

감마선을 조사한 ICR 마우스 정세관에서 apoptosis 발생 평가

장종식 · 김중선¹ · 김종춘¹ · 김성호^{1*}

경북대학교 축산학과, ¹전남대학교 수의과대학 동물의학연구소

Received March 5, 2009 / Accepted March 17, 2009

Evaluation of Radiation-induced Apoptosis in Seminiferous Tubule of ICR Mouse after Gamma Irradiation. Jong Sik Jang, Joong Sun Kim¹, Jong Choon Kim¹ and Sung Ho Kim^{1*}. *Department of Animal Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea, ¹Animal Medical Center, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea* - The killing of male germ cells by radiation and other toxicants has recently been attributed to apoptosis, but a critical evaluation of the presence of the different features of apoptosis in each epithelial stage has not been performed. In this study, mouse testes exposed to radiation were examined by light microscopy and terminal transferase-mediated end labeling (TUNEL) with periodic acid-Schiff (PAS) stains to determine whether the cells were apoptotic according to several criteria. Apoptosis was easily recognized by the presence of peroxidase-stained, entirely apoptotic bodies. In the TUNEL-positive cells or bodies, the stained products correlated precisely with the typical morphologic characteristics of apoptosis as seen at the light microscopic level. The changes that occurred from 0 to 24 hours after exposing the mice to 2 Gy of gamma-rays (2 Gy/min) were examined. The numbers of apoptotic cells reached a peak at 12 hours after irradiation and then declined. The mice that received 0-8 Gy of gamma-rays were examined 8 hours after irradiation. Dose-response relationships were generated for each stage of the epithelial cycle by counting TUNEL-positive cells. The dose-response curves were linear-quadratic [$y = (-0.014 \pm 0.009)D^2 + (0.31 \pm 0.697)D + 0.3575$. Where y = the number of apoptotic cells per seminiferous tubule, and D = the irradiation dose in Gy, $r^2 = 0.9$] and there was a significant relationship between the frequency of apoptotic cells and the radiation dose. Although the maximum response was produced by 8 Gy, even 0.5 Gy induced marked changes. These changes were most pronounced in B spermatogonia of stage V and the spermatocyte at the mitotic cells of stage XII.

Key words : Gamma-ray, apoptosis, seminiferous tubule, epithelial stage

서 론

Apoptosis는 생리학적인 조절에 의해 세포가 자연 소멸되는 현상으로 정상 또는 비정상적인 내·외부의 자극에 대한 반응으로 나타나며, 세포내 항상성을 유지할 수 없을 정도의 심각한 외부적 손상을 받았을 때 나타나는 괴사와는 구별된다[2,15]. Apoptosis는 여러 가지 생화학적 특징이 관찰되어 왔으며, 형태학적으로 핵의 응축, 염색체의 변화, 핵파편의 모양, 세포질의 산성호성 등의 일반적 변화 관찰 및 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay와 같은 DNA 분절을 확인하는 in situ end labeling 방법으로 확인 가능하다[4,9].

고환은 방사선에 가장 민감한 장기 가운데 하나이며 저선량 방사선에도 고환의 기능 및 형태에 변화를 주게 된다. 방사선의 조사는 고환세포의 염색체의 이상이나 apoptosis 및 고환세포수 감소 등의 손상을 유발하게 된다[4,7]. 방사선 조사에 의해 고환세포는 방사선 용량과 시간에 따라 다양한 반응을

나타낸다. 방사선 치료환자에서 0.1 Gy의 낮은 선량에서도 정조세포는 형태학적인 변화와 숫자의 감소가 보고되었으며, 2-3 Gy의 선량에서는 정모세포가, 4-6 Gy에서는 정자세포 숫자의 감소가 보고되었다[5]. 세포의 종류에 따른 차이뿐 아니라 고환의 정세관상피 주기에 따라서는 방사선에 다른 민감도를 보인다고 알려져 있다[4,9]. Oakberg [13]는 방사선 조사에 의해 고환의 죽은 세포가 괴사(necrosis)와 유사하다고 하였으나 이는 apoptosis 세포사가 알려지기 이전의 보고이며, Huckins와 Oakberg [6]는 방사선을 조사한 마우스 정조세포의 형태학적 변화가 apoptosis와 연관성이 있을 것이라고 제안하였고, Allan 등[1]에 의해 랫드 정조세포의 방사선에 의한 죽음을 처음으로 apoptosis라고 기술하였다. 이후 방사선을 조사한 동물의 고환에서 형태학적인 연구방법에 의하여 apoptosis의 발생유무, 방사선 조사 시간 및 용량에 따른 형태학적인 변화가 보고되었다[4,9]. 고환의 정조세포는 정상 고환에서도 정자발생동안 정상적으로 세포가 소멸되고 방사선이나 세포사를 유발시키는 약물, 체온 상승 및 고환 허혈 등의 다양한 원인에 의해 초기 세포사가 유발되는데 이러한 초기 세포사는 대부분 apoptosis이다[4,9-11].

지금까지 고환에서 방사선에 의한 apoptosis 관련연구는 정

*Corresponding author

Tel : +82-62-530-2837, Fax : +82-62-530-2841

E-mail : shokim@chonnam.ac.kr

세관 상피의 명확한 구분 없이 이루어져 왔으며, Oakberg [12]의 기준에 따른 정자 발생의 각 단계별 변화에 대한 연구는 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 방사선조사 후 시간 및 용량에 따른 고환 정세관 상피에서의 apoptosis 발생과 정세관 상피단계(epithelial stage)별 차이 등을 평가하였다.

재료 및 방법

실험 동물

7주령의 수컷 ICR 마우스(오리엔트바이오, 성남)를 사용하였다. 동물의 사육은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조명시간은 12시간(오전 8시 점등-오후 8시 소등) 및 조도 200-300 lux로 설정된 시설에서 수행하였다. 순화기간을 거쳐 polycarbonate 사육상자에 4마리씩 수용하였고 실험동물용 고형사료(삼양사료, 원주)와 정수장치를 통과한 수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 마우스는 4마리를 하나의 실험군으로 적용하였으며, 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animal' (1996, USA)에 준하여 취급하였으며 동물실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 수행되었다.

방사선 조사

방사선조사는 실험용 방사선 조사기(Gamma-cell Elan 3000, Nordion International, Canada)를 사용하여 ^{60}Co 감마선(선량률: 2 Gy/min)을 1회 전신조사 하였다.

실험군의 분류 및 조직 관찰

방사선 조사 후 시간 경과에 따른 변화 관찰을 위하여 2 Gy의 방사선을 조사하고 0, 2, 4, 8, 12, 16 및 24시간에 관찰되는 고환 정세관에서의 TUNEL 양성세포를 측정하였으며, 방사선 조사용량에 따른 변화 관찰을 위하여 0.5, 1, 2, 4 그리고 8 Gy의 방사선을 조사하고 8시간 후 apoptosis 발생양상을 측정하였다. 부검은 경추탈구를 실시하였으며 양측 고환을 채취한 후 Bouin's 고정액에 24시간 동안 고정하고 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매, 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하였다. Apoptosis를 확인하기 위해 TUNEL 염색과 고환정세관상피의 단계를 구별하기 위하여 periodic acid Schiff (PAS) 이중염색을 적용하였다[14]. 방법을 간단히 기술하면 Apoptag *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit, Intergen Co., USA)를 사용하여 4 μm 두께로 박절한 조직을 파라핀 제거 후 phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6)으로 세척하고 조직의 endogenous peroxidase를 불활성화 시키기 위해 3% H_2O_2 에 실온에서 30분 동안 처리하였다. Kit에 포함되어 있는 equilibration 완충액으로 15분 동안 처리한 다음

TdT를 첨가하여 37°C 에서 90분 동안 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위해 반응정지 완충액에 조직절편을 넣고 상온에서 30분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase로 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 diaminobenzidine (DAB)용액으로 발색시켜 증류수로 세척하였다. TUNEL 염색이 완료된 조직을 정세관상피 단계구분을 위하여 0.5% periodic acid로 10분 동안 조직을 산화시키고 Schiff 시약으로 20분간 발색 후 sodium metabisulfate로 수세하여 비결합물을 제거하였다. Hematoxylin으로 20초간 대비염색을 시행하고 봉입하였다.

검경

각 실험동물 당 100개의 정세관 단면에서 apoptosis 양성세포의 수를 검경하여 방사선 조사 후 시간경과 및 방사선 조사용량에 따른 변화를 우선 계측하였다. 각각의 정세관을 Oakberg [12]의 기준에 따라 12단계로 분류하였고 II-III, V, VIII, XI 단계를 나타내는 정세관을 각 개체 당 2개씩 선별하여 정세관내의 발생단계별 생식세포수를 계수하였으며 0, 0.5, 2.0, 8.0 Gy 조사군에서 I-XII 단계 별 apoptosis 발생을 관찰하였다. 각 단계의 정세관은 I단계와 VIII단계는 마우스 마리 당 10개씩을, 이외 단계는 마리 당 5개씩을 측정하여 평균을 산출하고 각 마우스의 성적으로 적용하였다.

통계분석

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며 모든 성적의 분석은 Graph PAD In Plot program (GPIP, Graph PAD software, USA)을 사용하였고 Student's t-test를 이용하여 통계적 분석을 하였다. 각 조사선량에 따라 측정된 TUNEL 양성세포 발생의 평균값은 linear quadratic model ($Y=aD^2+bD+c$)에 적용하여 선량-반응곡선을 구하였다.

결과 및 고찰

조직학적 변화

H-E 염색상에서 apoptosis 발생세포의 핵은 진하게 염색되었으며 세포질은 산성호성을 나타냈으나 핵의 응축 정도는 세포마다 차이가 있었으며, TUNEL 염색에서는 강한 양성반응을 나타내는 세포로 관찰되었다. 방사선 비조사 대조군에서도 정세포 및 일부 분열중인 정모세포에서 apoptosis 양성세포가 관찰되었으며 정자세포와 지지세포에서는 특이적인 이상이 없었다. TUNEL-PAS 이중염색의 결과, 침단체(acrosome)에 선택적으로 적색의 양성반응을 나타냈으며 침단체의 확장 각도를 명확하게 관찰할 수 있어 각 상피단계의 구별이 용이하였다(Fig. 1).

방사선 조사 후 시간경과 및 조사용량 따른 TUNEL 양성세포변화

TUNEL 양성세포의 시간에 따른 변화를 보면 방사선 조사

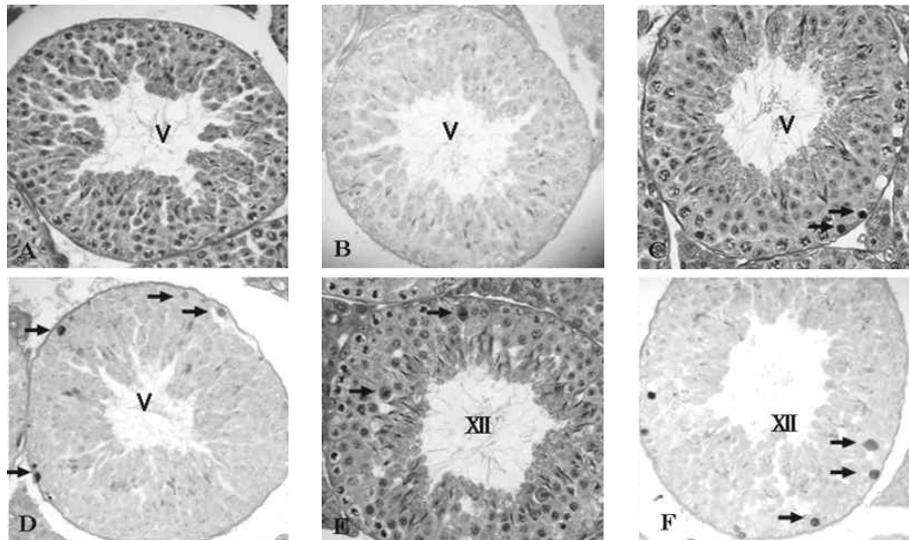


Fig. 1. Representative photographs of testis from control and irradiated mice stained with H-E (panel A, C, E) and TUNEL-PAS (panel B, D, F). (A, B) Stage V seminiferous tubule of control mouse showing normal spermatogenesis. (C, D) Stage V seminiferous tubule of irradiated mouse showing apoptotic cells (arrow). (E, F) Stage XII seminiferous tubule of irradiated mouse showing apoptotic cells (arrow).

후 8시간(1.202 ± 0.076)에 급격하게 증가하여 12시간(2.445 ± 0.217)에 최고치를 나타내었고 18시간(1.094 ± 0.081)에 빠르게 감소하였으며(Fig. 1) 기존 보고[4,9]와 유사하였다. 방사선 조사용량의 증가에 따른 변화를 관찰하기 위하여 0-8 Gy의 방사선을 조사하고 8시간 뒤에 변화를 관찰한 결과 방사선 조사군

의 TUNEL 양성세포 수는 방사선 조사용량에 비례하여 증가하였다(Fig. 2). TUNEL 양성세포는 정조세포와 정모세포에서 주로 관찰되었으며 특히 정조세포에서 그 수가 많았다. 비조사대조군에서 0.315 ± 0.065 개의 양성세포가 관찰되었으며, 0.5 Gy조사군에서 0.684 ± 0.137 , 1 Gy조사군에서 0.881 ± 0.092 , 2

Table 1. The number of spermatogenic cells in seminiferous tubules of male mouse testis 8 hours following irradiation

Epithelialstage	Parameters	Irradiation dose (Gy)			
		0	0.5	2	8
II	Spermatogonia	15.0	12.5	9.7	9.6
	Pachytene spermatocytes	46.5	51.5	50.3	55.7
	Round spermatids	123.0	103.0	108.7	89.3
	Elongated spermatids	113.3	94.0	114.3	102.3
	Sertoli cells	12.5	9.0	12.3	15.0
V	Spermatogonia	21.3	23.7	16.5	19.0
	Pachytene spermatocytes	52.0	52.7	49.5	64.0
	Round spermatids	120.3	117.0	101.0	127.0
	Elongated spermatids	95.3	108.3	104.5	121.0
	Sertoli cells	15.8	10.3	11.5	10.0
VIII	Spermatogonia	2.8	2.0	3.0	2.0
	Preleptotene spermatocytes	37.0	40.0	33.0	38.0
	Pachytene spermatocytes	54.3	48.0	48.3	45.0
	Round spermatids	116.8	114.0	95.7	107.0
	Elongated spermatids	89.3	129.5	63.3	38.0
	Sertoli cells	11.8	10.0	11.3	13.0
XI	Spermatogonia	7.7	4.5	5.0	3.5
	Pachytene spermatocytes	43.3	37.8	40.7	36.5
	Round spermatids	65.0	63.8	39.3	48.0
	Elongated spermatids	137.8	121.5	81.0	138.0
	Sertoli cells	14.0	12.0	11.3	10.5

Results are presented as mean from four mice in each group.

Table 2. Quantitative analysis of apoptotic cells detected by the TUNEL-PAS in spermatogenic cells from different stages of seminiferous tubules

Epithelial stage	Irradiation dose (Gy)			
	0	0.5	2	8
I	0.44±0.27 ^a	1.00±0.01 ^b	1.17±0.25 ^b	1.33±0.38 ^b
II-III	0.28±0.08 ^a	0.67±0.12 ^b	0.88±0.01 ^c	1.59±0.49 ^d
IV	0.16±0.11 ^a	0.75±0.35 ^b	1.08±0.25 ^b	2.08±0.46 ^c
V	0.37±0.25 ^a	0.83±0.24 ^b	1.42±0.12 ^c	3.40±1.16 ^d
VI	0.18±0.21 ^a	0.25±0.15 ^a	0.89±0.16 ^b	1.58±0.41 ^c
VII	0.11±0.17 ^a	0.31±0.09 ^a	0.58±0.12 ^b	2.10±0.55 ^c
VIII	0.14±0.09 ^a	0.23±0.14 ^a	0.53±0.12 ^b	1.86±0.21 ^c
IX	0.36±0.21 ^a	0.40±0.25 ^a	0.49±0.34 ^a	1.90±0.14 ^b
X	0.41±0.27 ^a	0.68±0.25 ^{ab}	1.33±0.47 ^{bc}	1.70±0.28 ^c
XI	0.31±0.12 ^a	0.47±0.18 ^{ab}	0.93±0.37 ^b	1.86±0.20 ^c
XII	1.20±0.89 ^a	1.80±1.69 ^a	2.63±0.88 ^a	3.88±0.17 ^b

Results are presented as mean (±SD) from four mice in each group.

^{a-d} Means (±SD) with different superscripts in the same stage of epithelium are significantly different at p<0.05.

Gy 조사군에서 1.007±0.231, 4 Gy조사군에서 1.162± 0.067 그리고 8 Gy조사군에서 1.959±0.338개의 양성세포가 관찰되었다. 각 조사선량에 따라 측정된 TUNEL 양성세포의 평균값이 linear-quadratic model (Y=aD²+bD+c)에 잘 맞고 이에 적용하면 용량-반응의 관계식은 Y=(-0.014±0.009)D²+(0.31± 0.697)D+0.3575 (r²=0.9, Y=고환정세관 한 개당 TUNEL 양성세포의 수, D=방사선량 Gy)이었다. 용량별 변화 관찰 시점은 apoptosis가 확연히 증가하면서 시간경과에 따른 정세관 발달주기 변화에 영향이 가장 적은 방사선 조사 후 8시간이 적절하였다. 방사선 비조사 대조군에서도 비교적 많은 양성세포가 관찰된 것은 고환의 경우 정조세포의 증식과 분화과정 중의 생리적 apoptosis의 결과라는 보고[3]와 일치하였다.

방사선 조사에 의한 고환 정세관 상피 주기 별 세포수 및 apoptosis 발생 변화

정세관의 전체 세포수를 관찰하기 위해 각각의 정세관을 분류하여 정자발생 단계 중 II, V, VIII, XI단계의 정세관에서 상피 주기별 생식세포수를 계수하였다. 고선량 방사선 조사군에서 일부 정조세포의 수적 감소 경향을 보이는 경우도 있었으나 용량의존성은 없었다. 관찰시점인 방사선 조사 후 8시간은 방사선 조사가 정세관 상피세포수의 변화에 영향을 미치지 이전 시점임을 확인할 수 있었다(Table 1).

Oakberg [12]의 기준에 따라 정세관 상피의 각 주기에서 방사선 조사에 따른 TUNEL 양성 세포의 숫자는 V단계 및 XII 단계에서 높은 증가를 나타냈다(Table 2). 방사선에 의한 정조세포의 apoptosis 변화는 Hasegawa 등[4]의 연구결과와 유사하였다. TUNEL 양성세포는 V단계의 B 정조세포에서 가

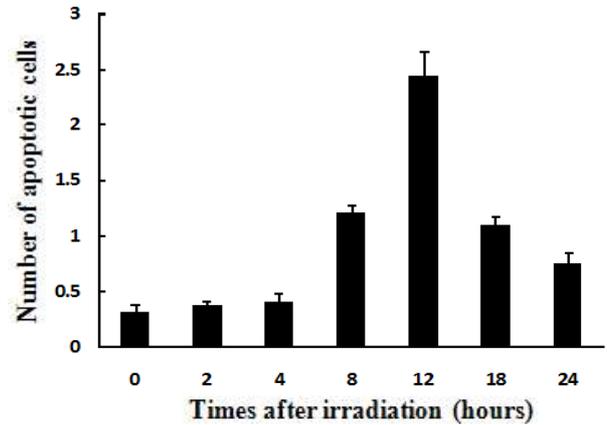


Fig. 2. Time-course incidence of the number of apoptotic cells (assessed by TUNEL-PAS) counted in the seminiferous tubule of male mouse testis up to 24 hours following 2 Gy-irradiation. Results represent as mean (±SD) from four mice in each group.

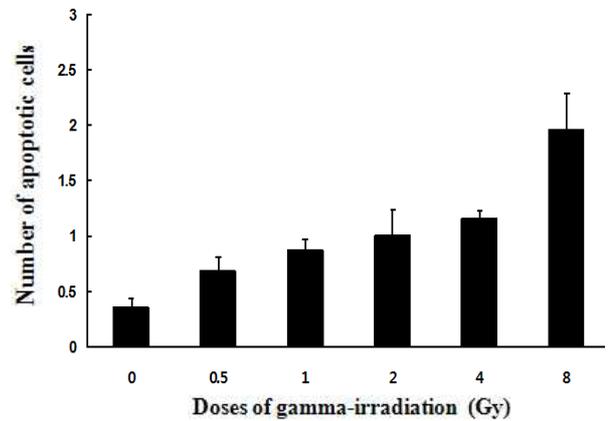


Fig. 3. The effect of radiation dose on the number of apoptotic cells (assessed by TUNEL-PAS) in the seminiferous tubule of male mouse testis 8 hours following 0-8 Gy-irradiation. Results represent as mean (±SD) from four mice in each group.

장 많이 관찰되었으며 이는 V단계가 다른 단계와 비교하여 정조세포의 숫자가 많고 B 정조세포가 VII-VIII단계의 전세사기 세포와 같은 다른 세포에 비해 방사선에 민감한 결과로 생각된다. VII-VIII단계는 방사선조사 후 TUNEL 양성세포가 적게 관찰되어, 이 단계의 전세사기 세포가 비교적 방사선에 저항성이 있는 것으로 사료된다. XII단계에 TUNEL 양성세포의 수가 다른 단계에 비교하여 크게 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 이는 다른 단계와 달리 정모세포의 TUNEL 양성세포가 증가하는 것으로 다른 단계에서 관찰되는 TUNEL 양성세포 양상과는 차이가 있었다. 다른 연구자의 보고에서는 단계를 X-XII 단계까지 모두 모아서 결과[9]를 정리하거나 정조세포에서의 변화만을 관찰한 결과[4]로, XII단계의 특이적인 양상을 보고하지 못한 것으로 생각된다. IX단계의 경우 세포질소적이 관찰

되어 H-E염색만으로는 apoptosis와 구별이 쉽지 않아 다른 연구자[4,14]의 경우 apoptosis 관찰에서 제외하였으나 TUNEL-PAS 이중염색방법을 이용한 결과 IX단계에도 구별이 가능하였다.

실험결과 방사선 조사 후 고환 정세관에서 TUNEL 양성세포가 크게 증가하였으며 방사선 조사에 의한 TUNEL 양성세포의 숫자는 고환 정세관의 단계에 따라 차이가 관찰되며 V 단계 B 정조세포와 XIII단계 정모세포에서 많이 관찰되었다. 이는 다른 단계와 비교하여 방사선에 민감한 정조세포가 V 단계에 많은 것이 원인이라고 생각되며 XIII단계 정모세포에 TUNEL 양성세포 숫자의 증가는 정모세포가 세포분열 중 방사선에 민감하게 반응한 것으로 판단된다. 정세관상피 주기에 따른 apoptosis 관련 단백질의 변화양상과 방사선조사 후 시간 경과에 따른 정자 및 정자세포의 변화양상에 대한 지속적인 연구가 계속되어야 하겠다.

요 약

방사선 및 각종 독성물질에 의한 고환 정세관세포의 사멸은 apoptosis와 관련이 있다고 알려져 있으나 정세관상피주기에 따른 apoptosis 발생에 대한 변화연구는 미진하다. 본 연구에서는 감마선을 조사한 ICR 마우스의 고환에서 apoptosis 발생을 transferase-mediated end labeling (TUNEL) 과 periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 동시에 실시하여 관찰하였다. Apptosis는 TUNEL 양성으로 나타났으며 특징적 형태변화를 보였다. 2 Gy (분당 2 Gy의 선량률)의 방사선을 조사하고 24시간동안의 변화를 관찰한바 방사선조사 후 12시간에 가장 높은 apoptosis 발생을 보였고 이후 감소하였다. 8 Gy까지의 방사선을 조사하고 8시간에 변화를 관찰한 결과 모든 정세관상피 주기에서 방사선 용량에 비례한 apoptosis의 발생이 관찰되었다. 방사선 용량-반응은 linear-quadratic 곡선 $y=(-0.014\pm 0.009)D^2+(0.31\pm 0.697)D+0.3575$. y는 정세관 당 TUNEL 양성세포의 수, D는 방사선 용량(Gy), $r^2=0.9$ 에 가장 일치 하였다. 최대 반응은 8 Gy에서 관찰되었으며, 0.5 Gy조사군에서도 변화가 나타났다. 이러한 변화는 정세관상피주기 V에서 B정조세포와 정세관상피주기 XII의 분열기 정자세포에서 가장 현저하였다.

감사의 글

이 논문은 경북대학교(2009년도) 학술연구지원금에 의해 연구되었음.

References

1. Allan, D. J., G. C. Gobe, and B. V. Harmon. 1987. Cell death

in spermatogenesis, pp. 229-258, In Potten, C. S. (ed.), *Perspectives on Mammalian Cell Death*, Oxford University Press, Oxford.

2. Eastman, A. 1993. Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **121**, 160-164.
3. Giampietri, C., S. Petrunaro, P. Coluccia, A. D'Alessio, D. Starace, A. Riccioli, F. Padula, F. Palombi, E. Ziparo, A. Filippini, and P. De Cesaris. 2005. Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. *Contraception* **72**, 298-302.
4. Hasegawa, M., G. Wilson, L. D. Russell, and M. L. Meistrich. 1997. Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat. Res.* **147**, 457-467.
5. Howell, S. J. and S. M. Shalet. 2005. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **34**, 12-17.
6. Huckins, C. and E. F. Oakberg. 1978. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. *Anat. Rec.* **192**, 529-542.
7. Kamiguchi, Y. and H. Tateno. 2002. Radiation- and chemical-induced structural chromosome aberrations in human spermatozoa. *Mutat. Res.* **504**, 183-191.
8. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
9. Liu, G., P. Gong, H. Zhao, Z. Wang, S. Gong, and L. Cai. 2006. Effect of low-level radiation on the death of male germ cells. *Radiat. Res.* **165**, 379-389.
10. Miura, M., I. Sasagawa, Y. Suzuki, T. Nakada, and J. Fujii. 2002. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. *Fertil. Steril.* **77**, 787-793.
11. Moon, C., C. W. Jeong, H. Kim, M. Ahn, S. Kim, and T. Shin. 2006. Expression of CD44 adhesion molecule in rat testis with ischemia/reperfusion injury. *J. Vet. Med. Sci.* **68**, 761-764.
12. Oakberg, E. F. 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* **99**, 391-413.
13. Oakberg, E. F. 1955. Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. *Radiat. Res.* **2**, 369-391.
14. van der Meer, Y., R. Huiskamp, J. A. Davids, I. van der Tweel, and D. G. de Rooij. 1992. The sensitivity to X rays of mouse spermatogonia that are committed to differentiate and of differentiating spermatogonia. *Radiat. Res.* **130**, 296-302.
15. Wyllie, A. H. 1981. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis, pp. 9-34, In Bowen, I. D and R. A. Lockshin (eds.), *Cell Death in Biology and Pathology*, Chapman & Hall, London.