

초음파 흡수에 의한 단백질에서의 온도 변화 특성

신동욱, 김의준, 윤석왕
성균관 대학교 물리학과 음향학 연구실

Temperature variation due to ultrasonic absorption in protein

D. O. Shin, E. J. Kim, S. W. Yoon

Acoustics research Laboratory, Department of Physics, Sung Kyun Kwan University

요 약

초음파 흡수에 의한 단백질에서의 온도 변화 특성을 관측하기 위하여, 간단한 조직의 형태인 계란 흰자와 계란 흰자의 주성분인 물과 알부민 수용액을 시료로 선택하여, 초음파 흡수에 의한 온도 변화 특성을 물리 음향학적으로 관측하였다. 수 MHz의 초음파를 집속형 변환기에서 연속파의 형태로 시료에 투사하였을 때, 한정된 시료에서의 온도 변화를 측정하였다. 측정결과, 물과 알부민 성분에 의한 온도 증가 효과는 미미함을 알 수 있었다. 초음파 흡수에 의한 계란 흰자에서의 온도 변화는 단백질의 주성분인 알부민에 의한 효과 보다는, 단백질을 구성하고 있는 각 성분들의 결합에 의한 효과가 큼을 알 수 있다. 이들 결과에 대한 이론적 검토로부터 초음파 흡수에 의한 인체내 온도 변화 및 부작용에 대한 초음파 강도의 안전기준의 토대 마련이 가능함을 제시하였다.

1. 서론

초음파가 의학에 이용된 것은 1930년대 이후이며, 계속적인 연구로 1940년대 후반 초음파를 인체의 연부조직에 방사하여 나타나는 파의 특성을 이용하여 세포조직을 관찰 및 진단하기 시작하였다[1].

초음파는 인간이 들을 수 있는 가장 주파수 상한인 20 kHz 이상의 음파를 말한다. 그러나 모든 주파수 영역의 초음파가 의학에 이용되지는 않는다. 진단을 위해서는 인체에 대해서 매우 정확한 분해능과 양질의 상을 형성해야 하며, 치료 및 외과적 수술을 수행하기 위해서는 많은 에너지의 전달을 필요로 한다. 이때의 분해능과 에너지는 사용되는 초음파의 주파수와 밀접한 관계를 가지

고 있다. 높은 분해능을 얻기 위해서는 주파수를 증가시켜야 하지만, 주파수의 증가는 음파의 감쇠가 수반되므로 부과 분해능이 감소된다[2]. 일반적으로 부과와 감쇠를 고려하여 최적의 분해능과 양질의 상을 형성하기 위해서, 의학에 사용되어지고 있는 주파수 영역은 대략 1 - 10 MHz가 적절한 것으로 알려져 있다[2][3].

초음파가 매질을 통과할 때에 매질에서의 음파 감쇠는 흡수(absorption), 산란(scattering), 반사(reflection)의 물리적 현상으로 나타난다[1]. 초음파를 인체에 투사할 경우, 이러한 감쇠 효과는 우리 인체에 중요한 영향을 미치게 된다. 특히, 흡수에 의한 감쇠는 우리 인체나 동물의 조직에서 초음파 에너지를 열로 변환시키는 중요한 원인이 된다[4].

많은 연구 결과에 의하면 인체조직은 단시간 동안에 1 °C의 온도 변화에도 상당히 민감한 반응을 나타내는 것으로 보고되고 있다[5][6]. 이처럼 초음파 흡수에 의해 발생하는 온도 변화는 사용 방법에 따라 세포를 파괴하는 악 영향을 발생하거나 암세포의 분열을 막아주는 또는 암세포를 파괴하는 치료의 수단으로 활용될 수 있다. 흡수에 의한 온도 상승은 시료에서 초음파에 의한 노출 시간과 주파수 및 강도 변화에 따라 조절할 수 있다. 초음파를 의학에 이용하는 경우, 사용 주파수 및 강도세기 그리고 투사 시간에 따른 인체조직 내에서의 온도 증가를 고려하는 것이 환자의 안전에 매우 중요한 변수로 작용하게 된다[7].

본 연구에서는 초음파를 인체조직에 투사할 경우, 조직의 주성분 중의 하나인 단백질에 의한 온도 변화 특성과 발생 가능한 부작용에 관한 연구를 수행하기 위한 기초 연구로, 간단한 형태의 조직인 계란 흰자를 시료로 선택하여 초음파 투사시 발생하는 온도 변화 특성을 관측 하였으며, 단백질의 주성분인 알부민 수용액과 물에서의 온도 변화를 비교 분석하여 초음파 투사시 계란 흰자에서의 단백질에 의한 온도 변화 특성을 규명하였다.

II. 초음파 투사에 의한 시료에서의 온도 변화식 유도

집속형 초음파 변환기에서 물을 매개로 하여 초음파를 시료에 투사 하였을 때, 시료에서는 초음파 흡수에 의하여 열이 발생된다.

이론적인 온도 변화식은 에너지 방정식에서 유도 될 수 있다.

$$\rho C_p \frac{dT}{dt} + P \nabla \cdot U = \phi^{(abs)} + K \nabla^2 T \quad (1)$$

여기서, ρ 는 밀도 [g/cm^3], C_p 는 비열 [$J/g^\circ C$], T 는 온도 [$^\circ C$], t 는 시간 [s], P 는 음압 [Pa], U 는 입자 속도 [cm/s], K 는 열 전도도 [$W/cm^\circ C$] 이다.

음파는 역학파로서 매질에 투사되었을 때 압력을 전달한다. 그러나 본 연구에서는 전파되는 음에 의해 매질에 전달되는 에너지를 고려하므로 비압축성으로 볼 수 있으며, 또한, 사용된 시료가 유동성이 매우 작음으로 매질의 점성에 의한 효과 역시 무시할 수 있다. 따라서, 에너지 방정식은 다음과 같이 기술된다.

$$\rho C_p \frac{dT}{dt} = K \nabla^2 T \quad (2)$$

이 관계식으로부터 매질에 열원이 존재하는 경우, 온도 방정식을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \kappa \nabla^2 T + Q \quad (3)$$

초음파의 투사에 의해 발생하는 열원은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$Q(r, t) = \frac{2\alpha}{\rho C_p} I(r) F(t) \quad (4)$$

여기서, κ 는 열 확산도 [cm^2/s]이며, α 는 시료에서의 흡수 계수 [Np/cm]이고, $I(r)$ 는 위치의 함수로 나타나는 강도 분포이고, $F(t)$ 는 시료에 투사되는 음파의 형태이다.

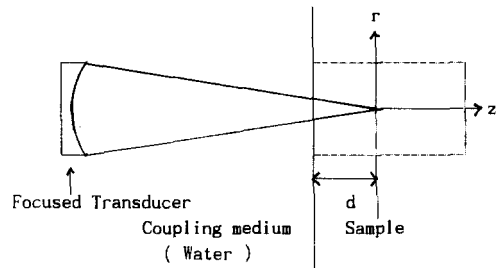
시료에서의 흡수계수는 실험적으로 다음과 같이 유도할 수 있다[8][9].

$$\alpha = \alpha_0 f^q \quad (5)$$

여기서, α_0 는 측정하고자 하는 시료에 의존하는 상수, f 는 시료에 주사된 주파수 [Hz], 그리고 q 는 측정하고자

하는 시료에 의존하는 상수를 나타낸다. 일반적으로 인체의 연부조직에서 q 는 약 1의 값으로 주어지며, 계란의 흰자에서는 $q = 1.25$ 이고, 물과 같은 유체에서 q 는 약 2인 것으로 보고되고 있다[8][9][10].

원통 좌표계를 사용하여 초음파의 투사 방향을 z 축의 양의 방향으로 하고 원점에 초점을 위치시키면, 초점에서의 강도 분포는 초음파의 진행 방향인 축방향 z 와, 방사방향 r 에 Gaussian 형태를 취하게 된다[11].



[그림1] 온도 변화식을 유도하기 위한 실험 조건

매질에서 에너지 손실을 갖는 경우 강도는

$$I(\vec{r}) = I(r, z) - I_0 \exp[-2\alpha(z+d)] \exp\left(-\frac{r^2}{\beta_r} - \frac{z^2}{\beta_z}\right) \quad (6)$$

이다. 여기서, d 는 경계면에서 초점까지의 거리이고, 빔폭은 $\beta = (HPBW/2)^2 / \ln 2$ 로서, 축방향 z 의 빔폭 β_z 과 방사방향 r 의 빔폭 β_r 로 정의되며, HPBW(Half Power Beam Width)는 파의 세기가 1/2이 되는 빔폭의 길이를 나타낸다[4][11]. 사용된 초음파는 연속파이므로, $F(t) = [\sin(2\pi ft)]^2$ 으로 나타낼 수 있다. 여기서 f 는 주파수를 나타낸다. 식(4), (6)을 식(3)에 적용하여 온도에 대한 해로 나타내면 다음과 같다.

$$T(\vec{r}, t) = \frac{2\alpha I_0}{\rho C_p} \int_0^t dt' [\sin(2\pi ft')]^2 \int_{-d}^{z'} dz' \int_0^{r'} dr' \int_0^{2\pi} r' d\theta \cdot [(4\pi\kappa t')^{3/2}]^{-1} \exp[-2\alpha(z'+d)] \exp\left[-\frac{r'^2}{\beta_r} - \frac{z'^2}{\beta_z}\right] \cdot \exp\left[-\frac{(r-r')^2 + (z-z')^2}{4\kappa t'}\right] \quad (7)$$

시료의 크기는 축방향으로부터 초점에서 $-d$ 로부터 무한대까지의 범위로 주어지고, 방사 방향은 $-\infty$ 로부터 ∞ 의 범위로 주어지는 경우, 즉 x_1, x_2, y_1, y_2, z_3 가 ∞ 일 때 다음과 같이 단순화시킬 수 있다.

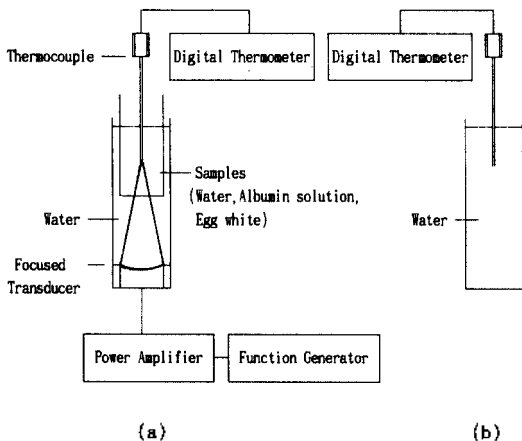
$$T(\vec{r}, t) = \frac{\alpha I_0}{\rho C_p} e^{-2\alpha d} \int_0^t dt \left[\sin(2\pi f t) \right]^2 \left(1 + \frac{4\kappa t}{\beta_r} \right)^{-1} \cdot \exp\left[-\left(\frac{r^2}{\beta_r} \frac{1}{1+4\kappa t/\beta_r} \right) \right] \left[\left(1 + \frac{4\kappa t}{\beta_r} \right) \right]^{-1} \cdot \exp\left[-\left(\frac{z^2}{\beta_z} \frac{1}{1+4\kappa t/\beta_z} + \frac{2\alpha z - 4\alpha^2 \kappa t}{1+4\kappa t/\beta_z} \right) \right] \cdot \left[\operatorname{erf}\left[\frac{1}{\sqrt{4\kappa t}} \left(1 + \frac{4\kappa t}{\beta_r} \right)^{1/2} \left(\frac{z - 4\alpha \kappa t}{1+4\kappa t/\beta_z} + d \right) + 1 \right] \right] \quad (8)$$

위의 식을 축점($\vec{r}=0$)에서의 온도 증가식으로 나타내면 다음과 같다.

$$T(0, t) = \frac{\alpha I_0}{\rho C_p} e^{-2\alpha d} \int_0^t \left[\sin(2\pi f t) \right]^2 \exp\left[-\frac{4\alpha^2 \kappa t}{1+4\kappa t/\beta_z} \right] \cdot \left(1 + \frac{4\kappa t}{\beta_r} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4\kappa t}{\beta_z} \right)^{-1/2} \cdot \operatorname{erf}\left[\frac{1}{\sqrt{4\kappa t}} \left(1 + \frac{4\kappa t}{\beta_r} \right)^{1/2} \left(d - \frac{4\alpha \kappa t}{1+4\kappa t/\beta_z} \right) + 1 \right] dt \quad (9)$$

위의 식에서 온도 증가가 축점에서의 강도와 시료의 밀도, 비열, 흡수 계수에 선형적으로 의존함을 알 수 있으며, 시료에서의 열 확산도와 사용된 집속형 초음파 변환기의 빔폭에 의존함을 알 수 있다.

III. 측정 방법



[그림2] 실험 장치도. (a) 초음파 투사에 의한 시료에서의 온도 변화 측정. (b) 주위의 온도 변화 측정

초음파를 집속형 초음파 변환기에서 물을 전달매질로 하여 시료에 투사하였을때의 온도 변화를 관측하기 위하여 다음과 같은 장치를 하였다. 인체의 각 부위가 환경된 크기로 되어있음으로 인하여, 본 실험 장치에서는 시

료의 크기를 한정된 크기로하여 온도 변화를 관측하였다.

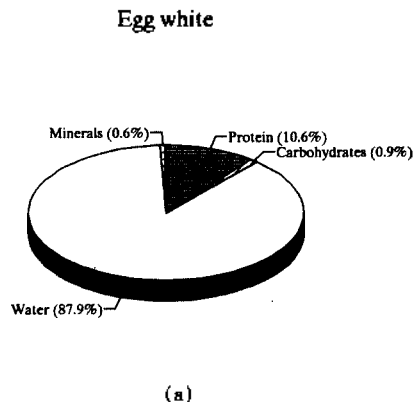
function generator에서 연속파를 발생하여 power amplifier로 증폭하였으며, 증폭된 신호는 집속형 초음파 변환기로부터 물을 전달 매질로 하여 시료에 투사하였다. 전달 매질인 물은 음파 감쇠의 원인을 줄여주기 위하여 물을 끓여 기포를 제거하여 사용하였다. 온도 변화의 측정은 0.1 °C의 분해능을 갖는 digital thermometer를 사용하였으며, 측정에는 3.5 MHz, 5 MHz, 10 MHz 주파수의 초음파를 사용하였다. 그리고 주변 온도의 영향을 고려하기 위하여 온도 측정 장치와 동일한 장치를 옆에 설치하여 주위의 온도 변화를 동시에 관측하였다. 축점의 위치는 needle hydrophone을 사용하여, digital oscilloscope로 입사파를 관측하여 강도가 최대점인 지점으로 결정하였고, 이 지점에서 digital thermometer로 온도변화를 관측하였다.

측정에 사용된 축점에서의 강도세기는 self reciprocity calibration method를 이용하여 집속형 초음파 변환기의 송신 감도 결정후 입력전압에 근거하여 측정하였다 [12][13][14].

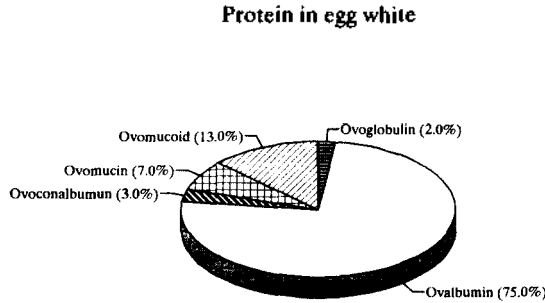
IV. 결과 및 분석

1. 계란 흰자와 알부민 수용액 및 물에서의 온도 변화 특성

계란 흰자에 초음파 투사시 발생하는 온도변화에 대해 단백질에 의한 효과를 관측하기 위하여 초음파 투사에 의한 계란 흰자에서의 온도 변화를 측정하였고, 단백질의 주성분에 해당하는 알부민 수용액과 물에 의한 온도 변화 효과를 비교 분석하였다. 그림 3은 계란흰자를 구성하는 각 성분의 비를 나타낸다[15].



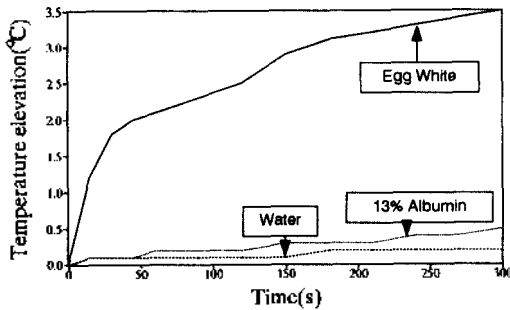
초음파 흡수에 의한 단백질에서의 온도 변화 특성



(b)

[그림 3] (a) 계란 흰자의 성분비, (b) 계란 흰자를 구성하고있는 단백질의 성분비

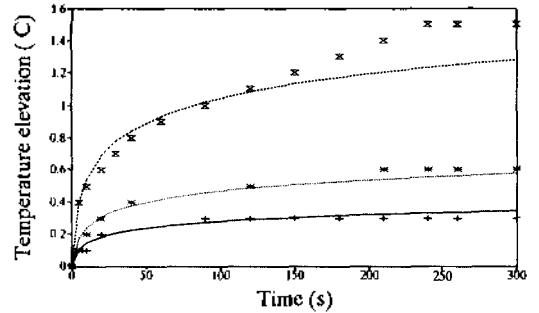
그림 4는 3.5 MHz의 집속형 초음파 변환기를 사용하여 11 W/cm^2 의 강도로 시료에 투사하였을 때의 온도 변화이다. 그림 4에서 볼 수 있듯이 계란흰자의 주성분인 물과 알부민 수용액에서의 온도 변화 효과가 비미함으로, 계란흰자에서의 온도 증가 효과는 계란흰자의 각 성분들의 화학적 결합에 의한 것임을 알 수 있다. 이러한 각 성분의 화학적 결합은 단백질을 구성하여 흡수계수를 증가시키는 것으로 추정된다.



[그림 4] 3.5 MHz의 집속형 초음파 변환기의 초점에서의 강도가 11 W/cm^2 인 초음파를 계란 흰자, 일부민 수용액 및 물에 투사하였을 때 초점에서의 온도 변화.

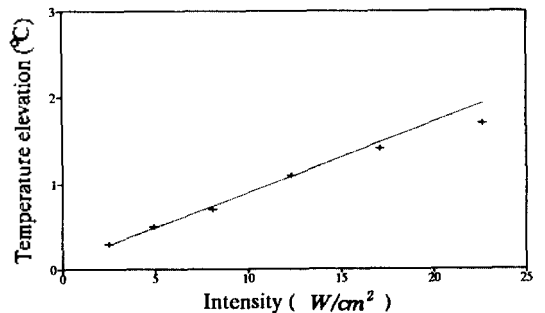
2. 계란 흰자에서의 온도 변화 특성

그림 5는 계란 흰자에서 측정된 초음파의 투사시간에 따른 온도변화의 실험치와 이론치의 비교를 나타낸다.



[그림 5] 10 MHz의 집속형 초음파 변환기에서 초점에서 강도가 3.6 W/cm^2 , 6.0 W/cm^2 , 13.3 W/cm^2 인 초음파를 계란 흰자에 투사하였을 때 초점에서의 온도 변화. (실선은 이론값이며, 점들은 실험값이다.)

그림 5에서 볼 수 있듯이 초음파 투사시 발생하는 온도 변화 특성은 시간에 대해 Log 형태를 나타내며, 열 확산에 의해 초기에 급격한 온도 증가를 나타냄을 알 수 있다. 이와 같은 특성의 원인은 시료에 초음파가 투사되었을 때, 초기에는 에너지의 흡수에 의하여 온도가 증가하며, 시간의 경과에 따라 열이 Gaussian 분포로 확산되기 때문이다. 즉, 초기 시간에서는 초음파의 확산에 비하여 시료에 흡수되는 양이 많으나, 시간이 지나면서 확산되는 양과 투사되는 양이 같아짐을 의미한다. 강도가 13.3 W/cm^2 의 세기인 실험값이 시간이 증가함에 따른 이론값과의 차이가 나타나는데, 이것은 시료의 크기가 한정된 것으로 인한 오차로 추정된다. 즉, 한정된 시료의 크기에서는 단일 효과로 인하여 더 높은 온도 증가를 가져온다.



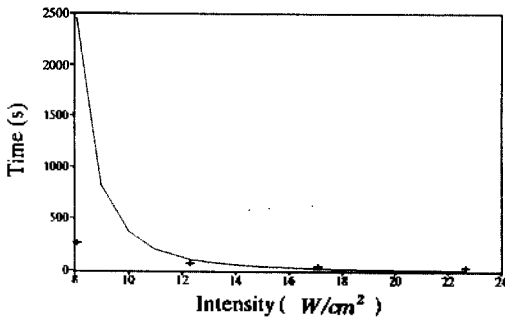
[그림 6] 10 MHz 집속형 초음파 변환기를 사용하여 2분 동안 계란 흰자에 투사하였을 경우 강도 변화에 따른 초점에서의 온도 변화. (플러스 기호가 실험값이며, 선이 이론값이다.)

초음파의 투사강도에 대한 시료에서의 온도 변화를 관측할 수 있었다. 그림6은 강도의 변화에 따른 온도 증가 곡선이며, 강도에 대한 온도 증가가 선형적으로 비례함을 알 수 있다. 즉 강도의 증가가 효과적인 온도 증가 방법임을 나타낸다.

이들 측정결과와 이론적 비교가 근접함으로 인하여 암의 매질에 초음파 투사시 발생하는 열의 이론적 예측이 가능하고, 온도 변화에 의한 치료 효과 및 부작용에 대한 강도의 안전 기준을 위한 토대 마련이 가능함을 보았다. 또한, 초음파 투사에 의해 인체조직의 치료를 위해서는 시료의 크기와 초음파 투사에 의해 발생하는 에너지의 관계에 대한 많은 연구가 수행되어야 함을 제시하고자 한다.

3. 초음파 투사에 의한 계란흰자에서의 1 °C 의 온도증가에 대한 투사강도와 시간과의 관계

그림 7은 인체 조직에 초음파 투사시 투사강도와 시간과의 적절한 적용을 위한 기초연구로 계란흰자에서 1 °C 의 온도 증가를 위한 투사강도와 시간과의 관계를 측정하였다.

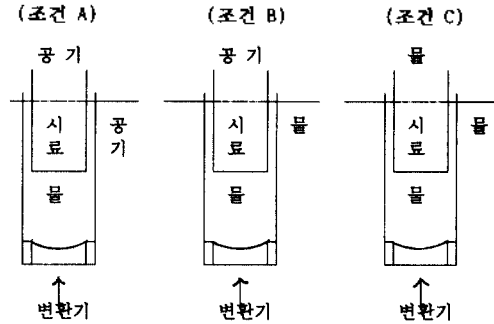


[그림 7] 10 MHz 집속형 초음파 변환기에서 계란 흰자에 초음파를 투사하였을 때 초점에서 1 °C 증가에 따른 강도와 시간과의 관계.(플러스 점이 실험 값이며, 선이 이론값이다.)

인체는 짧은 시간 동안에 1 °C의 작은 온도 변화에도 치명적인 영향이 발생하는 것으로 보고되고 있다. 초음파를 인체에 투사하기 위해서는 환자의 안전을 위하여 적용분야와 목적에 따라 온도와 강도와의 적절한 활용 기준이 필요함을 제시하고자 한다.

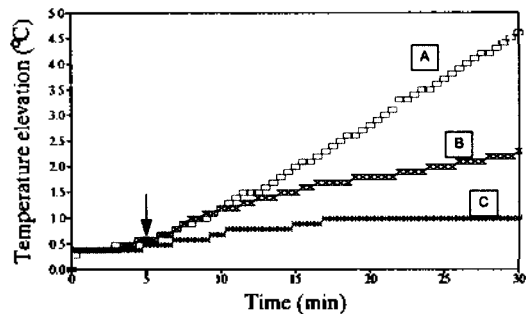
4. 한정된 시료 크기에서 외부 조건에 따른 온도 변화.

시료에 초음파를 투사할 경우, 시료 내부에 발생하는 열과 그 시료를 둘러싸고 있는 외부 조건과의 상관관계를 보기 위하여 그림 8과 같은 형태로 외부 조건을 변화시켜 발생하는 현상을 관측하였다.



[그림 8] 동일한 실험 장치에서 시료의 외부 조건의 변화에 따른 온도 변화 특성. (조건 A: 기존의 온도 변화 특성 실험과 같이 시료를 공기 중에 노출시켰을 경우, 조건 B: 시료의 옆면은 물로 둘러싸이고, 윗면은 공기에 노출된 경우, 조건 C: 시료의 옆면과 윗면 모두 물로 둘러싸인 경우)

그림 9는 외부조건의 변화에 따라 투사되는 초음파와 시료에서의 온도 변화의 관계를 나타낸다.



[그림 9] 3.5 MHz의 초음파를 28 W/cm²의 강도로 물에 투사하였을때, 시료의 외부 조건에 따른 초점에서의 온도 변화.

그림9로부터 5분 이내의 초음파 투사 시간동안에서는 외부조건의 변화에 의한 온도 변화의 차이가 적고 시간이 증가할 수록 큰 변화가 나타남을 볼 수 있다. 이 측정결과로부터 한정된 크기의 시료에서의 온도 변화는 외부 조건에 많은 영향을 받을 수 있고, 인체내의 한정된 크기를 갖는 각 부위에 초음파를 투사하기 위해서는 시료크기와 초음파 투사에 의해 발생하는 열에 대한 많은 연구가 선행되어야 하리라고 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 초음파 흡수에 의한 인체에서의 온도 변화를 관측하기 위한 기초 연구로, 간단한 조직의 형태인 계란 흰자와 계란 흰자의 주성분인 물과 일부인 수용액을 시료로 선택하여 초음파 투사에 의한 온도 변화 특성을 물리 음향학적으로 관측하였다.

측정결과, 초음파 투사에 의한 계란 흰자에서의 온도 증가에 비해 물과 일부인 수용액에서의 온도 증가가 미미함을 알 수 있었고, 이와 같은 현상으로부터 초음파 흡수에 의한 계란 흰자에서의 온도 변화는 계란 흰자를 구성하고 있는 각각의 성분에 의한 효과 보다는 단백질을 이루는 각 성분들의 결합에 의한 효과임을 알 수 있었다. 이러한 각 성분의 화학적 결합은 단백질을 구성하여 흡수계수를 증가시키는 것으로 추정할 수 있다.

측정값과 이론값의 근접함으로 인하여 이론적인 온도 변화에 의하여 임의의 시료에서의 온도 변화를 추정할 수 있으며, 온도 변화에 의한 치료 효과 및 부작용에 대한 강도의 안전 기준을 위한 토대 마련이 가능함을 제시하였다.

시료의 크기가 온도 증가에 큰 영향을 미치며, 또한 한정된 시료에서의 온도 변화가 외부 조건에 큰 변수로 작용함을 알 수 있었다. 이와같은 결과로부터 진단 및 치료의 목적으로 인체내의 한정된 크기의 각 조직에 대한 초음파의 투사 강도를 결정하기 위해서는 시료크기에 따른 온도 변화 특성에 대한 많은 연구가 필요함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구를 지원하여 주신 산학 협동 재단에 감사를 드립니다.

참고 문헌

- [1] F. J. Fry, "Biological Effects of Ultrasound - A Review," *Proceedings of the IEEE*, 67(4), pp. 604-619 (1979).
- [2] W. D. O'Brien, Jr., "Ultrasonic Bioeffects: A View of Experimental Studies" *BIRTH Vol 11:2 Fall 1984* pp. 149-157.
- [3] W. D. O'Brien, "Biological Effects of Ultrasound: Rationale for the Measurement of Selected Ultrasonic Output Quantities," *ECHOCARDIOGRAPHY* 3, pp. 165-179 (1986).
- [4] Kevin, J. Parker, "The thermal pulse decay technique for measuring ultrasonic absorption coefficients" *J. Acoust. Soc. Am.* 74(5), pp. 1356-1361 (1983).
- [5] C. M. Schgal, J. F. Greenleaf, "Ultrasonic absorption and dispersion in biological media: A postulated model" *J. Acoust. Soc. Am.* 72(6), pp. 1711-1718 (1982).
- [6] R. M. Arther, K. V. Gurumurthy, "A single-pole model for the propagation of ultrasound in soft tissue" *J. Acoust. Soc. Am.* 77(4), pp. 1589-1597 (1985).
- [7] P. K. Choi, J. R. Bae, and K. Takagi, "Frequency dependence of ultrasonic absorption in egg white" *J. Acoust. Soc. Am.* 80(6), pp. 1884-1846 (1986).
- [8] J. L. Drewniak, K. I. Carnes and F. Dunn, "In vitro ultrasonic heating of fetal bone" *J. Acoust. Soc. Am.* 86(4), pp. 1254-1258 (1989).
- [9] L. Filipczynski, "Estimation of transient temperature elevation in lithotripsy and in ultrasonography" *Ultrasound in Med. & Biol.* Vol. 17, No. 7, pp. 715-721 (1991).
- [10] K. I. Carnes and F. Dunn, "Absorption of ultrasound by mammalian ovaries" *J. Acoust. Soc. Am.* 84(1), pp. 434-437 (1988).
- [11] J. L. Drewniak, L. A. Frizzell, F. Dunn, "Errors resulting from finite beamwidth and sample dimensions in the determination of the ultrasonic absorption coefficient" *J. Acoust. Soc. Am.* 88(2), pp. 967-977 (1990).
- [12] R. J. Bobber, "Underwater Electroacoustic Measurements" *Naval Research Laboratory* pp. 24-33.
- [13] R. B. Patterson "Using the Ocean Surface as a Reflector for a Self-Reciprocity Calibration of a Transducer" *J. Acoust. Soc. Am.* 42(3), pp. 653-655 (1967).
- [14] R. J. Bobber, "General Reciprocity Parameter" *J. Acoust. Soc. Am.* 39(4), pp. 680-687 (1966).
- [15] A. L. Romanoff and A. J. Romanoff "The avian egg" *John Wiley & Sons*, pp. 316, pp. 326 (1949).