

## 6 MeV LINAC 방사선 조사에 의한 생쥐 난소조직의 미세구조 변화

윤철호, 문명진\*  
단국대학교 대학원 생물학과

### Fine Structural Modification of Mouse Ovarian Tissue by Irradiation of 6 MeV LINAC Radiation

Chul-Ho Yoon and Myung-Jin Moon\*

Department of Biological Sciences, Graduate School, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received May 14, 2003; Accepted May 30, 2003)

#### ABSTRACT

This research investigates the fine structural as well as the morphological changes of the mouse ovarian tissue after irradiation of various dose rates of 6 MeV LINAC radiation. The normal structure of the ovarian tissue is consisted of various stages of follicles including primordial and growing follicles, and ovarian stromal connectives. When we observed the ovarian tissues irradiated with a dose rate of 200 cGy/min using light and electron microscopes, granular cells in growing follicles are in irregular shape unlike normal follicles. Small segments of cells scattered in follicular antrum among granular cells. We could observe neutrophils and macrophages around the segments, which means the cells already got in the process of decrease owing to the effects radiation. With coincident to the increase of the dose rate of x ray irradiation as 400 or 600 cGy/min, the mature follicles appeared as an irregular form and the granular cells surrounding oocyte also deformed comparing to their normal counterparts. The granulosa cells within mature follicle are already occurred necrotic change and apoptosis. The nuclei in some cells got so fragmented that the segments formed the shape of a horseshoe or scattered in small and condensed pieces. All the cells at a granular layer irradiated with a dose rate of 600 cGy/min show typical characteristics of apoptosis. The neutrophils involved in inflammatory reaction appear evidently in follicular antrum of growing follicles, and macrophage scattered with residual and apoptotic bodies.

**Key words** : Fine structure, Mouse, Ovary, Radiation

#### 서 론

세포에 방사선 에너지를 조사시키면 조직의 구성 분자 내에서 물리학적 변화 단계를 거쳐 수소원

자 (hydrogen atom,  $\cdot H$ ), 수화전자 (hydrated electron,  $e_{aq}^-$ ), 그리고 수산기 (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ )와 같은 일차 유리기들이 형성된다 (Singh & Singh, 1982). 이러한 유리기들은 세포 내에서 생체를 구성하는 분자의 구조적 변화를 야기하고 (Fridovich, 1986), 이로 인

\* Correspondence should be addressed to Dr. Myung-Jin Moon, Department of Biological Sciences, Graduate School, Dankook University, Anseo-Dong San 29, Cheonan 330-714, Korea. Ph.: 041-550-3445, FAX: 041-551-9229, E-mail: moonmj@dankook.ac.kr

해 효소 활성화의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등이 손상될 뿐만 아니라, 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질의 산화가 유발된다(Emerit & Chaudiere, 1989).

방사선의 전신조사에 따른 조혈계에 대한 장애의 범위는 중에 따라 다르지만 보통 간세포(stem cell)의 파손의 원인이 되어 여러 가지 생리학적 반응을 나타내고 있다고 보고되었다(Pizzarello & Witcofski, 1970; Vacek & Rotkoviska, 1970; Stoney et al., 1975; Aardal & Laerum, 1983; Aardal, 1984; Bernabei et al., 1992). 또한 방사선의 전신조사 후 신경계의 형태학적 변화를 보면 보통 방사선 감수성이 높은 장기로 비교적 낮은 선량에서도 일시적으로 여러 가지 생리학적 반응이 나타난다고 보고되었다(Rider, 1963; Lampert & Davis, 1964; Marks et al., 1981; van der Kogel, 1986; Lebel & Sheline, 1987; Jaberaboansari et al., 1988, 1989).

방사선 조사 후 배양된 소·돼지 및 사람의 내피 세포유래 성장인자(Endothelial cell-derived growth factor, EDGF) (Witte et al., 1989)와 사람에서의 대식 세포유래 성장인자(macrophage-derived growth factor, MDGF) (Thornton et al., 1996), 그리고 흰쥐의 노르에피네프린(norepinephrine) (Franken et al., 1992) 등에 변화 양상이 나타나며, 방사선 조사 후  $\alpha$ -아드레날린 작용성 및  $\beta$ -아드레날린 작용성 수용체에도 변화 양상이 나타난다고 보고되었다(Lauk et al., 1989; Franken et al., 1992).

Ronnback(1983)은 흰쥐에 방사선원인 strontium-90을 투여한 배아의 난소내 세포수가 감소하는 것을 보고하였다. 또한, X-선,  $\gamma$ -선, 중성자선(neutrons) 및 양자선(photons)등에 대한 미성숙 난자의 감수성 역시 매우 민감하다고 보고되었다(Erickson et al., 1976; Gregg et al.). 그리고, iodine-125 혹은  $\beta$ -선원인 삼중수( $^3\text{H}_2\text{O}$ )를 흰쥐에 복강주사 혹은 구강으로 섭취시킨 후 조직학적으로 관찰했을 때 난소내 난자의 수가 감소하는 경향을 보였고, 난자의 형태가 핵물질이 분산되고, 가성숙되며, 과립세포의 핵응축 현상이 일어난다는 보고들(Dobson & Cooper, 1974; Kapoor et al., 1985; Lavu et al., 1985; Satow et al., 1989)은 난포가 퇴화된다는 것을 의미한다. 그러나, 방사선 치료를

위해 임상에서 인체에 사용하는 X-선을 이용한 난포의 폐쇄와 퇴화과정에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 동위원소를 이용하지 않고 임상에서 암치료에 사용되는 방사선조사장비를 이용하여 생쥐에 방사선을 직접 조사함으로써 photon energy(X-선)에 대한 난소의 방사선 생물학적 장애에 관한 성장난포의 세포학적 변화를 규명하고자 하였다. 임상에서 암치료를 위하여 200, 400, 600 cGy의 X-선을 조사하는 것과 같은 조건으로 생쥐에 조사한 후 3일간 사육한 다음, 적출한 난소 조직의 미세구조적인 특성을 관찰함으로써 조사선량에 따른 세포의 형태학적 변화과정을 규명하였다.

## 재료 및 방법

실험에 사용한 실험동물은 SD생후 5주차 암컷 생쥐를 사용하였다. 사육은 12/12시간(light/dark) 조명 하에서 사료와 물을 상시 공급해주면서 1주일 이상 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 생후 5주차 암컷 생쥐 3마리씩을 3개군으로 나누어 X-선을 각각 200, 400, 600 cGy를 전신 조사하고 3일간 사육한 다음 난소를 적출하여 실험에 사용하였다.

생쥐에 X-선 조사를 하기 위한 고정, 즉 SAD 변화를 막기 위하여 고정상자를 제작하였다. 고정상자는 3마리의 생쥐가 X-선 조사면 내에서 제한적인 좌우 움직임을 가능하지만 상하의 거리 변동을 줄이기 위하여 상자 윗덮개를 생쥐의 크기에 고정시켰다.

X-선 조사기기는 경인지역에서 현재 암치료에 이용되고 있는 미국 Varian사의 CL 2100 C/D 선형가속기(1988, 6월 설치)이용하였으며 불필요한 skin sparing effect를 방지하기 위하여 X-선 에너지는 6 MeV photon beam(X-선)을 이용하였다.

실험조건은 실내온도 25.5°C 기압은 755 mmHg 상태에서 Dose rate는 200 Gy/min였고 SAD는 100 cm, FS는 25×25 cm, SC factor는 1.038, tray factor는 0.970, SAD factor는 1.030이었다. SD 생후 5주차 암컷 생쥐의 평균두께는 4 cm(mid depth 2 cm)로 하였으며 방사선 조사는 POP(parallel opposed pair)로 조

사하였다.

X-선 조사방법 및 선량은 200 cGy를 A-P로 100 cGy, P-A로 100 cGy로 조사하였고 이때의 MU 값은 97 (AP/PA)이었고, 400 cGy 조사시는 A-P로 200 cGy, P-A로 200 cGy로 조사하였고 이때의 MU 값은 194 (AP/PA)이었다. 600 cGy 조사에서는 A-P로 300 cGy, P-A로 300 cGy 조사하였고 이때의 MU 값은 291 (AP/PA)이었다.

난소조직의 조직학적 관찰을 위해 시료를 paraffin 포매 (embedding)된 조직절편으로 제작하여, xylene으로 paraffin을 제거하고, 함수과정을 거친 다음 수돗물에서 10분 동안 수세하였다. Hematoxylin에서 5분 동안 핵을 염색한 후 흐르는 물에서 10분간 방치한 다음, Eosin에서 2분 동안 세포질을 염색하고 alcohol 농도 상승 순으로 탈수시킨 후, xylene으로 투명화시켜 Polymount medium으로 봉입 (mounting)하여 난포의 핵과 세포질을 관찰하였다.

전자현미경 관찰을 위한 시료의 제작을 위해 각각의 X-선 조사선량으로 처리한 생쥐의 난소를 적출하여 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)에 2시간 동안 전고정하고, 인산완충용액 (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)으로 15분씩 2회 세척한 다음, 1% OsO<sub>4</sub> (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)로 1시간 후고정하였다.

고정이 끝난 재료는 동일 완충용액으로 2회씩 세척한 후, ethanol 농도 상승 순으로 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 Epon-Araldite 혼합액에 포매한 다음, 60°C vacuum drying oven (Yamato, Japan)에서 36시간 동안 중합반응시켰다. 포매된 조직은 초박절편기 (ultramicrotome, LKB-2088)로 준초박절편 (semi-thin section)을 제작한 다음, 1% toluidine blue (1% borax)로 hot plate (60°C) 상에서 2분간 염색하였다.

염색이 끝난 절편을 증류수로 충분히 세척한 다음, 광학현미경 (Olympus CH30)으로 저배율에서 고배율까지 관찰하였다. 이어서 조직의 미세구조를 관찰하기 위해 초박절편 (ultra-thin section)을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100 CX-II (JEOL, Japan) 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 광학현미경 관찰

정상 발육된 생쥐의 난소에서 다양한 성장시기의 난포들이 관찰되었다. 난포 (follicle)는 과립세포 (granulosa cell)들이 한 층 또는 여러 층으로 난포세포를 둘러싸고 있는 구조를 하고 있었다. 성장난포 (growing follicle)를 Hematoxylin-Eosin 염색 결과, 성장난포에서 난자주변에는 투명대 (zona pellucida)가 염색되지 않은 상태로 뚜렷하고 균질한 물질로 채워져 있었다. 투명대와 인접해서 다층의 과립세포들이 일정하게 배열되어 있었다. 이들 난포를 둘러싸고 있는 층은 혈막세포 (capsule cell)들에 의해서 난포막을 형성하였는데, 혈막세포는 2개 또는 3개의 세포층으로 길게 신장되어 있었고, 인접된 난포와 난포 사이의 기질에는 혈관이 잘 발달되어 있었다 (Fig. 1A).

광학현미경상에서 원시난포 (primordial follicle)에서 일차난포세포가 단층의 편평한 난포세포 (follicular cell)에 둘러싸여 있었다. 난포세포는 둥근모양을 하고 있었으며 핵은 세포의 중앙 또는 약간 옆으로 치우쳐 존재하고 있었고, 핵내에는 인이 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 원시난포와 인접한 지질에는 모세혈관이 잘 발달되어 있었다 (Fig. 1B). 난포세포 주변에는 지속적으로 유사분열을 하는 난포세포들이 관찰되었다. 난포세포를 둘러싸고 있는 난포세포들은 유사분열에 의해 증식되면서 다층의 과립층 (granulosa layer)을 형성하였다. 과립층을 형성하는 세포는 핵이 구형이나 타원형의 형태를 하고 있었고 염색질은 고르게 분포하고 있었으며, 이들 과립세포층 아래에는 난포를 경계하는 난막세포들이 관찰되었다 (Fig. 1C).

생쥐의 난소에 정확히 X-선 200 cGy를 조사하고 3일간 사육한 후 조직학적 변화를 H-E 염색으로 관찰한 결과, 성숙난포를 구성하는 세포의 핵들은 대부분 진하게 염색되었다. 또한 난포 주변 지질세포의 핵들도 정상군에서 보다 진하게 염색되는 것을 확인하였고 난포막의 배열도 불규칙하게 관찰되었다 (Fig. 1D). 방사선에 피폭된 성숙난포는 난자와 인접한 부위에 커다란 난포동을 형성하고 있었고 과립층세포는 난포액에 밀려 더 이상 증가하지 않았다. 난자를

둘러싸고 있는 투명층은 방사선 피폭을 받지 않은 정상난포에서 보다 과립층세포와의 경계가 불규칙하게 관찰되었다(Fig. 1E). 성숙난포의 과립층세포를 광학현미경하에서 고배율로 확대하여 관찰한 결과, 과립층세포는 핵이 응축되어 약간 찌그러져 있거나, hematoxylin에 진하게 염색되어 관찰되었다(Fig. 1F).

400 cGy를 조사한 생쥐의 난소 조직에서는 성장난포와 성숙난포 및 퇴화난포가 잘 관찰되었다. 그러나 이들 난포조직에는 피사되어 응축된 핵이나, 진하게 염색된 핵을 갖고 있는 과립세포들이 잘 나타났다(Fig. 2A). 성장난포에서 난자를 둘러싸고 있는 과립층세포들은 응축된 핵을 가지고 있었으며, 이런 핵을 가지고 있는 세포는 다른 세포에 비해 세포질이 변성되어 피사가 진행되고 있는 상태로 확인되었다. 일부과립세포들은 핵이 진하게 염색되면서 세포질이 전형적인 apoptosis의 형태로 관찰되었다(Fig. 2B). 400 cGy의 X-선량을 조사, 3일이 경과되었을 때 변화를 보면 성숙난포에서 난자를 둘러싸고 있는 투명대는 매우 불규칙한 구조를 하고 있으며 과립층세포들의 배열은 일정하지 않고 흩어져 나타나기 시작하였다. 또한 과립층세포들은 핵이 심하게 응축되어 있었으며, 난포액이 들어있는 난포동은 피사된 세포들이 흩어져 있어서 정상 성숙난포에서의 난포동 모양과는 현저한 차이를 보였다(Fig. 2C).

생쥐의 난소에 600 cGy의 조사선량으로 피폭된 난소의 조직표본에서 난포는 정상난포와는 달리 매우 불규칙한 모양을 하고 있었다(Fig. 2D). 과립층세포는 400 cGy의 X-선을 조사한 조사군에서 보다 현저하게 양의 세포들이 응축되어 나타났고 이들 세포들은 모두 피사가 진행되는 상태로 관찰되었다(Fig. 2E). 난포동에는 일부 백혈구가 출현한 것을 확인할 수 있었는데 이와 같은 경우는 이미 염증반응이 진행되고 있음을 의미한다. 또한, 난포동에는 과립층에서 이탈되어 떨어져 나온 피사된 세포들을 확인할 수 있었고, 난포동을 채우고 있는 난포액은 정상난포에서와는 달리 불규칙한 물질로 채워져 있었다(Fig. 2F).

## 2. 투과전자현미경 관찰

정상난소의 난포에 대한 미세구조를 관찰한 결과,

원시난포에서 난포세포를 둘러싸고 있는 난포세포의 핵은 둥글거나 약간 신장된 형태를 하고 있었으며, 염색질은 고르게 분포하고 있었다. 투과전자현미경상에서 원시난포는 난포세포 주위를 한 층의 난포세포들이 둘러싸고 있었고, 난포세포는 입방형의 형태를 하고 있었다. 세포의 핵은 구형 또는 타원형으로 나타났으며, 염색질이 고르게 분포하고 있어서 전자밀도가 비교적 낮게 관찰되었다.

원시난포에서 난포를 둘러싸고 있는 난막세포(theca cell)는 길게 신장되어 길이가 약 50  $\mu\text{m}$  정도를 나타냈으며, 핵도 신장되어 있었다. 구형의 형태로 진하게 염색되었으며, 과립층세포의 핵은 구형 또는 타원형의 형태로 염색질이 고르게 분포하고 있었다. 또한 이들 세포사이에는 작은 간격들이 존재하고 있었으며, 피사되거나 apoptosis가 일어나는 세포는 관찰되지 않았다. 성장난포에서 투명대는 아주 일정하고 동일한 두께로 난포세포를 둘러싸고 있었고, 난포막은 길게 신장된 난막세포들에 의해서 형성되어 있었다(Fig. 3A).

투과전자현미경상에서 과립층세포는 핵막이 균일한 구형 또는 타원형의 형태로 핵막이 균일하게 존재하고 있었고, 성장이 활발한 과립층세포에서 핵의 염색질은 대부분 전자밀도가 낮은 진정염색질로 구성되어 있었으며, 인도 관찰되었다. 또한, 세포가 성숙함에 따라 핵막 주변에 염색질이 뭉쳐서 전자밀도가 높게 나타나는 세포의 핵도 관찰되었고, 투명대는 직경이 약 5  $\mu\text{m}$ 로 일정한 두께를 유지하고 있었다. 한편, 투명대와 인접한 과립층세포는 세포질 돌기를 뺀 후 투명대의 안쪽으로 함입되어 있었다(Fig. 3B).

200 cGy의 X-선을 조사한 성장난포를 준초박절편을 제작하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 난포의 전체적인 모양은 찌그러져 있었고, 난자를 둘러싸고 있는 투명층은 두께가 일정하지 않았고 불규칙하게 나타났다. 과립층세포는 정상난포와는 달리 불규칙한 모양을 하고 있었고, 과립세포 사이의 난포동에는 많은 세포성분의 부스러기가 산재하여 있었으며, 이들 주변에 호중구와 대식세포가 관찰되었다(Fig. 4A). 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 과립세포의 핵에서 핵막은 대부분 불규칙한 모양으로 찌그러져 있었으며, 염색질은 핵막과 인접하여 뭉쳐 있는 상태로 판

찰되었다. 또한, 과립세포 사이에는 핵이 응축되어 붕괴되기 시작하는 세포들도 확인되었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 이시기에 이미 세포는 방사선 피폭에 의하여 사망하는 기작이 이미 진행되어 있었다는 것을 확인할 수 있었다. 과립세포의 세포질에는 세포소기관이 잘 발달되어 있었는데, 특히, 미토콘드리아가 세포질 전체에 산재되어 있었고 많은 분비과립들을 가지고 있었다(Fig. 4B).

X-선을 600 cGy로 조사한 난소조직에서는 난포세포를 둘러싸고 있는 과립층세포에서 핵의 분절화(segmentation)가 일어난 상태이거나, 응축되어 있는 상태로 나타났다. 또한 난포동에는 많은 호중구들과 이물질들을 탐식한 대식세포도 관찰되었다. 정상 대조군에서와는 달리, 과립층세포는 핵과 세포질의 형태가 모두 변형되어 있었다. 일부 세포에서는 핵의 분절화 현상이 진행되어 핵이 잘게 쪼개져서 흩어져 있거나, 응축된 상태로 관찰되었다(Fig. 5A). 과립층의 모든 세포는 apoptosis의 전형적인 특성을 나타내었는데, 성장난포의 난포동에는 염증반응에 관여하는 호중구가 관찰되었으며, 주변에 산재된 세포 파쇄물(cell debris) 및 apoptotic body와 함께 대식세포도 쉽게 관찰되었다(Fig. 5B).

## 고 찰

포유동물의 생식소는 태아기에 형성되는 세 개의 연속적인 원신장 중 2번째 증신의 복두개를 따라 두꺼워지면서 발생한다. 원시생식세포에서 기원한 난원세포는 분화하여 원시난포(primordial follicle) 내에 휴지기 상태로 있는데, 이들 중 일부가 생식주기를 통하여 지속적으로 휴지기 난포군을 벗어나 성장을 시작하게 된다. 성장을 시작한 난포는 극히 소수만이 배란되며 나머지 대부분은 퇴화 또는 폐쇄(atresia)라는 기작을 통하여 소멸된다(Fortune, 1994).

난포의 성장은 여포세포의 성장과 함께 일어나는데 주로 일차 난포세포와 주변의 기질도 함께 성장을 한다. 일차난포에서 여포세포는 활발한 유사분열에 의해서 증식되어 과립층세포(granulosa cell)를 형성한다. 이때 난포세포와 과립층세포에서부터 분비되

는 당단백으로 구성되는 투명대(zona pellucida)를 형성하게 되며 난포의 성장이 지속되면서 이차난포는 과립층세포의 크기와 수가 증가되고 이들 세포사이에 난포액이 축적되면서 난포동을 형성한다.

본 연구에서 생쥐의 난포 성장과정을 조직표본을 제작하여 관찰한 결과, 과립세포들의 지속적인 분열현상을 확인할 수 있었다. 성장난포에서 난자를 둘러싸고 있는 투명층은 표면이 매끄럽고 균질한 상태였고, 난소를 구성하고 있는 결합조직의 교원섬유는 풍부하게 발달된 혈관주위나 기질층에 분포되어 있었다. 정상적으로 발육중인 난포조직은 세망섬유도 일정하고 규칙적으로 분포하고 있어서 난소조직의 뼈대 역할을 하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

난포의 퇴화는 난포형성과정중 난포내 내분비 환경의 변화 등 다양한 원인에 의하여, 소수 배란된 난포를 제외한 나머지 난포가 퇴화하여 소멸되는 것을 말한다(Ingram, 1962; Peters & McNatty, 1980; Tsafri & Braw, 1984). 난포의 퇴화는 비배란기(태아기, 미성숙기, 임신기, 수유기)와 폐경기(Hage et al., 1978; Peters, 1982) 및 정상의 난소주기(Koering et al., 1982; Greenwald, 1994)의 모든 단계에서 일어나며, 사람의 경우에는 평생을 통하여 일어난다고 보고되고 있다(Turnbull et al., 1977; Tsafri & Braw, 1984).

본 연구에서도 정상 난소 조직내에는 퇴화가 진행되는 난포들이 관찰되었는데, 이들의 난포는 모양이 성숙난포와 달리 약간 위축되어 있었으며, 과립층세포의 핵은 응축되어 나타났다. 또한, 세망섬유 염색에서 난포막의 세망섬유는 약간 풀어져 있었고, 과립층세포의 응축된 핵은 정상 성장난포의 세포 핵보다 진하게 염색되는 것을 확인하였다.

생식세포에 인위적인 손상을 가하여 난포의 퇴화 기작에 관한 연구가 최근까지 지속되고 있다. 발정전기의 뇌하수체 절제(Braw et al., 1981; Sadrkhani et al., 1987), androgen 처리에 의한 폐쇄(Bagnell et al., 1982; Gore-Langton & Armstrong, 1988), 황체자극 호르몬의 배란전 분비 억제(Uilenbroek et al., 1980), 성선자극호르몬(gonadotropin hormone)의 조절에 의한 GTH 수용체 작용조절(Hubbard & Greenwald, 1983; Hirshfield, 1986) 및 이온화 방사선의 조사(Naib, 1985; Ramzy, 1990)에 의해서 난포의 폐쇄

가 유발될 수 있음이 보고되었다.

이온화방사선에 피폭된 세포들은 핵 및 세포질에서 변화가 일어나고 생체의 생식세포가 이온화방사선에 의해 소멸된다는 사실은 매우 잘 알려져 있다 (Dobson & Felton, 1983; Erickson, 1985). 그리고 이온화 방사선에 대한 생체의 영향을 평가하는 방법으로 생식세포에 대한 생화학적, 형태학적 효과, 세포의 치사정도, 생식능력의 변화 및 유전적 영향 등이 연구되어 왔다 (Mandl, 1964; Lindop, 1969).

본 연구는 정상 생쥐 생체에 200, 400, 600 cGy의 X-선을 조사한 후 3일이 경과된 조직을 일반조직염색과 특수조직 염색으로 관찰한 결과 난포의 위축은 신속하게 진행되었으며, 200 cGy 조사선량에서 이미 과립층세포는 세포사이 경계가 불규칙하게 나타났고, 조사선량이 증가할수록 이들 세포는 핵의 응축과 핵의 분절화 현상이 뚜렷하게 나타났다. 핵이 응축되면서 피사되어 가는 세포에서는 세포질이 작아지는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 현상은 수분과 전해질이 세포 밖으로 빠져나가기 때문인데, 세포내 골격이 수축되고 세포내 압력이 상승함으로써 나타난다 (Savill et al., 1990).

본 연구의 특수조직염색에서 난포의 근간을 이루는 기질의 세망섬유는 형태가 불규칙하고 흩어져 있는 상태로 관찰되었다. 이와 같은 현상은 세포의 다양한 변화와 함께 이들 조직을 받쳐주는 성분들의 변형이 일어나게 된다. 결국 저선량의 X-선에서 이미 조직은 치명적인 손상을 받아 난포의 구조적 변형이 일어남과 동시에 구성세포들의 피사와 세포자연사가 일어났다는 것을 의미한다.

전자현미경으로 관찰한 결과 X-선 조사에 의해서 과립층세포의 세포예정사에 관한 형태적 특징을 확실하게 확인할 수 있었다. 정상난포의 원시난포는 난포세포주위를 한층의 난포세포들이 둘러싸고 있었다. 난포세포는 입방형의 형태를 하고 있었고, 이들 세포와 세포사이에는 부착반에 의해서 서로 연결되어 있었다. 원시난포에서 난포를 둘러싸고 있는 난삭세포는 길게 신장되어 길이가 약 50  $\mu\text{m}$  정도로 나타났으며, 핵도 신장되어 있었다. 성장이 활발한 과립층세포에서 핵의 염색질은 대부분 전자밀도가 낮은 진정염

색질로 구성되어 있었으며, 인도 관찰되었다. 투명대는 직경이 약 5  $\mu\text{m}$ 로 일정한 두께를 유지하고 있었다. 한편, 투명대와 인접한 과립층세포는 세포질 돌기를 뺀어 투명대의 안쪽으로 함입되어 있었다. 또한 이들 세포는 피사되거나 세포 예정사가 일어나는 세포는 관찰되지 않았다.

200 cGy의 X-선을 조사한 결과, 난포의 전체적인 모양은 찌그러져 있었고, 난자를 둘러싸고 있는 투명층은 두께가 일정하지 않아 불규칙하게 나타났으며, 과립층세포는 정상난포와는 달리 불규칙한 모양을 하고 있었다. 과립세포 사이의 난포동에는 많은 세포성분의 부스러기가 산재하여 있었으며, 이들 주변에 호중구와 대식세포가 관찰되었다. 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 과립세포의 핵에서 핵막은 대부분 불규칙한 모양으로 주그러져 있었으며, 염색질은 핵막과 인접하여 뭉쳐 있는 상태로 관찰되었다. 이는 Savil 등(1990)에 의해 발표된 결과와 마찬가지로 피사되어 가는 세포에서는 수분과 전해질이 유출되어 세포내 골격이 수축되었음을 시사하는 것이다. 또한, 과립세포 사이에는 핵이 농축되어 붕괴되기 시작하는 세포들도 확인되었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 이 시기에 이미 세포는 방사선 피폭에 의하여 사망하는 기작이 이미 진행되어 있었다는 것을 확인할 수 있었다.

X-선을 600 cGy로 조사한 난소조직에서 과립층세포는 정상대조군에서와는 달리 세포의 형태나 핵의 모양이 모두 변형되어 있었다. 일부 세포는 핵이 분절화되어 핵 부스러기가 마치 말발굽의 징모양을 하고 있거나, 잘게 쪼개져서 흩어져 있거나, 농축된 상태로 관찰되었는데 이는 조사선량이 증가할수록 세포의 핵이 응축되고 핵의 분절화 현상이 뚜렷하게 된다는 Dobson과 Cooper(1974), Kapoor 등(1985), Satow 등(1989)의 보고와 일치하였다. 결국 이 시기에 과립층의 모든 세포는 apoptosis의 전형적인 특성을 보여주었다. 성장난포의 난포동에서 빈번하게 발견되는 호중구는 염증반응에 관여하는 것으로 관찰되었으며, 주변에 산재된 세포 파쇄물 및 apoptotic body와 함께 관찰되는 대식세포의 출현도 확인되었다.

## 참 고 문 헌

- Aardal N, Laerum OD: Circadian variations in bone marrow. *Exp Hematol* 11 : 791-801, 1983.
- Bagnell CA, Mills TM, Costtoff A, Mahesh VB: A model for the study of androgen effects on follicular atresia and ovulation. *Biol Reprod* 27 : 1727-1737, 1982.
- Braw RH, Bar Ami S, Tsafirri A: Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* 25 : 989-996, 1981.
- Dobson RL, Cooper MF: Tritium toxicity: Effect of low level  $^3\text{H}_2\text{O}$  exposure on developing female germ cells in the mouse. *Radiat Res* 58 : 91-100, 1974.
- Dobson RL, Felton JS: Female germ cell loss from radiation and chemical exposures. *Am J Indust Med* 4 : 175-190, 1983.
- Emerit J, Chaudiere J: CRC Hand Book of Free Radical and Antioxidants in Biomedicine, Miquel J, Quintailha AT, Weber H (eds.) vol. 1, CRC Press, Florida, pp. 177, 1989.
- Erickson BH: Effects of ionizing radiation and chemical on mammalian reproduction. *Vet Hum Toxicol* 27 : 409-416, 1985.
- Erickson BH, Reynolds RA, Murphree RL: Late effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on the bovine oocyte as reflected by oocyte survival, follicular development, and reproductive performance. *Radiat Res* 68 : 132-137, 1976.
- Fortune JE: Ovarian follicular growth and development in mammal. *Biol Reprod* 50 : 225-232, 1994.
- Franken NAP, van der Laarse A, Bosker FJ, Reynart IWC, van Ravels FJM, Strootmn E, Wondergem J: Time dependent changes in myocardial norepinephrine concentration and adrenergic receptor density following x irradiation of the rat heart. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24 : 721-727, 1992.
- Fridovich I: Superoxide dismutase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmyer. Academic Verlag, Berlin, 58 : 61-97, 1986.
- Gore Langton RE, Armstrong DT: Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neil J (ed). Raven Press, New York, pp. 331-385, 1988.
- Greenwald GS, Shyamal KR: Follicular development and its control. In: Knobil E, Neil JD (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 2 : 629-724, 1994.
- Gregg RL, Humphrey HD, Thames JR, Meyn RE: The response of chinese hamster ovary cells to fast neutron radiotherapy beams III. Variation in relative biological effectiveness with position in the cell cycle. *Radiat Res* 76 : 283-291, 1978.
- Harrison AA, Dunbar PR, Neale TJ: Immunoassay of platelet derived growth factor in the blood of patient with diabetes mellitus. *Diabetologia* 37 : 1142-1146, 1994.
- Hirshfield AN: Effect of a low dose of pregnant mare's serum gonadotropin on follicular recruitment and atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 35 : 113-118, 1986.
- Hubbard CJ, Greewald GS: *In vitro* effects of luteinizing hormone on induced atretic graffian follicles in the hamster. *Biol Reprod* 28 : 849-859, 1983.
- Ingram DL: Atresia. In: *The ovary*, vol. 1, Zuckerman S (ed). Academic Press, New York, pp. 247-273, 1962.
- Jaberaboansari A, Nelson GB, Roti JL: Postirradiation alterations of neuronal chromatin structure. *Radiat Res* 114 : 94-100, 1988.
- Jaberaboansari A, Landis MR, Wallen CA: Alterations of neuronal nuclear matrix and chromatin structure after irradiation under aerobic and anoxic conditions. *Radiat Res* 119 : 57-72, 1989.
- Kapoor G, Sharan RN, Srivastava PN: Histopathologic changes in the ovary following acute and chronic low level tritium exposure to mice *in vivo*. *Int J Radiat Biol* 47 : 197-203, 1985.
- Koering MJ, Goodman AL, Williams RF, Hodgen GD: Granulosa cell pyknosis in the dominant follicle of monkeys. *Fertil Steril* 37 : 837-844, 1982.
- van der Kogel AJ: Radiation included damage in the central nervous system: An interpretation of target cell responses. *Br J Cancer* 53 (Suppl 7) : 207-217, 1986.
- Lampert PW, Davis RL: Delayed effects of radiation on the human central nervous system. *Neurology* 14 : 912-917, 1964.
- Lauk S, Bohm M, Feiler G, Geist BJ, Erdmann E: Increased number of cardiac adrenergic receptors following local heart irradiation. *Radiat Res* 119 : 157-165, 1989.
- Lavu A, Reddy PP, Reddi OS: Iodine 125 induced micronuclei and sperm head abnormalities in mice. *Int J Radiat Biol* 47 : 249-253, 1985.

- Lebel SA, Sheline GE: Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg* 66 : 1 22, 1987.
- Lindop PJ: The effects of radiation on rodent and human ovaries. *Proc Soc Med* 62 : 144 148, 1969.
- Mandl AM: The radiosensitivity of germ cell. *Biol Rev* 39 : 288 371, 1964.
- Marks JE, Baglon RJ, Prasad SC: Cerebral radionecrosis: Incidence and risk in relation to dose, time, fractionation, and volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7 : 243 252, 1981.
- Naib ZM: The effects of irradiation and other therapies. In: *Exfoliative cytopathology*, Little Brown Co, pp. 575 586, 1985.
- Peters H, McNatty KP: *The ovary*. Granada Publishing, London, pp. 113 128, 1980.
- Pizzarello DJ, Witcowski RL: A possible link between diurnal variations irradiation sensitivity and cell division in bone marrow of male mice. *Radiology* 97 : 165 167, 1970.
- Ramzy I: Effects of radiation and chemotherapy. In: *Clinical Cytopathology and Aspiration Biopsy, Fundamental Principles and Ractice*, Appleton, Lange, Norwalk, Connecticut, pp. 107 116, 1990.
- Rider WD: Radiation damage to the brain a new syndrome. *J Ca Assoc Radiol* 14 : 67 69, 1963.
- Ronback C: Effects on fetal ovaries after protracted, external gamma irradiation as compared with those internal deposition. *Acta Radiol Oncol* 22 : 465 471, 1983.
- Sadrkhanloo R, Hofeditz C, Erickson GF: Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen treated rat. *Endocrinology* 120 : 146 155, 1987.
- Satow YH, Hori JY, Lee M, Ohtaki S, Nakamura SN, Okada S: Effect of tritiated water on female germ cells: Mouse oocyte killing and RBE. *Int J Radiat Biol* 56 : 293 299, 1989.
- Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C: Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343 : 170 173, 1990.
- Stoney PJ, Halberg F, Simpson HW: Circadian variation in colony forming ability of presumably intact murine bone marrow cells. *Chronobiologia* 2 : 319 324, 1975.
- Thomton SC, Walsh BJ, Bennett S, Robbins JM, Foulcher E, Morgan GW, Penny R, Breit SN: Both *in vitro* and *in vivo* irradiation are associated with induction of macrophage derived fibroblast growth factors. *Clin Exp Immunol* 103 : 67 73, 1996.
- Tsafri A, Braw RH: Experimental approaches to atresia in mammals. In: *Oxford Review of Reproductive Biology*, Vol 6. Oxford Univ Press, pp. 226 265, 1984.
- Turnbull KE, Braden AWH, Mattner PE: The pattern of follicular growth and atresia in bovine ovary. *Aust J Biol Sci* 30 : 229 241, 1977.
- Uilenbroek JT, Woutersen PJ, van der Schoot P: Atresia of preovulatory follicles: Gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod* 23 : 219 229, 1980.
- Vacek A, Rotkoviciska D: Circadian variations in the effect of X irradiation on the hematopoietic stem cells of mice. *Strahlentherapie* 140 : 302 326, 1970.
- Witte L, Fuks Z, Haimovitz Friedman A, Vlodavsky I, Goodman DS, Eldor A: Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Research* 49 : 5066 5072, 1989.

#### < 국문초록 >

본 연구는 6 MeV LINAC에서 발생한 X 선을 생쥐 생체에 조사한 후, 방사선 조사선량에 따른 난소 조직의 미세구조적 변화를 광학 및 전자현미경으로 관찰하였다.

X 선을 200 cGy의 선량을 조사한 후 적출한 난소조직에서 성장난포의 과립층세포는 핵이 응축되어 나타났고, 난자를 둘러싸고 있는 투명층은 정상 대조군에서보다 경계가 불규칙하게 관찰되었다. 400 cGy로 조사된 난소조직에서 과립층세포는 대부분 응축된 핵을 가지고 있었으며, 피폭된 과립층세포의 사멸에 의한 세포질의 단백질 변성이 확인되었다. 600 cGy의 선량을 조사한 난소의 조직표본에서 성장난포는 위축되어 있었으며, 난포 중에는 백혈구가 침윤되어 있었고, 난포액은 정상난포와 달리 불규칙한 물질로 채워져 있었다.

투과전자현미경으로 관찰한 결과, 200 cGy의 방사선을 조사한 성장난포에서 과립층세포는 정상난포와는 달리 불규칙한 모양을 하고 있었다. 과립세포 사이의 난포 중에는 많은 세포성분의 부스러기가 산재하여 있었으며, 이들 주변에 호중구와 대식세포가 관찰되어, 이 시기에 이미 방사선 피폭에 의한 세포사의 기작이 진행되고 있음이 확인되었다. X 선을 600 cGy로 조사한 난소조직의 과립층세포는 세포의 형태나 핵의 변형이 현저하여, 일



부 세포는 핵의 분절화가 진행되는 등, apoptosis의 전형적인 특징이 관찰되었다. 특히 성장난포의 난포동에서는 염증반응에 관여하는 호중구가 잘 관찰되었으며, 주변에 산재된 세포 파쇄물 및 apoptotic body와 함께 대식세포의 출현도 확인되었다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A, B, C. Light micrographs of the normal mouse ovary. Paraffin embedded tissues were sectioned with the thickness of 5  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin eosin. Normal ovary contains stromal connective cells and various follicles. Each follicle consists of an oocyte (O) and multiple layers of granulosa cells (G). D, E, F. Light micrographs of the ovary treated with X ray. The ovary was acutely irradiated at a dose rate of 200 cGy/min and obtained after 3 days following irradiation by X ray. Note the aggregation of blood cells (arrows) near the follicles. AN: antrum, Bars indicate 10  $\mu\text{m}$ (C), 20  $\mu\text{m}$ (B, D, E, F), and 40  $\mu\text{m}$ (A), respectively.
- Fig. 2.** A, B, C. Photo micrographs of the ovary treated with a dose rate of 400 cGy/min and obtained after 3 days following irradiation. Paraffin embedded tissues were sectioned with the thickness of 5  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin eosin. The granulosa cell within the follicles showing strongly eosinophilic cytoplasm and condensing nucleus. D, E, F. Photo micrographs of the ovary treated with X ray. The ovaries were irradiated at a dose rate of 600 cGy/min and obtained after 3 days following irradiation by X ray. The mature follicles appeared as an irregular form. The granulosa cells within mature follicle were already occurred necrotic change and apoptosis. Arrows indicate blood vessels. AN: antrum, G: granulosa cell, O: oocyte. Bars indicate 20  $\mu\text{m}$ (C, F), 40  $\mu\text{m}$ (B, E), and 100  $\mu\text{m}$ (A, D), respectively.
- Fig. 3.** Transmission electron micrograph of normal mouse ovary showing primordial follicle and a portion of growing follicle. A. Normal features of the nuclei (N) of granulosa cells and theca cells appeared. B. The growing follicles have an inactivated granulosa cells, which have the characteristics of actively dividing cells. AN: antrum, O: oocyte, SC: stromal connective cell. All bars indicate 5  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 4.** Transmission electron micrograph of growing follicles after 3 days post irradiation of 200 cGy. A. Most of the granulosa cells have electron dense and heterochromatid nuclei (N). Among these, some of necrotized cells appeared. B. The granulosa cells of this ovary have numerous secretory granules (S) within their cytoplasm. AB: apoptotic body, M: mitochondria. All bars indicate 5  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 5.** Transmission electron micrograph of growing follicles after 3 days post irradiation 600 cGy. A, B. The granulosa cells within the follicle were already occurred necrotic changes. Numerous apoptotic bodies (AB) and irregular shaped cellular components appeared within the granulosa cells of this ovary. AN: antrum. All bars indicate 5  $\mu\text{m}$ .









