Ketamine과 Pentobarbitone이 생쥐의 난소내 난자퇴화 및 과립세포의 자연세포사에 미치는 영향

김종훈, 윤용달

한양대학교 자연과학대학 생물학과

Effects of Ketamine and Pentobarbitone on Degeneration of Oocyte and Apoptosis of Granulosa Cells in Mouse Ovary

Jong-Hoon Kim, Yong-Dal Yoon
Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Corresponding Author: Yong-Dal Yoon, Ph. D.
Department of Biology, College of Natural Sciences,
Hanyang University,
Haengdang-dong Sungdong-gu, Seoul 133-791,
Tel: 02-290-0955, Fax: 02-299-3495
E-mail: ydyoon@email.hanyang.ac.kr

Running Title: Follicular atresia induced by ketamine

= **Abstract** =

In mammal, lots of follicles start simultaneously their growth but only a few oocytes are ovulated in every sexual cycles. Most of matured and grown oocytes are destined to degenerate by atresia. However, the molecular and physiological mechanisms are not elucidated yet. The present study was designed to establish an induction method of follicular atresia with ketamine or pentobarbitone and evaluate the effect of these anesthetics on oocyte maturation and granulosa cell apoptosis of the mouse ovarian follicle.

The percentages of degenerated oocyte and apoptotic granulosa cell in ketamine treated groups were significantly higher than that in controls(58.9% vs 33.5%, $p < 0.01$, degeneration; 44.9% vs 26.6%, $p < 0.01$, apotosis). Futhermore, it was revealed that the concentrations of progesterone in both groups were markedly higher than that in control.

In conclusion, it is considered that ketamine induce an atresia as pentobarbitone, and may be useful for inducing follicular atresia.

Key Words: Ketamine, Pentobarbitone, Atresia, Apoptosis, Oocyte, Ovary, Mouse

서 론

포유동물의 난포는 난소내 내분비적 환경요인에 의해 선택된 일부 난포만 "배란(ovulation)"되며 나머지는 "폐쇄(atresia)"의 과정을 거쳐 소멸되어진다(Ryan, 1981; Tsafriri & Braw, 1984; Yoon, 1990; Tilly, 1996). 즉, 난소내 대부분의 난포가 퇴행분화하며, 또한 난포내의 난자도 퇴화되어 소멸되어진다. 그러나 난포폐쇄의 기작은 종에 따라, 난포의 분화정도에 따라 다르며, 시작과 그 후 진행되는 일련의 기작은 아직 불분명하다.

이러한 난포폐쇄에 관한 연구로는 난포폐쇄를 형태학적으로 인지할 수 있는 조직화학적인 연구와 생리, 생화학적 연구, 그리고 최근에는 분자생물학적인 연구 방법이 보고되어 왔다(Tsafriri & Braw, 1984; Yoon 1990; Tilly, 1996). 난포폐쇄에 따른 형태적 변화에는 과립세포와 협막세포의 형태적 변화와 난자의 형태적 변화를 들 수 있으며, 난자의 퇴화는 종에 따라 차이가 있으나, 폐쇄가 시작되면 핵막이 소실되고 극체가 방출되며(Braw and Tsafriri, 1980), 난자내 세포소기관이 응집되고 활면소포체와 골지체가 발달한다(Zamboni, 1970). 또한 폐쇄후기에는 난자가 찌그러지며, 괴사가 일어나고, 가성숙(pseudomaturation), 가분할(pseudocleavage), 혹은 분절(fragmentation)이 일어난다. 난포폐쇄와 관련된 생리적 변화로는 스테로이드 호르몬, 생식소자극호르몬, 그리고 프로락틴이 관련된 난포의 기능적 변화가 일어남이 알려져왔으며(Tsafriri & Braw, 1984) 이는 난소내 스테로이드가 생식소자극호르몬에 대한 난포의 반응성을 변화시킨 결과로 보여진다(Richards, 1980). 돼지의 폐쇄난포에서 스테로이드 합성율은 정상난포에 비해 높으며(Lee and Yoon, 1985), 종에 따라 또는 난포의 분화상태에 따라 합성호르몬이 다르나, 폐쇄가 일어나면 progesterone(P_4)의 생성이 증가하는 반면, estrogen(E_2)의 생성은 억제된다는 것이 일반적인 견해이다(Braw and Tsafriri, 1980; Lee and Yoon, 1985).

분자생물학적 기법이 도입된 최근에 난포의 폐쇄의 기작이 자연세포사(apoptosis)에 의한 결과라는 주장이 대두되었다(Hughes and Gorospe, 1991). 따라서 최근에는 난포폐쇄의 한 연구방법으로 돼지 혹은 소의 난포로부터 얻은 과립막 세포에서 자연세포사가 유발된 세포를 유세포 분석법(flowcytometry)으로

측정하였다(Guthrie et al., 1994; Blondin et al., 1996). 그러나 난포의 폐쇄와 연관하여 과립막세포의 DNA함량 및 세포주기에 대한 연구는 미진한 실정이며, 소나 돼지, 사람 등 대난포를 가진 동물에서 세포주기분석에 의해 난포폐쇄를 검증한 보고는 있으나, 생쥐와 같은 소동물에 대한 이러한 연구는 거의 없다.

이상과 같이 복합적인 요인이 관여하는 난포폐쇄의 기작을 밝혀내기 위한 연구방법의 하나로 인위적인 난포폐쇄 유도에 대한 연구가 진행되어 왔다. 실험적으로 난포폐쇄를 유도하는 방법에는 성체의 경우, 발정전기(proestrus)에 뇌하수체를 절제하거나(Braw et al., 1981), estrogen을 투여하거나, pentobarbitone을 처리하여 배란전 LH의 분비를 억제시키는 방법 등이 알려져 있으며(Uilenbroek et al., 1980), 미성숙 개체의 경우 PMSG 또는 anti-PMSG 처리하거나 뇌하수체를 제거하는 방법(Hirshfield, 1986) 등이 보고되어 있다.

그러나 마취제로서 배란 전 LH 분비를 억제하여 난포의 폐쇄연구에 유용한 model로 사용되는 pentobarbitone(Terranova, 1981)과, 역시 마취제로서 조직학적인 관찰결과가 난포폐쇄를 유발하는 것으로 보이는 ketamine이 동일한 기작에 의하여 난포폐쇄를 유발하는지는 불확실하다. 또한 난포폐쇄와 관련지어, 난자의 퇴화에 역할을 담당하는 것으로 알려진 여러 가지 스테로이드 호르몬들의 합성이 ketamine에 의해 조절되어 일어나는지도 불명확한 상태이다.

따라서 본 연구는 마취제로서 LH surge를 억제하여 난포폐쇄를 억제하는 것으로 알려진 pentobarbitone과 ketamine이 난자의 퇴화에 미치는 영향을 비교하고, 난소내 스테로이드합성에 미치는 영향을 조사하며, 이들 마취제를 처리한 생쥐 과립세포의 세포주기분석을 통하여 ketamine이 난포폐쇄에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 대한실험기기 동물센타에서 공급받은 후, 14/10시간(Light/Dark)의 조명조건에서 고형사료와 신선한 물을 충분히 공급한 상태로 3일간 적응시켰으며, 정상적인 성주기를 갖는 생쥐 암컷만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2. ketamine 및 pentobarbitone의 처리 및 시료의 채취

대조군과 ketamine 처리군, pentabarbitone 처리군을 각각 10마리씩 한 군으로 하여, 세 군 모두 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, sigma) 5IU/0.2ml을 복강에 주사하여 성주기를 동일화한 후, LH surge가 일어나는 48시간 후에 pentobarbitone(Nembrutal sodium solution, Abott Labs.) 75mg/kg(body weight)과 ketamine(Parks-Davis) 110mg/kg(body weight)을 체중에 따라 각각 복강 또는 근육에 주사하였고 이에 대한 대조군에는 생리 식염수(0.85% NaCl, w/v)를 0.2ml씩 주사하였다.

시료의 채취는 마취제를 처리한 후 72시간에 시행하였으며, 혈액은 ether로 마취시킨 생쥐로부터 26G, 1ml 일회용주사기를 사용하여 심장천자에 의하여 획득하였다. 난자채취를 위한 난소는 생쥐로부터 적출한 후 Dulbeccos' phosphate buffered saline(D-PBS, pH 7.4, Gibco)에 보관하였으며, 스테로이드 호르몬 측정을 위한 혈청은 사용 전까지 -70℃의 저온냉동기에 보관하였다.

3. 난자의 수획 및 검경

적출한 난소는 지방질을 제거하고 D-PBS로 세척 후 새로운 D-PBS를 포함하는 시계접시로 옮겼다. 난자를 수획하기 위하여 해부현미경하에서 26G 주사바늘로 난포를 터뜨린 후, 난포로부터 방출된 난자들을 물리적인 방법과 D-PBS에 용해시킨 0.2%(w/v) hyaluronidase(Sigma)를 사용하여 난구세포(cumulus cells)

를 제거하였다. 난자는 즉시 D-PBS에 용해시킨 2.5%(v/v) glutaraldehyde(Merck)에서 1시간 동안 고정하여 0.5%(w/v) aceto-lacmoid 혹은 1%(w/v) toluidine blue로 염색한 후 봉입하여 광학 현미경(Olympus, CH-2)으로 검경하였다. 난자의 상태를 보다 정확히 판단하기 위해서는 0.1%(w/v) acridine orange로 염색하여 형광현미경(Leitz, Dialux 20 EB)하에서 관찰하였다.

4. 과립세포의 유세포분석(flow cytometry)

유세포분석에 의한 과립세포의 핵내 DNA 양 측정은 Seifer 등(1992)의 방법을 원용하였다. 난자의 수획시에 난포로부터 배출된 과립세포에 HBSS(Hank's balanced salt solution; 0.01M EDTA)를 첨가하여 4℃에서 400 x g로 5분간 원심분리 하였다. 침전된 세포를 4℃에서 80% ethanol에 30분간 고정한 뒤 RPMI 1640 medium으로 세포를 세척하여 다시 침전시키고, 0.1% NP-40(sigma), 0.1mM EDTA, 50μg/ml RNase(sigma), 50μg/ml propidium iodide(sigma)이 함유된 RPMI 1640 medium에 잘 혼합하여 4℃에서 2시간 동안 염색하였다. 유세포분석에 방해가 되는 세포덩어리를 35μm nylon mesh로 여과 한 후 argon laser의 488 nm 파장에서 발기하여 610 nm의 파장으로 여기 되는 propidium iodide의 형광성에 따라 DNA양을 측정하였고, 610 nm 파장만이 감지되도록 578/28 band-pass filter를 장치하여 분석하였다. 세포주기 histogram은 각각 20,000개의 세포로부터 얻었으며, A_0(G_0/G_1보다 DNA 형광성이 낮은 구역의 세포군집), G_0/G_1(DNA 합성전기), S(DNA 합성기), G_2/M(DNA 합성 후 유사분열기)의 각각의 구역을 얻은 후, 세포분석 프로그램(Coulter)을 이용하여 계산하였다.

5. 혈청내 E_2 및 P_4의 농도의 변화

혈청내에 존재하는 E_2와 P_4의 농도는 본 연구실에서 확립한 방사면역측정법(radioimmunoassay)으로 정량 하였다(Yoon, 1981; Lee and Yoon, 1985). 추적자(tracer)는 각각 [2,4,6,7,16,17]-^{3}H-E_2(98Ci/mM, Amersham)와 [1,2,6, 7,16,17]-^{3}H-P_4(110Ci/mM, Amersham)을 이용하였으며, E_2 및 P_4의 항 혈청은 각

각 본 실험실에서 합성한 역가 1:15000, 1:2000을 사용하였다. 표준 스테로이드 호르몬은 Sigma사 제품을 사용하였다.

6. 통계검증

통계학적 유의성 검정을 위하여 측정치를 10^{-3}자리에서 반올림하여 student's t-test방법을 사용하였으며 p값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. Ketamine이 난자성숙에 미치는 영향

난자의 성숙도는 각 실험군별로 핵막붕괴가 일어나지 않은 난자(GV, germinal vesicle), 핵막붕괴가 일어난 난자(GVBD, germinal vesicle break-down), 극체를 형성한 난자(PB, polar body), 퇴화된 난자(DEG, degeneration)의 4단계로 구분하여 관찰하였다. Acridine orange를 이용한 염색방법은 핵막과 염색체가 뚜렷하게 관찰되는 GV 난자(Fig. 1, a), 핵막이 소실되고 염색체만이 관찰되는 GVBD 난자(Fig. 1, b), 극체를 형성하여 염색체가 서로 떨어진 두 곳에서 발견되는 PB 난자(Fig. 1, c), 그리고 퇴화되어 fragmentation이 일어난 퇴화난자(Fig. 1, d)의 형태를 용이하게 구별할 수 있었다.

Ketamine 처리후의 난포내 난자성숙도는 대조군에서 germinal vesicle이 완전한 상태로 존재하는 GV 난자가 관찰된 총 난자의 53.2%를 차지하는 반면, 실험군에서는 29.7%로 현저하게 낮았다($p < 0.05$)(Fig. 2). 퇴화된 DEG 난자의 경우는 대조군에서 33.5%로 나타났고, 실험군에서 58.9%를 나타내어 대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다($p < 0.05$). 그 밖에 핵막이 붕괴되어 소실된 GVBD 난자는 대조군에서 9.4%를, 실험군에서는 7.8%를 나타내었고, 극체를 형성한 PB 난자는 대조군에서 3.9%, 실험군에서 3.4%를 나타내었다.

2. Pentobarbitone이 난자성숙에 미치는 영향

Pentobarbitone 처리 후의 난포내 난자의 성숙도는 ketamine 처리군과 유사하였다(Fig. 2). GV난자의 경우 대조군의 53.2%에 비해 실험군에서는 30.3%를 나타내어 현저한 감소를($p < 0.01$), DEG난자의 경우 대조군의 33.5%에 비해 실험군에서는 59.4%를 나타내어 현저한 증가를 나타내었다($p < 0.01$). GVBD난자의 경우는 대조군에서 9.4%를, 실험군에서는 7.5%를 나타내었고, PB난자의 경우, 대조군에서 3.9%를, 실험군에서는 2.8%를 나타내었다.

3. Ketamine과 pentobarbitone이 과립세포의 세포주기에 미치는 영향

A_0기는 자연세포사에 의해 propidium iodide에 대한 DNA의 약한 형광성을 보이는 시기로서, 대조군에서는 분석한 전체세포의 26.6%가 A_0기에 속하는 반면 ketamine처리군에서는 44.9%, pentobarbitone처리군에서는 55.7%로 현저하게 증가되었다($p < 0.01$)(Fig. 3). G_0/G_1기는 세포가 분열하지 않거나 분열을 개시하는 초기로서 대조군의 39.7에 비하여 ketamine처리군에서는 27.2%, pentobarbitone처리군에서는 20.9%로 유의성있게 감소하였다($p < 0.01$). S기와 G_2/M기에 속하는 과립세포의 비율은 대조군에 비하여 다소 감소하는 경향을 보였지만 유의성은 없었다.

4. 혈청내 E_2 및 P_4의 농도변화

4-1 P_4의 농도변화

혈청내 P_4의 농도(ng/ml)는 대조군이 0.96 ± 0.28 ng/ml, ketamine 처리군이 1.81 ± 0.22 ng/ml, pentobarbitone 처리군이 2.14 ± 0.17 ng/ml로 측정되어 대조군에 비하여 ketamine 처리군($p < 0.05$)과 pentobarbitone 처리군($p < 0.05$)에서 유의성있는 농도증가를 나타내었다(Fig. 4).

4-2 E_2의 농도변화

혈청내 E_2의 농도(pg/ml)는 대조군이 57.09 ± 6.53 pg/ml, ketamine 처리군이 54.85 ± 4.52 pg/ml, pentobarbitone 처리군이 61.88 ± 3.43 pg/ml로 측정되어 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

고 찰

포유류의 난소내 난포폐쇄는 원시세포 및 성장, 성숙하고 있는 난포가 퇴화하는 모든 현상을 의미하며(Guraya, 1985), 이러한 난포의 퇴행분화는 배란난포의 정확한 수량을 결정하는데 중요한 역할을 한다(Hirshfield, 1986). 그러나 이러한 난포폐쇄의 양상은 형태적으로 현저하게 인지할 수 있는 폐쇄후기에야 알게 되므로 종래의 연구는 조직학적인 방법에 집중될 수밖에 없었다. 따라서 난포폐쇄의 다양한 요인과 그 정확한 기작에 대해서는 거의 밝혀져있지 않은 상태이다. 난포폐쇄의 기작을 이해하기 위한 실험 모델로서 인위적인 실험실 내의 난포폐쇄유도에 관한 많은 방법들이 연구되어 왔으나, 난포폐쇄를 인위적으로 유도하는 방법은 각기 장, 단점을 갖고 있고, 아직까지는 자연적인 난포폐쇄와 동일한 난포폐쇄를 유발시키는 확실한 방법이 없으며, 더불어 대부분의 난포폐쇄에 관한 연구들이 과립세포 및 협막세포에 집중되어 인위적 난포폐쇄에 따른 난포내 난자의 퇴화에 관한 연구가 미흡한 실정이다.

최근에 난포가 폐쇄로 진행되거나 아니면 배란 단계로 발달하는 선택 기작은 난소내 세포들의 자연세포사에 의해 결정되는 것으로 설명하고 있다(Hsueh et al., 1994). 자연세포사는 괴사와는 대조적으로 그 과정에서 유전자의 발현이 필요하므로 세포의 죽음은 계획된 일련의 사건의 결과라는 것을 암시한다. 자연세포사는 모든 진핵생물에서 유전적으로 보존되어 존재하는 계획된 “자살”이며, 이는 세포수준의 강한 보호 본능임에도 불구하고, 이에 관한 분자적인 기전은 분명하지 않은 실정이다. 자연세포사와 세포의 증식에는 밀접한 연관성이 있는 것으로 보여지는데 즉, 세포주기의 발달을 촉진시키는 많은 oncogene들 역시 자연세포사의 유발과 밀접한 관계를 가지고 있으며(Tilly et al., 1995) 세포주기에 손상이 일어나면 자연세포사는 막강하게 개시되어진다(Telford et al., 1991).

본 연구는 PMSG를 주사하여 성주기를 동시화시킨 뒤 발정전기에 해당하는 48시간 후 pentobarbitone 및 ketamine을 처리하여 각각의 마취제가 난자의 퇴화 및 E_2, P_4의 농도, 그리고 과립세포의 자연세포사에 미치는 영향을 조사하였다. 두 실험군 모두 퇴화된 난자(DEG)의 수가 germinal vesicle이 완전한 난자(GV)에 비하여 두 배에 달하여, 대조군보다 현저한 난자 퇴화율을 나타냈으며, 이는

자연적으로 일어난 난포폐쇄 및 ketamine과 pentobarbitone을 처리하여 인위적으로 유도된 난포폐쇄, 그리고 그 밖의 요인들에 의해 퇴화되어진 난자들에 의해 얻어진 결과라고 판단되어진다. 그러나 난포폐쇄가 일어나면 감수분열과 함께 핵막이 소실되거나 극체가 방출된다는 보고(Braw and Tsafriri, 1980)와는 달리, 두 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성은 없으나 핵막이 소실된 난자(GVBD)와 극체를 형성한 난자(PB)에서 다소 낮은 결과를 보였다. 이는 pentobarbitone이나 ketamine이 난포폐쇄를 유도하는 기작에 있어서, 일반적인 난포폐쇄기작과 다를 수 있음을 시사하며, 성숙된 난자인 GVBD난자와 PB난자가 난포폐쇄에 의해 퇴화되어 나타난 결과라고 사료된다.

과립세포의 세포주기분석 결과, 대조군에서도 난포폐쇄시에 보여지는 과립세포의 자연세포사가 높은 수준으로 관찰되었는데, 이는 자연적으로 일어나는 난소내 난포폐쇄에의한 결과로 사료된다. 그러나 대조군에 비하여, ketamine이나 pentobarbitone을 처리한 실험군에서는 A_0기의 세포가 현저하게 증가되었으며, 이와는 반대로 G_0/G_1기의 세포들은 유의성있게 감소하였다. 이러한 결과는 아마도 난포폐쇄가 진행되면서 G_0/G_1기의 과립세포들이 세포주기를 멈추고 A_0기로 진행되어 자연세포사가 일어나는 것으로 보여진다.

일반적으로 폐쇄난포의 스테로이드 합성률은 정상난포에 비하여 높게 나타나며(Braw and Tsafriri, 1980; Lee and Yoon, 1985), 종에 따라 또는 난포의 상태에 따라 다르나, 폐쇄가 일어나면 흰쥐의 난포는 E_2와 androgen을 생산하는 능력을 상실하고 다량의 P_4를 생산하는 능력을 보유한다고 보고되었다(Yoon, 1981; Teranova, 1981). 그러나 이러한 연구의 대부분은 흰쥐를 비롯하여 대동물에서 주로 연구되었으며, 본 연구에서처럼 생쥐를 대상으로 한 실험은 거의 없는 실정이다. 본 연구에서 폐쇄난포를 유도하는 두 마취제는 P_4의 농도를 현저히 높이는 것으로 관찰되었다. 즉, P_4의 경우 pentobarbitone 처리군과 ketamine처리군, 두 실험군에서 모두 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 나타내어 난포폐쇄시 다량의 P_4가 분비된다는 보고와 동일한 결과를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 ketamine과 pentobarbitone은 배란 전 LH surge를 억제하거나, 난포의 성장에 관여하는 스테로이드 호르몬들의 불균형을 유도하여 난포내 난자의 퇴화 및 난포내 과립세포의 자연세포사를 유발시키는 것으로 사료된다

결 론

본 실험에서는 마취제의 일종인 ketamine과 pentobarbitone이 생쥐 난소내 난자의 퇴화, 혈청내 E_2 및 P_4의 농도변화, 그리고 과립세포의 자연세포사에 미치는 영향을 알아보았다. ketamine 혹은 pentobarbitone을 처리한 실험군에서 대조군에 비하여 현저히 높은 난자의 퇴화율을 보였으며, 과립세포의 유세포분석결과 역시 대조군 보다 현저히 높은 비율로 과립세포의 자연세포사를 유발시킴을 알 수 있었다. 또한 대조군에 비하여 P_4의 합성률도 이들 마취제에 의하여 유의성있게 증가된 결과를 나타내었다. 따라서 ketamine과 pentobarbitone은 난포폐쇄의 연구에 유용한 실험모델로서 이용될수 있다고 사료된다.

인 용 문 헌

Bauer-Dantoin AC, Mc Donald JK, Levine JE: Neuropeptide Y potentiates Luteinizing hormone(LH)-releasing hormone-stimulated LH-surges in pentobarbital-blocked proestrus rat. *Endocrinology* 1991, 129, 402-408.

Blondin P, Dufour M, Sirard MA: Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: Folw cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol Reprod* 1996, 54, 631-637.

Braw RH, Bar-Ami S, Tsafriri A: Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* 1981, 25, 989-996.

Braw RH, Tsafriri A: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J Reprod Fertil* 1980, 59, 267-272.

Braw RH, Tsafriri A: Follicles explanted from pentobarbitone treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 1980, 59, 259-266.

Breiteneker G, Friedrich F, Kemeter P: Futher investigations on the maturation and degeneration of human ovarian follicles and their oocytes. *Fertil steril* 1978, 29, 336-341.

Channing CP, Fowler S, Engel B, Vitek K: Failure of daily injection of ketamine HCl to adversely alter menstrual cycle length, blood estrogen, and progesterone levels in the Rhesus monkey. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, 155, 615-619.

Coetsier T, Dhont M, De Sutter P, Merchiers E, Vesichelen L, Rossel MT: Propofol anaesthesia for ultrasound guided oocyte retrieval: Accumulation of the anasthetic agent in follicular fluid. *Human Reprod* 1992, 7, 1422-1424.

Darzynkiewicz Z, Williamson EA, Carswell EA, Old LJ: Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1984, 44, 83-90.

Guraya SS: Follicular atresia. In: Biology of Ovarian follicle. Chap 7, *Springer-Verlag,* Berlin. 1985, 228-275.

Guthrie HD, Welch GR, Copper BS, Zakaria AD, Johnson LA: Flow cytometric determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod* 1994, 50, 1303-1311.

Hirshfield AN: Effect of low dose of pregnant mare's serum gonadotropin on follicular recruitment and atresia in cycling rat. *Biol Repod* 1986, 35, 113-118.

Hsueh AJW, Billig H, Tsafriri A: Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr rev* 1994, 15, 707-724

Hughes FM & Gorospe WC: Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991, 129, 2415-2422.

Lee YK, Yoon YD: Changes of the concentration of steroid hormones in the porcine follicular fluids on atresia. *Kor J Fetil Steril* 1985, 12, 83-98.

Moore RM, HAy MF, Dott HM, Cran DG: Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J Endocrinol* 1978, 73, 309-318.

Richard JS: Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones of follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 1980, 60, 51-89

Ryan R: Follicular atresia: Some speculations of biochemical makers and mechanisms. In: Schwartz, N. B., and M. Hunzicker-Duunn(eds), Dynamics of Ovarian Function. *Raven Press,* New York 1981, 1-11.

Seifer DB, Honig J, Penzias AS, Lavy G, Nadkarni PM, Jones EE, Cherney AHD, Flynn SD: Flow cytometric analysis of deoxyribonucleic acid in human granulosa cells as a function of chronological age and ovulation induction regimen. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 75, 636-640.

Telford WG, King LE, Fraker PJ: Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolf* 1991, 1133, 275-285.

Terranova PF: An estradiol-progesterone shift in atretic follicles of the pentobarbital-treated hamster. In: Dynamics of Ovarian Function. *Reven Press*, New York 1981, 35-41.

Tilly JL: The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Frontiers Biol* 1996, 1, 1-11.

Tilly KI, Banerjee S, Banerjee PP, Tilly JL: Expression of the p53 and

Wilm's tumor suppressor genes in the rat ovary: gnadotropin repression in vitro and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. *Endocrinology* 1995, 136, 1394-1402.

Tsafriri A, Braw R: Experimental approch to atresia in mammal. *Oxf Rev Reprod Biol* 1984, 6226-6265

Uilenbroek JThJ, Van der Linden R, Woutersen PJA: Changes in estrogen biosythesis in preovulatory rat follicles after blockage of ovaultion with pentobarbitone sodium. *J Reprod Fert* 1984, 70, 549-555.

Uilenbroek JThJ, Woutersen PJA, Van der Schoot P: Atresia of preovulatory follicles; Gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod* 1980, 23, 219-229.

Yoon YD: The hormonal levels of the short luteal phases in Korean women. *J Basic Sci* 1981, 1, 154.

Yoon YD: Mechanism of follicular atresia: (I) Morphological and functional changes. *Kor J Emb Trans* 1990, 5, 1-20.

Zamboni L: Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biol Reprod(suppl)* 1970, 2, 44-63.

Fig. 1. Photomicrographs of the various stages of oocyte stained with acridine orange. The oocytes were obtained at 72 hour after injection of ketamine or pentobarbitone in PMSG-primed mouse ovary.
a, GV(germinal vesicle intact); b, GVBD(germinal vesicle break down); c, PB(polar body); d, DEG(degeneration). Magnification: a, X250; b, c, d, X400.

Fig. 2. Effects of ketamine and pentobarbitone on oocyte maturation of PMSG-primed mouse ovary. The percent of oocytes for their maturation was evaluated by staining with 0.5% aceto-lacmoid or 0.1% acridine orange. Data were expressed as means ± S.D. (n=10). *, $p < 0.05$ vs control.

Fig. 3. Effects of ketamine or pentobabitone on apoptotic cell death of mouse granulosa cells. Granulosa cells were harvested by nonezymatic needle puncture technique at 72 hour after injection of ketamine or pentobarbitone. The percentage of granulosa cells containing sub-diploid amount of DNA(%A0 cells), and the distribution of cells in the stages of the cell cycle, were determined by DNA fluorescence flow cytometry of propidium iodide-stained nuclei of ethanol-fixed cells. Data were expressed as mean ± S.D. (n=3). *, $p < 0.01$ vs control.

Fig. 4. Effects of ketamine or pentobarbitone on levels of estrogen and progesterone in PMSG-primed mouse sera. Steroid hormone were extracted and measured by radioimmunoassay at 72 hour after injection of ketamine or pentobarbitone. Data are expressed as mean ± S.D. (n=5). *, $p < 0.05$ vs control.