J. Korean Asso. Radiat. Prot.
Vol. 24 No.1 : 17-22(1999)

■論 文■

Cell cycle evaluation of granulosa cells in the γ-irradiated mouse ovarian follicles

Jin-Kyu Kim, Chang-Joo Lee, Young-Keun Lee,
Kang-Won Song* and Yong-Dal Yoon*
Korea Atomic Energy Research Institute
**Dept. of Biology, Hanyang University*

감마선에 조사된 생쥐 난포 과립세포의 세포주기 분석

김진규 · 이창주 · 이영근 · 송강원* · 윤용달*
한국원자력연구소, *한양대학교 생물학과
(1999년 1월 8일 접수, 1999년 4월 23일 채택)

Abstract - This study was carried out to evaluate the biochemical and morphological effects of ionizing radiation on mouse ovarian follicles. Immature mice (ICR, 3 week-old) were irradiated with a dose of $LD_{80(30)}$ at KAERI. The ovaries were collected after 6 hours, 12 hours, 1 day, and 2 days post irradiation. With the morphological basis of the histological staining with hematoxylin-eosin, immunohistochemical preparation using *in situ* 3'-end labeling was evaluated. Flowcytometric evaluation of DNA extracted from the whole ovary was performed. The percentage of A_0 (subpopulation of cells with degraded DNA and with lower DNA fluorescence than G_0/G_1 cells), apoptotic, cells in the cell cycle was significantly higher in the irradiated group than in the control group. The number of *in situ* 3'-end labeled follicles increased at 6 hours post irradiation. All the analyses represented that the ionizing radiation-induced follicular atresia was taken place via an apoptotic degeneration. Such a degeneration underwent very fast and acutely. Therefore, it is concluded that the radiation-induced follicular degeneration is, like the spontaneous atresia, mediated by an acute apoptosis of follicular granulosa cells. Flowcytometric evaluation of cell cycles can make the role for quantifying the atretic follicles and understanding the mechanism of the radiation-induced cell death.
Key Words : Radiation, Ovary, Follicle, Atresia, Flowcytometry

요 약 - 이온화방사선이 동물 생식세포에 미치는 생화학적 및 형태학적 영향을 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다. 미성숙 생쥐 (ICR, 3 주령)에 γ선을 선량 $LD_{80(30)}$으로 전신조사하였다. 방사선 조사 후 6 시간, 12 시간, 1 일, 그리고 2 일 후에 난소를 적출하였다. 난소에서 추출한 과립세포의 세포주기를 DNA에 대한 유세포 분석으로 분석하였다. 세포자연사를 확인할 수 있는 A_0 세포주기는 이온화방사선이 조사된 실험군에서 대조군에 비해 현저히 높은 값을 보였다. 이온화방사선을 조사한 후 6 시간 군에서 TUNEL 면역조직화학 염색도를 나타낸 난포의 수가 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 따라서, 본 실험의 결과 방사선 조사에 의해 유발되는 난포의 퇴화는 6 시간 이내에 급성으로 진행되는 과립세포의 세포자연사에 의해 매개됨을 알 수 있었다. 유세포분석기를 이용한 세포주기 평가는 방사선에 의해 유발되는 세포자연사 기작의 이해와 퇴화난포의 정량화를 위한 수단이 될 수 있다.
중심어 : 방사선, 난소, 난포퇴화, 세포주기, 유세포분석

서 론

이온화방사선에 피폭된 세포들은 핵 및 세포질에 변화가 일어나며, 고등동물의 생식세포가 이온화방사선에 의해 사멸된다는 사실은 매우 잘 알려져 있다[1, 2]. 그리고 이온화방사선에 대한 생체의 영향을 평가하는 방법으로 생식세포에 대한 생화학적, 형태학적 효과, 세포의 치사정도, 생식능력

의 변화 및 유전적 영향 등이 연구되어 왔다[3]. X선, γ선, 중성자 및 양자 등에 대한 미성숙 난자의 감수성 역시 매우 민감하다고 보고되었다[4]. 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사에 의해 매개되며[5, 6, 7], 과립세포의 핵응축 (pyknosis)은 세포자연사 (apoptosis)의 한 과정으로 알려져 있다[8].

유세포분석기 (flowcytometer)를 이용하여 세포주기와 세포자연사에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[9]. 한 개 또는 몇 개 이내의 nucleosome 단위로 분절된 DNA는 세포막의 투과성이 증가된 경우 세포 밖으로 유출되므로 사멸세포 내의 DNA 양은 감소하게 되어, propidium iodide와 같은 DNA 결합색소로 염색한 후 유세포분석을 시행하면 사멸체의 DNA는 G_1기의 세포보다 적게된다 ("Sub-G_1 peak", A_0 세포). 세포자연사적인 DNA의 분해는 형태학적인 난포의 퇴화와 상관관계를 갖는다고 보고되었다[10]. 또한 세포 밖으로 유출된 DNA의 양을 면역학적 방법으로 검출하면 사멸의 정도를 평가 할 수 있다[11].

그러나 이온화방사선에 의해 유발되는 난포의 퇴화가 세포자연사에 의한 매개로 일어나는지에 대한 연구는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구는 γ-선에 의해 피폭된 생쥐 난소 내 과립세포에 대한 세포주기 분석과 TUNEL 방법에 의한 면역조직화학적 분석을 통해 난포의 퇴화에 따른 세포자연사의 양상을 조사하기 위해 시행되었다.

재료 및 방법

한국화학연구소에서 분양받은 생후 3 주된 생쥐 (ICR, 체중 10±1g)에 이온화방사선을 전신조사하였다. 이온화방사선 조사는 한국원자력연구소 저준위 조사시설의 감마선원 (^{60}Co, 약 1.5x10^{14} Bq, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하였다. 선원과 실험동물 사이의 거리를 106cm로 일정하게 하고 6.94x10^{-2}Gy/min.의 선량율로 $LD_{80(30)}$이 되는 8.3Gy의 선량을 조사하였다. 이때의 조사선량은 Friche dosimeter로 측정하였다[12]. 이온화방사선 조사 후 diethyl ether (Merck) 마취 하에 경추파괴로 생쥐를 도살한 후 난소를 적출하였다.

생쥐 난소를 10% neutral buffered formalin (NBF) 용액에 12시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직에서 고정액을 제거하기 위하여 1시간 동안 흐르는 물에 세척한 후 저농도에서 고농도의 ethyl alcohol 과정을 거쳐 탈수하였다. Xylene으로 alcohol을 제거한 후 조직을 투명화하여 paraffin을 침투시켜 포매하였다. 조직의 이탈을 방지하기 위하여 poly-L-lysine (Sigma)을 슬라이드에 도말 건조시켰다. 박편절단기 (Microtome, Lipshow)를 사용하여 4㎛로 박절한 후 핵과 세포질을 관찰하기 위하여 슬라이드를 xylene에 넣어 paraffin을 제거한 후 alcohol 과정을 거쳐 물에 세척하였다.

난포내 과립세포의 세포자연사 정도를 파악하기 위한 대조염색을 위해 hematoxylin-eosin (HE) 염색을 실시하였다. 즉, hematoxylin에 5분동안 핵을 염색한 후, 1% HCl-alcohol에 탈색시키고, 흐르는 물에 10분 동안 방치하였다. 그 후 eosin으로 2분간 세포질을 염색한 후 alcohol 과정을 거쳐 탈수시켰으며, xylene에서 투명시킨 후 Canada balsam (Sigma, ChemBio)으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 방법에 의한 세포자연사를 분석하기 위해 *in situ* 3' end labeling을 실시하였다. 즉, *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag: Oncor, Gaithersburg, MD)를 사용하였으며 절차는 제조회사의 방법에 따랐다. 조직절편을 xylene에서 paraffin을 제거하고 alcohol 과정을 거쳐 물에 세척한 후 슬라이드 위에 500 ㎕의 phosphate buffered saline (PBS)를 처리하여 37℃에서 30분간 배양하였다. PBS를 제거한 후에 250㎕의 proteinase K용액을 슬라이드에 떨어뜨려 37℃에서 30분간 배양한 후 물에 수세하였다. 50㎕의 TdT buffer를 처리하여 실온에서 10분간 배양한 후 TdT buffer를 제거하였으며, 50㎕의 TdT solution (TdT buffer 45㎕, biotin-dUTP 2.5㎕, TdT 2.5 ㎕)을 처리하여 37℃에서 60분간 배양하였다. TdT용액을 제거한 후 Tris buffer (pH 7.2, DAKO S-3001, TB)용액에서 15분간 배양한 후 물로 잘 세척하고, 50 ㎕의 blocking solution에 10분간 방치하였다. Peroxidase가 conjugated된 streptoavidin에 30분간 반응시키고, Tris saline에 세척하였다. 100㎕의 0.3% methyl green으로 3분간 교차염색하였으며, 염색 후 흡수종이로 슬라이드 위에 염색액을 제거하였다. 즉시 xylene과정을 거친 다음 Canada balsam으로 봉입하였다.

과립세포의 세포주기 분석을 위한 유세포분석의 절차는 다음과 같았다. NBF에 고정한 생쥐난소를 alcohol 과정을 거쳐 탈수하고 xylene 과정을 거쳐 투명화시킨 다음 paraffin에 침투시켜 block을 만들고, paraffin block을 50㎛ 두께로 박편하여 centrifuge tube에 넣은 다음 Histo-Clear (DAKO)

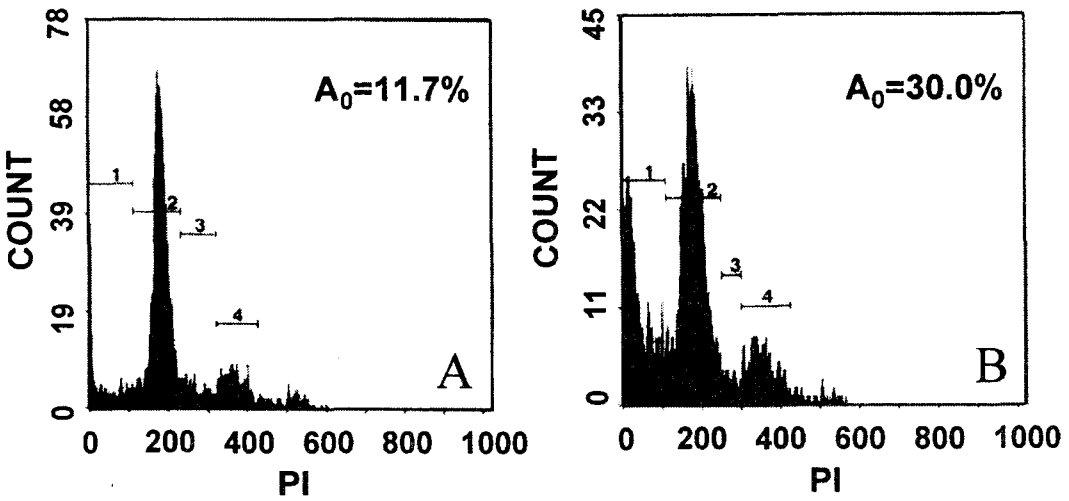

Fig. 1. Histograms of DNA extracted from granulosa cells of the immature mouse ovaries. Total DNA was extracted after 6 hours from the control (A) and the irradiated mouse ovarian granulosa cells (B). The percentage of granulosa cells containing sub-dibploid amounts of DNA (% A_0 cells) and the distribution of cells in the stage of the cell cycle were determined by DNA fluorescence flow cytometry of propidium iodide (PI)-stained nucleus of paraffin embeded cells. Total $1x10^6$ cells were counted with at least 5 times per the experimental group. Region 1 represent the portion of the granulosa cell population containing sub-diploid level of DNA (A_0). Region 2, 3, and 4 represent G_0/G_1, S, and G_2/M stage of the cell cycle, respectively. Note that region 1, which means the apoptotic cell cycle of granulosa cells, showed an acute increase at 6 hours post irradiation.

Table 1. Immunohistochemical detection of apoptosis by TUNEL in the irradiated mouse ovaries.

	0h	6h	12h	1d	2d
Control group	+	+	+	+	+
Irradiated group	+	+++	++	+	+

+++ very intensive; ++ intensive; + mild

에 30분 동안 처리하여 paraffin을 제거하였다. Paraffin을 제거한 후 무수 및 95% ethyl alcohol에 각각 20분씩 2회 처리한 후 80%, 70%, 50% ethyl alcohol의 순서대로 10분씩 처리하여 조직을 함수시켰다. DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, GIBCO)에 2회 (1.5시간) 부유시키고 미리 37℃ 수조에 넣어 가온시킨 0.5% pepsin 용액 (pH 1.5, stock 용액: pepsin 200 ㎎/PBS 40㎖)을 2.5㎖ 첨가하여 37℃ 항온기에서 수시로 흔들어 주며 30분간 방치하였다. 균질혼합기로 잘 혼합한 후, 0.025% Pepstatin (Beringer-Manheim)을 1㎖ 첨가하여 다시 흔들어 주었다. 1,500rpm으로 10분간 침전시킨 후, DPBS로 10분씩 3회 원침 수세하였다. 원심관에 buffer를 0.5㎖이상 남긴 후, RNase 300㎕를 첨가한 후 균질혼합기로 혼합하여 37℃에서 30분간 방치하였다. 53㎛ nylon mesh로 여과한 후 hemocytometer로 세포수를 계측하여 1×10^6

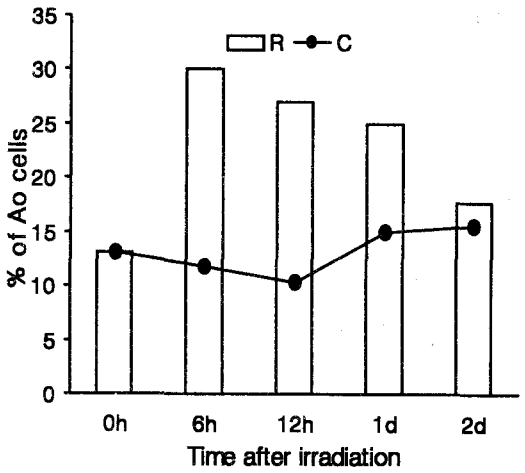

Fig. 2. Percentage of A_0 cells in the normal and irradiated mouse ovarian granulosa cells. Mice were irradiated and the ovarian granulosa cells were analysed by a flowcytometer. Percentage of A_0 cells in the irradiated mouse ovarian granulosa cells (R) became higher than that of the control (C) at 6 hours post irradiation, and gradually decreased thereafter. h, hours; and d, days.

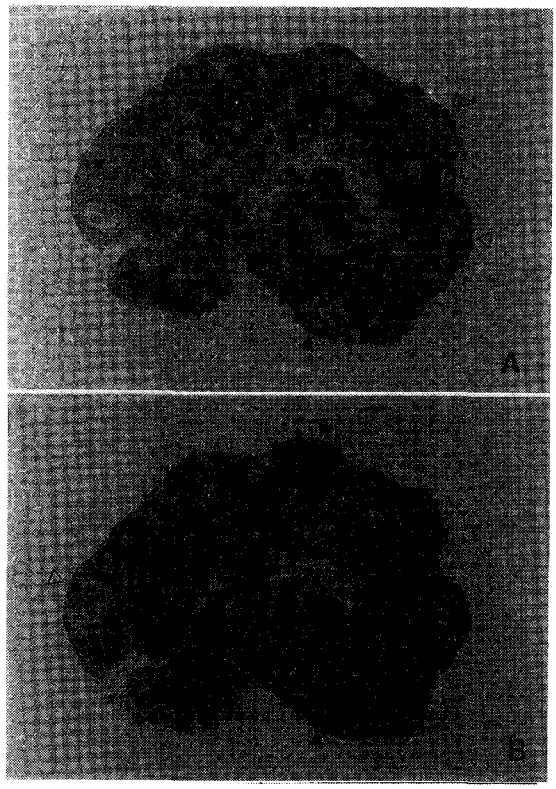

Fig. 3. Microphotographs of γ -irradiated immature mouse ovaries. After 6 hours post irradiation, ovaries were stained with hematoxylin-eosin (A) and *in situ* 3'-end labeling (B). Original magnifications, x40. Open arrows, normal follicles; black arrows, atretic follicles.

개/㎖의 세포가 되도록 하였다. A_0, G_0/G_1, S, 그리고 G_2/M 세포주기는 Guthrie 등 [9]의 방법에 따라 propidium iodide 50㎕/㎖ 첨가한 후 유세포측정기 [Flow cytometer, Coulter Epics Profile II (Hialeah FL)]로 측정하였다.

결 과

이온화방사선에 의한 난포의 퇴화가 세포자연사를 매개로 하여 일어나는지를 분석하고자 이온화 방사선에 의해 조사된 난소내 과립세포를 추출하여 세포주기를 유세포분석기로 조사하였다. 과립세포 $1x10^6$ 개를 유세포분석한 결과 (Fig. 1), H-E 염색을 기본으로 하여 비교한 방사선 조사 후 6 시간의 TUNEL 염색결과를 Fig. 3에 나타내었으며, Table 1에 요약하였다. TUNEL 염색에 의한 세포자연사를 확인한 결과, 난포의 과립세포의 핵이 분획화되는 것을 관찰할 수 있었으며, 방사선조사 후 6 시간에 대조군에 비해 현저히 많은 수의 난포가 TUNEL 면역조직화학 염색도를 나타냈다 (Table 1). 본 실험에서 확인한 대조군의 일차 난포 이상의 강소형성 난포들의 경우, 이온화방사선에 의해 유발된 퇴화된 난포에서는 TUNEL 방법에 의한 면역조직화학 염색도가 시간에 따라 일정한 값을 보였으나, 방사선 조사군의 경우 6 시간에 급격히 증가하였으며, 12시간 이 후에는 감소하여 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 즉, TUNEL 염색도를 볼 때, 방사선조사 6시간 군에서 가장 높은 값을 보였으며 12시간 군에서는 감소하였고, 1 일과 2 일에는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 세포자연사 단계를 의미하는 세포주기인 A_0 주기는 이온화방사선이 조사된 실험군에서 대조군에 비해 현저히 높은 값을 보여 이온화방사선 조사 후 6시간 군에서 대조군에 비해 약 3배의 증가를 나타내었다 (Fig. 2). 대조군에서 A_0 세포주기를 나타내는 결과는 6시간에 11.7%, 12시간 10.3%, 1일 15.0%, 2일 15.5%로 나타났으며, 이온화방사선 조사군의 경우, 6시간에

30.0%, 12시간 25.0%, 1일 20.9%, 그리고 2일에는 17.7%로 나타났다.

논 의

본 연구는 성적인 성숙이 완료되지 않은 미성숙 생쥐를 이용, 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화현상을 알아보고자 시행하였다. 따라서, 이온화방사선에 의해 유발된 퇴화 난포에 대해 유세포분석기를 이용한 과립세포의 세포주기 분석과 TUNEL 방법에 의한 면역조직화학적인 분석을 실시하였다. 이온화방사선에 대한 생체의 영향을 평가하는 방법으로 생식세포에 대한 생화학적 효과, 형태학적 효과, 세포의 치사정도, 생식능력의 변화 및 유전적 영향 등에 관하여 보고되고 있다[13]. 또한, 생식세포는 이온화방사선에 매우 큰 민감성을 갖는다고 알려져 있다[14]. 생쥐 난소에 있어, 생후 3 주령인 경우 방사선에 가장 큰 민감도를 나타낸다고 보고되었으며[15], 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화는 난포성숙호르몬에 의해 억제된다는 보고가 있다[16]. 본 연구에서 사용한 이온화방사선의 선량은 $LD_{80(30)}$인 8.3 Gy의 준치사선량으로서 난포의 퇴화가 이온화방사선에 의해 급성으로 진행된 점[16]에 비추어 볼 때 생식세포에 대한 이온화방사선의 직접적인 영향을 평가하기 위해서는 고선량 조사의 적정성이 인정될 수 있다.

TUNEL 방법은 작은 조각으로 잘려진 DNA의 3'-말단에 결합함으로써 세포자연사가 일어난 세포에 염색된다. 본 실험에서 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화가 세포자연사에 의한 것임을 보여주는 TUNEL 염색도가 방사선 조사후 6 시간에 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 즉, TUNEL 방법에 의해 조직절편내 세포자연사의 확인에 있어서도 6 시간에 대조군에 비해 많은 난포가 퇴화되었으며, TUNEL의 염색도도 진하게 나타났다. 본 실험의 결과, 일반적인 조직학적 관찰 결과[18]와 마찬가지로 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사를 매개로 하여 일어난다는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 난포의 퇴화는 이온화방사선 조사 후 6 시간에 급격히 일어나는 것으로 생각된다.

퇴화난포 과립세포의 세포주기에 대한 유세포분석이 보고되고 있다[9]. 세포자연사하는 세포는 DNA가 분해되어 세포 밖으로 유출되기 때문에 DNA-특이적인 형광염료에 대한 염색도가 계속 감소함으로써 확인될 수 있다. 반면 괴사세포(necrotic cell)의 경우에는 DNA의 염색도가 즉각적인 감소를 보이지 않기 때문에 정상과 괴사세포간의 차이를 쉽게 구별할 수 없다[17]. 유세포분석에 의해 세포주기를 측정한 본 실험의 결과 dominant peak 및 이의 우측에 있는 작은 peak를 볼 수 있었다. 첫 번째 peak는 휴지기 (G_0)와 DNA 합성전기 (presynthetic phase: G_1) 세포로서 DNA 양은 2N이다. G_0/G_1 peak 우측에 있는 작은 peak는 G_2/M peak로 세포분열직전 (postsynthetic phase: G_2) 에 있거나 세포분열을 하고 있는 세포에 해당하며 G_0/G_1에 있는 세포의 두배의 DNA 양과 염색체수 (4N)를 가지고 있는데, 이 둘은 유세포 측정법으로 분리할 수 없다. G_0/G_1과 G_2/M peak 사이의 channel에 있는 세포들은 G_0/G_1과 G_2/M에 있는 세포의 중간 정도의 DNA 양을 갖고 있으며 DNA 합성 주기의 DNA 복제 또는 정지기 S 세포들이다[17]. A_0세포는 분해된 DNA 그리고 형광염색도가 G_0/G_1 세포보다 낮은 세포의 집단으로서 본 실험에서 방사선 조사군의 경우 대조군에 비해 약 3배의 높은 양을 나타냈다. 즉, 과립세포의 유세포분석 결과 세포자연사를 확인할 수 있는 세포주기인 A_0주기는 이온화방사선을 조사받은 군에서는 6시간에 현저히 높은 값을 보였다. 이는 이온화방사선에 의해 과립세포가 조사 후 6시간 만에 급속히 세포자연사한다는 것을 의미한다.

따라서, 유세포분석과 TUNEL 방법에 의한 면역조직화학적 검사를 통해서도 이온화방사선에 의한 난포의 폐쇄가 과립세포의 세포자연사에 의해 매개됨을 확인할 수 있었다. 특히 과립세포에 대한 세포주기 분석은 난포 내 세포자연사의 기작을 이해하는 데 필요한 기초자료를 제공할 수 있는 수단이 될 수 있음을 확인하였다.

결 론

이온화방사선에 조사된 생쥐 난소에 대한 HE 염색을 대조하여 TUNEL 면역조직화학염색으로 관찰한 결과 정상 난소에 비해 조사 6 시간에 난포들이 급성으로 퇴화되는 것이 확인되었으며, HE 염색에 의해 확인되는 세포자연사하는 과립세포들에서 TUNEL 염색도를 확인할 수 있었다. 유세포분석을 통해서도 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화는 급성으로 진행되며 세포자연사를 의미하는 A_0 주기를 갖는 세포의 급격한 증가로 보아 자연적인 난포퇴화와 마찬가지로 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화 역시 과립세포의 세포자연사를 매개로 하여 일어남을 확인할 수 있었으며, 이러한 난포의 퇴화는 이온화방사

선에 의해 급성으로 일어난다는 알 수 있었다. 유세포분석기를 이용한 세포주기 평가는 방사선에 의해 유발되는 세포자연사 기작의 이해와 퇴화난포의 정량화를 위한 중요한 수단이 될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. I. Ramzy, "Effects of radiation and chemotherapy." in : *Clinical Cytopathology and Aspiration Biopsy*, Fundamental Principles and Practice, Appleton, Lange, Norwalk, Connecticut, pp107-116(1990).
2. R. L. Dobson and J. S. Felton, "Female germ cell loss from radiation and chemical exposures." *Am. J. Indust. Med.* **4**, 175-190(1983).
3. P. J. Lindop, "The effects of radiation on rodent and human ovaries." *Proc. Soc. Med.* **62**, 144-148(1969).
4. T. Straume, R. L. Dobson and T. C. Kwan, "Neutron RBEs and the radiosensitive target for mouse immature oocyte killing." *Radiat. Res.* **111**, 47-57(1987).
5. A. J. W. Hsueh, H. Billig and A. Tsafriri. "Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process." *Endocrine Rev* **15**, 707-724(1994).
6. J. L. Tilly, K. I. Tilly, M. L. Klenton and A. L. Johnson. "Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels." *Endocrinology* **136**, 232-241(1995).
7. A. L. Johnson, J. T. Bridgham, J. P. Witty and J. L. Tilly. "Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression." *Endocrinology* **137**, 2059-2066(1996).
8. A. Gougeon. "Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses." *Endocrine Rev* **17**, 121-155(1996).
9. H. D. Guthrie, G. R. Welch, B. S. Cooper, A. D. Zakaria and L. A. Johnson, "Flow cytometry determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cell to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig." *Biol. Reprod.* **50**, 1303-1311(1994).
10. B. R. Cowden and S. K. Curtis, "Microfluorometric investigations of chromatin structure." *Histochemistry* **72**, 11-23(1981).
11. V. N. Afamasyev, B. A. Korol, N. Matylevich, V. A. Pechatnikou, S. R. Umansky, The use of flow cytometry for the investigation of cell death. *Cytometry* **14**, 603-609(1993).
12. W. H. Niels and J. B. Roger, "Manual on Radiation Dosimetry." Marcle Dekker Inc., New York(1970).
13. J. S. Shin, Y. K. Lee, M. K. Kim and Y. D. Yoon, "Changes of serum steroid level in the whole-body irradiated rat." *Kor. J. Fertil. Steril.* **21**, 297-303(1994).
14. B. H. Erickson, "Effects of ionizing radiation and chemical on mammalian reproduction." *Vet. Hum. Toxicol.* **27**, 409-416(1985).
15. S. Mathur, K. Nandchahal, H. C. Bhartiya. "Radioprotection by MPG of mice ovaries exposed to sublethal gamma radiation doses at different postnatal ages." *Acta Oncologica* **30**, 981-983(1991).
16. J. K. Kim, C. J. Lee, Y. K. Lee, K. W. Song and Y. D. Yoon, "Effects of follicle stimulating hormone on γ-ray irradiated immature mouse ovarian follicles." *J. Korean Asso. Radiat. Prot.* **23**, 89-96(1998).
17. Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota and F. Traganos. "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* **13**, 795-808 (1992).
18. J. K. Kim, C. J. Lee, K. W. Song, B. R. Do and Y. D. Yoon, "γ-Radiation accelerates follicular atresia in immature mice" *In Vivo* **13**, 21-24(1999).