کشت سلول تا 72 ساعت ادامه داده شد و هر 24 ساعت میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از روش MTT انجام شد. فعالیت و زنده ماندن سلول‌ها به‌صورت درصد نسبت نمونه به کنترل محاسبه گردید. نتایج توسط نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس (آزمون ANOVA) در سطح معناداری $P<0/05$ تحلیل شد.



تصویر 2- تصاویر حاصله از میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی 10X. جهت بررسی رشد و تکثیرسلول‌های فیبروبلاست انسانی تحت و بدون میدان الکتریکی 0/35 آمپر در سه بازه زمانی 24، 48 و 72 ساعت برروی بستر پلی استایرن .الف)کنترل (بدون تحریک مغناطیسی)، ب) با تحریک مغناطیسی

یافته‌ها

در این پژوهش سعی شد اثرات تحریک میدان مغناطیسی در چسبندگی و رشد فیبروبلاست‌ها در شرایط مربوط به مهندسی بافت بررسی شود. محدوده مناسب و همچنین روش مناسب ایجاد تحریک الکتریکی بر روی سیستم کشت سلول با استفاده از رابطه زیر که شدت میدان حاصل از جریان الکتریکی را بیان می‌کند، به‌دست آمد.

برای سیم لوله‌ای که فاقد هسته آهنی باشد مقدار k=1 می‌باشد.

$$\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$$

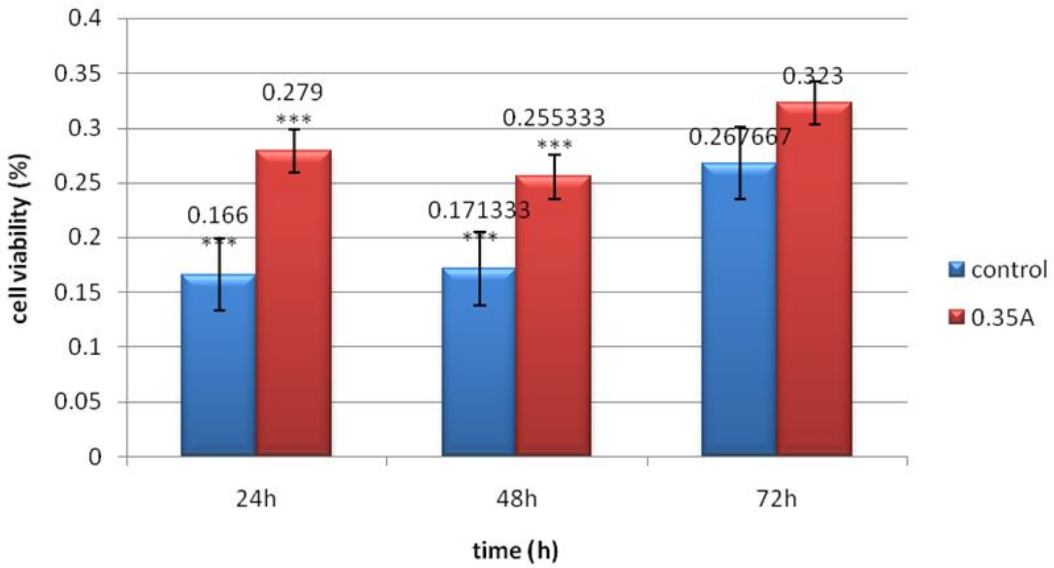
$$B = k\mu_0 I \frac{N}{l}$$

به‌دست آوردن شدت جریان بهینه جهت تحریک سلول‌ها: تعیین محدوده شدت تحریک الکتریکی با استفاده از روش آزمون و خطا صورت گرفت، بدین‌صورت که از شدت جریان‌های بسیار پایین 0/1 آمپر شروع شده و تا محدوده 0/4 آمپر، سلول‌ها تحت تأثیر میدان‌های ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفتند تا این‌که یک شدت میدان بهینه‌ای به‌دست آمد.

جهت بررسی رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی بستر پلی استایرن (ظرف کشت سلول) با استفاده از میکروسکوپ نوری پس از کاشت سلول‌ها در پلیت 24 خانه به تعداد 10^4 سلول، پس از گذشت 24، 48 و 72 ساعت از کشت سلول‌ها در شرایط تأثیر میدان مغناطیسی و بدون اعمال میدان، تصاویری تهیه شد (تصویر 2).

به‌منظور بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها تحت میدان مغناطیسی با شدت جریان عبوری 0/35 از آزمون MTT در 3 بازه زمانی 24، 48 و 72 ساعت استفاده شد و نتایج حاصل در مقایسه با نمونه کنترل تحریک‌نشده به‌صورت نمودار ارایه گردید (نمودار 1).

تصاویر حاصله از میکروسکوپ معکوس و آزمون MTT نشان داد که در جریان عبوری 0/35 آمپر سلول‌های فیبروبلاستی در زمان‌های مختلف کشت 24، 48 و 72 ساعت رشد معناداری نسب به گروهی که تحت تحریک نبوده (P<0/05) داشته‌اند.



نمودار 1- نتیجه حاصل از تست MTT ، طی بازه‌های زمانی 1) 24، 2) 48 و 3) 72 ساعت پس از کشت سلول با تحریک مغناطیسی و بدون تحریک مغناطیسی. این آزمون با سطح معناداری P<0/05 با آنالیز ANOVA انجام شد که با * نشان داده شده است. وجود *** بیانگر سطح معناداری 0<P<0/0001 می‌باشد.

درمان‌هایی که تا کنون برای ترمیم بافت پوست مورد استفاده قرار گرفته است شامل استفاده از بافت پوست موجود در سایر نقاط بدن شخص بیمار و یا استفاده از بافت‌های موجودات دیگر و یا از بدن افراد دیگر است، که هر کدام دارای مشکلات خاص مانند: محدودیت در بافت دهنده و یا احتمال وجود انتقال بیماری به فرد پذیرنده بافت هستند. هدف از مهندسی بافت، ترمیم بافت پوست از طریق به‌کارگیری ابزار بیولوژیکی همانند سلول‌ها با استفاده از ابزارهای مصنوعی مؤثر و زیست مواد برای طراحی داربست می‌باشد. هدف نهایی باید احیای بافتی باشد که هردو ویژگی ساختاری و عملکردی جراحت پوستی را به سطح قبل از آسیب برگرداند **(4)**. هدف مهندسی بافت ترمیم، جایگزینی، حفظ و افزایش عملکرد بافت‌ها یا ارگان‌های اختصاصی است **(8)**.

در مطالعه حاضر اثرات متقابل تحریک میدان الکترومغناطیسی در چسبندگی و رشد فیبروبلاست‌ها در شرایط مربوط به مهندسی بافت بررسی شد. در این مطالعه محدوده مناسب و همچنین روش مناسب ایجاد تحریک فیزیکی بر روی سیستم کشت سلول با استفاده از رابطه شدت میدان حاصل از جریان الکترومغناطیسی، به‌دست آمد. نتایج نشان داد که میدان الکترومغناطیسی با محدوده مناسب توانسته است رشد سول را القاء کند. این افزایش رشد سلول‌ها تفاوت معناداری با سلول‌های کنترل که القاء نشده بودند، داشت. همچنین تصاویر میکروسکوپی نشان داد که سلول‌ها پس از القاء به‌مدت **72** ساعت نه‌تنها افزایش رشد قابل توجهی داشته‌اند بلکه رشد آن‌ها به سمت قطبین جهت‌دار گردیده است که این می‌تواند در مهندسی بافت و کشت سلول بر روی داربست‌های مختلف مهم باشد. در این راستا می‌توان به بررسی و مقایسه تحقیقات دیگر دانشمندان پرداخت.

در سال **2007** Hoi ting و همکارانش بر روی اثرات متقابل هدایت‌کننده خصوصیات سطحی و تحریک میدان الکتریکی ضربانی در جهت‌گیری و طویل شدن فیبروبلاست‌ها و کاردیومیوسیت‌ها مطالعه کردند و هدف اصلی از این مطالعه تعیین اثرات متقابل فرمان‌های هدایت‌کننده سطحی و تحریک میدان الکتریکی در طویل شدن سلولی و جهت‌گیری در شرایط مربوط به مهندسی بافت قلب بود **(9)**. در تحقیق حاضر نتایج مشاهدات میکروسکوپی نیز نشان داد که سلول‌های فیبروبلاستی بعد از قرار گرفتن در میدان مغناطیسی در جهت میدان کشیده شده‌اند.

در سال **2011** دکتر کاظم پریور و همکارانشان نشان دادند که تغییرات ایجاد شده توسط میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روند اسپرماتوژنز مؤثر است و موجب افزایش معنا دار اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های ثانویه می‌شود **(10)**.

استفاده از جریان برق به‌عنوان درمان بالینی جایگزین و یک رویکرد مؤثر برای بررسی رفتار سلولی درون بدن پیشینه‌ای طولانی دارد. هرچند که به‌دلیل نبود یک رسانای مناسب (مثل مواد داربستی زیست سازگار)، بهره‌مند شدن از مزیت این عامل القاکننده در به وجود آوردن بافت، کار سختی بوده است **(11)**.

تحریک الکتریکی به‌عنوان یک هدایت‌کننده فیزیکی، رویکردی اصولی و بالقوه مؤثر جهت کنترل رفتار سلولی، ارایه می‌کند. قضیه استفاده از میدان الکتریکی مبتنی بر سه واقعیت است. اول این که جریان الکتریکی زیستی در بدن انسان وجود داشته و نقشی مهم در حفظ اعمال زیستی طبیعی (مانند سیگنالینگ در سیستم عصبی، انقباض عضلانی و التیام زخم) دارد **(12)**.

دوم این که برخی از سلول‌ها حساس بوده و به‌شدت وابسته به الگوی الکتریکی هستند. این امر در سلول‌های عصبی و قلبی، بیشتر و در سایر انواع سلول‌ها مانند فیبروبلاست‌ها **(13)** و سلول‌های اندوتلیال، کم‌تر دیده می‌شود **(12)**.

سوم این‌که، تحریک الکتریکی به‌صورت یک میدان مغناطیسی ضربان‌دار (PEMF) در بالین به‌عنوان درمانی جایگزین در تسریع التیام زخم‌ها **(14)**، زخم‌های مزمن دیابتیک شریانی **(15)**، کاهش درد مزمن در بیماری‌هایی

مانند آرتریت و سردرد (16)، درمان بیماری‌هایی مانند پارکینسون (17) و تقویت بازسازی سلول‌های عصبی (18) استفاده شده است. همچنین ES به‌طور بالقوه برای تحریک سلول‌ها (بالاخص در مقایسه با روش‌های زیستی مرسوم) بسیار مؤثر است. در این روش، بدون نیاز به عوامل رشد گران‌قیمت یا اندوتوکسین‌ها و مواد شیمیایی که ممکن است برای سلول مضر باشند، می‌توان به آسانی سیگنال‌های الکتریکی را بر روی سلول‌ها از طریق اتصال به یک منبع برق، اعمال کرد.

در این مطالعه، مشاهدات میکروسکوپی و نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که سلول‌های فیبروبلاست انسانی در میدان با شدت جریان عبوری 0/35 آمپر نسبت به نمونه کنترل، افزایش رشد و تکثیر داشته‌اند. به‌علاوه، با افزایش مدت زمان کشت تا 48 ساعت سلول‌ها در خطوط میدان امتداد پیدا کردند. این‌که چگونه تحریک الکتریکی با فیبروبلاست‌ها بر همکنش می‌دهد، به‌خوبی مشخص نیست. تحریک الکتریکی تغییراتی را بر روی نفوذپذیری غشایی و ساختار اسکلت سلولی اعمال می‌کند. بعلاوه، گزارش شده است که طی اعمال تحریک الکتریکی، سیالیت غشاء سلولی کاهش می‌یابد. به‌طور وضوح، این اثرات ناشی از اعمال تحریک الکتریکی، مرتبط با ساختارهای غشاء سلول هستند. غشاهای سلولی وضعیت‌های الکتریکی بسیار پیچیده و متعادل از خود نشان می‌دهند که مشخصه بارهای سطحی کوازی-الکترواستاتیک پروتئین‌های غشایی و جریان یونی به داخل و بیرون کانال‌های غشایی (شامل آن‌هایی که دریچه حساس به اختلاف پتانسیل دارند) می‌باشد. انتظار می‌رود هرگونه اخلال الکتریکی در این حالات ظریف (به‌عنوان مثال با استفاده از تحریک مغناطیسی که در این مطالعه استفاده شد)، با اعمال سلولی درگیر شود. با این وجود، مشخصاً مطالعات بیشتری برای تعیین کردن مکانیسم‌های دخیل در این امر لازم است. در این مطالعه، محدوده کاری تحریک فیزیکی مشخص شد که بر روی چسبندگی و رشد سلول اثر قابل ملاحظه‌ای دارد. هرچند که محدوده‌های بالاتر اعمال تحریک، نیازمند مطالعات بیشتر است. به‌علاوه، نتایج به‌دست‌آمده در مورد تغییرات رفتار سلولی در مدت‌زمان‌های مختلف کشت نشان داد که با استفاده از میدان مغناطیسی در جریان‌های کم می‌توان بعد از گذشت 24 ساعت سلول‌ها را در جهت میدان رشد داد. این رویکرد می‌تواند در بازسازی مصنوعی بافت در مهندسی بافت بسیار کاربردی و مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که استفاده از روش‌های فیزیکی مانند تحریک الکتریکی می‌تواند رشد و تکثیر سلول‌ها را افزایش دهد. این تحریک در مقایسه با روش‌های درمانی دیگر می‌تواند روش کارآمد و مؤثری در بازسازی سریع پوست باشد، که این افزایش رشد در مهندسی بافت پوست مورد توجه است.

References

1. Ghaedi K, Razavi Sh. [A summary of the principles of tissue engineering (Persian)]. Genomics in the third millennium 2007: 2-5.
2. Keck M, Lumenta BD, Kamolz LP. Skin Tissue Engineering. in: Lumenta BD, and Kamolz LP. Dermal Replacements in General, Burn, and Plastic Surgery. New York: Springer, 2013; 13-25.
3. Stücker M, Struk A, Altmeyer P, Herde M, Baumgärtl H & Lübbers DW. The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. PDF Journal of Physiology. 2002; 538(3) 985–994.
4. Wong DJ, Chang HY. Skin tissue engineering. StemBook, Stanford University, Stanford. CA94305. [Cited March 31 2008] Availabel at: URL: http://www.stembook.org.
5. Clark AF, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. J Invest Dermatol. 2007;127:1018-29.

6. Zarepour A. Effect of flow and electric field on the adhesion and growth of cultured fibroblast cells on poly-lactic acid levels (persian). M.Sc thesis in polymer engineering. Tehran: Research Institute. Iran Polymer and Petrochemical Institute. 2011; 23.
7. Meng Sh, Rouabhia M, Zhang Ze. Electrical Stimulation in Tissue Regeneration. Applied Biomedical Engineering. Gaetano D. Gargiulo, Aliatair McEwan, 2011;80-89.
8. Yusop AH, Bakir AA, Shaharom NA, Abdul Kadir MR, Hermawan H. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review. Int J Biomater. 2012;2012:641430.
9. Au HT, Cheng I, Chowdhury MF, Radisic M. Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes. Biomaterials. 2007;28(29): 4277–93.
10. Parivar K, Nabiuni M, Golestanian N, Amini E. [Effect of low frecuency electromagnetic fields on the spermatogenesis and blood serum protein of Balb/c mice (Persian)]. Journal of Cell & Tissue (JCT). 2011; 2(1): 47-56
11. Shi G, Zhang Z, Rouabhia M. The regulation of cell functions electrically using biodegradable polypyrrole–polylactide conductors. Biomaterials. 2008; 29(28):3792–3798.
12. McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. J Physiol Rev .2005;85: 943-978.
13. Aaron RK, Ciombor DM. Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair. J Cell Biochem 1993;52: 42–6.
14. Ojingwa JC, Isseroff RR. Electrical stimulation of wound healing. J Invest Dermatol. 2003;121(1):1–12.
15. Peters E, Lavery L, Armstrong D, Fleischli J. Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. J Arch Phys Med Rehabil.2001; 82: 721–5.
16. Rushton DN. Electrical stimulation in the treatment of pain. Disabil Rehabil. 2002; 24(8): 407–15.
17. Loher TJ, Burgunder JM, Pohle T, Weber S, Sommerhalder R, Krauss JK. Longterm pallidal deep brain stimulation in patients with advanced Parkinson disease: 1-year follow-up study. J Neurosurg .2002;96(5):844–53.
18. Sisken BF, Walker J, Orgel M. Prospects on clinical applications of electrical stimulation for nerve regeneration. J Cell Biochem .1993;51(4): 404–9.