

근타박상시 치료용 초음파가 혈관내피성장인자와 Substance-P 발현에 미치는 효과에 대한
면역조직화학적 연구

신성대학 물리치료과
김용수, 오대영
대구대학교대학원 재활과학과 물리치료전공
김석범

**An Immunohistochemical Study of Effects of Therapeutic Ultrasound on the
Expression of VEGF and Substance-P in Muscle Contusion Injury**

Kim, Yong-Su, P.T., Ph.D. • Oh, Tae-Young, P.T., M.S.

Department of Physical Therapy, Sinsung college

Kim, Souk-Boum, P.T., M.S.

*Major in Physical Therapy, Dept. of Rehabilitation Science, Graduate School, Taegu
University*

Abstract

Therapeutic angiogenesis is the controlled induction or stimulation of new blood vessel formation to reduce unfavourable tissue effects caused by local hypoxia and to enhance tissue repair. Therapeutic ultrasound can be considered as a physical agent to deliver therapeutic angiogenesis. The purpose of this study was to evaluate the effect of therapeutic ultrasound after muscle contusion injury by observed immunoreactivity of vascular endothelial growth factor(VEGF) that plays an important role in angiogenesis and substance-P in pain transmission. Ultrasound irradiation(1MHz, 1W/cm², continuous mode, treatment time 5 min) was applied through water submersion technique to 1 limb daily by kept off 5cm from muscle belly of gastrocnemius.

The result of this study were as follows.

1. In morphological observation, there were no significant changes excepts of 7 days. At 7 days, granular tissue viewed abundantly in control group. In other groups, general feature were increased interspace of muscle fiber; centronucleated muscle fiber; collapsed of muscle and nerve tissue; appeared inflammatory cell.
2. The VEGF was expressed in interspace of muscle fiber. Especially, at 7 days in experimental group, VEGF was showed in connective tissue surrounding gastrocnemius muscle.
3. The VEGF was higher expressed in experimental group at 2 and 3 days, but in control group at 7 days.

These data suggest therapeutic ultrasound enhanced production of VEGF in the early day relatively, therefore stimulated angiogenesis in the skeletal muscle induced contusion injury. Also therapeutic ultrasound may stimulate pain relief by diminish of substance-P in dorsal

horn of spinal cord.

I. 서 론

혈관신생(angiogenesis 또는 neovascularization)은 새로운 혈관의 성장을 의미하는 것으로, 짧은 시간동안 제한적으로 조절되면서 일어나는 생리적·병리적(Schizukuda 등, 1999) 현상을 말한다. 이러한 혈관신생은 배아발생(embryonic development)(Adams 등, 2001), 자궁재생(endometrial regeneration) 및 상처치유과정(Reher 등, 1999) 등과 같은 생리적인 혈관신생과 암세포 성장(Harris 등, 2002), 류마티드 관절염(Ferrara, 1996), 당뇨병성 망막병증(Petrova 등, 1999) 등과 같은 병리적인 상황에서 비정상적으로 항진되는 혈관신생반응에서 관찰되어진다.

혈관신생 과정은 조직 괴사, 궤양 등은 감소된 혈관형성의 결과로 생기는 현상으로, 이러한 현상으로 인해 조직과 기관의 기능이상 뿐만 아니라 죽음까지도 초래할 수 있다. 그러므로 균일한 혈관신생은 성인의 상처 치유와 조직 재생과정에 반드시 필수적으로 요구되는 과정이다(Reher 등, 1999).

이러한 혈관신생을 개시(initiation)하고 조절하는 것에는 혈압, 혈관벽 장력, 혈관벽 스트레스, 증가된 혈류, 증가된 헤마토크리트 및 조직 성장에 의한 혈관벽의 신장과 같은 역학적 인자와 사이토카인, 모노카인(monokine), 성장인자와 같은 대사성 또는 화학 인자가 있는데(Young과 Dyson, 1990), 특히 혈관신생 또는 내피세포의 증식을 유도하는 능력을 가진 인자들을 혈관신생 인자(angiogenic factor)라고 부른다(Ferrara 등, 1992). 비록 이러한 분자들의 생화학적 성질과 구조들에 대해서는 잘 알려져 있지만, 그들이 어떻게 생체내에서 혈관신생과정을 유도하는 지에 대해서는 확실하게 밝혀진 것이 없다.

혈관신생과정에 강하게 영향을 주는 것으로 고려되어지고 있는 네가지 카테고리는 성장인자(growth factor), 사이토카인(cytokine), 세포외 기질구성요소(extracellular matrix components) 및 세포간 상호작용(intercellular interaction)이다(Reher 등, 1999). 이러한 혈관신생 인자들은 서로서로 독립적인 작용을 가지는데, 조직의 재분열을 개시시켜주거나 또는 보조인자(cofactor)로서 작용하면서 내피세포에 직·간접적으로 작용한다. 내피세포에 직접적인 작용을 하는 성장인자 중 혈관신생과정에 중요한 역할을 담당하는 성장인자 중 하나가 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)이다(Conway 등, 2001; Risau, 1997). 혈관내피성장인자는 내피세포에 특이적인 유사분열촉진제로서, 내피세포의 증식과 이동, 세포외 기질의 재형성, 모세혈관의 형성과 같은 혈관신생을 일으키는데 관여한다(Neufeld 등, 1999).

치료적 의미에서의 혈관신생과정은 국소허혈 등에 의해서 유발되는 바람직하지 못한 조직의 변화를 감소시키기 위하여 또는 조직의 치유를 향상시키기 위하여 국소부위 혈관성장을 유도하는 것을 의미한다(Carmeliet과 Jain, 2000). 초음파는 이러한 치료적 의미에서의 혈관신생과정을 유발시킬 수 있는 물리적 인자로서 고려되어지고 있다.

1952년 Americal Council of Physical Medicine and Rehabilitation이 초음파 치료를 공식 물리 치료 도구로서 채택한 이래 초음파는 근골격계 장애를 지닌 환자의 치료적 목적을 위한 도구로써 가장 빈번하게 사용되고 있으며(남기원, 2000; Roebroek 등, 1998), 치료적 유용성 또한 널리 연구되고 있다(Brian과 Takamaru, 1997). 초음파는 열효과와 비열효과(기계적 효과)를 통해서 조

직의 변화를 유도할 수 있는 심부온열기구로, 전자기장 스펙트럼(electromagnetic spectrum)에 속하는 다른 전기치료기기와는 달리 초음파 에너지는 음향 스펙트럼(acoustical spectrum)에 속한다(Starkey, 1999).

일반적으로 치료사들은 급성기 상태에서는 $0.51\sim 1.5W/cm^2$ 범위의 강도에서 맥동 초음파를 선호해서 사용하고, 만성기 상태에서는 $1.01\sim 2.0W/cm^2$ 범위의 강도에서 연속초음파를 주로 사용한다(Warden과 McMeeken, 2002). 이러한 치료용 초음파의 강도 선택은 열효과에 의한 치료효과를 주목적으로 하는지, 또는 비열효과의 치료효과를 주목적으로 하는지에 따라 달라진다. 즉, 초음파를 급성기 상태에서 적용을 할때는 일반적으로 치료의 목적이 염증반응 감소, 통증 감소 등이고 조직온도의 증가는 배제해야 되므로 초음파의 비열효과를 주목적으로 적용되어지고, 만성기 상태에서는 조직의 혈류, 온도, 신장성 증가 및 통증 감소 등을 목적으로 하므로 초음파의 열효과를 주목적으로 적용한다. 그러므로 급성기 상태에서의 치료강도는 만성기 상태보다 낮은 강도에서 실시된다(Warden과 McMeeken, 2002).

특히 초음파는 심부온열치료의 한 방법으로서 단파나 극초단파 같은 다른 심부온열 치료기기에 비해 조작이 간편하며, 가장 깊은 조직까지 침투가 가능하고, 인공고관절, K-강선 등의 금속이 있는 경우에도 안전하게 사용할 수 있기 때문에 가장 많이 사용되고 있는 온열치료기기 중 하나이다(한태륜과 신희석, 1990). 특히 초음파 치료의 일차적 특성은 각 조직의 상이한 초음파 흡수율을 이용하여 치료를 받아야 할 부위에 선택적인 조직온도상승을 일으킬 수 있다는 것이다(김진호와 이청기, 1990).

지금까지 연구되어져 온 저강도 초음파의 효과에는 조직의 재생 촉진(Dyson, 1997), 다양한 कै양의 치유 촉진(Nussbaum 등, 1994), 관절연골세포의 분화와 증식 향상(성진형 등, 1999), 골성상 촉진(Harle 등, 2001; Tanzer 등, 2001), 아킬레스 건의 치유 촉진(Cunha 등, 2001), 말초신경의 회복촉진(Paik 등, 2002), 석회성 건염의 치유촉진(Ebenbichler 등, 1999) 관절염 치유촉진(Huang 등, 1999), 만성 허혈성 근육내의 혈류 증진(Fabrizio 등, 1996), 혈관신생 촉진(Young과 Dyson, 1990), 통증 감소(Esenyel 등, 2000; Hasson 등, 1990; Uhlemann, 1993) 등이 있다.

치료용 초음파는 물리치료사에 의해서 다양한 근골격계 병변에 적용되어져 왔는데, 전통적으로 1MHz의 주파수를 주로 사용해 왔으며(Moore 등, 2000), 이러한 치료용 초음파가 골격근의 재생 과정을 촉진시킨다는 연구들 또한 많이 발표되고 있다. Karnes와 Burton(2002)은 장지신근에 원심성 수축-유도성 근육손상을 일으킨 후 치료용 초음파(1MHz, $0.5W/cm^2$, continuous mode)를 이용하여 수중치료를 실시한 결과 7일째 대조군에 비하여 실험군에서 최대 등척성 근력(maximum isometric tetanic force)이 통계학적으로 높게 나타남을 보고하였고, Rantanen 등(1999)은 오른쪽 장딴지근에 근타박상을 유발시킨 후 초음파(3MHz, $1.5W/cm^2$, pulsed mode)를 적용한 결과 초음파를 적용한 군에서 위성세포의 증식이 더 향상됨을 보고하였다.

최근에는 이러한 치료용 초음파가 치료적 의미에서의 혈관신생에 있어 혈관신생 인자를 유도할 수 있는 방법으로 고려되어지고 있다. Young과 Dyson(1990)은 흰쥐의 피부에 $1cm^2$ 의 넓이로 손상을 일으킨 후 초음파($0.75MHz$, $0.1W/cm^2$ 와 $3MHz$, $0.1W/cm^2$)를 적용한 결과 5일째 실험군 간에는 차이가 없었으나, 대조군과 비교하였을 때 더 많은 혈관형성이 이루어져 있음을 보고하였고, Amabile 등(2001)은 동맥의 기계적 과확장 손상(arterial mechanical injury) 유발 후 혈관내 초음파(endovascular ultrasound)($2MHz$, $50W/cm^2$)를 적용한 결과 대조군에 비교하여 혈관 유전자(vascular gene) 발현이 증가함을 보고하였다. 이상의 연구결과들에서 알 수 있듯이 치료용

초음파는 골격근의 재생과정 뿐만 아니라, 골격근 재생과정에서 필수적으로 요구되어지는 과정인 혈관신생과정에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 지금까지 연구되어진 다양한 초음파의 치료효과 중 저강도 초음파 적용이 골격근 손상 후 혈관신생과정과 통증에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 연구하고자 한다.

골격근 손상 후 일어나는 혈관신생 과정은 손상으로 인해 괴사된 조직에 대한 탐식작용 이후 바로 나타나는 과정으로(Chambers와 McDermott, 1996), 이러한 혈관신생은 골격근 재생에 있어 중요한 역할을 담당하는 위성세포가 성공적인 증식, 분화 및 근관 형성에 필수적으로 요구되어지는 지속적인 산소와 영양공급을 위해서는 혈관에서 100~200 μ m 이내에 위치해야 하기 때문에, 반드시 선행적으로 이루어져야만 하는 과정 중 하나이다(Carmeliet과 Jain, 2000; Grounds, 1991). 이러한 골격근 손상에는 근열상, 근타박상, 근좌상 등 여러 가지가 있는데(Kami 등, 1999), 이 중 근타박상은 사지에 직접적으로 타격이 가해졌을 때 보여지는 근육손상 중 가장 빈번하게 발생하는 형태이다. 근타박상의 증상은 종창, 구축, 압통(tenderness), 통증, 기능적·구조적 손실 등 비특이적으로 나타나고, 현미경적 수준에서는 근섬유와 모세혈관 파열, 혈액 침착, 혈종 형성, 손상 받은 근섬유 주변에 공간형성, 부종 등이 관찰된다(Beiner와 Jokl, 2001).

이전 연구에서 골격근 손상부위에 저강도 초음파 적용은 통증과 부종감소, 관절가동범위 증진에 효과가 있다고 하였고(Bryant와 Milne, 1998; Falconer 등, 1990; Windt 등, 1999), Reher 등(1999)은 배양한 단핵구, 골아세포, 섬유아세포에 두 종류의 초음파(1MHz와 45kHz)를 적용한 결과 모든 세포에서 혈관내피성장인자 발현의 증가를 보고하면서, 치료용 초음파가 혈관신생과정에 관여할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 그러나 치료용 초음파에 의해서 위성세포의 손상부위로의 이주(migration)와 증식이 억제된다는 연구결과 또한 일부 보고되고 있고(Alter 등, 1998), 저강도 초음파를 이용한 골격근의 재생과정에 있어 혈관내피성장인자를 *in vivo* 상태에서 관찰한 논문들은 거의 없는 실정이며, 저강도 초음파와 관련된 논문들 또한 대부분 초음파에 의해서 발생하는 조직내 온도변화와 관련된 연구들이 대부분이다(Draper 등, 1995; Reed와 Ashikaga, 1997).

이에 본 연구에서는 골격근 손상 유발 후 치료용 초음파가 골격근 재생과정을 촉진시키는지 여부에 대하여 근섬유의 형태학적인 변화를 광학현미경하에서 살펴보고, 또한 치료용 초음파에 의해서 혈관내피성장인자가 시간의 경과에 따라 어떻게 변화하는지에 대하여 면역조직화학법을 이용하여 연구하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서 사용한 실험동물은 동일한 조건하에서 사육된 생후 8-10주, 체중 250-300g의 성숙한 Spague-Dawley계 흰쥐를 성별 구분없이 25마리를 사용했다. 실험동물은 초음파를 적용하는 실험군과 초음파를 적용하지 않는 대조군으로 나누어 실시하였으며, 장딴지근 내 혈관내피성장인자의 발현을 관찰하기 위한 실험군과 대조군은 손상 후 1일군, 2일군, 3일군, 7일군으로 나누었고, 요수분절 내 Substance-P의 발현을 관찰하기 위한 실험군과 대조군은 손상 후 1일, 2일, 3

일, 5일군으로 나누어 실험하였다. 실험기간 중 물과 먹이는 무제한 공급하였고, 사육실의 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\pm 2\%$ 로 최적의 상태를 유지하였으며, 사육장의 광주기와 암주기는 각각 12시간으로 조절하였다.

2. 근타박상 유발

장딴지근에 근타박상을 유발하기 위하여, 염산케타민(Ketamine HCL, 유한양행)과 Xylazine hydrochloride(바이엘 코리아)를 1:1 비율로 섞은 후 복강내 주사하여($2\text{ml}/\text{kg}$) 전신마취를 시킨 상태에서 오른쪽 하지의 후면부를 삭모하였다. 그리고 나서 슬관절 신전, 족관절 90도 굴곡상태로 유지시킨 상태에서, 장딴지근의 근건부에서 무릎방향으로 1~1.2cm 윗부분을 표시한 후, 표시한 지점이 중앙에 오도록 조절하면서 100cm 높이의 원통형 관을 위치시켰다. 이 상태에서 31.4g의 쇠구슬을 낙하시켜서 장딴지근에 근타박상을 유발시켰다(Fig. 1).

3. 초음파 적용

초음파(SONOTENS 501, DAEYANG MEDICAL, Korea) 조사는 실험군에서 손상 1일 후부터

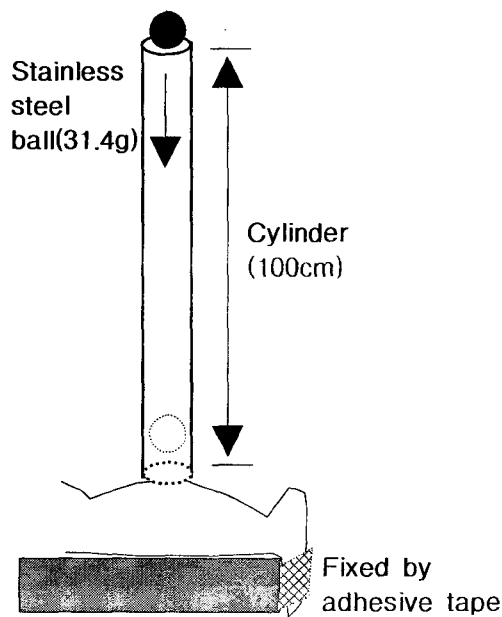


Fig. 1. Schematic representation of the muscle contusion model in rat.

실시하였는데, 연속 모드(continuous mode)로 파장 1 MHz, 강도 $1\text{ W}/\text{cm}^2$ 를 이용하여 도자(지름: 3cm)의 헤드를 장딴지근의 근복에서부터 0.5cm 이격하여, 수온을 25°C 로 일정하게 유지시키면서 5분동안 1일 1회 적용하였다. 이때 실험동물은 전신마취를 실시하였고, 최소한의 부분만 수중에 닿게 하면서 일정한 자세를 유지시키기 위하여 실험실에서 직접 제작한 플라스틱 고정틀을 사용하였다(Fig. 2). 초음파를 적용하는 동안 대조군 또한 마취를 시켜줌으로써 실험군과 최대한 동일한 조건을 주었다. 초음파 조사 후에는 체온이 하강되는 것을 방지하기 위하여 마른 수건을 이용하여 수분을 제거하였다. 초음파의 수중치료시 사용한 물은 삼차증류수를 이용하여 탈개스수(boiled degassed water)를 만들어 사용하였다.

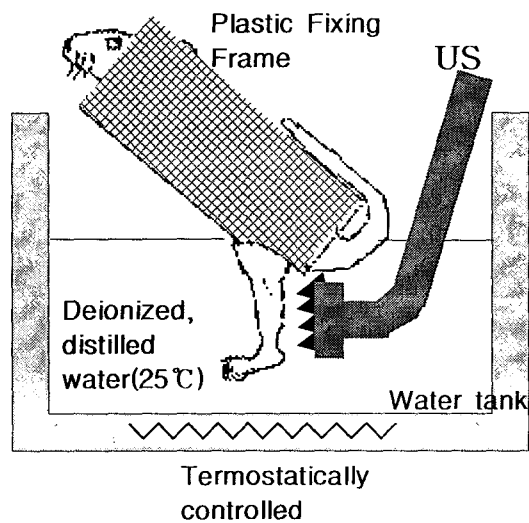


Fig. 2. Schematic drawing of therapeutic ultrasound insonation model. US=ultrasound.

조직채취를 위하여 초음파 조사 후 1시간 경과 후에 전신마취를 시켜 0.9% NaCl을 이용하여 심장관류를 하였고, 조직의 전고정을 위하여 4% paraformaldehyde 또한 심장관류시켰다. 오른쪽 하지의 피부절개 후 장딴지근을 채취하였다.

4. 조직절편 제작

후고정된 장딴지근 조직은 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올(Ethanol, Merck)에 담귀 2시간 동안 흔들어서 탈수(dehydration)과정을 실시하였고, xylene을 이용하여 청명(clearing)과정을 실시하였다. Xylen과 파라핀의 혼합비율을 조절하면서 파라핀 포매(paraffin embedding)를 한 후, 파라핀 블록(paraffin block)을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 미세절단기(BRIGHT 5040, Bright instrument company Ltd.)를 사용하여 10 μ m의 두께로 자른 후 슬라이드에 올려, 건조기(C-SL SLIDE WARMER, Chang Shin Scientific Co, Korea)에 24시간동안 건조시켰다.

5. 헤마톡실린-에오진 염색

(Hematoxylin & Eosin Staining)

근타박상 유발 후 근육의 형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 헤마톡실린-에오진 염색을 실시했다. 제작된 슬라이드를 xylene에 10분씩 2회 담귀 탈파라핀(deparaffin) 시켰고, 다시 100% 에탄올에서 50% 에탄올까지 계속적으로 농도를 낮춰줌으로써 합수(hydration) 과정을 실시했다. 3차 증류수에 10분간 수세한 후 헤마톡실린에 8분간 침수시키고 흐르는 물에 1분간 수세하였고, 다시 80% 에탄올에 3분간 침수시켰다. 그리고 나서 에오진에 8분간 침수시킨 후 탈수와 청명과정을 실시하고 마지막으로 PMM(permanent mounting media)을 이용하여 cover glass로 봉입하였다.

6. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

혈관내피성장인자의 면연조직화학반응을 관찰하기 위하여 먼저 제작된 슬라이드를 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 증류수에 10분씩 3번 수세하였고, 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)를 억제시키기 위하여 methanol 200ml에 30% H₂O₂ 1ml를 첨가하여 만든 용액에 30분간 침적시켰다. 그리고 나서 증류수와 0.1M PBS(pH 7.4)에 각각 10분씩 3회 세척하고, 조직내 비특이적인 면역반응을 차단하기 위하여 normal horse serum에 실온에서 1시간 동안 전처리 시킨 후 1차 항체인 mouse anti-VEGF(rhVEGF121, Oncogene Research Products, Boston, USA)을 1:50으로 희석하여(희석용액: 0.1M PBS, 0.003% Triton X-100, 0.02% Normal goat serum) 36°C에서 1시간동안 반응시켰고, 2차 항체는 biotinylated anti-mouse IgG(Vector Lab., USA)으로 실온에서 1시간 동안 반응시켰으며, 3차 항체는 Vectastatin Elite ABC Regent(Vector Lab., USA)로 2차 항체와 마찬가지로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 각각의 과정 사이에 0.1M PBS로 10분씩 3회 수세하였으며, 전처리때와 마찬가지로 조직이 마르는 것을 방지하기 위하여 습윤상자 내에서 실시하였다. 위의 과정을 거친 후 DAB 용액(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in Tris-HCl buffer)으로 발색시킨 후, Mayer's hematoxylin staining으로 핵염색을 실시하였다. 마지막으로 탈수와 청명과정을 거친 후 영구봉입하였다.

7. 자료처리

시간경과에 따른 근육의 형태학적인 관찰은 광학현미경(OLYMPUS BX50, Japan)을 사용하여 관찰하였고, 면역반응을 보인 혈관내피성장인자의 세포수와 Substance-P의 면역측정은 Image-Pro Plus win 4.0β 프로그램을 이용하여 측정하였으며, 측정된 자료는 실험군과 대조군 사이의 차이를 비교하기 위하여 SPSS for win 10.0을 이용하여 일원배치분산분석을 실시하였으며, 유의수준 α 는 95%로 하였다.

III. 결 과

1. 시간경과에 따른 형태학적 관찰

시간경과에 따른 근육의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 헤마톡실린 에오진 염색을 실시하였다. 결과적으로 초음파를 조사한 실험군과 조사하지 않은 대조군 사이에 형태학적인 변화는 7일군에서만 확연하게 나타나고 3일군까지는 나타나지 않았다. 7일군에서는 실험군과 대조군 모두에서 육아조직의 형성을 관찰할 수 있었는데, 대조군에 비해서 실험군에 형성된 육아조직의 양이 놀라울 정도로 적다는 것을 알 수 있었고(Fig. 13, Fig. 14). 핵이 중앙부에 위치하는 근섬유(centronucleated muscle fiber)가 관찰되었다(Fig. 16). 3일군까지 관찰되어지는 근섬유의 일반적인 특징들은 쇠구슬이 떨어진 바로 아랫 부위의 근육조직은 파괴되어 그 형태를 유지하지 못하고 있고(Fig. 9), 근육사이에 위치하는 신경섬유 중 윗부분에 위치하는 신경섬유 또한 파괴되어 있는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 10). 그리고 근섬유 사이의 공간이 혈액침착과 부종 등에 의해서 넓어져 있었으며(Fig. 11, 12), 넓어진 공간주변 부위에 계속적으로 염증세포가 관찰되었다

(Fig. 15)

2. 시간경과에 따른 혈관내피성장인자의 면역반응

혈관내피성장인자의 면역조직화학반응은 초음파를 실시한 실험군과 실시하지 않은 대조군 모두에서 면역반응이 관찰되었다. 이러한 혈관내피성장인자의 발현부위는 초기에는 근타박상으로 인하여 사이공간이 넓어진 근다발막 사이공간과 근섬유 사이에서 특징적으로 나타났고, 특히 근섬유 사이에 위치한 혈관의 주변에서도 강한 면역반응이 나타났다. 그러나 실험군의 경우 7일에서는 근섬유 사이에서의 혈관내피성장인자의 면역반응을 거의 관찰할 수 없었고, 근육을 싸고 있는 결합조직에서 혈관내피성장인자의 면역반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 18).

시간경과에 따른 혈관내피성장인자의 면역반응 변화를 비교하기 위하여 Image-Pro Plus win 4.0β 프로그램을 이용하여 면역반응을 보인 혈관내피성장인자의 발현세포수를 계산하여 비교하였는데, 실험군과 대조군 각각의 일원배치분산분석에서는 모두 유의한 변화를 보였지만 ($p < 0.05$)(Table 2, Table 3), 사후검정 결과 실험군에서는 시간경과에 따라 모든 시간대에서 유의한 변화를 보인 반면($p < 0.05$)(Table 2, Fig. 4), 대조군의 경우는 1일과 7일, 2일과 7일에서만 유의한 차이가 보였고 시간경과에 따라서는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다($p > 0.05$)(Fig. 5).

실험군과 대조군의 비교에서는 1일군을 제외한 2일, 3일 및 7일군에서 유의한 차이가 관찰되었다(Table 1, Fig. 3). 1일에서는 실험군과 대조군 사이에 혈관내피성장인자 발현 정도에 큰 차이가 나타나지 않으나(Table 1, Fig. 3, Fig. 17, Fig. 18), 2일과 3일, 그리고 7일에서는 실험군과 대조군을 비교하였을 때 발현정도에 차이를 관찰할 수 있었다(Table 1, Fig. 3). 그러나, 2일과 3일에서는 실험군에서 대조군에 비하여 더 강한 면역반응을 관찰할 수 있었던 반면에(Table 1, Fig. 3, Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22), 7일에서는 대조군에서 실험군에 비하여 더 강한 면역반응이 관찰되었다(Table 1, Fig. 3, Fig. 23, Fig. 24).

Table 1. The change of VEGF expression at 1, 2, 3, and 7 days.

unit : pixels

	1 day	2 days	3 days	7 days
Exp.	63.0±6.92	87.0±6.20	101.4±6.46	53.6±4.72
Cont.	51.2±12.07	57.4±10.38	60.0±12.88	79.0±5.29

(Mena±Standard Deviation)

Fig. 3. The comparison with VEGF expression between experimental and control groups.

* : $p < 0.05$

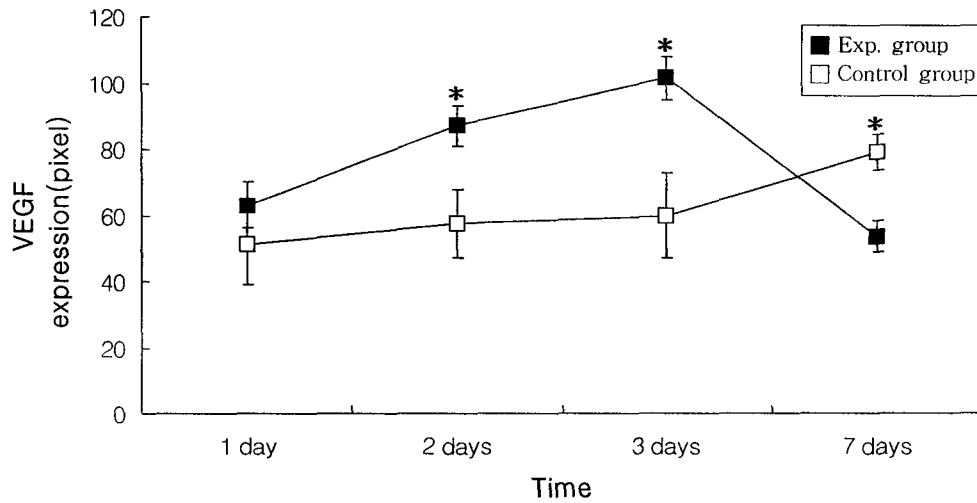


Table 2. One way ANOVA of VEGF expression in the experimental group.

	SS	df	MS	F	P-value
between	7183.35	3	2394.45	63.59	0.000*
within	602.40	16	37.65		
total	7785.75	19			

SS : sum of square

df : degree of freedom

MS : mean square

* : $p < 0.05$

Fig. 4. The change of VEGF expression in the experimental group. * : $p < 0.05$

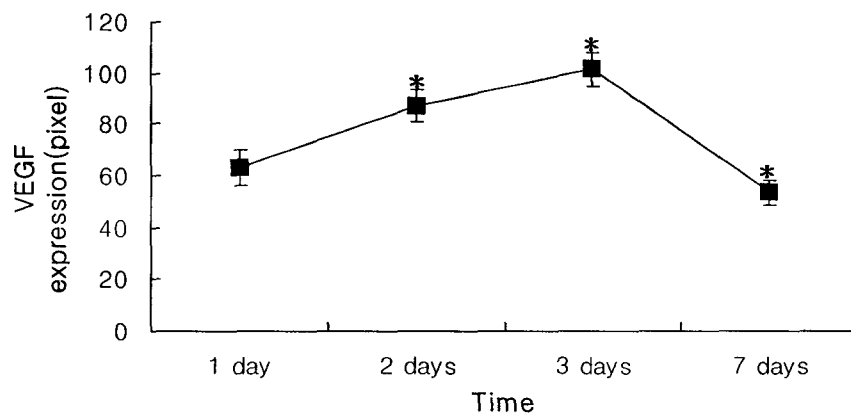


Table 3. One way ANOVA of VEGF expression in the control group.

	SS	df	MS	F	P-value
between	2153.80	3	717.93	6.41	0.005*
within	1790.00	16	111.87		
total	3943.80	19			

SS : sum of square

df : degree of freedom

MS : mean square

* : $p < 0.05$

Fig. 5. The change of VEGF expression in the control group.

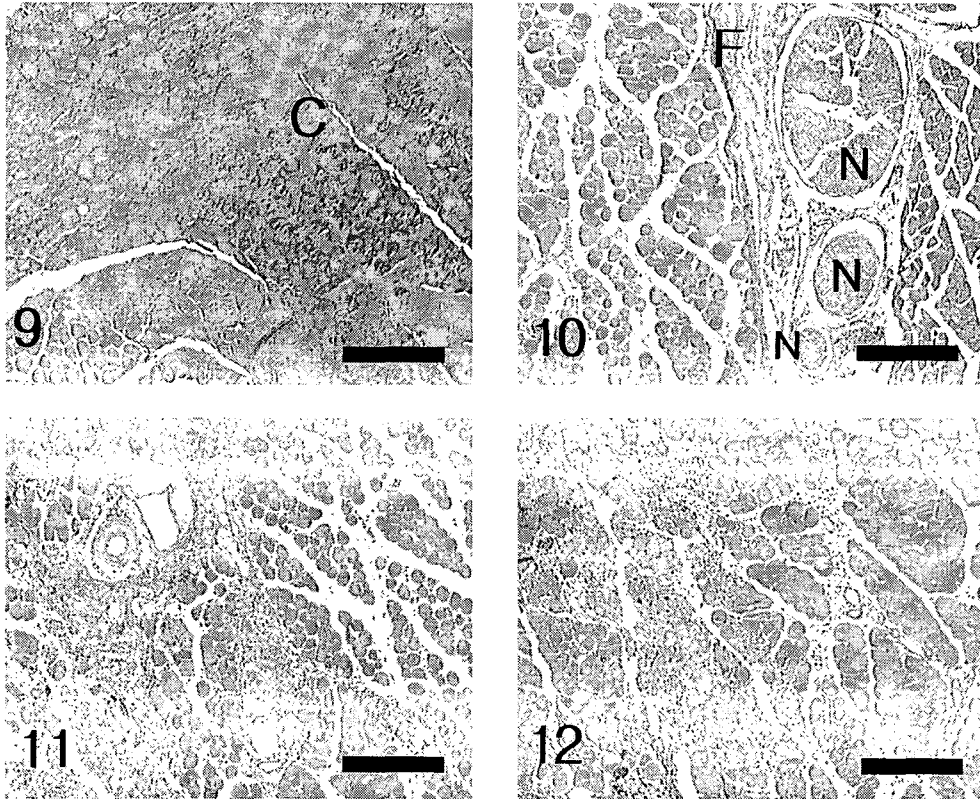
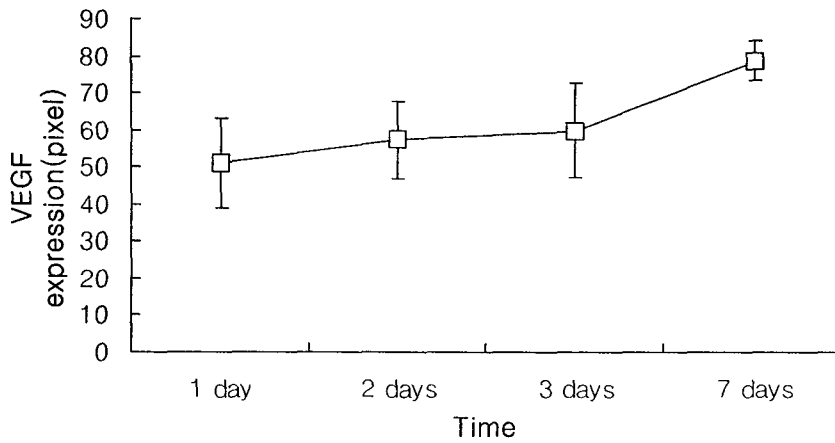


Fig. 9. Hematoxylin & eosin stain at 1 day in control group($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$). The lower part of contacted with stainless steel ball was collapsed muscle fiber.

C : collapsed muscle fiber

Fig. 10. Hematoxylin & eosin stain at 1 day in control group($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$). The nerve fiber between muscle fiber was also injured, and interspace of muscle fiber was increased. F : fascia, N : nerve fiber

Fig. 11. Hematoxylin & eosin stain at 3 day in experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$). The interspace of muscle fiber was increased by blood leakage.

Fig. 12. Hematoxylin & eosin stain at 2 days in control group($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$). Inflammatory cell showed.

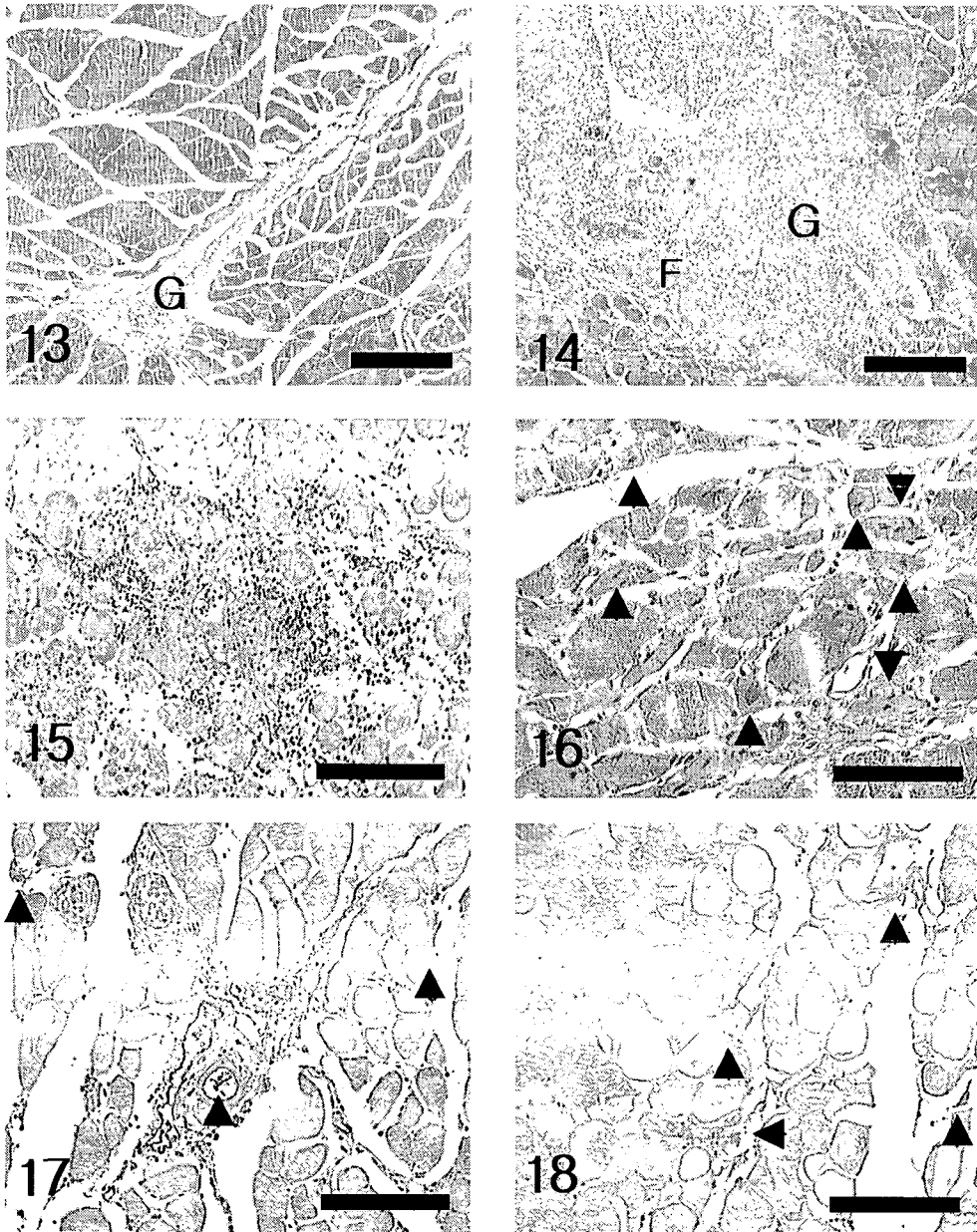


Fig. 13. Hematoxylin & eosin stain at 7 days in experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Granular tissue formation was observed. G : granular tissue

Fig. 14. Hematoxylin & eosin stain at 7 days in control group($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Granular tissue formation was observed. F : fascia, G : granular tissue

Fig. 15. Hematoxyline & eosin stain at 2 days in experimental group($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Necrosis was showed.

Fig. 16. Hematoxyline & eosin stain at 7 days in experimental group($\times 200$; bar = $100\mu\text{m}$).

Centronucleated muscle fiber (arrow) was showed.

Fig. 17. Immunoreactivity (arrow) with the VEGF antibody at 1 days in experimental group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Fig. 18. Immunoreactivity (arrow) with the VEGF antibody at 1 days in control group ($\times 100$

; bar = $200\mu\text{m}$).

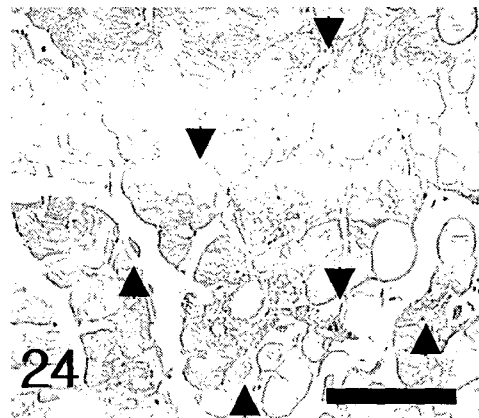
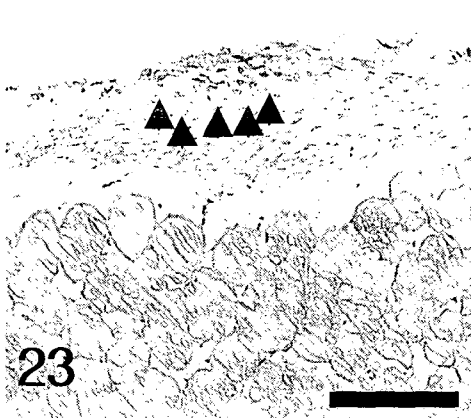
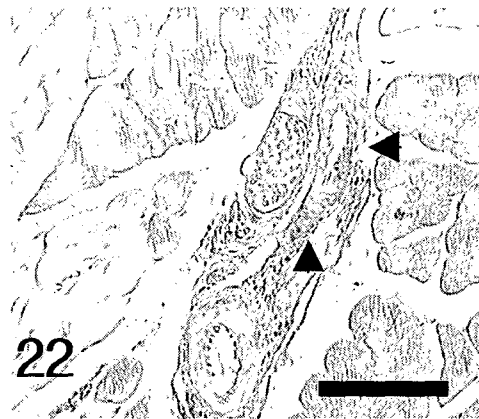
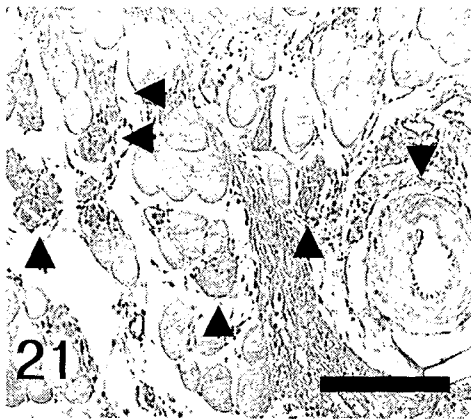
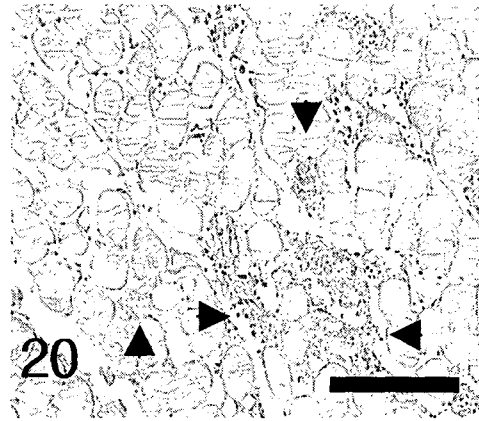
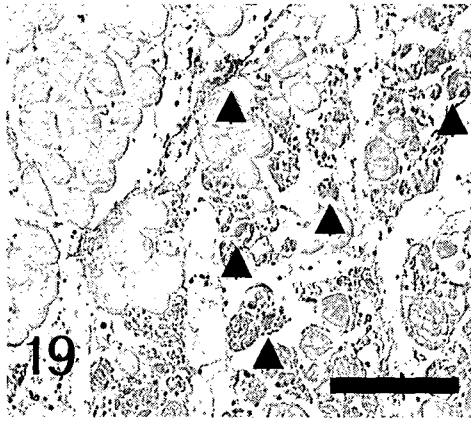


Fig. 19. Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 days in experimental group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Fig. 20. Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 days in control group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Fig. 21. Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 3 days in experimental group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Fig. 22. Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 3 days in control group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Fig. 23. Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 7 days in experimental group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

Fig. 24. Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 7 days in control group ($\times 100$; bar = $200\mu\text{m}$).

IV. 고 찰

본 연구의 주요결과는 장딴지근에 근타박상을 유발시킨 후 저장도 초음파 적용시 혈관신생과정에 관여하는 성장인자 중 하나인 혈관내피성장인자의 발현이 초음파를 실시하지 않은 대조군의 경우는 계속적으로 증가하지만 초음파를 실시한 실험군의 경우 처음 3일 동안은 계속 증가하나 7일째는 감소하며, 형태학적인 관찰에서 7일째 실험군에서의 육아조직 형성이 대조군과 비교하였을 때 매우 적게 나타나는 것으로 보아 치료용 초음파가 손상 후 초기과정에서 혈관내피성장인자의 발현을 향상시킴으로써, 골격근의 재생과정을 촉진시킨다는 것이다.

치료적 의미에서의 혈관신생이라는 용어는 다양한 허혈상태로 인해 나타나는 현상에 대한 치료로써 혈관의 국소 성장을 유발시키기 위한 중재방법으로 제시되었다(Hockel 등, 1993). 전통적으로 치료적 의미에서의 혈관신생은 대망 조직편(omentum majus flaps)과 근육 조직편(muscle flaps)과 같은 혈관신생을 일으킬 수 있는 잠재력이 높은 혈관신생자가유래성 조직(autologous tissue)의 이식과 같은 수술적 방법에 의해서 일차적으로 유도되어졌다(Reher 등, 1999). 최근에는 혈관신생에 대한 생물학적 과정에 대한 이해의 진보와 더불어 사이토카인과 성장인자와 같은 혈관신생 인자의 발견과 이러한 물질들에 대한 클로닝(cloning) 기술의 발달로 약물투입 등의 방법으로 혈관신생을 유도시킬 수 있는 단계에까지 이르렀다(Hockel 등, 1993). 그러나, 혈관신생에 대한 지속적인 연구가 이루어지면서 수술적 방법이나 약물투입에 의한 방법 이외에 운동적용(김재철 등, 2002; Amaral 등, 2001c), 레이저 조사(Amaral 등, 2001a; Bibikova 등, 1994), 전기자극(Hang 등, 1995), 초음파 조사(Amabile 등, 2001; Mukherjee 등, 2000; Reher 등, 1999)와 같은 방법 또한 혈관신생을 촉진시킬 수 있는 방법으로 제시되어지고 있다.

이 중 초음파는 사용방법이 간단하고 인체의 원하는 부위에 비교적 안전하게 적용시킬 수 있다는 장점 때문에 가장 많이 사용되고 있는 심부열치료 방법으로(김진호와 이창기, 1990), 비록 지금까지는 진단용 기구로서의 초음파의 임상적 가치가 상대적으로 매우 중요하게 인식되어져 오고 있지만, 최근에는 초음파에 의해서 유도되어지는 생리학적인 효과 즉, 조직의 파괴와 조직의 치유촉진 모두의 가능성을 지니고 있는 성질에 대한 관심 또한 증가하고 있다(Harle 등, 2001).

초음파에 의해서 유도되어지는 효과들은 초음파의 적용방법(연속모드 또는 맥동모드), 강도 및 주파수 등에 따라 다르게 나타난다. 본 실험에서는 둥근 모양의 헤드를 이용하여 연속모드로 1 MHz의 주파수와 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 의 강도로 실시하였는데, Reher 등(1999)은 초음파 조사에 있어 연속모드의 사용이 맥동모드(pulsed mode)에 비하여 치료시간을 단축시킬 수 있다는 장점이 있고, 둥근 모양의 초음파 헤드는 더 크고 효과적인 치료부위를 제공해 준다고 하였다. 또한 수중치료에 있어 삼차증류수를 이용하여 탈개스수를 만들어 사용하였는데, Griffin(1980)은 증류수, 글리세린, 미네랄유의 3가지 매질의 초음파 전달능력에 대한 실험에서 초음파의 강도나 치료거리에 상관없이 증류수를 이용한 치료가 초음파의 전달능력이 가장 좋다고 하였다. 한테룬과 신희석(1990)은 토끼를 이용하여 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$, $1.5\text{W}/\text{cm}^2$, $2.0\text{W}/\text{cm}^2$, $3.0\text{W}/\text{cm}^2$ 의 강도로 15분간 대퇴부위에 초음파(1 MHz)를 적용하면서 시간경과에 따른 피부, 피하조직, 1cm 깊이의 근육, 2~3cm의 근육에서의 온도변화를 thermister needle을 이용하여 측정한 결과 $3\text{W}/\text{cm}^2$ 의 강도를 제외하고는 적용전과 적용후 15분까지 근육에서의 온도변화가 유의하게 일어나지 않음을 보고하였다. 그러므로, 본 실험에서 초기 3일 동안 대조군에 비하여 실험군에서 혈관내피성장인자의 발현이 더 높게 나타

난 것은 단순한 온도상승에 의한 효과뿐만 아니라 초음파의 비열효과 또한 배제할 수 없는 원인임을 알 수 있다.

지금까지 치료용 초음파에 의한 혈관내피성장인자의 발현을 관찰한 논문은 거의 발표되지 않고 있다고 해도 과언이 아니다. 본 실험에서 시간경과에 따른 혈관내피성장인자의 면역반응은 처음 3일동안은 실험군이 더 많이 발현되었고, 7일째에는 대조군이 더 많이 발현됨을 알 수 있었다. 처음 3일 동안은 2일과 3일에서 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 더 많이 발현됨을 알 수 있었는데, 이러한 결과에서 치료용 초음파가 손상 후 초기의 혈관내피성장인자 발현을 촉진시킴으로써, 신생혈관의 형성 중 손상 후 초기 3일에 최대반응을 보이는 신생혈관의 증식과정에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 또한 초음파를 실시하지 않은 대조군의 경우 비록 통계학적으로는 유의한 변화를 일으키지는 않았지만 계속적으로 증가한 반면, 초음파를 실시한 실험군의 경우 7일째 급격하게 감소한 현상은 초음파 조사에 의한 초기 기능회복의 촉진과 연관지어 생각할 수 있는데, Karnes와 Burton(2002)은 손상이 유발된 장지신근에 치료용 초음파(1MHz, 0.5W/cm², continuous mode)를 적용한 후 최대 등척성 근력(maximum isometric tetanic force)을 측정할 결과 3일군과 5일군에서는 유의한 차이가 없었지만 7일째 유의한 차이를 보고하였다. 이러한 연과 결과에서 골격근 손상 후 초음파 적용시 7일째에는 어느정도의 기능회복이 시작된다는 것을 알 수 있고, 이러한 기능회복의 시작과 함께 형성된 신생혈관의 성숙과정을 유도함으로써 혈관내피성장인자의 발현량이 적어진다고 사료되어진다.

본 연구의 형태학적인 관찰에서 3일군까지는 실험군과 대조군사이의 육안적인 형태의 차이가 없었고, 7일째 실험군이 대조군에 비해서 육아조직의 형성이 훨씬 적게 이루어진 것을 관찰하였는데, Beiner와 Jokl(2001)은 이러한 현상이 신경신호입력의 손상, 혈관의 미성장, 콜라겐 교차결합 증가, 그리고 재생되어지는 근모세포의 과도한 침착 등의 원인에 의한 것이라고 하였다. 또한 7일군에서 핵이 중앙에 위치하는 근섬유가 관찰되었는데, 핵이 중앙부에 위치하는 근섬유의 출현은 손상 후 근관과 근섬유들이 새롭게 재생되어지고 있다는 증거로서, 근육이 재생과정에 있어 이러한 현상들은 손상 후 기저막과 세포막 사이에 위치하는 위성세포가 기저막 손상으로 인해 분비되면서 다핵형 근관을 형성하고 결과적으로 근섬유의 형태를 취하면서 손상회복을 이루는 과정 중 하나이다(Kasemkijwattana 등, 1998). 이와 유사한 결과로서 Kasemkijwattana 등(1998)은 하퇴삼두근에 근타박상을 유발하여 치유과정을 관찰한 실험에서, 2일까지 큰 혈종이 관찰하였고, 7일에는 핵이 중앙에 위치하는 근섬유를 관찰하였다.

치료용 초음파에 의한 세포 기능 변화 또는 단백질 합성과 관련된 분자적 기전은 아직까지 확립되어 있지 않다. 지금까지 제시되어진 분자적 기전은 다음과 같다. (1) 미세소관의 압박, 또는 공동형성, 미세기포(microbubble)와 음향흐름은 세포내 미세운동을 유발시키고(Molina 등, 2000), 칼슘이온의 세포내 이동을 촉진시켜 칼슘이온으로 하여금 세포막 투과성(membrane permeability)의 변화 및 이차전령(second messenger)과 같은 화학신호의 활동을 향상시키며, 이온 이동 또는 단백질 이동과 같은 변화는 결과적으로 유전자 발현과 관련된 세포내 신호를 변화시킨다(Amsó, 1994; Young과 Dyson, 1990). (2) 세포 표면부위에 작용하는 기계적 압력은 또한 양이온 채널의 압력 수용체(stretch receptor) 형태를 활성화시키고, 이로 인한 양이온의 농도증가 또한 유전자 발현을 조절하는 세포내 신호를 변화시킨다(Sachs, 1991). (3) 초음파에 의해서 전달되어지는 기계적 에너지는 세포 대사(cell metabolism)와 유전자 발현에 영향을 주는 세포외 기질의 세포골격에 부착상태를 변화시킨다(Yang 등, 1996). (4) 초음파 조사 동안 증가된 온도는

세포 대사에 영향을 준다(Reher 등, 1999). 저장도 초음파의 사용은 조직에 열이 발생하는 것을 감소시키고, 또한 공동현상 즉, 초음파를 조사하는 부위의 가스의 고동(pulsation) 또는 증기로 채워진 공간(vapour-filled voids)이 발생할 가능성을 감소시킨다(Webster 등, 1980). 이외에 Dinno 등(1989)은 치료용 초음파의 기계적 효과는 인접한 세포의 세포막 투과성을 변화시켜서, 세포 안으로 Ca^{2+} 이온을 유입시킴으로써, 세포 내에 Ca^{2+} 농도를 증가시키고, 이러한 세포 내의 변화는 세포의 움직임이나 성장인자의 합성을 증가시켜 상처치유의 회복에 영향을 준다고 보고하였다. 결론적으로,

V. 결 론

골격근 손상 후 일어나는 혈관신생과정에 있어 치료용 초음파의 효과를 알아보기 위하여 본 실험에서는 Spague-Dawley계 흰쥐의 장딴지근에 쇠구슬을 낙하시켜 근타박상을 유발시킨 후, 혈관신생에 있어 중요한 지표로 작용하는 혈관내피성장인자를 면역조직화학법으로 연구하였다. 실험동물은 초음파를 조사한 실험군과 조사하지 않은 대조군으로 나누었고, 시간경과에 따른 변화를 관찰하기 위하여 다시 1일, 2일, 3일, 7일군으로 나누어 관찰한 바 실험결과는 다음과 같았다.

1. 형태학적인 관찰에서 초음파를 조사한 실험군의 7일군에서 대조군에 비하여 육아조직의 형성이 매우 적게 이루어짐을 관찰하였고, 이를 제외한 나머지 군에서는 형태학적인 차이가 관찰되지 않았다. 일반적인 특징으로, 손상 후 7일까지 계속적으로 근섬유 사이의 공간이 넓어졌고, 염증세포와 핵이 중앙에 위치하는 근섬유의 출현이 관찰되었으며, 근육섬유 뿐만 아니라 근섬유 사이에 위치하는 신경섬유에도 손상이 가해졌음을 알 수 있었다.

2. 혈관내피성장인자의 발현부위는 실험군과 대조군 모두 손상으로 인해 넓어진 근다발막 사이 공간과 근섬유 사이에서 관찰되었는데, 특히 초음파를 조사한 7일군에서는 근섬유 사이에서의 발현이 관찰되지 않는 반면 근육을 싸고 있는 막에서의 발현이 관찰되었다.

3. 각 그룹간 혈관내피성장인자의 발현정도는 1일군에서는 비슷하게 나타났으나, 2일과 3일군에서는 실험군에서 더 많은 발현이 관찰되었고, 7일군에서는 대조군에서 더 많은 발현이 관찰되었다.

이상의 결과에서 근타박상으로 유도된 골격근의 손상 후 재생과정에 있어 치료용 초음파의 조사가 특히 초기에 혈관내피성장인자의 발현을 증가시킴으로써 혈관신생과정을 촉진시킴을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 김재철, 이호근, 황평한 등 : Retraining에 따른 골격근내 VEGF protein의 발현, 한국체육학회지, 41(2), 565-571, 2002.
- 김진호, 이청기 : 건관절 극하와 부위에서 초음파에 의한 조직온도 상승효과, 대한재활의학회지, 14(1), 128-137, 1990.
- 남기원 : 초음파가 흰쥐 관절연골내 열충격 단백질70의 발현에 미치는 영향, 대구대학교 재활과 학대학원, 석사학위 논문, 2000.
- 성진형, 류재덕, 김원유 등 : 치료용 저에너지 초음파가 배양중인 관절 연골세포에 미치는 영향, 대한정형외과학회지, 34(3), 617-624, 1999.
- 한태륜, 신희석 : 초음파 치료의 온열효과에 관한 실험적 연구, 대한재활의학회지, 14(1), 145-151, 1990.
- Adams RH, Diella F, Henning S, et al. : The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration, Cell, 104(1), 57-69, 2001.
- Alter A, Rozenszajn LA, Miller HI, et al. : Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro, Ultrasound in Medicine and Biology, 24(5), 711-721, 1998.
- Amabile PG, Waugh JM, Lewis TN, et al. : High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound, Journal of the American College of Cardiology, 37(7), 1975-1980, 2001.
- Amaral AC, parizotto NA, Salvini TF : Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice, Lasers in Medical Science, 16(1), 44-51, 2001a.
- Amaral SL, Papanek PE, Greene AS : Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training, American Journal of Physiology, Heart and Circulation Physiology, 281(3), 1163-1169, 2001b.
- Amso NN : Applications of therapeutic ultrasound in medicine, Ultrasonics Sonochemistry, 1(1), S69-S71, 1994.
- Beiner JM, Jokl P : Muscle contusion injuries: current treatment options, Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 9(4), 227-237, 2001.
- Bibikova A, Belkin V, Oron U : Enhancement of angiogenesis in regeneration gastrocnemius muscle of the toad(bufo viridis) by low-energy laser irradiation, Anatomy and Embryology, 193(6), 597-602, 1994.
- Brian R. Takamaru A : The effects of heating with ultrasound on knee joint displacement, The Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy, 26(3), 131-137, 1997.
- Bryant J, Milne R : Therapeutic ultrasound in physiotherapy, Report to the Development and Evaluation Committee, 90, 1-21, 1998.
- Carmeliet P, Jain RK. : Angiogenesis in cancer and other disease, Nature, 407, 249-257, 2000.
- Chambers RL, McDermott JC : Molecular basis of skeletal muscle regeneration, The Canadian Journal of Applied Physiology, 21(3), 155-184, 1996.

- Conway EM, Collen D, Carmeliet P : Molecular mechanisms of blood vessel growth, *Cardiovascular Research*, 49, 507-521, 2001.
- Cunha AD, Parizotto NA, Vidal BDC : The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 27(12), 1691-1696, 2001.
- Dinno M, Dyson M, Youn S, et al. : The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound, *Physical Medicine & Biology*, 34, 1543-1552, 1989.
- Draper DO, Schulthies S, Sorvisto P, et al. : Temperature changes in deep muscle of human during ice and ultrasound therapies: an in vivo study, *Journal of Orthopaedic Sports and Physical Therapy*, 21(3), 153-157, 1995.
- Dyson M : Advances in wound healing physiology: The comparative perspective, *Veterinary Dermatology*, 8, 227-233, 1997.
- Ebenbichler GR, Erdogmus CB, Resch KL, et al. : Ultrasound therapy for calcific tendinitis of the shoulder, *The New England Journal of Medicine*, 340(20), 1533-1538, 1999.
- Esenyel M, Caglar N, Aldemir T : Treatment of myofascial pain, *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 79(1), 48-52, 2000.
- Fabrizio PA, Schmidt JA, Clemente FR, et al. : Acute effects of therapeutic ultrasound delivered at varying parameters on the blood flow velocity in a muscular distribution artery, *Journal of Orthopedic Sports Physical Therapy*, 24(5), 294-302, 1996.
- Falconer J, Hayes KW, Chang RW : Therapeutic ultrasound in the treatment of musculoskeletal conditions, *Arthritis Care Research*, 3, 85-91, 1990.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, et al. : Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins, *Endocrine Review*, 13(1), 18-32, 1992.
- Ferrara N : Vascular endothelial growth factor, *European Journal of Cancer*, 32(14), 2413-2422, 1996.
- Griffin GE : Transmissiveness of ultrasound through tap water, glycerin, and mineral oil, *Physical Therapy*, 60, 1010-1016, 1980.
- Grounds MD : Towards understanding skeletal muscle regeneration, *Pathology, Research and Practice*, 187(1), 1-22, 1991.
- Hang J, Kong L, Gu JW, et al. : VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle, *The American Journal of Physiology*, 269(5), 1827-1831, 1995.
- Harle J, Salih V, Mayia F, et al. : Effects of ultrasound on the growth of bone and periodontal ligament cells in vitro, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 27(4), 579-586, 2001.
- Harris SR, Schoeffner DJ, Yoshiji H, et al. : Tumor growth enhancing effects of vascular endothelial growth factor are associated with increased nitric oxide synthase activity and inhibition of apoptosis in human breast carcinoma xenografts, *Cancer Letter*, 179(1),

95-101, 2002.

- Hasson S, Mundorf R, Barnes W, et al. : Effect of pulsed ultrasound versus placebo on muscle soreness perception and muscular performance, *Scandinavian Journal of Rehabilitation and Medicine*, 22(4), 199-205, 1990.
- Hockel M, Schlenger K, Doctrow S, et al. : Therapeutic angiogenesis, *Archives of Surgery*, 128, 423-429, 1993.
- Huang MH, Yang RC, Ding HJ, et al. : Ultrasound effect on level of stress proteins and arthritic histology in experimental arthritis, *Archives Physical Medicine and Rehabilitation*, 80, 1999.
- Kami K, Morikawa Y, Kawai Y, et al. : Leukemia inhibitory factor, glial cell line-derived neurotrophic factor, and their receptor expressions following muscle crush injury, *Muscle & Nerve*, 22, 1576-1589, 1999.
- Karnes JL, Burton HW : Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 83(1), 1-4, 2002.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogy G, et al. : Development of approaches to improve the healing following muscle contusion, *Cell Transplantation*, 7(6), 585-598, 1998.
- Molina RM, Garcia MSM, Mayoral MLG : Effect of muscular ultrasound stimulation on power spectrum electromyography during a strengthening training, *Electromyography and Clinical Neurophysiology*, 40(3), 163-168, 2000.
- Moore JH, Gieck JH, Saliba EN, et al. : The biophysical effects of ultrasound on median nerve distal latencies, *Electromyography and Clinical Neurophysiology*, 40(3), 169-190, 2000.
- Mukherjee D, Wong J, Griffine B, et al. : Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration, *Journal of the American College of Cardiology*, 35(6), 1678-1686, 2000.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. : Vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors, *The FASEB Journal*, 13(1), 9-22, 1999.
- Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B. : Comparison of ultrasound/ultraviolet-c and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury, *Physical Therapy*, 74(9), 812-823, 1994.
- Paik NJ, Cho SH, Han TR : Ultrasound therapy facilitates the recovery of acute pressure-induced conduction block of the median nerve in rabbits, *Muscle & Nerve*, 26(3), 356-361, 2002.
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K : Signaling via vascular endothelial growth factor receptors, *Experimental Cell Research*, 253(1), 117-130, 1999.
- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, et al. : Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury, *The American Journal of Sports Medicine*, 27(1), 54-59, 1999.

- Reed B, Ashikaga T : The effects of heating with ultrasound on knee joint displacement, *Journal of Orthopaedic Sports and Physical Therapy*, 26(3), 131-137, 1997.
- Reher P, Doan N, Bradnock B, et al. : Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF, *Cytokine*, 11(6), 416-423, 1999.
- Risau W : Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386(17), 671-674, 1997.
- Roebroek ME, Dekker J, Oostendorp RAB : The use of therapeutic ultrasound in physical therapy: practice patterns in Dutch primary health care, *Physical Therapy*, 78(5), 470-478, 1998.
- Sachs F : Mechanical transduction by membrane ion channel: mini review, *Molecular Cell Biochemistry*, 104, 57-60, 1991.
- Schizukuda Y, Tang S, Yokoda R, et al. : Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C[delta] activity, *Circulation Research*, 85(3), 247-256, 1999.
- Starkey C : *Therapeutic Modalities*, 2nd ed, Philadelphia, F.A. Davis Co., 1999.
- Tanzer M, Kantor S, Bobyn JD : Enhancement of bone growth into porous intramedullary implants using non-invasive low intensity ultrasound, *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 195-199, 2001.
- Uhlemann C : Pain modification in rheumatic diseases using different frequency applications of ultrasound, *Zeitschrift Fur Rheumatologie*, 52(4), 236-240, 1993.
- Warden SJ, McMeeken JM : Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 28(8), 1075-1080, 2002.
- Webster DF, Harvey W, Dyson M, et al. : The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vitro' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts, *Ultrasonics*, 18, 33-37, 1980.
- Windt DAWM, Heijden GJMG, Berg SGM, et al. : Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review, *Pain*, 81(3), 257-271, 1999.
- Young SR, Dyson M : The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 16(3), :261-269, 1990.