

생쥐난자의 성숙단계와 결빙억제제에 따른 동결 및 해빙 후 생존율에 관한 연구

제일병원 체외수정 연구실, 한양대학교 생물학과*

최규완 · 이호준 · 강희규* · 전용필* · 김문규*

Study on the Survival of Frozen-Thawed Mouse Oocytes According to Maturation Stage and Cryoprotectants

Kyoo Wan Choi, Ho Joon Lee, Hee Kyoo Kang*, Yong Pil Chun* and Moon Kyoo Kim*

*IVF Research Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital, Seoul 100-380, Korea *Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea*

= Abstract =

In order to increase the pregnancy rate by means of cryopreservation of the excess oocytes in IVF-ET program, the survival rate of the frozen-thawed oocytes of mouse was examined according to the stages of maturation, cryoprotectants and their treatment. The results were summarized as follows. First, during the continuous treatment with cryoprotectant media, the survival rate of oocytes was higher in DMSO than in PROH, and higher at low temperature(4°C) than at room temperature(25°C). Second, as regard with the maturation of immature(GV-intact) oocytes after treatment with cryoprotectant media, the rate of maturation in DMSO-treated group(52%) was higher than in PROH-treated group(35%). Third, according to the treatment of cryoprotectant media, the survival rate of frozen-thawed oocytes in DMSO-treated group(45%) was higher than in PROH-treated group(29%), and that of oocytes in DMSO 4-step treated group was higher than any other groups. Finally, in the post-thaw oocytes frozen at various stage of maturation, the survival rate of immature oocytes with GV was the highest in all groups. These results suggest that in the cryopreservation of mouse oocytes, DMSO was better than PROH as cryoprotectant, in treatment of cryoprotectant the multi-step treatment was better than single-step, and the post-thaw survival rate of oocytes was closely related to the maturity of oocytes. It is assumed that the highest survival rate of mouse oocytes with GV is due to the stability of the structures in nucleus and intracellular organelles, and of physiological function.

서 론

근래의 체외수정 및 배아이식술에서 과배란 유도 방법의 발달에 따라 다량의 난자 및 배아를 얻게 되었고, 다량의 배아를 이식함으로써 인태아의 빈도가 높아졌다. 따라서 다태아의 방지 및 이식횟수를 늘려 주어 임신율을 향

상시키기 위하여 배아 혹은 난자에 대한 동결 보존 기술을 응용해 왔다(Testart et al., 1986). 그러나 구미 대부분의 나라에서 인간의 발생중인 배아의 동결보존에 대한 윤리적 문제의 제기로 인해 법적으로 보존기간을 제한하는가 하면 금지하는 추세를 보이고 있으며(Walters, 1988), 잉여난자 및 폐기난소로부터의 난자를 이용한 공여난자 체외수정술(Leeton et al.,

1986)에서 난자의 동결보존에 대한 중요성이 인식되고 있다.

난자에 대한 동결보존은 1977년 Whittingham의 생쥐 난자에서의 보고 이래 여러 포유동물에서 보고되었고, Trounson(1984)이 인간 난자의 동결보존을 보고했으며, Chen(1986)에 의해 최초로 동결보존 및 해빙된 난자를 이용한 체외수정술에서 임신이 보고되었다. 그러나 아직 성공적인 보고도 많지 않으며, 난자의 동결보존에 대한 많은 문제점이 지적되고 있다(Ashwood-Smith et al., 1988; Kola et al., 1988; Mandelbaum et al., 1988).

인간을 비롯한 포유동물에서 미수정 난자의 동결보존은 배아에 비해 해빙 후 낮은 생존율(Sathananthan et al., 1988)과 낮은 수정 및 배아의 발생율이 보고되고 있다(Quinn et al., 1982; Mandelbaum et al., 1988; Hamlett et al., 1989; Schroeder et al., 1990; Sathananthan et al., 1988).

한편, 난자는 배아와는 다르게 성숙하는 과정에서 핵과 세포질의 세포학적 구조 및 생리화학적 변화가 많이 일어난다. 즉 성숙중인 난자는 핵막의 붕괴(germinal vesicle breakdown; GVBD), 염색체의 응축 및 탈응축과 미세관의 형성 및 소실이 일어난다. 이러한 성숙중인 난자에 동결보존중 저온처리 및 동결액의 처리는 난자세포질내의 미세관의 형성에 저해적인 요인으로 보고되었고(Pickering & Johnson, 1987; Sathananthan et al., 1988), 이로 인해 난자의 성숙 자체의 저해 및 난자의 성숙시 염색체 불분리 현상으로 인해 수정 후 염색체수 이상의 배아가 증가되는 것으로 보고되었다(Kola et al., 1988).

또한 성숙중에 난자의 골격구조 및 세포질내 소기관의 배열이 달라지게 되는데, 동결 및 해빙중 탈수과정과 가수과정 및 동결액의 처리에 의해 이같은 변화가 영향을 받게 되며(Johnson & Pickering, 1987), 이로 인해 해빙 후 성숙 및 수정의 저해를 받게 된다(Johnson, 1989).

그러나, 기존의 난자에 대한 동결보존은 배아에 준하여 시행하고 있지만 두가지 모두 방법론적으로 정립되지는 못한 상태이다. 또한 난자와 배아는 세포의 크기 뿐만 아니라 세포질내의 구조도 다르고, 동결하는 난자에서도 성숙정도에 따라 난자의 구조적 특성이 다르기 때문에 동결액의 처리 및 동결에 대한 내성이 다를 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 인간 체외수정 시술시 난자의 동결보존을 위한 예비 정보로 생쥐난자의 동결보존에 대한 방법을 시도해 보고자 하였다. 즉 동결액의 종류 및 처리방법에 따른 난자의 내성을 알아보고, 동결액이 체외 성숙에 미치는 영향, 동결액의 처리방법에 따른 해빙 후 생존성과 난자의 성숙시기에 따라 동결 및 해빙 후 난자의 생존율이 어떻게 달라지는지를 알아보고자 행하였다.

재료 및 방법

1. 난자의 획득

본 실험에서는 생후 4-8주된 생쥐(ICR strain)를 사용하였다. 성숙난자(M II oocyte)의 획득을 위해서는 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 5IU를 복강주사 48시간 후 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma) 5IU를 주사된 14-16시간후 경추파괴(cervical dislocation)로 도살하고 수란관 팽대부로부터 배란된 난자를 얻었으며, hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거한 후 배양액으로 씻은 후 동결에 사용하였다. 미성숙난자는 생쥐의 복강에 PMSG 5IU를 주사하고 46시간이 경과한 후 경추파괴로 도살하고 난소를 적출하여 난소당 10개 내외의 큰 난포를 26 gauge주사침으로 침자하여 나온 난자중 세포질과 핵이 건강한 미성숙란(GV oocyte)만을 사용하였다. 성숙중인 난자는 미성숙난자를 5시간(GVBD oocyte), 10시간(M I oocyte) 배양한 난자로 GVBD가 일어난 난자만을 사용하였다.

2. 동결액의 처리

난자의 동결을 위한 media는 10% fetal calf serum(FCS, Flow Lab.)을 포함한 PBS에 결빙억제제로 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)와 propanediol(PROH, Sigma)을 사용하여 일련농도(0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5M)의 동결액을 만들었다.

난자의 생존에 미치는 동결액의 영향을 알아보기 위해서는 난구세포들이 제거된 성숙난자를 10% FCS가 포함된 PBS를 대조군으로, DMSO 및 PROH가 1.5M씩 포함된 동결액을 실험군으로 사용하였다. 상온(25°C) 및 저온(4°C)에서 각 media내에 난자를 넣어 30분까지는 5분 간격으로 60분까지는 10분 간격으로, 최종 90분까지 처리하며 해부현미경하에서 형태학적으로

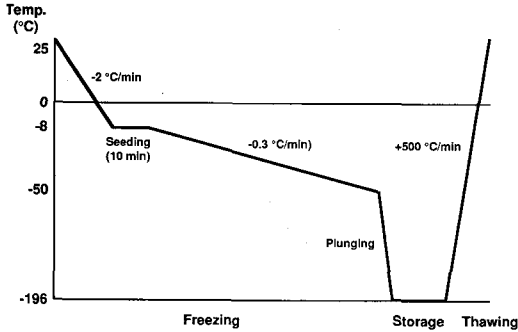


Fig. 1. Schematic diagram of freezing and thawing procedure.

Table 1. In vitro maturation of GV intact oocytes incubated for 20 hours after treatment with cryoprotectants

Treatment	No. of oocytes	Maturity of oocytes (%)		
		GV	GVBD-M I	M II
Ham's F-10	41	1(2)	15(37)	25(61)
PBS	48	2(4)	20(42)	26(54)
DMSO	46	3(7)	19(41)	24(52)
PROH	52	3(5)	31(60)	18(35)

관찰하여 세포질이 밝고 구형이 유지되는 난자를 생존한 것으로 판정하였다(Mandelbaum et al., 1988a).

또한 성숙에 미치는 동결액의 영향을 알아보기 위해서는 GV를 가진 미성숙난자에 DMSO와 PROH를 각 5분씩 4단계(0.25, 0.75, 1.25, 1.5M)로 침투시키고 4단계(1.5, 1.25, 0.75, 0.25M)로 제거시킨 후 0.4% BSA를 첨가한 Ham's F-10으로 세척한 후 배양기(37°C, 5% CO₂ in air, 100% humidity)내에서 20시간 배양하였다. 대조군으로는 10%의 FCS를 첨가한 PBS에 35분간 처리한 후 동일한 방법으로 배양하였다. 20시간 배양된 난자는 Carnoy's solution으로 6-10시간 정도 고정한 후 0.5% lacmoid액으로 염색하여 광학현미경하에서 난자의 핵상을 관찰함으로써 성숙정도를 판정하였다.

3. 동결 및 해빙

동결액의 처리방법에 따른 난자의 생존율을 알아보기 위해서는 난구세포를 제거한 성숙 난자는 총 처리시간을 20분으로 하여 DMSO와 PROH를 1단계(1.5M), 2단계(0.75, 1.5M), 3단계(0.5, 1.0, 1.5M), 4단계(0.25, 0.75, 1.25, 1.5M)로 처리한 후 straw에 넣고 세포냉동기(Cell

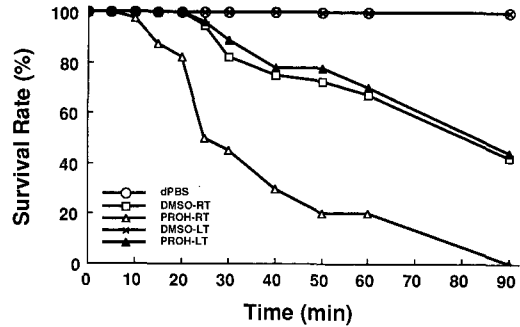


Fig. 2. Survival rate of oocytes during treatment of cryoprotectant media.

Freezer R204, Planer)를 이용하여 -50°C까지 저속냉동(-0.3°C/min)을 시행한 후 액체질소통에 직접 넣었다(그림 1). 수일 후 37°C water bath를 이용하여 급속해빙(500°C/min)시키고 4단계처리의 역순으로 결빙억제제를 제거한 후, 해부현미경과 광학현미경으로 관찰하여 모양이 둥글고, 세포질이 밝으며, 온전한 투명대를 가진 난자를 생존한 것으로 판정하였다(Mandelbaum et al., 1988a).

성숙단계에 따른 생존성을 알아보기 위해서는 PMSG처리 46시간 후 난소에서 획득한 미성숙난자를 0.4% BSA를 첨가한 Ham's F-10 배양액내에서 체외성숙시키며, 각 성숙단계(GV;0h, GVBD;5h, MI;10h, M II;ovulated)의 난자를 DMSO 4단계 방법을 이용하여 위에 기술된 바와 같이 동결 및 해빙 후 생존율을 관찰하였다.

결 과

1. 난자의 생존 및 성숙에 미치는 동결액의 영향

성숙난자의 생존율에 있어서 대조군은 상온과 저온에서 모두 100% 생존하였고, DMSO의 경우, 상온에서는 30분부터 생존율이 82.5%로 감소하였으나 저온에서는 90분까지 모두 온전하였다. 그러나 PROH의 경우는 상온에서 10분부터 감소하기 시작하여 25분에는 50%로 급격하게 감소된 후 지속적으로 감소하였으나, 저온에서는 상온에서보다 생존율이 훨씬 높아 DMSO의 상온처리군과 비슷한 양상을 나타낸다(그림 2).

미성숙난자에 각 동결액 처리후 20시간 배양시 M II 시기까지의 성숙은 Ham's F-10 medium과 동결액의 기본 배양액인 10% FCS가 섞

Table 2. the results of freezing and thawing of the ovulated oocytes according to the treatment step of cryoprotectants

Cryoprotectant	Treatment step	No. of oocytes	No. of oocytes(%) after thawing		
			Recovered	Zona-damaged	Survived
DMSO	1	78	65(83)	16(25)	22(34)
	2	105	93(88)	19(20)	28(30)
	3	40	32(80)	6(19)	11(34)
	4	113	109(97)	16(15)	49(45)
PROH	1	65	61(95)	14(23)	12(19)
	2	61	59(97)	13(22)	17(29)
	3	65	64(98)	12(18)	12(18)
	4	59	58(98)	13(22)	17(29)

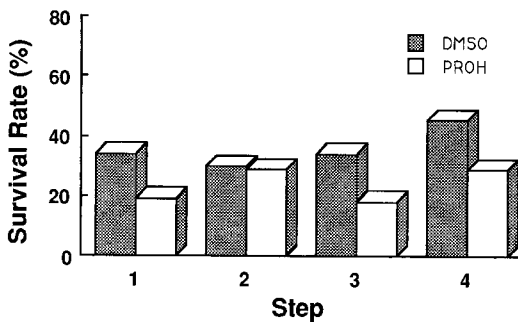


Fig. 3. The survival rates of frozen and thawed oocytes of mouse according to the treatment of cryoprotectants.

인 PBS에서는 각각 61%, 54%이었고, DMSO와 PROH처리군에서는 52%, 39%로 나타났다(표 1). 즉 동결액 처리후 성숙은 Ham's F-10에서 가장 높게 나타났고, PBS와 DMSO처리군에서는 비슷하게 나타났으며, PROH처리군에서 가장 낮게 나타났다. 성숙의 시작인 GVBD는 각 군에서 90%이상 일어났다.

2. 동결액의 처리방법에 따른 해빙 후 난자의 생존

동결액의 처리방법에 따른 해빙 후 난자의 생존율은 DMSO의 1단계에서 34%, 2단계에서 30%, 3단계에서 34%, 4단계에서 45%이었고, PROH의 각 단계에서는 19%, 29%, 19%, 29%로 나타났다. 즉 DMSO처리군이 PROH처리군보다 높은 생존율을 나타내었고, DMSO처리군은 다단계로 처리단계를 늘임에 따라 생존율의 증가를 보인 반면에 PROH처리군에서는 처리단계에 따른 생존율의 차이를 나타내지 않았다. 투명대의 상해는 DMSO와 PROH처리군 모두에서 20% 내외로 차이가 없게 나타났다(표 2, 그림 3).

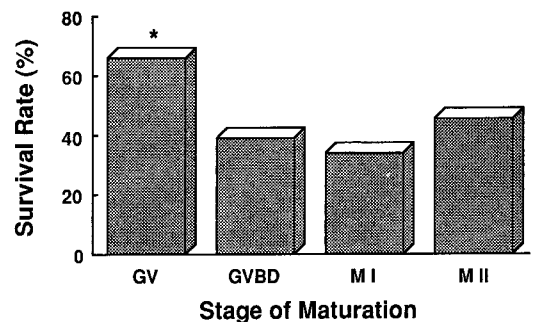


Fig. 4. The Survival rates of frozen and thawed oocytes of mouse according to the stages of maturation. * $p < 0.05$, significantly different from other stages.

Table 3. The results of freezing and thawing of the mouse oocytes at various stages of maturation in DMSO 4 step treatment

Stage of maturation	No. of oocytes	No. of oocytes(%) after thawing	
		Recovered	Survived
GV	151	131(88)	88(66)*
GVBD	122	96(80)	39(39)
M I	71	61(89)	22(34)
M II	113	109(96)	49(45)

*Significant vs other stages, $p < 0.05$

3. 난자의 성숙단계에 따른 해빙 후 생존

난자의 성숙시기별 동결 및 해빙 후 생존율에 대한 결과는 표 3에 나타난바와 같다. 동결 및 해빙 후 각 성숙단계에 난자의 생존율은 GV시기가 66%, GVBD시기가 39%, M I시기가 34%, M II시기의 난자가 45%로 나타났다. 즉 성숙중인 난자보다 성숙난자에서 높은 생존율을 나타내었고, GV가 있는 미성숙난자의 생

존율이 가장 높은 것으로 나타났다(그림 4).

고 찰

난자는 착상전 배아에 비하여 동결보존에 여러가지 어려움이 지적되고 있다. 즉 난자는 표면적에 비하여 체적이 크고, 특히 체외수정시 난자의 성숙도에 대한 정확한 판단이 어려울 뿐 아니라 성숙정도가 정확하게 일치되지 않는 것도 이유이며, 연구자에 따라 대립되고 있는 사실이지만 염색체수 이상의 유발여부 및 동결하는 시간도 배아에 비하여 자유롭지 못한 단점들이 있다. 그러나 윤리적, 종교적, 법적인 문제의 제기로 난자의 동결보존에 여러 방법이 시도되고 있다.

본 연구에서 난자의 동결보존의 요소인 동결액의 처리에 따른 난자의 생존율, 체외성숙과 해빙 후 생존율 및 성숙도에 따른 해빙 후 생존율을 알아본 결과로, 첫째, DMSO와 PROH의 두 동결액에서의 생존은 DMSO가 PROH보다, 실온에서 보다 저온에서 높게 유지되었다(그림 2). 이와 같은 결과는 동결액이 세포에 침투되는 속도의 차이로 인해 생기는 것으로 생각된다. 이러한 침투속도는 결빙억제제의 종류와 처리되는 온도에 따라 차이가 있으며, 침투속도의 차이로 인해 세포에 미치는 osmotic shock의 정도차이가 있고, 결과는 이들의 반영으로 생각된다. 이는 낮은 온도의 동결액에 노출된 난자에서의 해빙 후 생존률이 높다는 Johnson(1989)의 결과와도 일치한다. 그렇다면 동결시 탈수과정을 저온환경에서 실행하는 것이 해빙 후 생존율을 높일 수 있는 방법으로 사료된다. 그러나, 성숙된 난자에 저온처리하는 난자의 미세관을 분해(depolymerization)하여 세포질내에서 염색체를 퍼지게 하며, 다른 설치류보다 생쥐의 난자가 보다 민감하게 미세관에 영향을 받는다는 보고(Pickering & Johnson, 1987)도 있다. 저온처리 및 동결액 자체가 성숙난자에서 피질과립(cortical granule)을 방출시켜 투명대의 물리적 성질을 변화시킴으로써 수정율을 감소시킨다는 보고도 있다(Johnson et al., 1987, 1989; Vincent et al., 1990a). 따라서 동결액의 종류, 처리시간 및 온도는 보다 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

둘째로, 동결액의 처리 후 미성숙난자의 체외성숙은 동결액이 처리되지 않은 Ham's F-10 (61%)보다는 떨어지지만, 동결액의 기본 me-

dia인 PBS(54%)와 DMSO(52%)에서 비슷하게 나타난 것과 PROH(35%)에서 가장 낮게 나타난 것은 각 동결액의 침투율의 차이로 인한 결과로 사료된다. 또한 DMSO와 다르게 PROH는 세포질내에 존재하는 tubulin의 농도를 감소시켜 세포골격구조에 미치는 영향의 차이가 있다는 보고(Vincent et al., 1989)와도 상응하는 것으로 생각된다. 또한 동결액의 종류에 따른 성숙분열의 재개 및 성숙은 동결액에 의해 손상 받은 actin과 같은 골격구조가 동결액 제거시 복구되는 정도의 차이가 있다는 보고(Vincent et al., 1989; 1990b)로 볼때, 결빙억제제에 따라 침투속도의 차이와 세포골격구조의 손상 및 복구정도의 차이로 인해, 처리 이후 난자의 성숙율이 차이가 나는 것으로 사료된다.

셋째, 동결액의 처리단계에 따른 해빙 후 결과(그림 3)에서 DMSO처리군(45%)이 PROH처리군(29%)보다 해빙 후 생존율이 높게 나타난 이유는 처리방법이 동일했던 본 연구에서는 그림 1에서 나타났듯이 동결액이 종류 및 처리방법에 따라 침투속도 및 노출된 온도와 시간의 영향을 반영하는 결과로 사료된다(Todorow et al., 1989a). 또한 DMSO의 경우 1단계군에서 보다 4단계처리군에서 생존율이 높은 것은 osmotic shock를 줄여줌으로 상해를 줄여 주었기 때문으로 생각된다. 다른 연구자들도 이와 유사한 결과를 보고하였다(Siebzehnruebl et al., 1989; Todorow et al., 1989b). 본 연구에서는 냉각속도를 DMSO처리군과 PROH처리군에서 동일하게 시행했으나, 일부 연구자들의 보고에 따르면 PROH의 경우 급속냉각방법이 유리하다는 보고도 있다(Feichtinger et al., 1987). 본 연구에서의 PROH처리군에서 생존율이 낮은 것이 이러한 이유때문으로 생각된다. 따라서 DMOS와 PROH는 처리하는 방법이 근본적으로 달라야 될 것으로 사료된다.

난자의 성숙단계에 따른 해빙 후 생존율은 GV시기가 가장 높게 나타났다(그림 4). 이는 van Blerkom(1989)의 GV시기의 난자가 동결 및 해빙 후 세포구조나 염색체의 구조상으로 보다 안정적이고, 해빙 후 감수분열 재개 및 성숙의 빈도가 높다는 보고와 같은 경향을 나타내는 것으로 생각된다. 그러나 Mandelbaum 등(1988a)은 난자의 해빙 후 생존율과 성숙율을 고려할 때 오히려 극체를 가진 성숙난자가 유리하다는 이견을 나타내기도 하였다. 또한 난구세포로 싸인 쥐의 난자의 경우 미성숙난자

보다 성숙난자의 생존율이 높다는 보고도 있다 (Schroeder et al., 1990). 본 연구에서는 난구세포가 제거된 상태에서 시행된 결과이지만, 수정 직전의 성숙된 난자에서 피질과립(cortical granule)의 방출로 인한 투명대의 물리적인 성격의 변화(Vincent et al., 1990a), 혹은 방추사의 소실로 인한 염색체수이상(Kola et al., 1988)을 고려할 경우 GV시기의 난자가 동결보존에 유리할 것으로 사료된다.

이상의 결과들로 보아 생쥐난자의 동결보존은 DMSO다단계가 가장 좋은 생존율을 나타내고 있지만, PROH의 경우는 처리방법을 달리 해야 할 것으로 생각된다. 또한 종에 따라 난자의 크기 및 구조와 투명대의 두께가 다르기 때문에 종에 따른 적절한 동결방법이 선택되어야 할 것으로 사료된다. 사람의 체외수정기술에서 보고되었던 임신의 2례에서 서로 다른 동결 및 해빙방법을 사용하였고, 해빙후 8-25%로 높지 않은 생존율을 보고하였다(Chen, 1986; van Uem et al., 1987). 따라서, 아직 사람 난자에의 적절한 동결보존 방법을 찾으려 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 체외수정기술에서 잉여의 난자를 성공적으로 동결보존하여 임신율을 향상시키고자 사람 난자의 동결보존에 대한 예비지식을 얻기 위하여, 생쥐난자를 이용하여 동결보존을 시행하여 다음과 결과를 얻었다.

1. 동결액내에서의 난자 생존율은 PROH보다 DMSO에서, 상온에서보다 저온에서 더 높았다.

2. 동결액을 침투, 제거시킨 미성숙난자의 성숙율은 PROH처리군(35%)보다 DMSO처리군(52%)에서 높게 나타났다.

3. 동결액의 처리방법에 따른 해빙 후 난자의 생존율은 DMSO처리군(45%)이 PROH처리군(29%)보다 높게 나타났으며, DMSO 4단계 처리군에서 가장 높게 나타났다.

4. 난자의 성숙시기에 다른 해빙 후 난자의 생존율은 GV시기의 미성숙란(66%)이 가장 높게 나타났다.

결론적으로, 생쥐난자의 동결보존은 결빙억제제로는 DMSO가 PROH보다, 동결액의 처리는 다단계로 처리함이 높은 생존율을 얻는 방법이며, 해빙 후 난자의 생존율이 성숙정도와

밀접한 관계를 갖는 것으로 나타났다. GV시기의 난자에서 가장 높은 생존율을 보이는 것은 감수분열상에 있는 다른 성숙시기의 난자보다 핵과 세포소기관의 구조와 생리적 기능이 안정하기 때문이라고 사료된다.

인 용 문 헌

- Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC, Ashorn R: Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 1988, 3, 795-802.
- van Blerkom J: Maturation at high frequency of germinal-vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation: alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Hum Reprod* 1989, 4, 883-898.
- Chen C: Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986, 1, 884-886.
- Chuong CJ, Coulam CB: Effects of cryopreservation on the viability and fertilizability of unfertilized hamster oocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1986, 155, 1240-1245.
- Feichtinger W, Benko I, Kemeter P: Freezing human oocytes using rapid techniques. In: Feichtinger W, Kemeter P, eds. *Future aspects in human in vitro fertilization*, Springer Verlag, 1987, 101-110.
- Hamlett DK, Franken DR, Croje HS, Luus H: Murine oocyte cryopreservation: comparison between fertilization success rates of fresh and frozen Metaphase I and II oocytes. *Arch Androl* 1989, 23, 27-31.
- Johnson MH, Pickering SJ: The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 1987, 100, 313-324.
- Johnson MH: The effect of fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethylsulphoxide: an optimal protocol. *J IVF & ET* 1989, 6, 168-175.
- Kola I, Kirby C, Davey A, Trounson A: Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology* 1988, 38, 467-474.

- Leeton J, Caro C, Howlett D, Harman J: The search for donor eggs: a problem of supply and demand. *Clin Reprod Fertil* 1986, 4, 337-340.
- Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, Plachot M, Alnot MO, Lim H, Salat-Baroux J: Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. In: Jones, Jr HW, Schrader C, eds. *Annals of the New York Academy of sciences, New York*, 1988, 541, 550-561.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Tibi C, Cohen J, Salat-Baroux J: Solutions provided by the freezing of embryos and questions posed by the freezing of human oocytes. *Rev Fr Gynecol Obstet* 1988b, 83, 619-622.
- Pickering SJ, Johnson MH: The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1987, 2, 207-216.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG: Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1982, 66, 161-168.
- Sathananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, Mok H, Lee MN: The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988, 21, 385-401.
- Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ: Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 1990, 89, 43-50.
- Siebzenruebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L, Lang N: Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propane-1,2-diol. *Hum Reprod* 1989, 4, 312-317.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268-272.
- Todorow SJ, Siebzenruebl ER, Spitzer M, Koch R, Wildt L, Lang N: Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freezing-thawing regimens. I. Mouse and hamster. *Hum Reprod* 1989a, 4, 805-811.
- Todorow SJ, Siebzenruebl ER, Spitzer M, Koch R, Wildt L, Lang N: Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freezing-thawing regimens. II. Human. *Hum Reprod* 1989b, 4, 812-816.
- Trounson A: In vitro fertilization and embryo preservation. In: Trounson A, Wood C, eds. *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, Churchill Livingstone, Melbourne, Australia*, 1984, 111-130.
- van Uem JFHM, Siebzenruebl ER, Schuh B, Koch R, Torotnow, Lang N: Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987, 1, 752-753.
- Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP: Solvent effects on cytoskeletal organization and in vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil* 1989, 87, 809-820.
- Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH: The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fertil* 1990a, 89, 253-259.
- Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ: Dimethylsulphoxide affects the organization of microfilaments in the mouse oocyte. *Molecul Reprod Devel* 1990b, 26, 227-235.
- Walters L: Ethical aspects of the new reproductive technologies. In: Jones, Jr HW, Schrader C, eds. *Annals of the New York Academy of sciences, New York*, 1988, 541, 646-663.
- Whittingham DG: Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *J Reprod Fertil* 1977, 49, 89-94.