

저강도 초음파가 조골세포 활성화에 미치는 영향

홍성민¹, 한승무¹, 한은옥², 임사비나³, 김창주⁴

¹경희대학교 동서의학대학원 의료공학 전공, ²이화여자대학교 보건교육학과
³경희대학교 한의과대학 경혈학교실, ⁴경희대학교 의과대학 생리학교실
(2004년 2월 3일 접수, 2004년 6월 10일 채택)

The Effect of Low Intensity Ultrasound on Osteoblast Activation

Sung Min Hong¹, Seung Moo Han¹, Eun Ok Han², Sabina Lim³, Chang Ju Kim⁴

¹Dept. of Medical Engineering, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

²Dept. of Health Education, The Graduate School of Ewha Womans University

³Dept. of Meridian and Acupoint, college of Oriental Medicine, Kyunghee University

⁴Dept. of physiology, college of Medicine, Kyunghee University

(Received February 3, 2004. Accepted June 10, 2004)

요약 : 뼈의 형성과 재형성은 조골세포에 의한 골기질의 합성과 파골세포에 의한 재흡수에 의해 조절된다. 최근에는 골형성세포의 활성화를 통한 골조직의 재생 및 치유에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 골형성 세포의 활성화는 생물학적 자극뿐만 아니라 물리적 자극에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 물리적 자극 가운데서 연구가 거의 되지 않은 저강도 초음파가 골형성 세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 우선 다양한 특성의 초음파를 사용함으로써 세포활성에 미치는 최적의 초음파 조건을 결정하였다. 본 연구 결과 전체 duty cycle에서 초음파 강도가 0.3W/cm²일 경우가 세포활성에 가장 적합하며 duty cycle 50%인 경우 최고의 세포수 증가율을 나타내었다. 이와 같이 골조직의 재생에 적합한 초음파의 특성을 결정하여 골절 및 골다공증의 치료에 초음파를 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract : The bone formation and re-formation are regulated by two factors that are the synthesis of bone matrix by osteoblast and reabsorption by osteoclast. Recently, there are many studies about regeneration and healing of bone tissue by activation of osteoblast. In general, it is known that the activation of osteoblast is influenced by not only biological stimulus but physical stimulus. In this study, we verified that osteoblast activation was influenced by low intensity ultrasound. Various ultrasonic properties were used to find out the most appropriate condition on cell activation. From this study, we could confirm that 0.3W/cm² intensity of ultrasound was the most appropriate to cell activation over whole duty cycles and the increasing rate of cell was the highest at 50% duty cycle. Thus, it is expected that optimal ultrasonic characteristics on regeneration of bone matrix may be applied to fracture and osteoporosis healing.

Key word : Low intensity ultrasound, Osteoblast, Cell activation

서론

뼈의 형성과 재형성은 조골세포에 의한 골기질의 합성과 파골세포에 의한 재흡수에 의해 조절된다. 조골세포와 파골세포 활성의 불균형은 다양한 종류의 호르몬 변화, 염증반응을 일으키는 인자, 그리고 성장 인자의 변동에 의해 일어날 수 있는데 이러한 변동은 결국 골밀도 변화와 연골의 파괴와 같은 뼈의 이상을 야기할 수 있다고 알려져 있다[1].

과거에는 3.0W/cm² 이상으로 초음파 변환기(ultrasound transducer)를 움직이지 않은 상태로 3분 이상 적용하면 뼈에서 미네랄이 빠져나가고 성장판에 문제가 생

기면서 뼈의 성장이 지연된다고 보고되고 있다[2]. 그러나 한편으로는 초음파 치료를 하면 골세포 형성과정을 자극한다는 주장도 있다[3]. 이와 같이 과거에는 골부위에 초음파를 적용하는 것이 해롭다는 연구가 많았으나 최근의 연구에 의하면 골부위에 초음파를 적용할 경우에 골절치유 효과뿐만 아니라 손상된 건(tendon)의 치료에도 효과가 있을 것이라고 보고되고 있다[4]. 이러한 이유는 초음파 치료기구의 발달로 인해 초음파의 주파수나 강도, 그리고 전달양식을 다양하게 변화시킬 수 있기 때문이라 할 수 있다. 그러나 초음파 치료의 치유 효과에 대해서는 아직도 논란의 대상이 되고 있다.

일반적으로 초음파는 주파수와 강도에 따라 진단용, 세척용, 치료용으로 구분되며, 진단용 초음파는 3~5MHz의 주파수와 1~50 mW/cm²의 낮은 강도의 초음파를 사용하여 조직에 대한 열적 자극을 일으키지 않고, 세척용은 20~60kHz의 주파수와 8W/cm²이상의 높은 강도를 사용한다. 치료용 초음파는 1~3MHz의 주파수와 0.1~2.0W/cm²의 강도로서 열적 및 비열적 기전에 의해 세포와 조직에

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단과 경희대학교의 지원에 의하여 연구되었음.(KRF-2001-005-F00024)

통신 저자 : 한승무, (449-701) 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1

경희대학교 동서의학대학원 의료공학 전공

Tel. 031)201-2171, Fax. 031)204-6117

E-mail. smhan@khu.ac.kr

물리적 효과가 일어나게 한다[5].

치료용 초음파는 일반적으로 고에너지 고강도 초음파와 저장도 초음파로 나눌 수 있으며, 고강도 초음파는 조직에 의해 흡수되어 조직을 가열시키고 조직을 파괴하는 성질이 있고[6], 저장도 초음파는 비열, 기계적 효과로 파장 및 반사 파 형태로 영상을 나타내는 성질이 있다고 알려져 있다[7].

초음파는 조직 내의 세포를 물리적으로 자극할 수 있는 수단으로 초음파를 사용하여 뼈의 성장[8], 골절[9], 근육 조직의 치유 등[10][11] 손상된 조직의 치료에 효과적이며, 특히 골절의 치유에 있어서 골형성 세포의 증식을 촉진하여 뼈의 유합을 촉진한다고 보고되고 있다[8][12][13]. 또한, 골형성 세포는 생물학적 자극뿐만 아니라 5~20 μ A의 낮은 전류, 특수한 파장의 전자장 그리고 30~50mW/cm²의 저장도 초음파 에너지와 같은 물리적 자극에 의해서도 촉진될 수 있다[8].

초음파의 생물학적 효과에 대해서는 여러 문헌들을 통하여 보고되고 있으며, 이는 직접적인 열효과, 비열적인 원인, 세포막 이동 등과 관계가 있다고 보고하고 있다 [14][15][16]. 그러나 초음파가 생물학적인 효과가 있음에도 불구하고 초음파와 생체조직과 상호 작용하는 물리적 과정이 고주파 음향자극에 대한 조직의 복잡한 반응으로 잘 알려져 있지 않으며, 더욱이 초음파의 물리적 자극에 대한 연구는 상대적으로 매우 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 초음파 강도 및 치료 시간의 조절이 가능한 치료 시스템을 구성하고 각 파라미터의 조절을 통해 다양한 특성의 초음파를 사용함으로써 조골세포의 증식에 미치는 최적의 초음파의 특성을 평가하고 골형성 세포가 초음파의 물리적 자극에 의해서 촉진될 수 있음을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 초음파 치료 시스템

본 연구를 위하여 1MHz의 주파수를 가지며, 크게 전원부, 구동부, 제어부, 출력부로 구성된 초음파 치료 시스템을 제작하였다. 전원부는 SMPS (Switching Mode Power Supply)를 통하여 상용전원 (정격전압 220V, 60Hz)을 각각의 회로에 맞게 변환시켜 전달한다. 제어부에서는 초음파의 출력모드를 컨트롤하고 초음파 혼에 부착된 압전소자에 인가되는 전압을 조절하여 초음파 혼에서 발생하는 초음파 에너지를 조절하며, 구동부에서 생성된 1MHz의 전기신호는 출력부의 압전소자에 전달되어 소자를 진동시키고 초음파 혼을 통하여 음파의 형태로 변환된다.

Function generator는 1MHz의 정확한 주파수 펄스를 만들어 준다. 2Vp-p의 output pulse는 Counter에서 조절된 duty cycle을 disable 신호로 받아 Amplifier에서 5V로 증폭시킨다. Counter는 Timer와 함께 duty cycle을 조절하여 초음파의 강도를 컨트롤한다. 증폭된 신호는 Driver를 거쳐 Transformer에서 High Voltage로 증폭하여 압전소자의 진동을 유발시킨다. (Fig. 1)

또한 본 연구에서는 세포의 오염을 배제하기 위해서 Fig 2과 같이 micro application에 사용하기 적당한 exponential type의 horn을 제작하여 사용하였다. exponential type의

horn은 liner taper에 비해 magnification factor (magnitude = D/d)가 큰 장점을 가지고 있다.

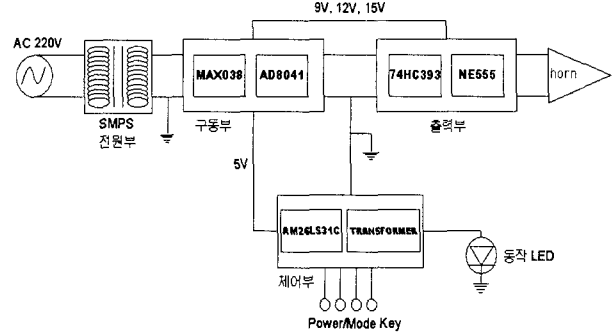
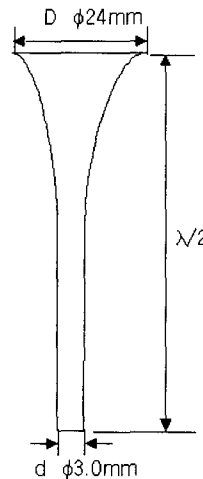


그림 1. 초음파 치료 시스템의 블록 다이어그램
Fig. 1. Block diagram of ultrasound healing system



Amplitude (μ m)	96
Horn magnification	8
Radiating area (cm ²)	0.07
Transmitted acoustic power (W)	9.5
Power density (W/cm ²)	135

그림 2. 사용된 초음파 horn의 특성
Fig. 2. Characteristic of ultrasonic horn

2. 초음파 특성 결정

최적의 초음파 특성을 결정하기 위하여 본 실험에서는 3가지 종류의 duty cycle을 사용하였다. Duty cycle은 한 주기에서 초음파의 on time과 off time의 비율로 결정이 되며 본 실험에서 사용된 초음파의 주기(pulse period)는 50msec로 고정한 후 Fig 3과 같이 30, 50, 그리고 70%의 duty cycle을 갖도록 조정하였다. 여기에서 duty cycle은 1 주기당 초음파의 on time의 비율을 뜻한다.

또한 각각의 duty cycle에 0.1, 0.3 그리고 0.5W/cm²의 세가지 강도를 적용하였다. 정확한 강도를 측정하기 위하여 Fig 4와 같이 hydrophone (HP-30, MKCKorea, Korea)을 사용한 측정 장치를 구성하였으며 사용된 hydrophone의 기본 사항은 Table 1과 같다.

사용된 hydrophone은 작은 탐촉소자가 가는 튜브 끝에 마운트되어 있으며 초음파 빔이 가해졌을 때 음압값에 비례하는 크기를 갖는 전기적 신호를 발생하며 이로부터 SPTA (Spatial Peak Temporal Average) 강도를 구할 수

있다. 본 측정장비에서는 직경 10mm 크기의 hydrophone 을 사용하였는데, 이와 같이 탐촉소자의 크기가 작은 이유는 음파의 변화를 배제하기 위함이다.

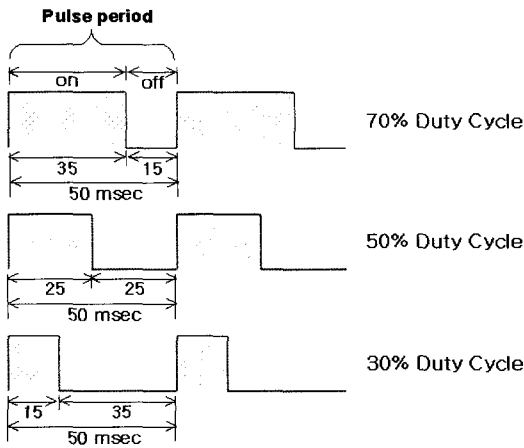


그림 3. 실제 적용된 duty cycle
Fig. 3. Actual duty cycles applied

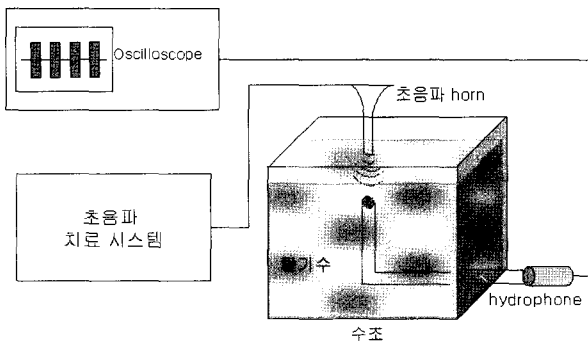


그림 4. 초음파 실출력 측정장치
Fig. 4. Measuring equipment of actual ultrasonic output

표 1. Hydrophone의 기본사항
Table 1. Basic specification of hydrophone

10kHz~5MHz	6.35mm
10mm	-20~50°C
Stainless Steel	XTR standard

3. 세포배양 및 초음파 조사

실험에 사용된 세포는 HOS cell (Human osteoblast cell, Caucasian, Female)이며 서울대학교 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 배양액은 DMEM media를 사용하였고, 각각의 media에 1% penicilin-streptomycin, 10% fatal bovin serum을 섞어서 사용하여 5% CO₂ incubator

(MCO-17AC, Sanyo, Japan)에서 일정기간 배양하였으며, 12 well plate에 1×10⁵cell/well로 seeding하여 37°C CO₂ incubator에서 16시간 incubation한 후, 제작된 초음파 치료 시스템을 사용하여 배양된 세포에 초음파를 조사하였다. 세포의 오염을 방지하기 위하여 3mm의 직경을 갖는 초음파 horn을 사용하였으며 70% 에탄올로 소독하였다. 초음파 horn은 37°C에서 세포배양 배지 3mL로 채워진 12 well plate 위에 고정하였다. 초음파 horn은 well에 수직으로 위치시키고 배지에 밀착시켰다. 초음파는 1MHz의 주파수로 0.1W/cm², 0.3W/cm², 그리고 0.5W/cm²의 강도로 조사하였으며 각 강도별로 duty cycle을 30, 50, 70%로 설정하여 각각의 세포에 0(control), 30, 60초씩 조사하였다.

초음파 조사 후 다시 3일간 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다. 살아있는 세포를 확인하기 위하여 Trypan Blue 염색방법을 사용하였으며, hemocytometer를 사용하여 cell counting을 실시하였다.

결 과

초음파가 조골세포 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 초음파의 강도와 duty cycle을 달리하여 총 9가지 조건에서 측정하였으며, 각각의 조건을 5회씩 반복하여 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 통계분석을 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1) 30초 조사 시 효과

초음파 조사 후 바로 현광현미경을 이용하여 200배 확대하여 세포의 형태를 관찰하였다. Duty cycle 30%와 50%의 경우는 특이한 변화를 관찰할 수 없었으나, duty cycle 70%인 경우는 모든 강도에서 세포 모양이 변화하며 파괴된 모습이 다소 나타났으며 0.5W/cm²의 초음파 강도에서 가장 큰 변화가 나타났다. (Fig. 5)

3일간 배양 후 다시 현광현미경을 이용하여 세포의 형태 및 증식정도를 관찰하였으며 세포수의 변화를 확인하였다. 대부분의 경우 대조군(control)에 비해 세포증식이 증가하였음을 확인할 수 있었으나 duty cycle이 70%인 경우는 모든 강도에서 크게 증가하지 않았다. 또한 duty cycle 70%, 강도 0.5W/cm²인 경우는 대조군에 비해 세포수가 감소하였음을 육안으로도 확인이 가능하였다. (Fig. 6)

세포수의 증감을 확인한 결과 duty cycle 50%, 강도 0.3W/cm²의 강도로 초음파 처리한 실험군에서의 증가율이 대조군에 비해 약 1.64배 증가하여 가장 높은 증가율을 보였으며, duty cycle이 30%와 50%에서는 전반적으로 대조군에 비해 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 duty cycle 70%일 경우에 다소 증가한 후 강도 0.1W/cm² 이후 서서히 감소하다 0.5W/cm²에서는 급격히 감소함을 보였다. (Fig. 7)

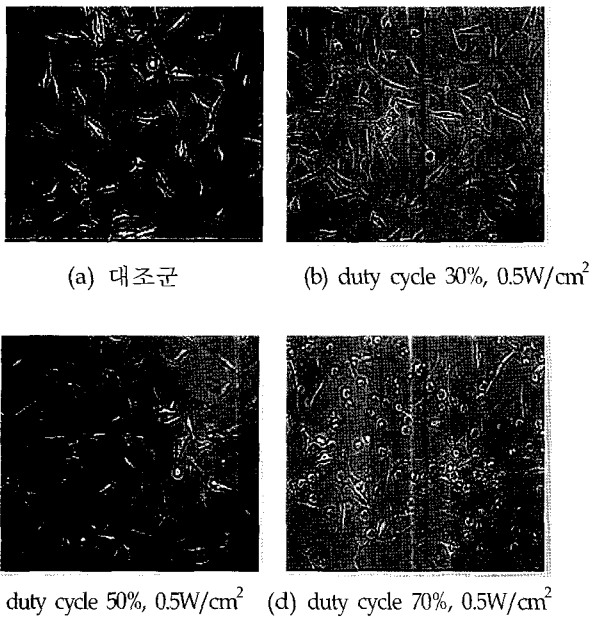


그림 5. 초음파 조사 직후 세포변화 (30초간 조사)
 Fig. 5. Cell transformation right after ultrasound irradiation (irradiation for 30 seconds)

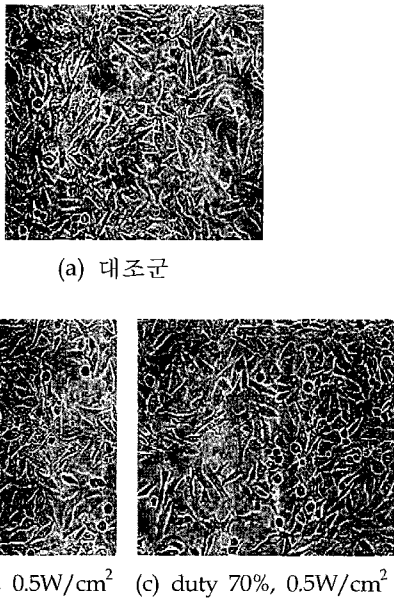


그림 6. 3일간 배양 후 세포변화 (30초간 조사)
 Fig. 6. Cell transformation after 3 days cultivation (irradiation for 30 seconds)

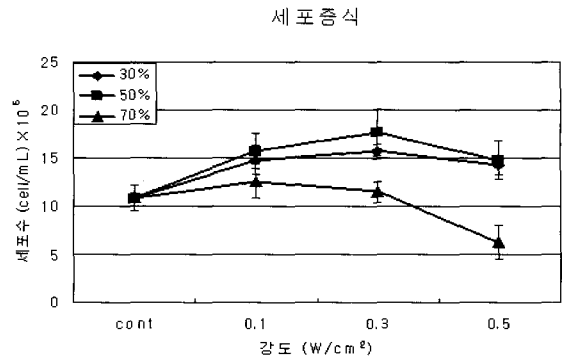


그림 7. 30초 조사 시 세포증식
 Fig. 7. Cell activation at irradiation for 30 seconds

2) 60초 조사 시 효과

60초간 초음파를 조사한 후, 3일간 배양한 군에서는 강도에 따라 대조군에 비하여 다소 증가한 경우도 있었으나 점차 감소하는 추세를 보였다. 30초 조사했을 때와 마찬가지로 duty cycle 70%에서는 대조군에 비해 세포의 증식이 미흡한 것을 확인할 수 있었다. 0.3W/cm²의 강도에서는 대조군보다 다소 증식되었으나, 나머지 모든 경우에서 대조군과 비교하여 유사한 수준이거나 대조군에 못 미치는 수준으로 증식된 것이 관찰되었다. (Fig. 8)

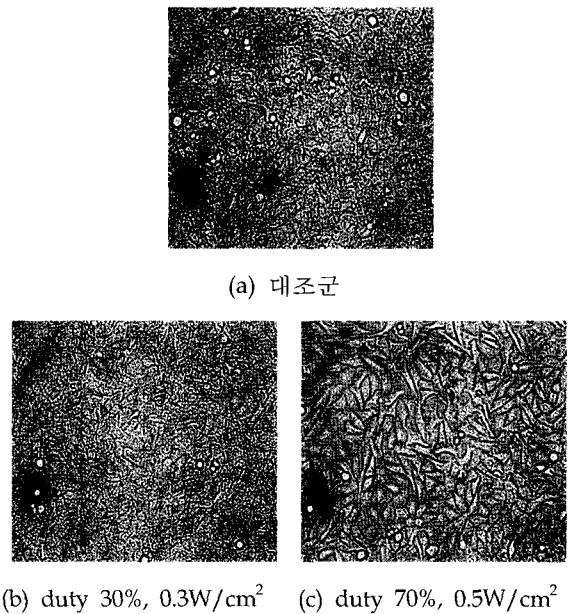


그림 8. 3일간 배양 후 세포변화 (60초간 조사)
 Fig. 8. Cell transformation after 3 days cultivation (irradiation for 60 seconds)

세포수의 증감을 확인해 보았을 때 duty cycle 30%, 0.3W/cm²의 강도에서 대조군에 비해 1.26배 증가하여 가장 많이 증식함을 보였으나 이는 오차범위 내로 유의성이 없다(p>0.05)고 판단된다. 전반적으로 duty cycle이 30%인 경우 대조군에 비해 약간의 증감이 있었음을 확인할 수 있

었다. Duty cycle이 50%와 70%의 경우는 강도가 높아짐에 따라 세포 수가 감소하는 경향을 보였으며 강도가 $0.5W/cm^2$ 인 경우는 모든 duty cycle에서 대조군에 비해 감소하였다. 초음파를 60초간 조사한 실험군에서는 duty cycle이 커짐에 따라 그리고 강도가 높아짐에 따라 세포 수는 감소하였고, 세포 수가 증가한 실험군 역시 대조군에 비해 크게 증가했다고 판단할 수 있는 실험군은 나타나지 않았다. (Fig. 9)

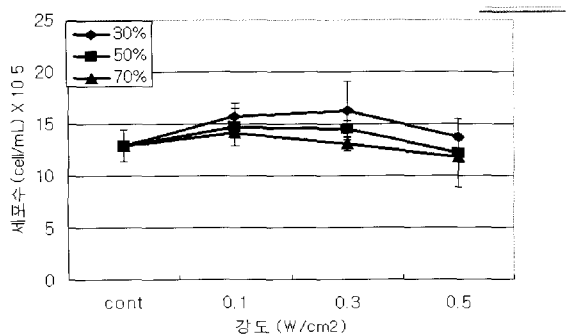


그림 9. 60초 조사 시 세포증식

Fig. 9. Cell activation at irradiation for 60 seconds

고찰 및 결론

본 연구에서는 저강도 초음파가 세포의 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 각 duty cycle별로 세 가지 강도를 부여하여 다양한 특성의 초음파를 사용하였다. 또한 초음파 조사시간을 30초와 60초의 두 가지 방법을 사용함으로써 초음파 강도, 모드 및 조사시간이 세포활성에 영향을 미치는 특성을 분석하였다.

치료용 초음파에서 저강도의 기계적 효과는 인접한 세포의 세포막 투과성을 변화시켜서 세포안으로 Ca^{2+} 이온을 유입시킴으로써, 세포 내의 Ca^{2+} 농도를 증가시키고 이러한 세포 내의 변화는 세포의 움직임이나 성장요소 합성을 증가시켜 상처치유에 이로운 영향을 준다고 보고된 바 있다 [17]. 이러한 것은 섬유모세포 배양에서 이들 세포가 융합되기 전에 초음파 치료를 하면 세포 증식을 자극할 수 있음을 의미하며, 이러한 결과는 초음파 치료가 인간 피부 모세포 배양에서 세포를 증식한다는 De Deyne와 Kirsch-Volder[18]의 주장과 일치한다.

본 연구에서는 형광현미경으로 세포의 형태를 확인한 결과 초음파를 30초 조사한 군과 60초 조사 후 3일간 배양한 군에서 모두 duty cycle 70%인 경우는 강도와 상관없이 초음파를 조사한 직후 세포의 모양이 변하며 세포의 위축이 감소하며 파괴되는 모습을 관찰하였다. 또한 강도가 높아질수록 보다 많은 수의 세포의 모양이 변함을 알 수 있었다. 이는 고강도의 초음파가 세포를 손상시켜 나타난 결과라고 볼 수 있겠다. 그러나 30초간 초음파 조사 후 3일간 배양한 결과에서 전반적으로 대조군에 비해 세포수가 증가함을 확인할 수 있었으며 duty cycle이 50%인 경우 최고 증가율을 보였고, 30%인 경우도 증가함을 알 수 있었다. 그러나 duty cycle이 70%인 경우는 증가율이 낮을 뿐만 아니라 강도가 $0.3W/cm^2$ 에서부터 감소하기 시작하여

$0.5W/cm^2$ 에서는 급격히 감소함을 확인하였다. 이는 초음파의 강도뿐만 아니라 duty cycle도 세포활성에 영향을 미치는 것을 나타내며 같은 강도의 초음파라 하더라도 duty cycle을 70% 이상으로 사용하는 것은 바람직하지 않음을 나타낸다. 또한 전체 duty cycle에서 강도가 $0.5W/cm^2$ 일 경우는 가장 낮은 증가율을 보여주고 있다. Yang 등[19]에 의하면 $0.5W/cm^2$, 1MHz 초음파 조사에서 가골 형성이 증가되는 것을 보고하였는데, 본 실험 결과로 미루어볼 때 $0.5W/cm^2$ 이상의 고강도 초음파는 세포를 손상시키는 것으로 판단되며 세포 증식을 촉진하는 용량을 초과한다고 사료되고 $0.5W/cm^2$ 이하의 강도를 사용하는 것이 가장 적절할 것으로 생각된다.

60초를 조사한 실험군에서는 대조군과 비슷한 수준의 세포증식이거나 혹은 대조군보다 세포증식이 떨어지는 것을 확인할 수 있었는데 저강도의 초음파라 하더라도 치료시간이 길어지면 세포에 영향을 줄 수 있을 것이라 판단된다.

일반적으로 세포는 유사분열 과정을 통하여 세포생장과 증식을 하며, 세포주기는 일반적으로 G₁기, S기, G₂기, M기(유사분열기)의 네 부분으로 나뉜다. 또한 세포주기가 일시적 또는 영구적으로 중단된 상태인 G₀기가 존재하는데, 초음파 조사 후 이들 세포의 세포증식율이 증가된 것은 세포분열주기상 G₀기의 세포들이 G₁기로 진입하였거나 혹은 세포분열주기가 감소되었기 때문으로 사료된다 [20][21][22]. 대부분의 세포에 있어 세포분열주기의 기간은 G₀기에 의해서 결정되며[23][24], 특히 G₀기의 유지 여부는 해당세포와 외적환경과의 관계에서 결정된다는 점에서 [25][26] 초음파의 물리적 자극이 세포분열주기에 영향을 미칠 것으로 판단된다. 또한 초음파 조사에 의하여 세포의 수가 증가된 것은 적어도 부분적으로는 세포분열주기를 이탈하여 활동이 중지된 세포들이 초음파의 자극으로 세포분열주기에 재진입한 결과로 세포증식이 촉진된 것으로 사료된다[27][28].

본 연구를 통하여 초음파의 물리적인 자극이 세포활성에 영향을 줄 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 다만 같은 강도를 갖는 초음파라 하더라도 어떤 duty cycle을 부여하느냐에 따라 세포활성에 부정적인 영향을 미칠 수도 있다는 점은 주지해야 할 것이다. 또한 $0.5W/cm^2$ 이상의 강도를 갖는 초음파의 사용은 어떠한 duty cycle의 경우에도 피하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 또한 본 연구는 조골세포의 활성화에 대한 실험으로 생체 내 실험 및 임상 적용하기 위해서는 골조직의 종류 및 두께에 따른 적절한 강도와 duty cycle에 대한 실험이 필요하며 본 연구를 바탕으로 각각의 조건에 따라 초음파 특성을 적절히 변화시킨다면 골절이나 골다공증 치료에 있어 골조직 재생에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Young-Yun Kong, William J. Boyle and Josef M. Penninger, "Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology", Immunology Today, 21:497, 2000
2. Baldes EJ, Herrick JF, Stroebel CF, "Biologic effects of ultrasound", Am J Phys Med, 37:111, 1958

3. Nyborg WL, Ziskin MC, "Biological Effects of Ultrasound", New York, Churchill Livingstone, 1985
4. Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendos S, "The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons", *Ultrasound Med Biol*, 16:801-807, 1990
5. Heckman JD et al., "Acceleration of tibia fracture-healing by non-invasive low intensity pulsed ultrasound", *J Bone Joint Surg*, 76:26-34, 1994
6. Burdette EC, Svenson GK, Lu X-Q et al., "Ultrasound hyperthermia system for breast cancer treatment", *Ultrasound Symposium*, 1873-1877, IEEE, 1994
7. Suslick KS ed, "Ultrasound, It's Chemical, Physical, and Biological Effect", New York, VCH Publishers, 1988
8. Duarte LR., "The stimulation of bone growth by ultrasound", *Arch Orthop Trauma Surg*, 101:153-159, 1983
9. Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP and Rubin C, "Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound", *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 355S:216-229, 1998
10. Enwemeka CS, Rodriguez O and Mendosa S, "The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons", *Ultrasound Med Biol*, 16:801-807, 1990
11. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T and Kalimo H, "Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury", *American J of Sports Medicine*, 27:54-59, 1999
12. Wiltink A, Nijweide PJ, Oosterbaan WA, Hekkenberg RT and Helders PJM, "Effect of therapeutic ultrasound on endochondral ossification", *Ultrasound Med Biol*, 21:121-127, 1995
13. Busse JW et al., "The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: A meta-analysis", *CMAJ*, 166:437-441, 2002
14. Dyson M, Brookes M, "Stimulation of bone repair by ultrasound", *Ultrasound Med Biol* 2(Suppl), 61-66, 1993
15. Cook SD et al., "Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke", *Clin Orthop*, 337:198-207, 1997
16. Kristiansen TK et al., "Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low intensity ultrasound", *J Bone Joint Surg*, 79A:961-973, 1997
17. Dinno M, Dyson M, Young S et al., "The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound", *Phys Med Biol*, 34:1543-1552, 1989
18. De Deyne, P.G., M. Kirsh-Volders, "In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts", *Phy. Ther*, 75:629-634, 1995
19. Yang KH, Choi CH, Cho JH, "Stimulation of fracture healing by low intensity pulsing ultrasound", *The Journal of the Korean Society of Fracture*, 11:247-253, 1998
20. Pardee AB, "A restriction point for control of normal animal cell proliferation", *Nat. Acad. Sci.*, 71:1286, 1974
21. Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, et al(ed).: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11th ed., p432, McGraw-Hill Book Co., New York, 1987
22. Stein GS, Lian JB, Owen TA, "Relationship of cell growth to the regulation of tissue specific gene expression during osteoblast differentiation", *FASEB J*, 4:3111-3123, 1990
23. Tolmach LJ, Lajtha LG, Smith CL, et al., "Differential sensitivity of the cell life cycle", *J Cell Comp Physical*, 62(suppl):141-156, 1963
24. Burns FJ, Tannock IF: On the existence of a G₀ phase in the cell cycle, *Cell Tissue Kinet*, 3:321, 1970
25. Baserga RL: Cell division and the cell cycle in Finch, CE, and Hayflick, L (eds): *Handbook of the Biology of Aging*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1977
26. Mendelsohn ML, *The growth fraction-A new concept applied to tumors*, *Science*, 132:1496, 1960
27. Ross R, "The fibroblast and wound repair", *Biol Rev*, 43:51-96, 1968
28. Bentley JP, Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing, *Ann Surg*, 165:186-191, 1966