뼈모세포의 활성도에 대한 자성의 효과에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치과보철학교실

조영욱·최부병·이성복

The Effect of Magnetism(Neodymium Magnet) on Activity of Osteoblast

Young-Wook Cho, D.M.D, Boo-Byung Choi, D.M.D.,D.D.Sc

Department of Prosthodontics, Divison of Dentistry, Graduate school, Kyung Hee University.

The object of this study is to observe the effects of magnetism on the osteoblasts using a neodymium magnet. The osteoblasts was cultured under magnetic fields of varying intensities to evaluate the effect of magnetism on the activity and alkaline phosphatase acitivty of the osteoblasts. Osteoblasts were cultured in the cell density of 10^4 for the evaluation of cell proliferation and 10^5/㎖ for the evaluation of ALP activity under 0. 10, 100, 500, 1000, 2000, 4000 gauss for 24 hour. For evaluation of osteoblast morphologic changes under magnetic, osteoblasts were observed by inverted microscope and TEM. To elucidate if IGF-receptors are increased under the magnetic field, we investigated osteoblasts by immunofluoroscence staining.

The results were as follows: In the varying intensities of magnetic fields, the degree of cell proliferation was the highest in the magnetic field of 10 gauss and this gradually decreased up to 1000 gauss. In the magnetic fields stronger than 1000 gauss, the degree of the cell proliferation decreased to an even lower level than that of the control group. The ALP activity and protein synthesis showed a similar increase pattern as the degree of cell proliferation compared to the control group but showed little difference. Under the microscope, morphological change of the cells (decrease in length and increase in roundness) were observed but no peculiarity of cell distribution could be found according to the magnetic field line. In the proper intensity of magnetic fields (10 gauss), the cultured cells showed increase in number of IGF Receptors compared to that of the control group.

뼈모세포의 활성도에 대한 자성의 효과에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치과보철학교실

조영욱·최부병·이성복

Ⅰ. 서 론

전자기장의 생물학적 영향에 관한 연구는 Yasuda[1]가 1950년대 골의 Piezoelectric properties에 관한 연구를 시작으로 전기와 전자기장이 골에 미치는 영향에 관한 연구, 특히 파절된 골에 있어서의 골 치유를 위한 비침습적인 방법으로 연구되어져 왔다. 특히 이러한 연구들은 정형외과 분야에서 골유착을 촉진시키기 위해 사용되어져 왔으며 Rabby 등[2]은 유도 전자기장이 골 형성을 촉진하며 뼈의 손상에 효과적임을 증명하였다.

한편 치과분야에서는 교정, 치주 분야에 널리 사용되어지다가[3-5] 임플란트가 널리 보급되면서 임플란트의 골유착 기간을 단축시키고자 전자기장이 식립된 임플란트 주위의 뼈 형성 및 뼈 성장에 미치는 영향에 대해서 활발한 연구가 행해져 왔다.

과거에 사용되었던 장치를 살펴보면 Brighton[6-8]에 의해 직류 전기장 자극 장치가 개발되었는데 골절 부위에 직접 전극을 삽입하고 직류전류를 흘려보내 이 부위에 국소적인 전류를 형성하였다. 그러나 이 방법은 조직에 직접적인 손상이 심하여 그 후 Brighton과 Pollack[9]은 골절 외부에 전극판을 부착시킨 후 교류전류를 이용하여 이 부위에 전기장을 형성하였으며 Basset등[10-11]은 외부코일을 위치시킨 후 일정한 주기로 교류전류를 흘려보내 이 부위에 유도 전자기장을 형성하였다.

치과학에서 사용되는 자석을 살펴보면 과거에 Alnico, Ferrite 그리고 Pt-Co 자석등이 다양한 보철물에 사용되어지다가 1970년대 이보다 훨씬 강한 자성을 갖는 희토류 자석이 발견되어 점차 사용이 증가하게 되었다. Sm-Co 자석과 Neodynium 자석같은 희토류 자석은 기존의 자석보다 6배정도 강한 자기력을 가졌으며 비자기화에 대한 저항성이 20~50배까지 커졌다. 이런 성질로 인해 1mm 이내의 크기의 자석도 제작가능하며 쉽게 자성을 잃지 않는다.

한편 이런 자석의 발달과 함께 자장이 생체에 미치는 영향에 대해서도 다방면에서 논의되고 있다. 여기서 주목할만한 점은 자장이 골 형성을 촉진한다는 점이다.

본 연구에서는 Neodymium 자석을 사용해 자성이 뼈모세포에 미치는 영향을 살펴보고자, 각각 다른 세기의 자기장 하에서 세포를 배양해 자성이 뼈모세포의 활성도, 알칼리성 인산효소의 활성, 단백질 생성에 미치는 영향을 관찰하고 세포를 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하여, 자성이 세포의 형태와 미세구조물의 변화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 뼈모세포를 이용하였다. 뼈모세포는 마우스의 두개관으로부터 얻은 뼈모세포양 세포주(osteoblast-like cell line)인 MC3T3-E1(E1)세포를 이용하였다. E1세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)와, 페니실린(100unit/ml)-스트렙토마이신(100μg/ml) (Gibco, USA)이 포함된 α-minimum essential medium(α-MEM; Gibco, USA)을 배양액으

로 하여 배양하였다.

2. 실험방법

1) 자기장 하에서 세포배양

세포를 자기장 하에서 배양하기 위해 다음과 같은 장치를 제작하였다(Fig. 1). 세포 배양판을 중앙에 위치시킨 후 양쪽에 자석을 부착시켜 거리를 조절할 수 있게 함으로써 배양판에 미치는 자기장의 세기를 조절하였다. 자석 이외의 모든 부분은 비자성체인 아크릴릭 재료를 사용하여 외부의 영향을 최소화하였다(Fig. 2).

각 세포를 35mm 세포배양판(Falcon, USA)에 10^4/㎖의 세포농도(세포활성평가의 경우) 혹은 10^5/㎖(알칼리성 인상효소 활성 평가의 경우)를 각각 2 ㎖씩 되도록 분주하고, 10% FBS와 페니실린(100 unit/ml)-스트렙토마이신(100μg/㎖)(Gibco, USA)이 포함된 α-MEM 용액에서 24시간 0, 10, 100, 500, 1000, 2000, 4000 가우스의 자기장 하에서 배양하였다(Fig. 3,4,5).

2) 세포활성의 평가

세포활성의 평가를 위해 MTT Assay를 시행하였다. 위에서 서술한 방법대로 각각 서로 다른 자기장 하에서 24시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well에 동일한 배양액을 1.8㎖, 0.01M phosphate buffered saline(PBS)에 5mg/㎖의 농도로 녹인 MTT (Sigma, USA)용액을 필터로 여과하여 well당 0.2㎖씩 첨가한 후 4시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 0.04N이 염산이 포함된 이소프로파놀을 well당 2㎖씩 첨가하여 반응물을 용해시킨 후 96 well plate로 옮겨 microplate reader(model 550, Bio-Rad, USA)로 540nm을 기준으로 하여 650nm 파장에서 측정하였다(Fig. 6).

3) 알칼리성 인산효소의 활성

24시간 세포를 자기장 하에서 배양한 후, 배양액을 제거하고 세포층을 PBS로 2회 수세하였다. 그 후 각 well에 생리식염수에 0.1% 농도로 희석한 Triton X-100(Polyscience, USA)을 첨가하고 실온에서 30분간 방치하였다. 0.1M Glycerine-NaOH 완충액(pH 10.4)에 100mM 농도로 용해시킨 *p*-nitrophenyl phosphate를 각 well에 첨가한 후 37˚C에서 10분간 배양하였다. 그 후 96 well plate로 옮겨 microplate reader(model 550, Bio-Rad, USA)로 405nm의 파장에서 측정하였다.

4) 단백질합성의 측정

24시간 세포를 자기장 하에서 배양한 후, 배양액을 10㎕씩 96 well plate로 옮긴 후에, protein assay dye를 200㎕씩 첨가한 후 20분간 방치하였다. 그 후 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)로 595nm의 파장에서 측정하였다.

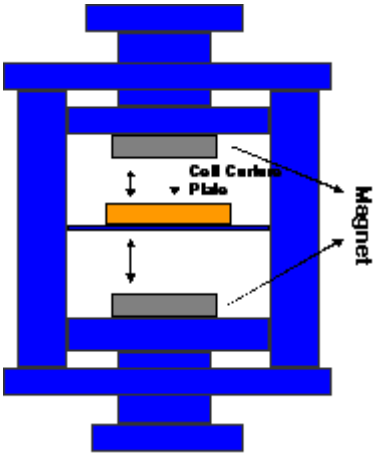


Fig. 1. Design for magnetic field forming device



Fig. 2. Magnetic field forming device for cell culture



Fig. 3. Gauss Meter (KANETEC, Japan)



Fig. 4. The evaluation of strength of magnetic fields with gauss meter



Fig. 5. Cell culturing under the magnetic fields.



Fig. 6. Microplate reader (Model 550. Bio-Rad, U.S.A)

5) 광학현미경 관찰

세포를 35mm 세포 배양판(Falcon,USA)에 10^4/㎖의 세포 농도로 2㎖씩 분주한 후 각각의 자기장 하에서 24시간 배양한 후에 역광 현미경(Olympus, Japan)으로 세포의 배열과 형태의 변화를 관찰하였다(Fig. 7).

6) 투과전자현미경 관찰

세포를 35mm 세포 배양판(Falcon, USA)에 10^5/㎖의 세포 농도로 2㎖씩 분주한 후 각각의 자기장 하에서 24시간 배양한 후에 배양액을 제거한 후, 인산완충용액으로 2회 수세하였다. 2.5% 글루타 알데하이드 용액으로 고정한 후 인산완충용액으로 수세하고 다시 1% O_8O_4로 후 고정하였다. 인산완충용액으로 수세한 후 일련의 알코올로 탈수하고 Epon에 포매하였다. 그 후 초박절편기로 세포를 중심으로 절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하고 투과전자현미경으로 자장에 따른 세포내 미세구조의 변화를 관찰하였다(Fig. 8).

7) IGF-Ⅰ수용체 면역형광염색

자기장 하에서 뼈모세포의 IGF-Ⅰ 수용체의 증가를 알아보기 위해서 자기장 하에서 세포를 24시간 배양한 후에, 배지를 제거하였다. 0.01M 인산완충용액(pH 7.4)으로 세포를 2회 수세 한 후, 4% 중성 포르말린으로 30분간 고정하였다. 그 후 비특이적 반응을 방지하기 위해 Goat의 정상혈청(goat normal serum, Santa Cruz, U.S.A)으로 20분간 반응시켰다. 여분의 혈청을 제거해 내고, 절편에 일차항체로서 IGF-Ⅰ 수용체에 대한 토끼의 항체 (Santa Cruz, U.S.A)를 이용하여 세포에 적용하여 실온에 2시간 반



Fig. 7. Inverted Microscope for exmaining cell shape change (Olympus, Japan)



Fig. 8. TEM (JEOL, Japan)

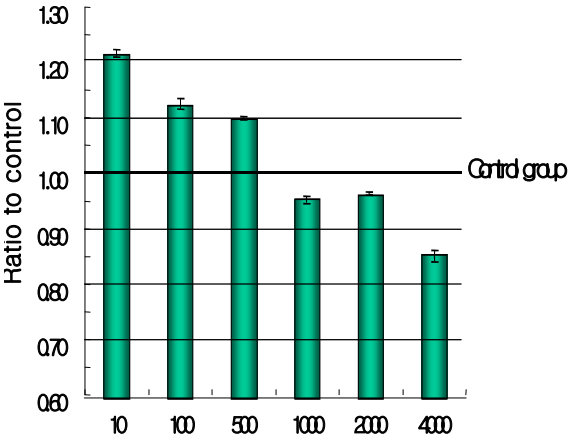


Fig. 9. The changes of the cell activity 24-hour after application of various strength of magnetic fields

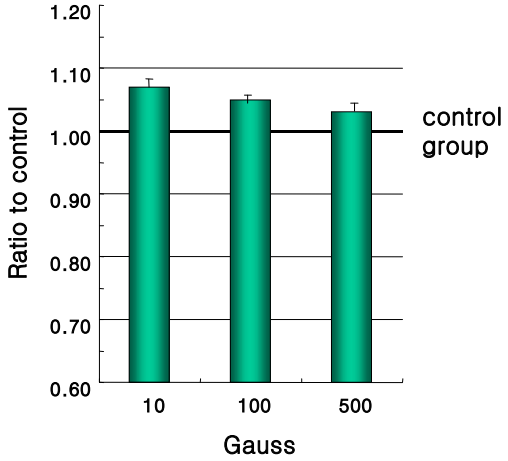


Fig. 10. The changes of alkaline phosphatase activity 24-hour after application of various application of various strength of magnetic fields

응시켰다. 그 후 세포를 0.01M 인산완충용액으로 5분씩 2회 수세한 후, 이차항체로서 형광표지된 Goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz, U.S.A)를 적용하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.01M 인산완충용액으로 수세한 후, 형광현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 세포활성의 평가

α-MEM 배양액의 뼈모세포(E1)를 각각 서로 다른 자기장 하에서 24시간 배양하고 세포 활성을 평가하였을 때 약 10 가우스의 자기장 하에서 가장 세포 활성도가 증가하였다. MTT assay 결과 10 가우스의 자기장 하에서의 세포 활성도는 대조군에 비해 약 20% 정도 증가하였다. 그러나 점점 자기장의 세기가 증가함에 따라 세포 활성도의 증가폭은 감소하였으며 1000 가우스 이상에서는 오히려 대조군에 비해 세포 활성도는 감소하였고 4000 가우스에서는 대조군의 80% 수준으로 현저히 저하되었다(Table 1).

2. 알칼리성 인산효소의 활성

세포 활성도와 비슷한 양상으로 10 가우스에서 가장 증가하였으며 자기장의 세기가 커짐에 따라 점차 감소하는 소견을 나타내었다(Table 2).

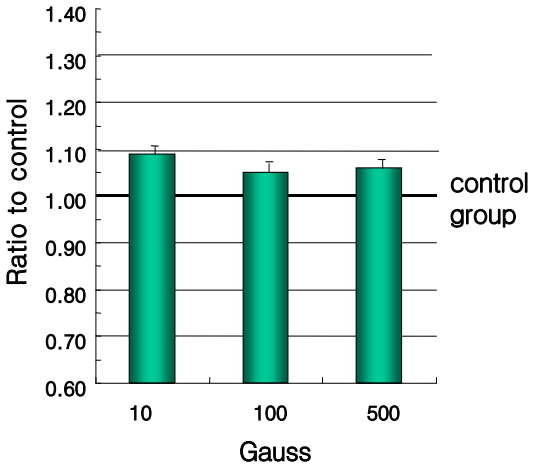


Fig. 11. The changes of total protein in the media 24-hour after application of various strength of magnetic fields

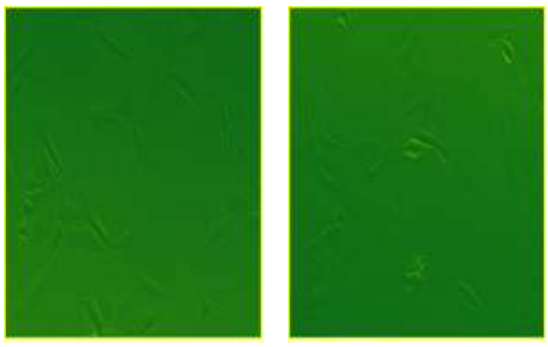
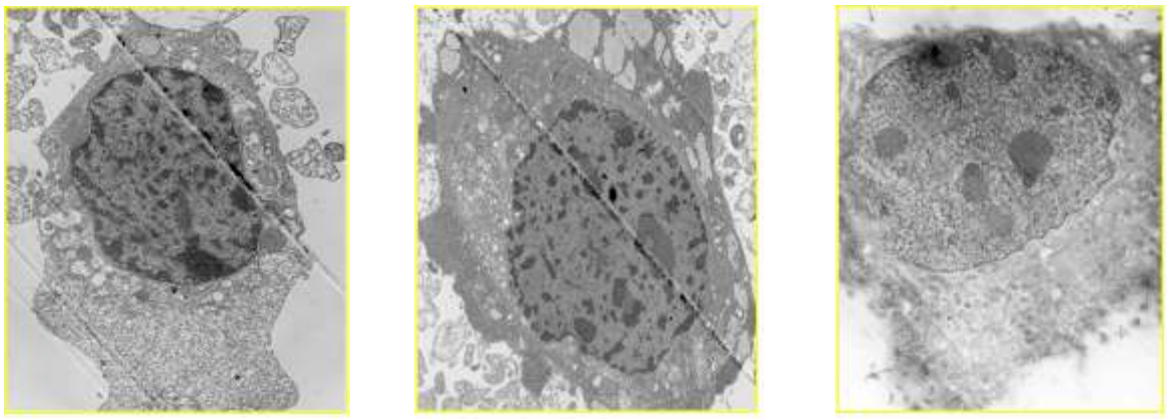


Fig. 12. Cell shape change under magnetic field



10 gauss 4000 gauss 4000 gauss

Fig. 13. MC3T3-E1 cell, osteoblast-like cell ultrastructure change under magnetic field

3. 단백질 합성의 평가

세포 활성도와 비슷한 양상으로 10 가우스에서 가장 증가하였으며 자기장의 세기가 커짐에 따라 점차 감소하는 소견을 나타내었다(Table 3).

Table 1. The changes of the cell activity 24-hour after application of various strength of magnetic fields

MTT	10G	100G	500G	1000G	2000G	4000G
1	1.29	1.23	1.09	0.98	0.90	0.88
2	1.17	1.11	1.10	0.94	0.96	0.84
3	1.20	1.12	1.12	0.95	0.87	0.89
4	1.14	1.11	1.16	0.95	0.99	0.82

Table 2. The changes of alkaline phosphatase activity 24-hour after application of various strength of magnetic fields

ALP	Control	10G	100G	500G
1	1.00	1.08	1.06	1.06
2	1.00	1.05	1.06	1.04
3	1.00	1.10	1.05	0.97
4	1.00	1.07	1.05	1.01

4. 광학 현미경 관찰

10 가우스에서는 뼈모세포의 정상적인 소견을 관찰할 수 있었으나 4000 가우스에서는 세포수의 현저한 감소와 함께 세포길이의 감소와 보다 원형으로의 형태변화가 관찰되었다(Fig. 12).

5. 전자 현미경 관찰

10 가우스에서는 정상적인 세포핵과 많은 수의 세포내 소기관을 관찰할 수 있었고 핵 분열활동도 활발하였다. 1000 가우스에서는 세포 소기관의 수가 현저히 감소하였고 일부 세포막의 소실과 세포질내 공포가 관찰되었다. 최대크기인 4000 가우스에서는 세포막이 소실되어 세포 소기관을 관찰할 수 없었고 핵의 변화와 일부 핵막이 소실되는 소견이 관찰되었다(Fig. 13).

Table 3. The changes of total protein in the media 24-hour after application of various strength of magnetic fields

Protein synthesis	Control	10G	100G	500G
1	1.00	1.00	1.01	0.98
2	1.00	1.37	1.23	1.16
3	1.00	1.13	1.20	1.33
4	1.00	1.01	1.01	1.04



Control 10 gauss

Fig. 14. IGF-receptor change under magnetic field

6. 면역형광 염색반응

대조군에 비하여 최적 가우스인 10 가우스에서 IGF-Ⅰ 수용체의 면역형광염색반응이 더 많은 양이 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 14).

Ⅳ. 총괄 및 고안

자성의 세포에 대한 생리학적인 기준은 아직 명료하게 밝혀지지 않았다. Black등[12]은 세포수준에서 처음으로 전자기장이 신호(message), 호르몬(hormone), 기질(substrate)로 구성된 3가지 기본적인 양식에서 적용된다고 제안하였다. 신호단계에서는 전자기장이 이온통로(ion channel)에서 검출될 수 있으며. 부하가 가해지거나 또는 전자기장 발생 장치에 의해서 적절한 자극이 가해질때 이온통로의 반응을 유발시키고 호르몬단계에서는 전자기장이 수용체에 결합하는 호르몬이나, 수용체 또는, 수용체 자체를 자극하여서 존재하는 호르몬의 역할을 변화시키며, 기질단계에서는 전자기장이 세포막 투과성, pH, 산소농도 또는 다른 수단을 변화시켜서 기질의 효용성을 변화시킨다고 하였다.

Inoue등[13]은 전자기장 노출은 뼈세포에 직접적으로 자극을 주어 뼈 재형성을 촉진시킨다고 하였으며 전자기장 자극 이후 미분화간엽세포들이 뼈모세포와 뼈세포로 분화하는 것을 관찰, 보고하였다.

Matsunaga등[14]은 전자기장에 의해 알칼리성인산효소의 활성이 증가되는 것을 측정함으로써 전자기장 노출에 의해 뼈모세포의 증식과 분화가 증가하는 것을 관찰, 보고하였다. 이와 같이 자기장은 뼈모세포를 이용한 실험에서 세포의 증식을 촉진하고, 알칼리성 인산효소의 활성을 증가시키는 작용을 하는 것으로 보고되었으며[15], 이러한 성질로 뼈가 파절된 환자에서 치유속도를 증가시키기 위해 자기장을 이용하는 것이 상당히 효과적인 것으로 알려져 있다.

그러나 지금까지의 실험은 임상적인 골 형성이나 조직소견에 관한 내용이 대부분이었고, 실제 뼈모세포에 있어서 어떠한 영향을 미치며 그 기전이 무엇인지에 관해서는 아직 부족한 실정이다. 따라서 본 실험은 세포실험에서 순수한 자석을 이용하여 세포 활성도나 형태, 미세구조의 변화를 살펴보고자 하였다. 본 실험에서는 순수한 자석을 가지고 순수한 자기장 하에서 실험하였지만 그 기전이나 결과는 전자기장과 같을 것이라 예상하였다.

이 실험의 첫째 목적이 뼈모세포의 활성도를 증가시키는 최적의 자기장 세기를 알아내는 것이므로 일단 기존의 실험에 사용된 설정을 참고로 하였다. Matunaga등[16]은 전자기장을 이용한 뼈 형성 시에 가장 적절한 설정은 0.4, 1, 2 가우스라고 하였다. 그러나 실제로 이 정도의 세기는 너무 약하여 순수 자석으로는 설정이 불가능하여 일단 10, 100, 500, 1000, 4000 가우스로 임의로 설정하였다. 그 결과 본 실험에서도 최소 설정인 10 가우스 범위에서 가장 세포 활성도는 높게 나타났으며 자기장의 세기가 커질수록 오히려 감소하는 것이 관찰되었다. 1000 가우스 이상에서는 오히려 대조군에 비해 감소하였고 4000 가우스에서는 대조군의 80% 수준을 나타내었다. 이 결과로 보아 세포 활성도는 자기장의 세기에 따라 크게 변화하며 아마도 과도한 세기의 자기장은 오히려 세포 활성도를 저하시키는 것으로 생각된다.

알칼리성 인산효소와 단백질 합성의 경우 세포 활성도와 같은 양상으로 증가하였으나 그 차이는 그리 많지 않았다. 알칼리성인산효소의 실제적인 기능은 알려져 있지 않지만, 뼈 형성 시에 광화과정에 작용한다는 것은 알려져 있다[17]. 알칼리성인산효소의 활성은 세포 활성도와는 다른 세기의 자기장에서 활성이 높아지는지 아니면 자성의 효과가 미약해서 그런지는 좀 더 연구가 필요할 것이다.

자성이 세포와 세포 소기관의 형태적인 변화에 미치는 영향을 알아보고자 각각 광학 현미경과 전자 현미경으로 관찰하였다. 이등[18]은 자기장에 노출된 뼈모세포의 형태가 세포길이는 감소하고 원형의 모양은 증가한다고 보고하였으며 본 실험에서도 이와 같은 소견을 나타내었다. 이와 같은 현상은 자성에 의한 세포의 반응기전을 연구하는데 한가지 단서가 될 것이라 생각한다.

전자현미경 관찰시 10 가우스에서는 정상적인 세포형태와 소기관 및 세포핵이 관찰되었으나 1000 가우스에서는 세포 소기관의 수가 감소하고 세포질내 공포가 형성되었으며, 일부 세포막이 불투명해지는 소견이 나타났다. 4000 가우스에서는 세포막이 소실되었고 핵의 형태변화와 일부 핵막이 소실되는 소견이 나타났다. 현재 과도한 세기의 자성이 세포에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 명확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 다만 이 실험으로 보아 과도한 세기의 자기장은 핵의 변화를 일으켜 핵 분열능력을 저하시킴으로써 세포 활성도를 저하시키며 세포막과 핵막을 직접적으로 파괴시키는 작용이 있는 것으로 생각된다.

1990년대 들어 성장인자에 관한 연구가 활발해지기 시작하였는데 Davidovitch 와 공동연구자들[19-20]은 cyclic nucleotides, prostaglandins이 모두 전자기장은 다른 기계적 자극을 주었을 때 치조골과 치주인대세포가 증가하는 것을 관찰하였다. Fizsmmon 과 공동연구자들[21-22]은 전자기장 자극이후에 세포에서 나오는 증가된 성장인자와 관련되어서 뼈 세포증식이 증가하는 것을 보고하였으며, 뼈의 중요한 요소인 IGF-2는 전자기장 자극 이후에 증가되고, 이는 증가된 성장인자의 분비에 의해 잘 설명될 수 있다고 하였다.

또한 Lohmann등[23]의 보고에 의하면 전자기장의 자극은 뼈모세포의 분화와 활성, 세포외 기질합성과 성장인자의 분비에 영향을 미치며 실제 *in vivo* 상에서도 뼈의 흡수를 감소시키고 형성을 증가시키는 효과가 있을거라고 예측하였다.

본 실험에서 자성은 성장인자뿐만 아니라 성장인자 수용체에 있어서도 그 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 향 후 더 많은 연구와 실험을 통해 밝혀져야 하겠지만 성장인자와 성장인자 수용체의 발현 증가가 뼈모세포의 세포 활성도를 증가시키는 한 원인이라 생각되며 그 기전에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것이라 생각된다. 한가지 더 고려해야 할 사항은 자석이 인체조직에 유해한지에 관한 내용이다. Altay등[24]은 자석을 식립한 조직표본을 관찰한 동물 실험결과 국소적으로 미치는 자기장의 경우 주위 조직의 병리학적인 소견은 관찰할 수 없다고 보고하였으며, Yan등[25]은 동물 실험결과 자기장이 외상이나 수술시 손상으로 인한 뼈의 무기물 흡수를 방지함으로써 오히려 재광화를 돕는 작용이 있다고 보고하였다. 따라서 이는 향후 동물 실험에 있어 좋은 참고 자료가 될 만 하며 아울러 이들 세포들이 유기적 관계를 맺고 있는 상황에서의 자석의 효과가 유기적으로 연구되어야 할 것이라 생각된다.

Ⅴ. 결 론

1. 뼈모세포를 각각 다른 자기장 하에서 배양시 10 가우스의 자기장 하에서 가장 세포 활성도가 증가하였으며 1000 가우스까지는 서서히 감소하다가 그 이상에서는 오히려 자기장의 세기가 증가할수록 대조군에 비해 오히려 세포 활성도는 감소하였다.
2. 알칼리성 인산효소활성과 단백질 합성능은 전반적으로 세포 활성도와 같은 양상으로 대조군에 비해 증가하였으나, 큰 차이를 보이지는 않았다.
3. 광학현미경 관찰시 높은 자기장하(4000가우스)에서 세포의 형태학적 변화(길이 감소와 원형모양의 증가)는 관찰할 수 있었으나 자기력선에 따른 세포 분포의 특이성은 관찰할 수 없었다.
4. 전자현미경 관찰시 10 가우스 자기장에서는 세포내 소기관의 형태가 정상적이었고 핵 활동도 활발하였으나 1000 가우스에서는 세포내 소기관 수가 감소하였고 공포가 나타났으며 4000 가우스에서는 세포막의 소실과 함께 핵의 변화와 일부 핵막이 소실되는 소견이 나타났다.
5. 적절한 자기장(10 가우스)하에서 배양된 뼈모세포의 경우 대조군에 비해 IGF-Ⅰ수용체의 수가 증가하였다.

이상의 결과로 보아 자성은 뼈모세포에 있어서 한가지 이상의 성장인자 수용체의 증가를 가져옴으로써 세포 활성도를 증가시키며 임상적으로 골 생

성이 증진되는 효과가 기대된다. 따라서 향 후 구강 내 임플란트나 뼈이식술 같은 분야에 있어서 임상적으로 응용 가능할 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Fukuda E, Yasuda I.: On the piezoelectric effect of bone. J Physiol Soc Japan, 12:121-128, 1957
2. Ryaby JT.: Clinical effects of electromagnetic and electric fields on the fracture healing. Clin Ortho, 355:S205-15, 1998
3. Basset CAL, Pawluk RJ, Pilla AA.: Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. Science, 184:575-577, 1974
4. Jacobs JD, Norton LA.: Electrical stimulation of osteogenesis in pathological osseous defects. J Periodontal, 47:311-319, 1976
5. Kawata T, Hirota K, Sumitani K, et al.: A new orthodontic force system of magnetic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 92:241-248, 1987
6. Brighton CT, Black J, Friedenberg ZB, et al.: A multicenter study of the treatment of non-union with constant current. J Bone Joint Surg, 63:2-13, 1981
7. Heppenstall RB, Brighton CT, Esterhai JL, Muller G.: Prognosis factors in non-union of the tibia: an evaluation of 185 cases treated with constant direct current. J Trauma, 24:790-795, 1984
8. Patterson D.: Treatment of nonunion with a constant direct current: A totally implantable system. Orthop Clin North Am, 15:47-59, 1984
9. Brighton CT, Pollack SR.: Treatment of recalitrant nonunion with a capacitively coupled electric field. J Bone Joint Surg, 67:577-585, 1985
10. Basset CAL, Mitchell SN, Norton L, Pilla AA.: A nonoperative salvage of surgically resistant pseudarthoses and nonunions by pulsing electromagnetic fields: a preliminary report. Clin Orthop, 1245:128-143, 1977
11. Basset CAL, Pawluk RJ, Pilla AA.: Augumentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. Science, 184:575-577, 1974
12. Black J.: Electrical stimulation, its growth, repair, and remodeling of the mucoskeletal system. New york praeger:2-3, 1987
13. Inoue S, Ohashi S, Kajikawa K, et al.: The effects of electrical stimulation on the bone differentiation to the bone. Orthop Res Sci, 7:501-507, 1980
14. Masunaga S, Skau T, Yoshikuni N, et al.: Intramedually callus induced by weak direct current stimulation:serial changes in the alkaline phosphatase activity at the site of electricity induced callus formation. J Japan Bioelect Res Soc, 2:67-71, 1988
15. Schmitt O.: The influence of the electromagnetic field on the activity of alkaline phosphatase in immobilised children. Arch Orthop Trauma Surg, 93:21-24, 1978
16. Matsunaga S, Sakou L, Jiri K.: Osteogenesis by pulsing electromagnetic fields: optimum stimulation setting. In Vivo, 10:351-6, 1996
17. Harris H.: The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. Clin. Chim. Acta., 186:133-150, 1990
18. Lee JH, Mcleod KJ.: Morphologic response of osteoblast-like cells in monolayer culture to electromagnetic fields. Bioelectromagnetics, 21:129-136, 2000
19. Davidovitch Z, Korostoff E, Finkelson MD, et al.: Effect of electric currents on gingival cyclic nucleotides in vivo. J Periodont Res, 15:355-362, 1980
20. Davidovitch Z, Shanfeld L, Montgomery PC, et al.: Biomechanical mediators of the effectsof mechanical forces and electric currents on mineralized tissues. Calcif Tissue Int, 36:s86-s97, 1984
21. Fitzsimmons RJ, Farley JR, Adey WR, Baylink DJ.: Frequency dependence of increased cell proliferation, in vitro, in exposures to a low-amplitude, low-frequency electric field: evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium. J Cell Physiol, 139:586-591, 1989
22. Fitzsimmons RJ, Farely JR, Mohan S, Baylink DJ.: Low amplitude, low frequency electric field-stimulated bone cell proliferation may in part be mediated by increased IGF-2 release. J Cell Physiol, 150:84-89, 1992
23. C.H.Lohmann, Z.Schwartz, Y.Liu, H.Guerkov, D.D.Dean, B.Simon, and B.D.Boyan.: Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. Journal of orthopaedic research, 18:637-646, 2000
24. O.T.Altay, T.Kutkam, O. Koseoglu, S. Tanyeri.: The biological effects of implanted magnetic fields on the bone tissue of dog. Int J Oral Maxillofac Implants, 6:345-349, 1991
25. Yan QC, Tomita N, Ikada Y.: Effects of static magnetic fields on bone formation of rat femurs, Med Eng Phys, 20:397-402, 1998