

10ème Congrès Français d'Acoustique

Lyon, 12-16 Avril 2010

Stimulation par ultrasons de la reconstruction osseuse crânienne

Jean-Christophe Béra¹, Bernard Lavandier¹, Jean-Luc Béziat², Arnaud Gleizal^{1,2}

¹UMR 556, INSERM – Université Lyon 1, F-69003 Lyon, bernard.lavandier@inserm.fr

²Hospices Civils de Lyon, Service de Chirurgie Maxillofaciale de l'Hôpital de la Croix-Rousse, F-69004 Lyon

Depuis près de quarante ans, des chercheurs proposent les ultrasons de faible puissance en physiothérapie pour stimuler la réparation tissulaire. Cette technique ne fournit pas de résultats spectaculaires et les mécanismes susceptibles d'intervenir ne sont pas parfaitement compris. Cependant, différents travaux réalisés sur des os longs montrent une accélération significative de la réparation dans différents cas de fracture. Par ailleurs, la reconstruction osseuse représente un enjeu important en chirurgie maxillofaciale, c'est pourquoi nous nous interrogeons sur une possible stimulation par ultrasons. Pour répondre à cette question, des essais de stimulation ultrasonore ont été effectués sur des cultures d'ostéoblastes (cellules à l'origine de la matrice osseuse) de crânes de souris. Sous l'effet d'ultrasons pulsés de 1 MHz et de fréquence de répétition 100 Hz, on observe une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de croissance. Les ultrasons pulsés seraient donc susceptibles de stimuler les ostéoblastes, et par là-même d'activer la reconstruction osseuse. Pour le confirmer, des expériences ont été menées sur des souris. Un petit trou a été réalisé sur l'os pariétal du crâne de chaque animal. Les animaux ont été insonifiés 5 minutes par jour pendant 10 jours, puis ont été suivis pendant 2 mois. Des mesures au microscanner ont permis de mesurer la reconstruction osseuse. Aucun effet n'est observé pour une intensité acoustique de 100 mW/cm². Pour une intensité plus élevée (300 mW/cm²), la stimulation ultrasonore entraîne en moyenne un comblement supplémentaire de la surface du trou à 2 mois d'environ 15 %. Tandis que les conditions expérimentales mises en œuvre peuvent faire varier le comblement naturel moyen entre 0 et 15 % en fonction de la configuration du défaut osseux réalisé, la part de reconstruction liée aux ultrasons varie peu.

1 Introduction

Les effets des ultrasons sur les milieux vivants ont été observés pour la première fois par Langevin vers 1917. C'est au cours de la décennie suivante que débutent les premiers travaux de recherche sur les effets des ultrasons sur les milieux biologiques. En 1968 Dyson et al. [1], puis en 1970 Dyson et Pond [2] présentent des travaux sur la stimulation par ultrasons de la réparation des tissus mous. La réparation des tissus mous et des tissus osseux montre des similitudes, chacun de ces processus se caractérisant par des phases inflammatoire, proliférative et de remodelage. Cette similitude et le fait que les cellules intervenant initialement sont les mêmes ont tout naturellement orienté les recherches sur l'utilisation des ultrasons dans la réparation des tissus osseux. Très peu d'articles ont été publiés sur le sujet.

Il a été montré dans des études expérimentales sur les fractures de péroné chez le rat que la stimulation ultrasonore pendant les phases inflammatoire et proliférative précoce accélère et augmente la cicatrisation. Ainsi une ossification directe avec production de peu de cartilage est ainsi mise en évidence. Le traitement en phase proliférative tardive a par contre montré des effets négatifs : stimulation de la croissance cartilagineuse, retard dans la consolidation osseuse [3]. L'étude citée a montré que l'utilisation d'ultrasons à 1,5 MHz (0,5 W/cm² SATP, 2 ms on - 8 ms off, pendant 5 minutes) était plus efficace que celle d'ultrasons à 3 MHz. Les effets thermiques augmentant avec la fréquence, ceci suggère des effets non thermiques, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient

pas encore précisément expliqués. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs auteurs. Ainsi, Pilla et al. [4] ont montré la formation d'un pont osseux à 17 jours après une ostéotomie sur un péroné de lapin traité par ultrasons (1,5 MHz, 0,3 W/cm² SATP, 200 μs on - 800 μs off, 20 minutes par jours), en comparaison de quoi il a fallu 28 jours pour les animaux témoins. Heckman et al. [5] ont montré une accélération de la consolidation osseuse similaire au cours d'une étude clinique chez l'homme. Ils ont traité des fractures ouvertes du tibia et ont montré une réduction significative du temps de consolidation avec une moyenne de 96 jours chez les sujets traités par ultrasons (1,5 MHz, 0,3 W/cm² SATP, 200 μs on - 800 μs off, 20 minutes par jours, traitement commençant dans les 7 jours suivant la fracture), tandis que le groupe de sujets non traités présentait une durée moyenne de 154 jours.

Par ailleurs, il s'avère que la plupart des études in vitro sur la stimulation osseuse par ultrasons utilisent des ostéoblastes crâniens alors qu'aucune étude in vivo sur ce site n'a été réalisée. Reher et al. [6] ont montré que l'expression de plusieurs protéines a été augmentée par les LIPUS, tels que le VEGF, IL-8, FGF-β, IL-1 β mais n'a pas affecté IL-6 et TNF-α. Harle et al. [7] ont montré que l'expression des gènes de l'ALP et l'OP a également été augmentée par ultrasons.

Le but de cette étude est d'étudier la ré-ossification de pertes de substances crâniennes après stimulation par ultrasons. Ces défauts crâniens ont été créés sur un modèle murin et la ré-ossification a été mesurée à 30 et 60 jours post-opératoire. Deux différentes intensités d'ultrasons ont été utilisées pour évaluer l'influence de ce paramètre.

2 Matériel et méthodes

2.1 Animaux

La présente étude a été effectuée chez des souris CD1 femelles âgées de 4 semaines. Toutes les expériences utilisant des animaux ont été réalisées conformément aux lignes directrices du Comité de Protection des animaux de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et le protocole expérimental a été soumis et approuvé par le Comité d'Ethique. Les animaux sont logés dans des compartiments avec température contrôlée et nourris *ad libitum* (alternance 12h jour/12h nuit).

L'étude au microscanner implique 18 animaux, répartis au hasard en 3 groupes de 6 animaux (un groupe témoin et deux groupes traités à deux intensités acoustiques différentes). L'étude histologique implique 6 animaux répartis de la même façon en 3 groupes de 2 animaux.

Tous les animaux ont été opérés afin de créer un défaut osseux au niveau de l'os pariétal droit. Le groupe témoins est représenté par les souris non soumises aux ultrasons. Le groupe US100 représente les souris soumises à une insonification de $100 \text{ mW/cm}^2_{\text{SATA}}$ et le groupe US300 représente le groupe soumis à une insonification de $300 \text{ mW/cm}^2_{\text{SATA}}$.

2.2 Procédure chirurgicale

Toutes les souris ont subi une intervention chirurgicale sous anesthésie. Après, une incision médiane de la peau crânienne est faite dans une direction sagittale, la zone pariétale est exposée, et le péricrâne décollé, permettant ainsi l'exposition de l'os. Un cercle de 3 mm de diamètre est dessiné au centre de l'os pariétal droit. Puis, un trou est fait à l'aide d'une fraise. La valeur moyenne de la surface des trous réalisés était de $3,6 \text{ mm}^2$. La fermeture cutanée est réalisée en points de suture séparés.

2.3 Ultrasons

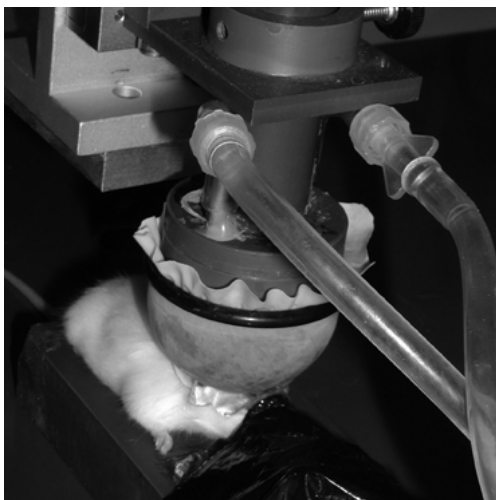


Figure 1 : dispositif d'insonification des animaux.

Les ultrasons sont générés en utilisant un générateur de signaux (Hewlett-Packard 8116A) et un amplificateur de puissance (Kalmus 150C). Un wattmètre réflectomètre (Rhode & Schwartz NAP) est utilisé pour contrôler la puissance émise. La sonde d'insonification est construite autour d'un transducteur plan de type PZT de fréquence 1MHz et de diamètre 20 mm. Une membrane en latex est

montée sur la sonde et remplie d'eau dégazée pour assurer le couplage acoustique et le refroidissement du transducteur afin de minimiser son élévation de température au cours de l'insonification (cf. figure 1).

Les paramètres des ultrasons utilisés sont les suivants : 1 MHz, durée des impulsions de 2 ms, fréquence de répétition de 100 Hz. Ce sont ceux utilisés lors d'une précédente étude *in vitro* [8]. Ce matériel permet des intensités acoustiques de 100 et $300 \text{ mW/cm}^2_{\text{SATA}}$ mesurées dans l'eau par la méthode de la microbalance. Le capteur est monté sur un support rigide permettant de faciliter la mise en place du capteur sur le crâne de l'animal anesthésié. La Figure 1 montre l'installation expérimentale. Le traitement par ultrasons est de 5 minutes par jour, 5 jours consécutifs par semaine pendant les deux semaines qui ont suivi la création du défaut osseux.

2.3 Imagerie des animaux.

L'imagerie animale est réalisée en collaboration avec la plate-forme d'imagerie Animage™ avec un microscanner SkyScan™ 1076. Celui-ci est utilisé en mode isométrique $35 \mu\text{m}$. Les données brutes de l'image du crâne sont ensuite reconstruites en 3 dimensions XYZ isométriques. A partir de celles-ci il est possible d'obtenir une reconstruction 3D de l'image du crâne de la souris comme le montre la figure 2. L'imagerie sous anesthésie des animaux a été réalisée à 3 jours, 30 jours et 60 jours après la chirurgie.

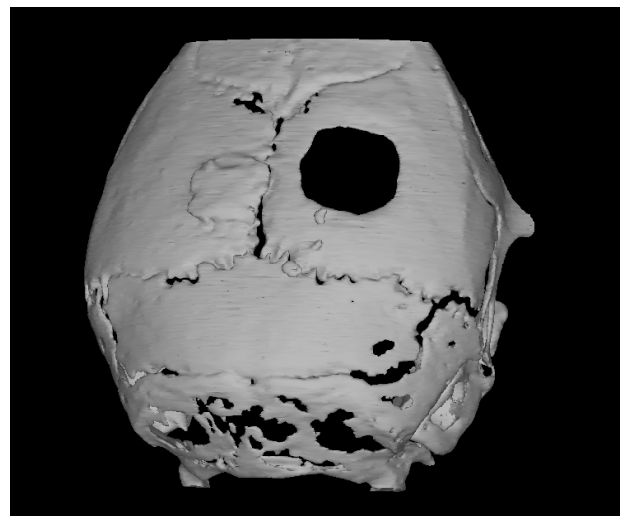


Figure 2 : exemple d'image de crâne de souris.

2.4 Analyse de la surface d'os reconstruite

Une première évaluation de l'os néo-formé est réalisée en comparant les surfaces projetées des défauts osseux à 3, 30 et 60 jours. A l'aide du logiciel CTan™ associé au scanner et partir des données stockées on retient un cube de dimension de $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}$ incluant le trou. Les données sont seuillées afin d'éliminer les tissus mous définis par une minéralisation inférieure à $0,3 \text{ g/cm}^3$. Des modèles binaires de l'image tridimensionnelle de la zone sont créées pour chaque étape de l'étude. Les images 3D de ces modèles à J3, J30 et J60 sont générées à l'aide du logiciel Ant™ du scanner et superposées afin d'obtenir des images 2D de la projection des trous. La figure 3 montre un exemple de superposition deux à deux de ces images. A l'aide du même logiciel, il est alors possible d'obtenir 3 images distinctes de la projection du trou et d'en calculer la surface. Les

rapports de reconstruction en surface à 30 jours et à 60 jours sont calculés comme suit:

$$RS30 = (\text{surface à J3} - \text{surface à J30}) / (\text{surface à J3})$$

$$RS60 = (\text{surface à J3} - \text{surface à J60}) / (\text{surface à J3})$$

Cette analyse de surface est comparable aux examens radiologiques utilisés par d'autres auteurs.

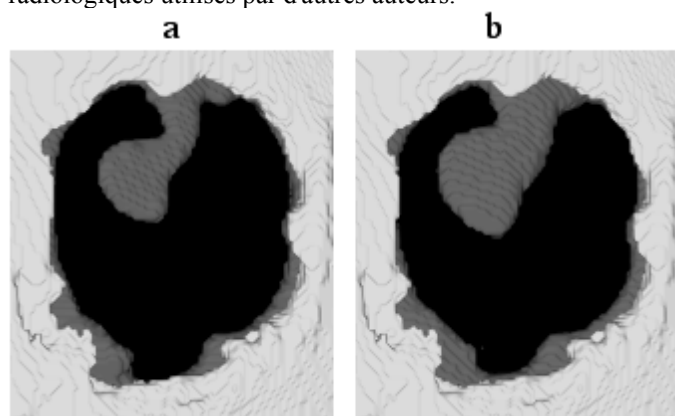


Figure 3 : exemple de projections de surfaces de trous superposées : a) à 3 et 30 jours, b) à 3 et 60 jours.

2.5 Analyse du volume d'os reconstruit

Une deuxième évaluation du taux de régénération osseuse est effectuée en comparant la ré-ossification sur des volumes osseux. Cette analyse vise à fournir des informations précises sur l'importance de la reconstruction du tissu osseux. Cette analyse décrite par ailleurs [9] est effectuée en utilisant le logiciel CTanTM associé au scanner. A partir des données stockées des reconstructions crâniennes à J30 et J60, nous avons calculé le volume d'os reconstruit (BV) autour du trou, volume caractérisé par une minéralisation comprise entre 0,3 et 0,68 g/cm³ utilisant le logiciel d'analyse d'images SkyScan CTANTM afin d'exclure le trou et l'os natif. Le volume extrapolé du trou initial (TV) est défini par le volume osseux d'une minéralisation inférieure à 0,68 g/cm³ entourant le trou afin de ne retenir que le trou et l'os reconstruit. Le rapport BV/TV est alors calculé et retenu comme paramètre de la reconstruction osseuse en volume à 30 et 60 jours après la création du défaut.

2.6 Analyse statistique

L'analyse statistique a portée sur les résultats de surface reconstruit (RS) et de volume reconstruit (BV/TV) provenant des mesures au microscanner. L'homogénéité des déviations standards entre groupes a été vérifiée par le test de Fisher. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer entre eux les groupes témoin et traités. Le test de Wilcoxon apparié a été utilisé pour comparer les défauts osseux d'un même groupe aux différents moments (3, 30 et 60 jours après traitement).

2.7 Etude histologique

Les animaux sont euthanasiés à 8 ou 15 jours après la chirurgie. Le crâne est ensuite disséqué à l'aide d'une paire de ciseaux. Les spécimens sont plongés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant la nuit et ensuite rincés à l'aide d'une solution tampon de 0,1 M de PBS le jour suivant. Ensuite, les échantillons sont fixés à l'aide d'une solution à 1% de tétroxyde d'osmium pendant 2 heures et déshydratés par une série de lavage à l'éthanol à

pourcentage croissant puis lavés avec de l'oxyde de propylène. La décalcification des échantillons est réalisée avec une solution de paraformaldéhyde à 4% et les échantillons ont été intégrés dans la selloidine. Les prélèvements histologiques (coupe d'épaisseur 50 µm) sont colorés à l'aide d'hématoxyline, de safran et d'éosine et de SNR-BCIP (marqueur ostéoblastique), puis examinés au microscope photonique (X100).

3 Résultats

3.1 Reconstruction osseuse en surface.

La figure 4 présente les résultats moyens de reconstruction en surface pour les groupes insonifiés (US100 et US300) et le groupe témoin, à 30 jours et à 60 jours. En moyenne, on observe une reconstruction de l'ordre de 10% pour le groupe témoin et pour le groupe US100, et une reconstruction de l'ordre de 30% pour le groupe US300. La dispersion entre les animaux d'un même groupe est partout importante et il n'y a pas de différence de dispersion significative entre les groupes (Fisher test, p>0,05).

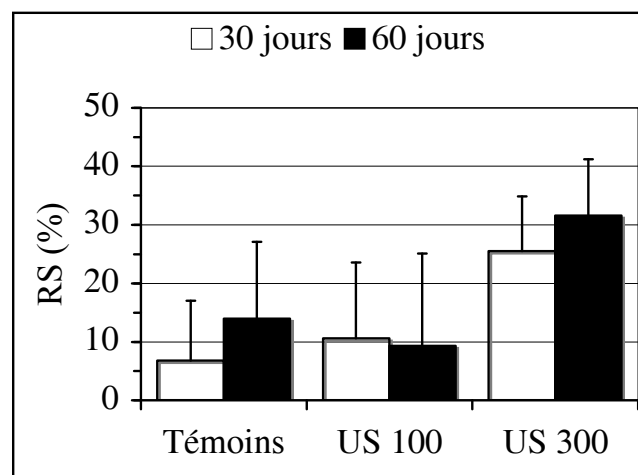


Figure 4 : reconstruction en surface (RS) : moyennes et écarts-types, pour chacun des 3 traitements, à 30 et 60 jours après traitement.

Aucune différence significative n'est détectée entre le groupe témoin et le groupe US100. Une augmentation significative de la reconstruction osseuse est observée dans le cas d'une insonification à 300 W/cm² (p=0,01 à 30 jours, et p=0,025 à 60 jours).

La comparaison des reconstructions entre 30 et à 60 jours après traitement montre une augmentation significative de la surface reconstruite dans cette période (p=0,01). Entre J30 et J60, on mesure une reconstruction moyenne de 4% sur l'ensemble des animaux tous groupes confondus.

3.2 Reconstruction osseuse en volume

La figure 5 présente les résultats moyens de reconstruction en volume pour les groupes insonifiés (US100 et US300) et le groupe témoin, à 30 jours et à 60 jours. La reconstruction moyenne est voisine de 11% pour le groupe témoin et le groupe US100, et voisine de 18% pour le groupe US300. Quel que soit le groupe, on

remarque que la dispersion des résultats entre les individus d'un même groupe est faible.

Comme pour l'analyse en surface, on n'observe aucune différence significative entre le groupe témoin et le groupe US100, tandis que le groupe US300 se différencie clairement de chacun des deux autres ($p=0,02$). Par contre, contrairement à l'analyse en surface, on n'enregistre aucune augmentation significative de la reconstruction entre J30 et J60.

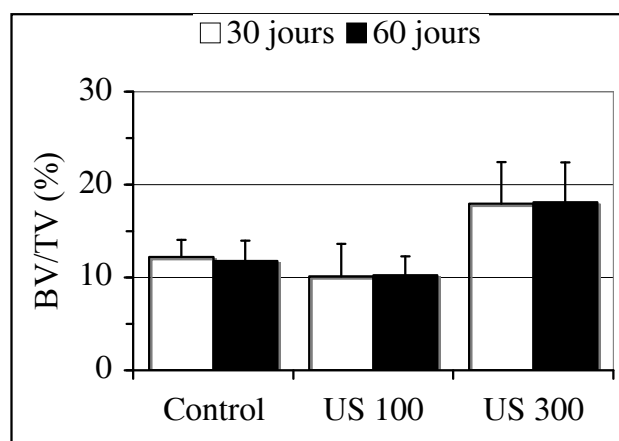


Figure 5 : reconstruction en volume (BV/TV) : moyennes et écarts-types, pour chacun des 3 traitements, à 30 et 60 jours après traitement.

3.3 Histologie

Les images histologiques des prélèvements effectués à 8 jours après traitement chirurgical ne laissent pas apparaître de différence entre les groupes traités ou non par ultrasons. Dans tous les cas, on observe la présence de marqueurs des ostéoblastes dans la partie corticale de l'os.

Au contraire, les prélèvements effectués à J15 semblent révéler une différence entre le groupe US300 et les deux autres groupes pour lesquels les marqueurs ostéoblastiques apparaissent de façon très éparse. Pour le groupe US300, on observe en effet des zones très fortement marquées (cf. figure 6).

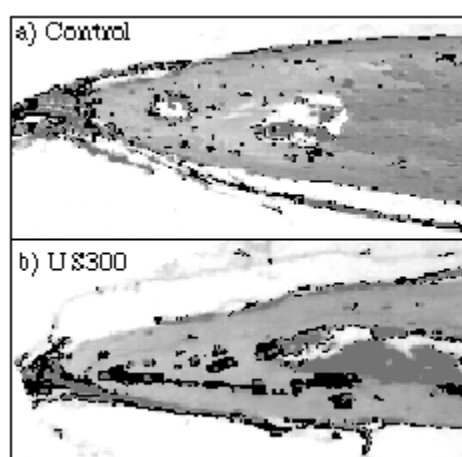


Figure 6 : exemples de coupe histologique à 15 jours après la chirurgie, pour une souris du groupe contrôle et une souris US300.

Le défaut osseux se situe à gauche sur les photos. La couleur safran, colorant les os, est transposée dans une couleur grise, et la couleur bleue, marquage ostéoblastique, est transposée en noir.

4 Discussion et conclusion

Une augmentation importante du taux de reconstruction, voisine du doublement, a été observée pour le groupe US300 : la valeur moyenne de reconstruction à 60 jours était d'environ 30% lorsqu'elle était rapportée à la surface et de 20% lorsqu'elle était rapportée au volume. La surface réossifiée est donc un peu plus importante que sur le volume réossifié. Cela laisse penser que le processus de régénération osseuse consiste d'abord à "boucher le trou". Il a également été observé une moyenne de remplissage du défaut osseux rapportée à la surface de 6% entre 30 et 60 jours, alors que le volume correspondant de remplissage est apparu comme négligeable. Malgré une faible persistance de reconstruction de surface au bout d'un mois, ces données ont révélé que l'effet des ultrasons peut être détecté et peut être correctement estimé à partir de 30 jours.

Les ultrasons induisent donc ici un effet évident, qui est en accord avec d'autres études sur la stimulation des fractures osseuses utilisant des ultrasons avec des paramètres très proches de ceux utilisés dans notre étude [3, 10]. Concernant plus précisément la réparation des défauts osseux, trois études expérimentales peuvent être directement comparées au présent travail, bien qu'elles traitent des os longs.

Deux autres études n'ont pas trouvé d'effets après stimulation par ultrasons. Ainsi, Spadaro [11] a stimulé les os fémoraux et tibiaux porteur d'un défaut de 5 mm (chez le rat de 4 semaines) avec des ultrasons de fréquence 1,5 MHz et d'intensité $30 \text{ mW/cm}^2_{\text{SATA}}$, 20 minutes pendant 4 semaines. Et Shortinghuis [12] a stimulé l'os mandibulaire porteur d'un trou de 5 mm (rat de 4 semaines) avec les mêmes ultrasons sans obtenir non plus d'effet concluant des ultrasons. Seuls ces deux auteurs n'ont pas obtenu d'effet après la stimulation ultrasonore. La faible intensité utilisée peut expliquer l'absence de stimulation observée. De la même façon, une insuffisance de l'intensité acoustique peut donc être responsable du manque d'effet ultrasonore sur notre groupe US100.

Notre étude suggère que seuls les ultrasons d'une intensité suffisante (typiquement voisine de 300 mW/cm^2) peuvent avoir un effet observable sur la régénération osseuse. Par ailleurs, ces ultrasons peuvent déclencher des réponses négatives et positives, en fonction de l'intensité et la durée de du traitement. Tsai et al. [13], a ainsi montré que l'utilisation d'ultrasons pulsés à 1,5 MHz, 500 mW/cm^2 stimule la guérison de fracture du péroné et la production de prostaglandine chez le lapin, alors qu'à 1000 mW/cm^2 on observe un retard de consolidation. Deforest et al. [14] ont montré que l'application d'ultrasons entre 2000 à 8000 mW/cm^2 pendant quelques minutes avait des effets destructeurs sur les os des animaux en croissance. Finalement, la plage d'intensité acoustique favorable à la stimulation de la reconstruction osseuse n'apparaît pas très large.

Par ailleurs, les mécanismes biophysiques impliqués dans stimulation de la régénération osseuse par ultrasons ne sont pas encore totalement élucidés. Nos travaux soutiennent un mécanisme similaire pour les différents types d'os, ce qui donne un sens aux essais in vitro sur ostéoblastes prélevés sur calvaria par rapport aux travaux in vivo sur la fracture des os longs. Les travaux de Gleizal et al. [8] suggèrent en particulier une augmentation des marqueurs de différenciation ostéoblastique (ALP, OP, le col-I, DMP-1) après traitement aux ultrasons. En outre, les

ostéoblastes traités par ultrasons ont exprimé un niveau plus élevé de Runx2, ainsi que des régulateurs en amont de Runx (BMP-2, BMP-4, BMP-7). Il semblerait également que les vibrations mécaniques augmentent la perméabilité des cellules aux ions Ca^{++} [15].

En conclusion, une augmentation significative de la reconstruction osseuse a été observée pour une intensité acoustique de 300 mW/cm² SATA. Une faible intensité acoustique de 100 mW/cm² SATA a été testée, mais la différence avec le groupe contrôle n'est pas significative. Un effet de seuil est donc suspecté dans les mécanismes de stimulation osseuse par ultrasons. Cela peut plaider en faveur d'une cause vibratoire responsable de ce phénomène. Ainsi, un minimum d'énergie mécanique serait nécessaire pour ouvrir les canaux calciques des cellules inflammatoires, et induire la stimulation de la prolifération ostéoblastique. Un autre résultat conforte cette hypothèse, puisque des échantillons histologiques prélevés dans les 15 premiers jours ont montré une croissance stimulée des ostéoblastes après insonification. D'autres paramètres de la stimulation ostéoblastique par ultrasons pourraient également faire l'objet d'investigations plus approfondies du fait de certains de nos résultats. En particulier, alors que la durée de traitement ultrasonore était de deux semaines dans cette étude, la preuve de concentration élevée d'ostéoblastes à 15 jours suggère une possible augmentation de l'effet par allongement du traitement.

Remerciements

Les auteurs remercient A. Matias et A. Birer pour l'aide technique apportée à ce travail, S. Chesnais pour ses conseils pour l'expérimentation in vivo ainsi que J.B. Pialat pour l'histologie. Ce travail a été rendu possible grâce à l'équipe de la plateforme Animage du CERMEP et à l'aide apportée par l'association "Les Gueules Cassées".

Références

- [1] Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of pulsed ultrasound. *Clin. Sci.* 35, 273-285 (1968).
- [2] Dyson M, Pond JB. The effect of pulsed ultrasound on tissue regeneration. *Physiotherapy* 56, 136-142 (1970).
- [3] Dyson M, Brookes M. Stimulation of bone repair by ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* S2:61-66 (1983).
- [4] Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, and Siffert RS. Non-invasive low intensity Pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbits. *J. Orthoped. Trauma*, 4, 246-253 (1990).
- [5] Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am* 76:26-34. (1994).
- [6] Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine* 11:416-423 (1999).
- [7] Harle J, Salih V, Knowles JC, Mayia F, Olsen I. Effects of therapeutic ultrasound on osteoblast gene expression. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12:1001-1004 (2001).
- [8] Gleizal A, Li S, Pialat JB, Beziat JL. Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low-intensity ultrasound: an in vitro study. *Ultrasound Med. Biol.* 32:1569-1574 (2006).
- [9] Lavandier B, Gleizal A, Béra JC. Experimental assessment of calvarial bone defect re-ossification stimulation using low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 35:585-94 (2009).
- [10] Gebauer D, Mayr E, Orthner E, Ryaby JP. Low-intensity pulsed ultrasound: effects on nonunions. *Ultrasound Med. Biol.* 31:1391-1402 (2005).
- [11] Spadaro JA, Albanese SA. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound Med. Biol.* 24:567-573 (1998).
- [12] Schortinghuis J, Stegenga B, Raghoobar GM, de Bont LG. Ultrasound stimulation of maxillofacial bone healing. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14:63-74 (2003).
- [13] Tsai CL, Chang WH, Liu TK, Song GM. Ultrasonic effect on fracture repair and prostaglandin E2 production. *Chin. J. Physiol.* 35:27-34 (1992).
- [14] DeForest RE. Effects of ultrasound on growing bone. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 34:21-30 (1953).
- [15] Demmink JH, Helders PJ, Hobaek H, Enwemeka C. The variation of heating depth with therapeutic ultrasound frequency in physiotherapy. *Ultrasound Med. Biol.* 29:113-8 (2003).