

The Effects of Cyclophosphamide on Apoptosis in Murine Lymphoma

Jehoon Yang, Hyung Joon Bae¹, Deuk Rok Seo², Phil Ok Koh² and Soo Dong Kwak²

Department of Organ Physiology, Asan Institute for Life Sciences, Seoul 138-740, Korea

Department of Medical Technology, Seoul Health College, Sungnam, 461-713, Korea¹

*Department of Veterinary Histology, Gyeongsang National University^{**}, Jinju 660-701, Korea²*

Whereas apoptosis is a critical mode of cell deletion in normal organism development, apoptotic cells are also observed in tumor therapy. We therefore investigated the expression of apoptotic cells induced as a function of time and dose in murine A-20 lymphoma treated with cyclophosphamide in vivo, by H&E and TUNEL method. The percent of apoptotic cells were scored from tumor section using TUNEL method. The expression of apoptotic positive cell was determined over a 10-day period following treatment of the mice with 200 mg/kg. Apoptosis increased further with time, reaching a peak value between 12~24 hr (scored $6.7 \pm 1.0\% \sim 6.1 \pm 0.7\%$), and then slowly declined to background levels by 10 days after treatment. The dependence of induction of apoptosis on the dose of cyclophosphamide was determined by treatment with 50, 100, or 200 mg/kg at 12 hr after treatment. Apoptosis was dose dependent in that as the dose was increased the percentage of apoptosis increased. However, the increase in apoptosis at the lower dose used (50 mg/kg) was higher on a per unit dose basis than that at the higher dose used (200 mg/kg). This result show that the alkylating agent cyclophosphamide strongly induces apoptosis in murine lymphoma.

Key Words: Apoptosis, Cyclophosphamide, Lymphoma, TUNEL method

서 론

세포의 증식과 죽음은 서로 균형을 이루어 개체의 형태학적 구조를 유지하나 이 중 한쪽의 균형이 깨어지면 질병으로 이어질 수 있다. 세포죽음에 관하여서는 단순히 세포괴사라는 형태로 이해되어 왔으나, 근래에는 apoptosis라는 세포죽음의 특별형태에 관심을 갖게 되었다. 이러한 apoptosis 현상은 정상적인 발육과정에서 각 조직의 발육과 퇴화의 동적인 균형을 이루어 정상적인 조직 또는 장기의 구조를 형성하고 유지하는데 크게 기여하며, 생체의 호르몬 의존성, 각종 퇴행성 변화나 종양조직의 성장 및 소멸과정에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{4,21}.

Apoptosis가 형성되는 과정에는 여러 가지 화학적 인자들과 종양유전자 산물이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 apoptosis가 억제되어 암이 생긴다는 개념을 이용하여 임상적 치료에 관심을 갖게 되었다. 즉, apoptosis를 항진시킴으로써 주위의 파괴와 염증을 유발하지 않으면서 암세포를 공격하기 때문에 종양치료에 적용하면 훌륭한 항암요법으로 사용할 수 있다는

것이다^{2,8,10}.

종양치료에 있어서 Habs 등⁹은 DENA 투여 후 생성된 rat의 간암에서 alcohol을 투여하여 apoptosis가 유도되어 간의 중량이 감소하였다고 하였으며, Stephens 등¹⁹은 mice 난소암에서 10 Gy 방사선 조사 후 4~6시간 후에 apoptosis를 일으키는 세포가 약 30%로 증가하였다고 보고하였다. 또한 화학요법제로 널리 쓰이고 있는 etoposide, cisplatin, doxorubicin, bleomycin, cyclophosphamide 등 또한 종양조직에서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있는데^{14,20}, Ormerod 등¹⁶은 시험관내 난소암에서 cisplatin 투여가, Meyn 등¹³은 유방암과 난소암에서 cyclophosphamide 투여가 투여용량에 비례하여 apoptosis를 유도하여 항암효과를 나타낸다고 보고하였다. 이 중 cyclophosphamide는 알킬화 약물로서 강력한 면역억제작용으로 인하여 면역매개질환의 치료와 장기이식시 거부반응 억제 등에 사용되고 있다. 그러나 시험관내 정상 및 암세포에서의 apoptosis 유도에 관해서는 많은 보고가 있으나^{11,12}, 생체내 apoptosis 유도에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 nude mouse에 lymphoma cell을 이식한 후 cyclophosphamide를 투여하여 투여용량 및 시간경과에 따른 종양의 성장 및 종양조직에서의 apoptosis 발현 양상을 조사하였다.

*는 문 접수: 2001년 11월 20일

수정재접수: 2001년 12월 19일

†별책 요청 저자: 양제훈

재료 및 방법

1. 실험동물

아산생명과학연구소 무균실 (SPF room)에서 사육한 7~8주령의 암컷 Balb/c nude mouse를 분양 받아 9개군으로 분류하였으며 각 군당 5마리씩 총 45마리를 사용하였다. 사육 및 실험 기간의 사육실 환경은 온도 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$ 를 유지하였고, 방사선 처리된 사료와 멸균된 식수를 자유로이 섭취하도록 하였으며, 깔짚과 우리는 주 2회 고압멸균하여 교환하였다.

2. 종양세포의 배양 및 이식

실험대상 세포주로는 Balb/cAnN mouse 유래의 A-20 lymphoma cell line을 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양 받아 10% 우태혈청, 100 U/ml의 penicillin 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin 그리고 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 glutamine을 첨가한 RPMI1640 (GIBCO Lab, USA)을 배양액으로 이용하여 5% CO_2 의 존재 하에 37°C 항온배양기에서 배양하였다.

종양세포를 mouse에 접종하기 전에 원심분리하여 배양액을 따라내고 trypsin 10 ml 및 배양액 10 ml과 혼합하여 원심분리하였다. Trypsin 처리된 세포 성분을 다시 PBS와 함께 원심분리하여 세척하고, PBS에 재부유시켜 혈구계로 세포농도를 측정하여 농도가 2×10^7 개/ml가 되도록 조절한 후 nude mouse 등쪽 피하조직에 한 마리 당 2×10^6 개/ml의 세포를 25 gauge 주사기로 주입하였다.

3. 약물 투여 및 조직학적 검사

종양의 크기는 매일 digital calipers (Mitutoyo, Japan)로 측정하였으며 장경이 10 mm에 도달하였을 때 cyclophosphamide (이하 CPA라 함; Sigma, USA)를 멸균된 생리식염수에 50, 100, 200 mg/kg 용량으로 용해하여 0.1 ml씩 복강내 투여하여 약물용량 및 투여 후 시간경과에 따른 종양의 크기를 매일 측정하여 종양의 성장 속도를 기록하였다. 대조군에서는 생리식염수만을 투여하였다.

조직학적 검사를 위하여 CPA 200 mg/kg 투여군에서 약물 투여 6, 12, 24, 48, 92시간 그리고 10일 후에 실험동물을 희생시킨 후 종양조직을 적출하여 10% neutral buffered formalin에 48시간 이상 고정하였다. 이후 탈수, 침투 등 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 4 μm 의 박절편을 만들어 H&E 염색을 실시하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 약물용량에 대한 종양의 성장을 관찰하기 위하여 역시 종양의 장경이 10 mm에 도달하였을 때 CPA를 50, 100, 200 mg/kg 용량으로 투여한 후 종양조직에서 apoptotic cell death가 가장 높게 나타난 12시간 후에 종양조직을 적출하여 CPA 투

여용량에 대한 종양조직의 변화를 관찰하였다.

4. *In situ* end labeling을 이용한 apoptosis 관찰

Apoptosis가 진행된 세포를 관찰하기 위하여 ApopTag *in situ* apoptosis detection kit-peroxidase (Oncogen, USA)를 사용하여 CPA 200 mg/kg 투여 후 6, 12, 24, 48, 92시간 그리고 10일 경과 후에, CPA 50, 100, 200 mg/kg 용량으로 투여한 후 apoptotic cell death가 가장 높게 나타났던 12시간 경과 후에 종양조직을 적출하여 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling) test를 실시하였다. 4 μm 로 절편된 조직을 탈파라핀 과정을 거친 후 proteinase K를 10 mM Tris/HCl (pH 8)에 20 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 희석하여 실온에서 20분간 처리하였다. 조직내의 내인성 과산화효소를 비활성화 시키기 위하여 실온에서 3% H_2O_2 /methanol에 5분간 반응시킨 후 digoxigenin-dUTP를 부착시킨 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 효소를 TdT labeling reaction mixture에 1:20의 비율로 혼합하여 점적하고 humidified chamber에 넣은 후 37°C incubator에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 조직을 stop buffer에 5분간, blocking buffer에 10분간 처리한 후 다시 blocking buffer에 1:50으로 희석시킨 conjugate를 점적하여 humidified chamber에 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨 다음 0.005% diaminobenzidine (DAB)에 0.01% H_2O_2 를 첨가하여 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 염색의 판정은 염색이 잘된 다섯 부위를 선택하여 고배율(x400)에서 종양세포 1000개를 세어 세포핵이 짙은 갈색으로 발색되는

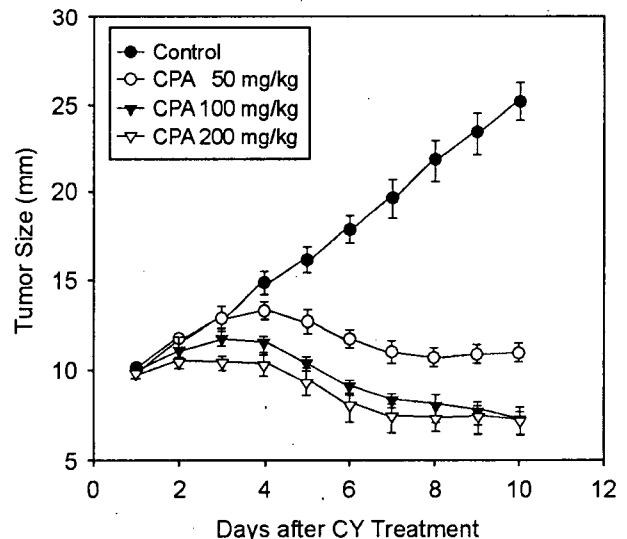


Fig. 1. Effect of cyclophosphamide on the growth of A-20 murine lymphoma. A-20 lymphoma cells (2×10^6 cells) were injected into the back of Balb/c nude mice. When tumor size reached 10 mm in diameter animals were treated i.p. with different doses of cyclophosphamide. Caliper measurement were performed everyday.

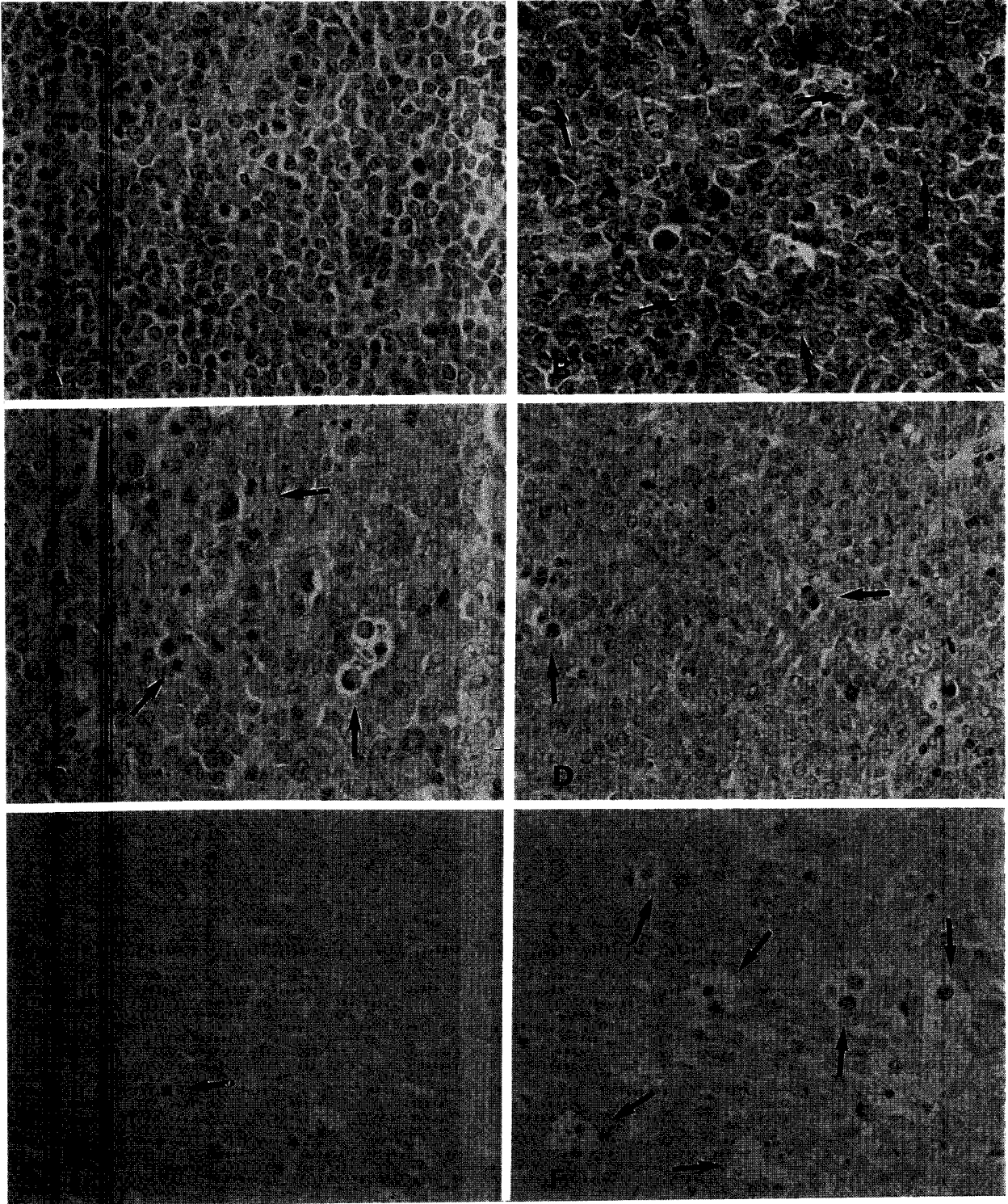


Fig. 2. Photomicrographs of the murine lymphoma tissues stained with H&E (A~D) and TUNEL (E, F) method. **B** and **F** (12 hr), **C** (48 hr), **D** (10 day) after treatment with cyclophosphamide 200 mg/kg, **A** and **E** vehicle alone. Arrows indicate to apoptotic cells. Note some of apoptotic cells show fragmentation of the condensed nucleus into multiple apoptotic bodies. x200.

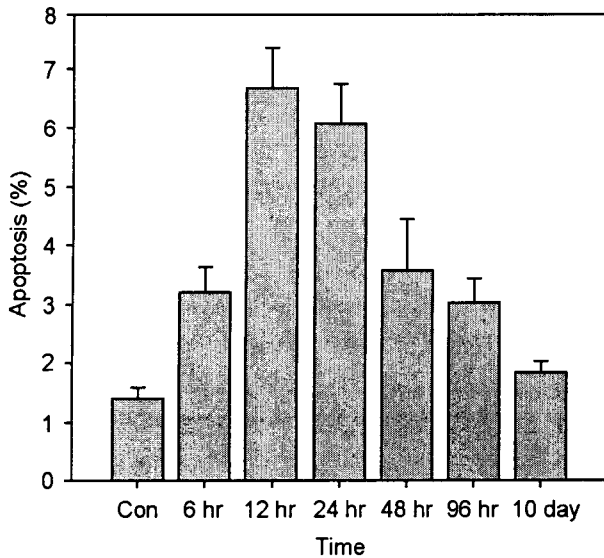


Fig. 3. The expression of apoptosis development in the A-20 tumor treated with single dose of cyclophosphamide 200 mg/kg i.p. given at time zero. Mice were sacrificed at different times following treatment and apoptosis scored from stained TUNEL method of the tumor tissue.

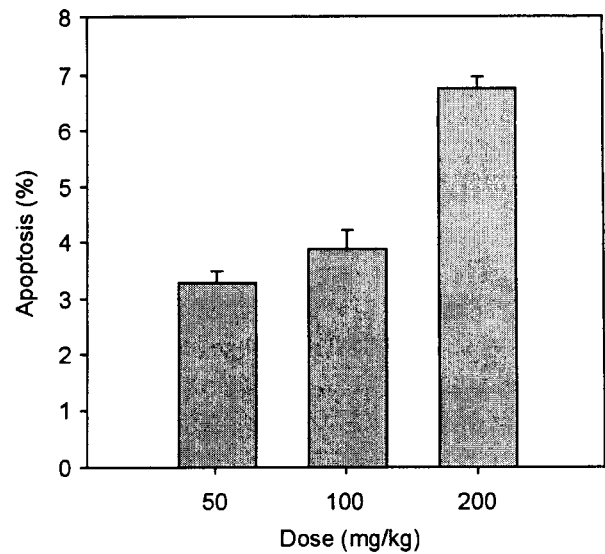


Fig. 4. Dose-response relationships for the A-20 tumor treated with different doses of cyclophosphamide. Mice were sacrificed at 12 hr times following treatment and apoptosis scored from stained TUNEL method of the tumor tissue.

세포를 양성반응세포로 간주하여 백분율을 구하였다.

결 과

1. 종양의 성장

Nude mouse 등쪽 피하조직에 A-20 세포 2×10^6 개를 주입한 후 약 1주일 경에 대부분의 동물에서 종양이 1~2 mm의 작은 결절로 축적되었고, 이후 잘 분계되는 원형 또는 난원형의 피하종양으로 성장하기 시작하였다. 종양세포 투여 약 2주 후에 종양의 장경이 10 mm에 도달하였는데, 이때 CPA를 50, 100 그리고 200 mg/kg 용량으로 투여하였다. 종양의 크기는 대조군에서는 지속적으로 증가하는 반면, CPA 투여군에서는 투여 후 4일경까지는 종양의 크기가 증가하였으나 이후에는 투여용량에 비례하여 지속적으로 감소하였다 (Fig. 1).

2. 조직학적 변화

Nude mouse 피하조직에서 주입한 후 성장한 대조군의 종양 조직을 H&E 염색을 실시하여 조사한 결과 조직학적으로 악성 림프종의 전형적인 양상을 보였다. 종양세포는 원형, 난원형 또는 다각형의 큰 세포들이 밀도 높게 배열되어 있었고, 둥글고 큰 핵을 가지고 있었으며, 세포분열 소견을 빈번하게 나타내었다 (Fig. 2, A). CPA 약물을 투여한 군에서 종양조직은 일부의 세포에서 apoptotic cell death의 조직학적 특징인 세포질의 호산성 변화, 핵축축, 세포 주변부에 농축된 핵 그리고 확실한 호산성 구형의 소체로 보이는 핵분절을 지닌

apoptotic body 등을 관찰할 수 있었다. Apoptosis 소견은 CPA 투여 6시간부터 나타나기 시작하였으며, 투여 12시간 후에 가장 많이 관찰되었고 24시간 후까지 높은 빈도로 발현되다가 이후 점차 감소하였는데 투여 10일 후까지도 일부의 세포에서 apoptosis를 관찰할 수 있었다. 12시간 후부터는 일부의 조직에서는 염색세포의 침윤도 볼 수 있었으며, apoptosis에 의한 세포의 소실이 24시간 후부터는 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 2, B~D).

3. *In situ* end labeling을 이용한 apoptosis 확인

CPA 200 mg/kg 투여 후에 6, 12, 24, 48, 92시간 그리고 10일 경과 후에 종양조직을 취하여 TUNEL 방법을 실시한 결과 대조군의 apoptosis 양성반응세포의 비율은 $1.4 \pm 0.3\%$ 였으나 6시간 경과 후에는 $3.2 \pm 0.5\%$ 로 점점 증가하였고, 12시간 후에는 $6.7 \pm 1.0\%$ 로 가장 많은 양성반응을 나타냈으며, 이후 24시간까지 $6.1 \pm 0.7\%$ 로 높게 지속되다가 점차 감소하여 48시간 후에는 $3.6 \pm 0.6\%$, 96시간 후에는 $3.1 \pm 0.3\%$ 로 떨어졌다. 10일 후에는 양성반응세포의 비율이 $1.9 \pm 0.4\%$ 로 대조군과 비슷한 수치를 보였다 (Fig. 2, Fig. 3).

CPA 투여용량에 따른 apoptosis 양성반응세포를 관찰하기 위하여 CPA를 50, 100, 200 mg/kg 용량으로 투여한 후 양성반응이 가장 많이 나타난 투여 12시간 후에 종양조직을 조사한 결과 각각 3.3 ± 0.6 , 3.9 ± 0.9 , $6.7 \pm 1.0\%$ 로 투여용량에 비례하여 200 mg/kg에서 높게 나타났다. 그러나 단위용량에 대한 apoptosis 양성반응세포의 비율은 50 mg/kg에서 보다 높게 나타났다 (Fig. 4).

고 찰

세포사망에 대한 기전으로서 apoptosis는 괴사와 구별되어 세포가 생존하는 환경에서 특정한 세포내 외적 자극에 따라 유전자 표현을 통하여 죽음에 이르는 과정으로 생체의 균형을 유지하는데 꼭 필요한 기능이며, 유핵세포사망의 가장 중요한 기전이다. 이러한 apoptosis는 형태발생 (morphogenesis), 조직의 위축 (atrophy), 배아형성 (embryogenesis), 사이토카인 (cytokine), 림프독소 (lymphotoxin), glucocorticoid 및 화학요법제 치료 후 종양퇴행시에도 나타난다고 알려져 있다^{1,7,17,18}. Apoptosis의 조직학적 소견은 세포막의 농포 (membrane blebbing), 세포질내 공포 (vacuole), 염색질 농축 (chromatic condensation), 핵분절 (nuclear fragmentation), 그리고 아포토시체 (apoptotic body)의 세포질내에 관찰 등이다^{4,21}.

항암제 투여에 의한 apoptosis는 Hendry 등⁹에 의해서 처음 보고된 이래 여러 종양세포에서 많은 연구가 이루어져 왔다. 즉 항암제 투여에 의해 apoptosis가 유도되며 apoptosis가 항암제에 의한 세포사의 가장 주된 기전으로 알려져 왔다^{3,10}. 본 연구에서도 항암제 CPA 투여에 의한 암의 치료과정에서 발생하는 종양조직의 변화와 apoptosis의 관련성을 알아보기 위하여 nude mice에 A-20 lymphoma cell을 이식한 후 형성된 종양에 CPA를 투여하여 나타난 종양조직의 변화를 H&E 염색과 TUNEL 방법에 의하여 조사한 결과 항암제 CPA 투여가 종양조직에서 apoptosis를 유도함으로써 종양의 성장을 억제시키는 것임을 알 수 있었다.

일반적으로 apoptosis가 진행중인 세포를 현미경상에서 관찰하는 것은 어려운 일이었으나, 1992년 Gavrieli 등⁵은 절단된 DNA를 동정할 수 있는 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 방법을 개발하였는데, 이의 원리는 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)에 의해 DNA의 3'-OH 말단에 biotin-16-dUTP를 결합시킴으로써 biotinylated polydeoxynucleotide polymer를 합성하고 다시 peroxidase가 결합된 avidin에 의해 증폭시킴으로써 조직학적으로 용이하게 검출하는 것이다. 본 연구에서 TUNEL 방법에 의한 apoptosis 발현을 조사한 결과 CPA 투여 후 6시간에 apoptosis 양성반응을 보인 세포의 비율이 증가함을 관찰할 수 있었고, 투여 후 12시간에는 6.7±1.0%, 24시간에는 6.1±0.7%의 세포들이 양성반응을 보여 12~24시간에 가장 높은 비율을 나타내었으며, 10일 후에는 약 1.9±0.4%로 대조군 수준으로 복귀되었다. 이는 Meyn 등¹²이 보고한 CPA 투여 후 유방암에서의 8~12시간 보다는 약간 늦게, 난소암의 12~18시간과는 유사하였으며, Stephens 등¹⁹의 난소암에서 방사선 조사 후 apoptosis 소견을 보인 세포는 1시간 후부터 관찰되기 시작하여 4시간 후에 최고치에 도달하였으며 1일 후에는 대조군의 수준으로 복귀되었다는

보고보다는 다소 늦었다. 이러한 결과는 방사선 치료시 모든 종양세포들이 동일한 시간동안 같은 양의 방사선을 조사 받는 것과는 달리 화학요법제인 CPA는 간에서 대사와 활성화, 종양 조직의 위치, 종양조직내의 혈관 분포의 차이에 등으로 인하여 종양세포들이 약물 노출되는 시간, 양 그리고 경로 등이 상이하기 때문인 것으로 사료된다. 아울러 CPA 투여나 방사선 조사 후에 빠른 시간내에 apoptosis가 높게 발현되는 것은 이들이 공통적으로 세포손상의 초기에 apoptosis를 유도함으로써 항암효과를 발현하는 것으로 생각된다.

세포사가 최고치에 도달했을 때 apoptosis 비율은 6.7±1.0%로서 Meyn 등¹²의 유방암에서 약 32%, 난소암에서 약 28%, Stephens 등¹⁹의 방사선 10 Gy 조사 후 난소암에서의 30% 보다 낮게 나타났는데 이러한 차이는 기존의 보고들이 생화학적 분석이나 H&E 염색 후 조직학적으로 확실한 형태를 취한 apoptosis를 조사하였기 때문인 것으로 사료된다. 이와 관련하여 Negoescu 등¹⁵은 조직학적으로 apoptosis 양상을 보인 세포의 단지 20% 이하만이 TUNEL 방법에 의해서 양성반응을 나타낸다고 보고한 바 있다.

CPA 투여용량에 따른 apoptosis 발현 양상을 관찰하기 위해 CPA를 50, 100, 200 mg/kg 용량으로 투여 후 양성반응이 가장 많이 나타난 12시간 후에 종양조직의 apoptosis 양성반응세포의 비율을 조사한 결과 각각 3.3±0.6, 3.9±0.9, 6.7±1.0%로 나타났다. 이는 CPA가 투여용량에 비례하여 apoptosis를 유도하는 것임을 의미하나, 단위용량에 대한 양성반응세포의 비율은 비교적 적은 용량인 50 mg/kg에서 높게 나타났다. 이는 CPA를 비롯한 대부분의 화학요법제들이 종양조직뿐만 아니라 정상세포에게도 손상을 주기 때문에 약물 투여용량결정에 있어서 고려해야 할 사항으로 사료된다.

이상에서와 같이 lymphoma cell을 nude mouse에 접종한 후 형성된 종양조직에 대한 CPA의 항암효과는 apoptosis 유도에 의한 것이며, 이러한 apoptosis의 발현 양상은 투여용량에 비례하여 증가하였으나 투여 단위당 양성반응세포는 비교적 적은 용량인 50 mg/kg에서 높게 나타났고, CPA 투여 후 12~24시간에 가장 활발한 apoptosis가 관찰되는 것으로 보아 CPA 투여에 의한 apoptosis는 종양세포 초기 손상에 관여하는 급성 반응으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Arends MJ, Morris RG and Wyllie AH (1990): Apoptosis. The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology*, **136**(3): 593-608.
- 2) Bursch W, Oberhammer F and Schulte-Hermann R (1992): Cell death by apoptosis and its protective role against disease. [Review] [54 refs] *Trends in Pharmacological Sciences*, **13**

- (6): 245-251.
- 3) Columbano GM, Zedda AI and Konishi Y (1996): Effects of cell proliferation and cell death (apoptosis and necrosis) on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **17(3)**: 395-400.
 - 4) Duvall E and Willie AH (1986): Death and the cell. *Immunol Today*, **7**: 115-119.
 - 5) Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, **119(3)**: 493-501.
 - 6) Habs M and Schmahl D (1981): Inhibition of the hepatocarcinogenic activity of diethylnitrosamine (DENa) by ethanol in rats. *Hepato-Gastroenterology*, **28(5)**: 242-244.
 - 7) Harmon JM, Norman MR, Fowlkes BJ and Thompson EB (1979): Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *Journal of Cellular Physiology*, **98(2)**: 267-278.
 - 8) Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS and Berchuck A (1995): Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. *Obstetrics & Gynecology*, **85(6)**: 1007-1010.
 - 9) Hendry JH and Potten CS (1982): Intestinal cell radiosensitivity: a comparison for cell death assayed by apoptosis or by a loss of clonogenicity. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics*. *Chemistry & Medicine*, **42(6)**: 621-628.
 - 10) Kerr JFR, Winterford CM and Harmon BV (1994): Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**: 2013-36 Garvrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**: 493-501.
 - 11) Klasa RJ, Bally MB, Ng R, Goldie JH, Gascoyne RD and Wong FM (2000): Eradication of human non-Hodgkin's lymphoma in SCID mice by BCL-2 antisense oligonucleotides combined with low-dose cyclophosphamide. *Clinical Cancer Research*, **6(6)**: 2492-2500.
 - 12) Lee JH, Park JH and Yang MH (1997): The effect of cyclophosphamide on Fas-mediated apoptosis. *Journal of Korean Medical Science*, **12(3)**: 185-189.
 - 13) Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR and Milas L (1994): Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, **33(5)**: 410-414.
 - 14) Mohammad RM, Wall NR, Dutcher JA and Al-Katib AM (2000): The addition of bryostatin 1 to cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) chemotherapy improves response in a CHOP-resistant human diffuse large cell lymphoma xenograft model. *Clinical Cancer Research*, **6(12)**: 4950-4956.
 - 15) Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C and Brambilla E (1996): *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **44(9)**: 959-968.
 - 16) Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D and Harrap KR (1994): Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Experimental Cell Research*, **211(2)**: 231-237.
 - 17) Ray PK, Das T, Sa G, Ghosh AK and Chattopadhyay S (2000): Protection of apoptotic cell death by protein A. [Review] [44 refs] *Apoptosis*, **5(6)**: 509-514.
 - 18) Shigeki T, Kensuke H, Makio T. and Kunio D (1997): Apoptosis of murine hepatocytes induced by high doses of galactosamine. *J Vet Med Sci*, **59(9)**: 785-790.
 - 19) Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, Milas L and Meyn RE (1993): Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiation Research*, **135(1)**: 5-80.
 - 20) Story MD, Mirkovic N, Hunter N and Meyn RE (1999): Bcl-2 expression correlates with apoptosis induction but not tumor growth delay in transplantable murine lymphomas treated with different chemotherapy drugs. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, **44(5)**: 367-371.
 - 21) Wyllie AH (1993): Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). [Review] [61 refs] *British Journal of Cancer*, **67(2)**: 205-208.