

Cryoloop를 이용한 생쥐 포배아의 초자화동결

삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 산부인과 불임클리닉²
염혜원¹ · 김수경¹ · 송상진¹ · 박용석¹ · 궁미경² · 강인수²

Vitrification of Mouse Blastocyst Using Cryoloop

Hyewon Youm¹, Soo Kyung Kim¹, Sang Jin Song¹, Yong-Seog Park¹,
Mi Kyoung Koong², Inn Soo Kang²

Laboratory of Reproductive Biology & Infertility¹, Division of Reproductive Endocrinology and Infertility,
Department of OB/GYN², Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: The aim of this study is to compare the efficiency of a method for the cryopreservation of mouse blastocyst.

Methods: Mouse embryos were obtained at 2-cell stage and cultured to blastocyst stage in T6 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Morphologically normal blastocysts were collected and randomly divided to one control and four experimental groups. In control group, blastocysts were cultured *in vitro* continuously for additional two days. In group 2, blastocysts were exposed to vitrification solution (ethylene glycol) only without cryopreservation (exposure only group). In group 3, 4 and 5, blastocysts were cryopreserved by slow-freezing procedure with glycerol (slow-freezing group) or by vitrification procedure using EM grids (EM grids group) and cryoloop (cryoloop group), respectively. Frozen blastocysts were thawed and cultured for additional two days. Twenty four hours after thawing, some blastocysts were fixed and stained with Hoechst 33342 (bisbenzimidazole) and the number of nuclei in each blastocysts were counted to confirm the survival of blastocysts in experimental groups.

Results: Survival rate and hatching rate of the blastocysts in slow-freezing group (24 h: 72.4% and 66.0%, 48 h: 63.2% and 64.6%) and EM grids group (24 h: survival rate 77.3%, 48 h: 70.1% and 71.4%) were significantly lower (X^2 -test $p < 0.05$) than those of control group (24 h: 93.4% and 86.0%, 48 h: 88.5% and 90.7%). In contrast, the survival rate and hatching rate of the blastocysts in cryoloop group (24 h: 84.1% and 84.1%, 48 h 79.3% and 87.7%) is well compared with those in the control group. The mean (\pm SD) cell number of blastocyst in the exposure only (89.2 ± 11.5), EM grids (85.0 ± 10.3) and cryoloop (89.0 ± 11.0) groups, except slow-freezing group (79.0 ± 10.0), were not significantly different from that of control group (93.1 ± 13.9) 24 h after thawing (Student's t-test).

Conclusion: This study demonstrates that higher survival rate of vitrified-thawed mouse blastocyst can be obtained using cryoloop as the embryo container at freezing rather than slow-freezing or vitrification using EM grids. The results of this study suggest that vitrification using cryoloop (with ethylene glycol) may be a preferable procedure for mouse blastocyst cryopreservation and could be applied to the human blastocyst cryopreservation.

Key Words: Blastocyst, Vitrification, Slow-freezing, EM grids, Cryoloop

최근에는 배양액과 배양조건의 개선으로 인간을 포함한 포유류에서 포배아까지 체외배양이 가능해졌으며 포배아 이식에 대한 요구가 높아지고 있다. 따라서 잉여의 포배아를 동결하는 것은 필수적이며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. Wittingham 등이 생쥐를 이용해 최초의 산자 생산을 보고한 이래, 배아의 동결과 용해를 위한 다양하고 새로운 방법들이 소개되고 있다. 성공적인 동결-용해는 배아의 상태에 따른 동결 방법에 의해 크게 좌우된다. 지금까지 저속동결 방법이 동결법의 주류를 이루어 왔으나 이 방법은 비싼 장비와 많은 시간이 소모되는 단점이 있다. Rall과 Fahy²는 포유동물의 배아를 동결할 수 있는 새로운 방법으로 초자화동결법(vitrification)을 소개하였고, 이는 저속동결법을 대체하거나 보완할 수 있는 방법 중 하나로 평가되고 있다. 초자화동결은 고농도의 동결보호제와 고속의 동결-용해 시간을 이용하여 빙결정을 이루지 않고 배아를 동결하는 방법이나 고농도의 동결보호제를 사용하기 때문에 동결보호제의 독성과 삼투압에 의한 충격이 생존을 위협하는 중요한 요인으로 생각된다. Kasai 등³은 동결보호제로서 ethylene glycol, Ficoll, sucrose의 혼합액을 소개하였다. Ethylene glycol은 투과성 물질로 동결 중 세포막을 안정화시키는데 중요한 역할을 하고 Ficoll은 액체 내의 점도를 증가시키는 기능을 담당하며 trehalose나 sucrose는 삼투압으로 인한 세포의 손상을 감소시키는 역할을 한다. 이들은 동결로 인해 세포 내의 수분이 감소될 때 세포막 변형을 막아주는 것으로 보이나 자세한 기작은 아직 알려져 있지 않다.⁴

최근 초자화동결을 위해 electron microscope (EM) grids,⁵ open pulled straw (OPS),^{6,7} cryoloop^{8,9} 등이 배아를 적재하는 도구로 사용되고 있다. Martino 등은 EM grids를 이용하여 난자의 동결-용해에 성공하였고 Vajta 등¹⁰은 OPS를 이용하여 소의 난자와 배아를 동결-용해한 뒤 산자를 보았다. Cryoloop는 단열층이 없는 열린 구조(open system)를 지니며 배아를 포함한 동결액의 부피가 1 µl 이하이므로 냉각과정 동안 빠르고 일정한 냉기의 전달이 이루어지는 장점이 있다. 1999년 Lane 등^{8,9}은 cryoloop로 hamster의 배아를 초자화동결하여 최초의 산자를 얻었으며 소의 난자와 배아에서도 cryoloop 초자화동결을 시행하여 높

은 생존율과 발생율을 보고하였다.

따라서 본 연구는 생쥐의 포배아를 여러 가지 방법으로 동결, 용해해 봄으로써 cryoloop를 이용한 초자화동결법으로 생쥐 포배아를 동결-용해 후 정상적인 발달 능력을 지니는지 확인하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 생쥐 배아의 획득

본 실험에 사용된 실험 동물은 생후 4~5주된 암컷 생쥐(ICR strain)와 생후 12주 이상된 수컷 생쥐(ICR strain)이다. 초기 배아를 획득하기 위하여 암컷 생쥐의 복강 내에 5 IU/ml의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 투여하고 46~48시간 간격으로 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 주사하여 과배란을 유도하였다. 이어서 각각 한 마리의 암수 생쥐를 하룻밤 동안 교미시키고 다음 날 아침 질전(vaginal plug)이 확인된 암컷만을 교미하였다고 판정하였다. hCG를 주사한 뒤 48시간에 plug가 확인되었던 암컷 생쥐를 경추파열로 도살한 뒤 수관관을 적출하여 0.4% bovine serum albumin (BSA, Gibco)-T6 medium에서 배양액을 관류하는 방법으로 2-세포기의 배아를 획득하였다.

2. 2-세포기 배아의 배양

획득된 생쥐의 2-세포기 배아는 10% fetal bovine serum (FBS)-T6 medium 내에서 paraffin oil drop 방법을 이용하여 포배아로 발달할 때까지 3일간 체외에서 배양하였다.

3. 실험 디자인

체외배양으로 얻은 생쥐의 포배아를 현미경 하에서 관찰하여 정상적인 모양으로 발달된 포배아를 선별하였다. 이들을 대조군과 4개의 실험군으로 분류한 뒤, 대조군의 배아는 10% FBS-T6 medium에서 2일간 더 배양하여 부화(hatching)와 외성장(out growth) 과정을 관찰하였다. 첫 번째 실험군은 배아를 초자화동결과 동일한 조건으로 동결액과 용해액에 노출시킨 뒤 동결하지 않고 대조군과 같은 방법으로 2일간 더 배양하였다. 두 번째 실험군은 저속동결법을 이용하여 생쥐의 포배아를 동결-용해한 뒤 2일

간 더 제외배양하였다. 세 번째 실험군은 EM copper grids (Gilder Co., Westchester, PA)를 이용하여 생쥐의 포배이를 초자화동결 하였고, 네 번째 실험군은 cryoloop (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA)를 이용하여 배이를 초자화동결한 뒤 용해하여 대조군과 같은 방법으로 배양하였다.

4. 저속동결 및 용해

저속동결은 Menezo 등¹¹의 방법을 응용하여 시행하였다. 포배이의 동결은 10% FBS-phosphate buffered saline (PBS)를 기본배양액으로 하여 5% glycerol, 9% glycerol + 0.2 M sucrose의 혼합액에서 각각 10분씩 평형을 유도하며 세포 내의 수분을 동결보호제와 대체하였다. 그 후 0.2 ml plastic straw (IVM Co, France)에 배이를 5~10개씩 장진하여 자동세포동결기 (Planner, Model KRYO-10 Series III)에 넣고 동결을 진행하였다. 상온으로부터 -7°C까지 분당 2°C씩 냉각시키고 -7°C에서 10분간 정체시켜 식빙 (seeding)을 유도하였으며, -7°C에서 -40°C까지는 분당 0.3°C씩 냉각

Table 1. Thawing procedure of blastocyst after slow freezing procedure

Step	Glycerol	Sucrose (M)	Time (min)
1	5	0.4	5
2	4	0.2	6
3	3	0.2	7
4	2	0.2	7
5	1	0.2	6
6	0	0.2	2
7	0	0	5

시킨 후, straw를 -196°C 액체질소에 보관하였다.

포배이의 용해는 액체질소에서 꺼낸 straw를 상온에서 40초간 정체시키고 37°C의 항온수조에서 1분간 녹인 후 Table 1에 명시된 단계에 따라 배이 내의 glycerol을 제거하였다. 용해가 끝난 포배이는 10% FBS-T6 medium으로 옮겨 2일간 배양하였다.

5. 초자화동결 및 용해

초자화동결은 Kasai 등³의 방법을 변형하여 실시하였다. 동결액과 용해액은 10% FBS-PBS를 기본배양액으로 하여 동결 1단계는 기본배양액에 20% ethylene glycol (v/v)를 첨가한 동결액에서 포배이를 3분간 탈수시켰다. 2단계는 포배이를 기본배양액에 40% (v/v) ethylene glycol, 18% (w/v) Ficoll (Ficoll 70, average MW: 70 000 Da), 0.3 M sucrose를 혼합한 동결액으로 평형을 실시한 뒤 5~10개의 포배이를 EM grids 또는 cryoloop에 적재하여 액체질소에 넣었다. 이때 2단계 시작에서 액체질소로 EM grids 또는 cryoloop를 침지하기까지 걸리는 시간은 60초를 넘지 않았다.

포배이의 용해 1단계에서는 액체질소로부터 EM grids 또는 cryoloop를 꺼내어 기본배양액 + 0.3 M sucrose의 용해액으로 옮겨 생쥐의 포배이를 순간적으로 녹인 후 같은 용해액으로 옮겨 2분간 정체하였다. 2단계에서는 기본배양액 + 0.15 M sucrose인 용해액으로 포배이를 옮겨 2분간 평형을 이루도록 하였으며, 3단계는 기본배양액에서 포배이를 3회 세척한 후 10% FBS-T6 medium으로 옮겨 배양하였다.

6. Cryoloop

초자화동결에 이용된 cryoloop는 두께 20 μm의

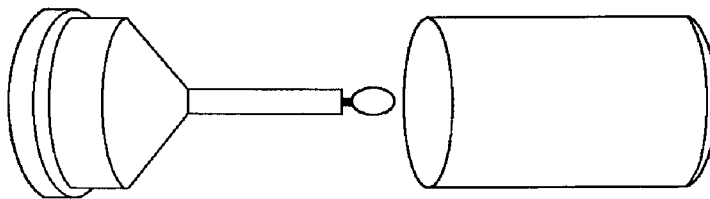


Figure 1. Illustration of the cryoloop used for the vitrification of blastocysts. The nylon cryoloop is attached to the lid of a cryovial by a stainless steel tubing. For vitrification, the blastocysts are placed on the cryoloop that had been coated with a thin film of cryoprotectant solution. Blastocysts on the cryoloop are placed into the cryovial, which is submerged and filled with liquid nitrogen and the vial is sealed.

Table 2. Effects of the cryopreservation on mouse blastocysts

Study group	No. of Blastocysts	24 h after the treatment		48 h after the treatment	
		Survival (%)	Hatching (%)	Survival (%)	Hatching (%)
Control	61	57 (93.4)	49 (86.0)	54 (88.5)	49 (90.7)
Exposure only	65	56 (86.2)	47 (83.9)	53 (81.5)	43 (81.1)
Slow-freezing	76	55 (72.4)*	33 (60.0)*	48 (63.2)*	31 (64.6)*
EM grids	119	92 (77.3) [†]	72 (78.3)	84 (70.1) [†]	60 (71.4) [†]
Cryoloop	82	69 (84.1)	58 (84.1)	65 (79.3)	57 (87.7)

P values significantly differ from control group (*p<0.005, [†]p<0.05)

Table 3. The mean cell number of a blastocyst cultured 24 h after thawing

Study group	No. of Blastocysts	Total cell number (means±SD)
Control	17	93.1±13.9
Exposure only	23	89.2±11.5
Slow freezing	16	79.0±10.0 [†]
EM grids	20	85.0±10.3
Cryoloop	18	89.0±11.0

P values significantly differ from the control group ([†]p<0.05)

nylon loop가 0.5~0.7 mm의 지름을 지닌 타원을 형성하며 cryovial 뚜껑 부분의 stainless steel pipe (micro tube)에 부착되어 있는 형태이다. 동결액에 cryoloop의 nylon loop 부분을 담그면 얇은 막의 동결액 film이 형성되고 그 위에 포배아를 올려 놓았다. Cryovial에 미리 액체질소를 충전시킨 뒤 포배아가 담겨 있는 nylon loop를 재빨리 cryovial에 넣으면 순간적으로 배아의 동결이 이루어지고 cryovial의 뚜껑을 닫은 후 -196℃의 액체질소 탱크에 넣어 보관하였다 (Figure 1).

7. 배아의 생존과 발달

초자화동결과 용해 후 배양 중인 생쥐의 배아는 해부현미경 하에서 2일 동안 24시간마다 관찰되었다. 이때 수축된 포배아가 포배강을 이루며 채팽창되거나 부화, 외성장하는 것을 생존한 것으로 간주하였다.

8. 배아의 염색 및 할구수 계수

포배아를 동결-용해하여 24시간 동안 체외에서 배양한 뒤 대조군과 실험군에서 생존해 있는 포배아의 할구수를 비교하였다. 이를 위해 포배아를 1% glutaraldehyde에 고정하고 10 µg/µl Hoechst 33342 (bisbenzimidazole solution, Sigma)가 포함된 PBS에서 염색하고 (Koong et al., 1998) 염색된 포배아를 0.4% polyvinyl pyrrolidin (PVP, Sigma)-PBS로 세척 후 mounting 하고 형광현미경 (nikon optiphot-2, Japan) 하에서 배아의 할구수를 계수하였다.

9. 통계처리

각 실험 값들의 통계적 유의성은 χ^2 -test를 이용하였고 세포의 할구수를 계수하는 경우 Student's t-test와 이용하였다. p값이 0.05 보다 작은 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 생쥐 포배아의 생존율과 부화율

본 실험에 사용된 생쥐 포배아의 생존율과 부화율은 용해 후 24시간과 48시간에 관찰하였다 (Table 2). 대조군과 4개의 실험군에서 각각의 처리 후 24시간에 관찰된 생쥐 포배아의 생존율은 대조군, 동결-용해액 노출군, 저속동결군, EM grids군, cryoloop군에서 각각 93.4%, 86.2%, 72.4%, 77.3%, 84.1%로 저속동결군 (p<0.005)과 EM grids군 (p<0.05)에서 대조군에 비해 생존율이 유의하게 감소하였다. 또한 부화율은 각각 86.0%, 83.9%, 60.0%, 78.3%, 84.1%로

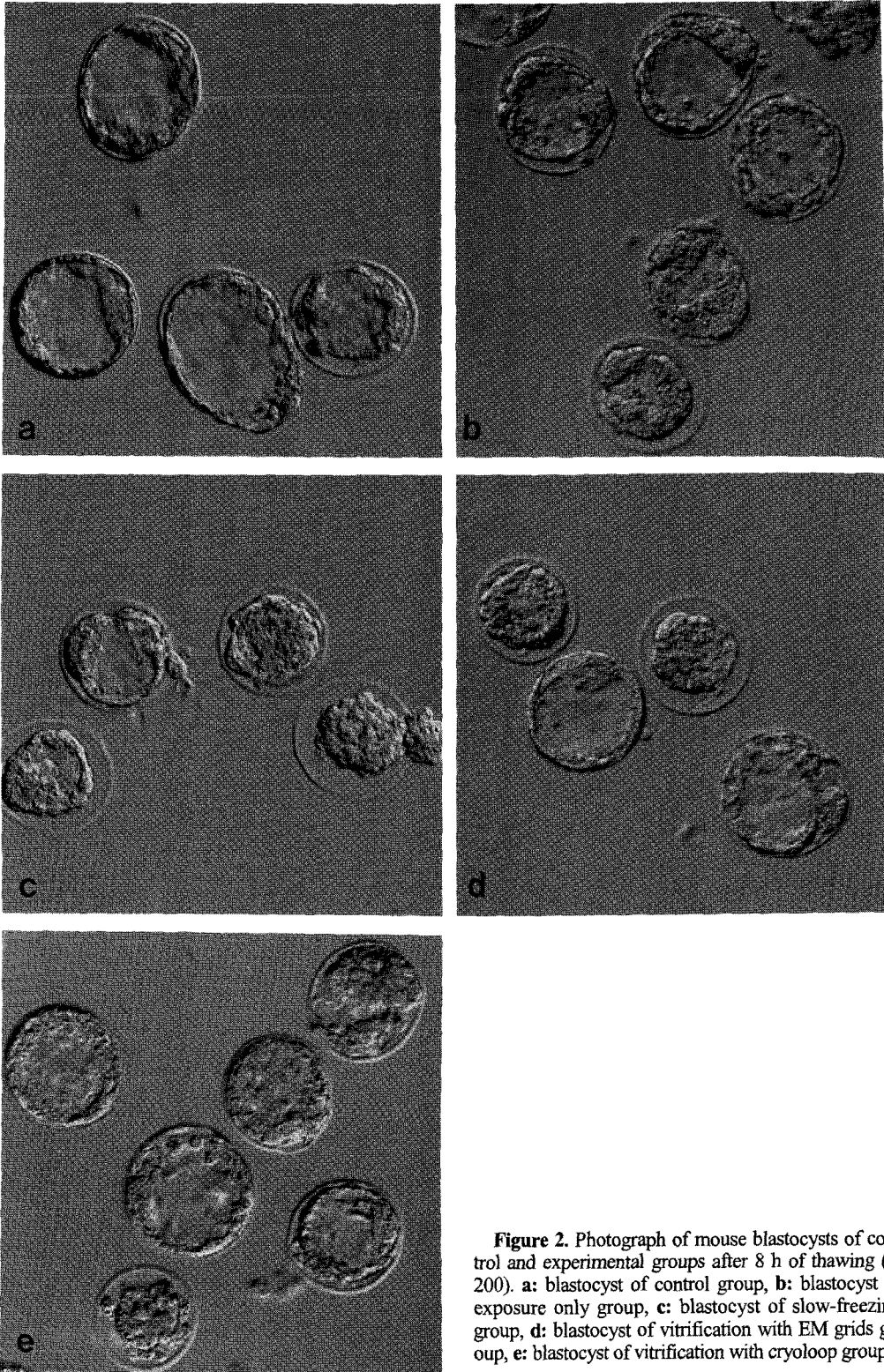


Figure 2. Photograph of mouse blastocysts of control and experimental groups after 8 h of thawing (X 200). **a:** blastocyst of control group, **b:** blastocyst of exposure only group, **c:** blastocyst of slow-freezing group, **d:** blastocyst of vitrification with EM grids group, **e:** blastocyst of vitrification with cryoloop group.

저속동결군에서 유의한 차이를 보이며 감소하였다 ($p < 0.005$).

동결-융해 후 48시간에 관찰한 생쥐 포배아의 생존율은 대조군, 동결-해빙액 노출군, 저속동결군, EM grids군, cryoloop군 각각에서 88.5%, 81.5%, 63.2%, 70.1%, 79.3%를 나타냈으며 부화율은 각각 90.7%,

81.1%, 64.6%, 71.4%, 87.7%를 보여 저속동결군 ($p < 0.005$)과 EM grids군 ($p < 0.05$)에서 유의한 차이를 보이며 생존율과 부화율이 감소되었다.

Figure 2는 대조군과 동결-융해한 실험군의 포배아 상태를 나타낸 것으로 각각의 처리 후 8시간 동안 배아를 체외에서 배양하여 융해된 포배아가 재

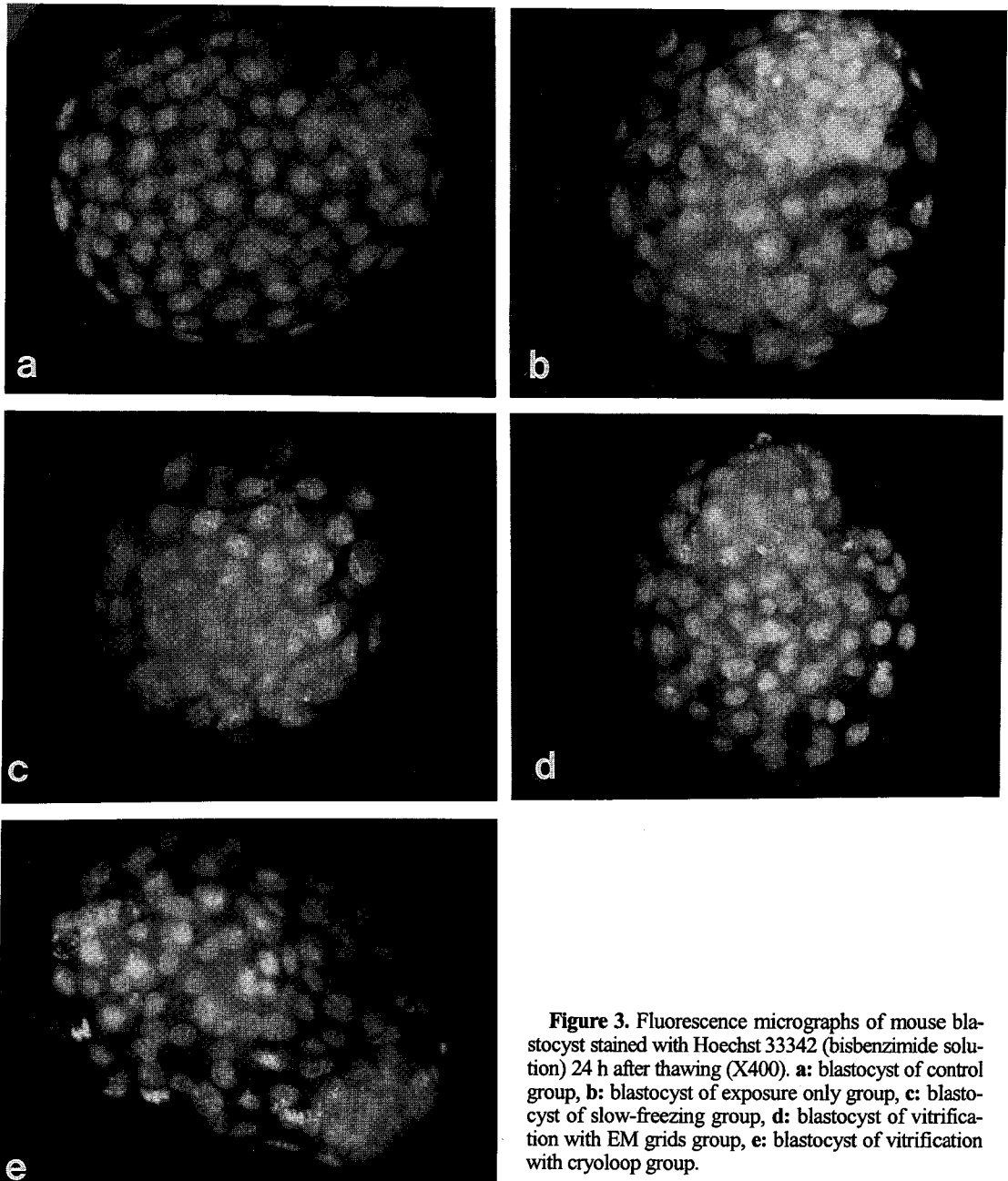


Figure 3. Fluorescence micrographs of mouse blastocyst stained with Hoechst 33342 (bisbenzimidazole solution) 24 h after thawing (X400). **a:** blastocyst of control group, **b:** blastocyst of exposure only group, **c:** blastocyst of slow-freezing group, **d:** blastocyst of vitrification with EM grids group, **e:** blastocyst of vitrification with cryoloop group.

팽창되는 것을 관찰하였다 (Figure 2). 동결과 용해의 과정을 거친 후 포배아가 재팽창되어 정상적인 모양으로 회복되는 것을 볼 수 있으며 저속동결군에서 응축된 형태의 포배아가 많이 관찰되었다.

2. 생쥐 포배아의 할구수

대조군과 실험군에서 생쥐 포배아의 할구수를 계수한 결과 (Figure 3), 대조군, 동결-해빙액 노출군, 저속동결군, EM grids군, cryoloop군에서 배아의 평균 할구수 (mean±SD)는 각각 93.1±13.9, 89.2±11.5, 79.0±10.0, 85.0±10.3, 89.0±11.0으로 저속동결군에서 유의하게 포배아의 할구수가 감소되었지만 ($p < 0.05$) 다른 실험군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

고찰

본 실험에서는 저속동결법이나 EM grids를 이용한 초자화동결법 보다 cryoloop를 이용한 초자화동결법으로 생쥐의 포배아를 동결하였을 때 더 높은 생존율과 부화율을 얻을 수 있었다. 그러나 EM grids군과 cryoloop군을 비교하였을 때 두 군간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 포배아의 동결이 배아의 할구에 미치는 손상과 생존한 배아의 성장률을 알아보기 위하여 배아의 할구수를 계수한 결과, 저속동결군을 제외한 모든 실험군에서 일단 생존한 포배아는 정상적인 할구수를 유지하며 발달할 수 있음을 보였다. 또한 초자화동결을 위한 동결보호제로 ethylene glycol을 이용하였을 때 대조군과 비교하여 배아의 발생에 큰 차이를 주지 않는 것을 관찰하였다.

배아의 동결은 종간의 차이, 배아의 발달단계, 동결보호제의 종류, 동결액의 첨가물, 온도, 온도 변화율, 배양환경을 포함한 다양한 요인에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다.^{12,13} 그러므로 다양한 종과 배 발생 단계에 따른 최적조건을 정하는 것이 세포를 동결-용해한 뒤 정상적인 생존력을 회복하는데 그 목적이 있는 '동결 (cryopreservation)'에서 가장 중요한 과제라 할 수 있다.

최근, 발생 중인 배아에 적합한 생리적 환경을 기초로 하여 G1.2, G2.2 (Scandinavian IVF Science)와 같은 sequential media가 개발되었다.¹⁴ 이로 인해 체외

배양으로 정상적인 포배아를 획득할 기회가 많아졌고 포배아 이식에 대한 선호도 또한 높아지고 있다. 하지만 포배아의 동결이 안정을 유지할 때 포배아 배양과 이식도 한계를 극복할 수 있으므로 포배아의 동결 방법을 확립하는 것이 필수적이다.

Cohen 등¹⁵은 glycerol을 이용한 저속동결법으로 인간의 포배아를 처음 동결하였다. 그 뒤 포배아의 동결을 위한 많은 연구가 진행되었으나 용해 후 생존율이 50~60%, 임신율 7~9%, 유산율 32%로서 매우 실망스러운 결과들이 보고되어 왔다. Vero cell을 이용한 공동배양을 통해 동결-용해된 포배아의 생존율 80%, 착상율은 13%로 다소 향상을 보였으나 동결하지 않은 포배아의 착상율에 비교하면 50%의 성과 밖에 얻지 못하였다.^{16,17} 이러한 저속동결의 단점을 보완하기 위해서 다양한 동결 방법이 연구되었고 초자화동결법이 포배아의 동결에 효과적이라는 결과들이 보고되고 있다.

초자화동결은 '결정화가 아닌 급격한 점성의 증가로 액체가 응결되는 동결'이라고 정의할 수 있다.¹⁸ 배아를 액체질소로 초자화동결할 때 배아 내의 수분이 결정화되는 것을 막기 위해서는 투과성을 지닌 고농도의 동결보호제가 필요하다. 동결보호제는 배아의 생존과 밀접한 관계가 있으며¹⁹ 동결로 인한 난자와 배아의 염색체 이상은 고속의 동결과정에서 부적절한 동결액 처리와 그 농도에 기인했기 때문일 것이라 생각된다. 생쥐 배아를 이용하여 최초로 초자화동결에 성공한 실험에서는 투과성을 지닌 동결보호제로 dimethyl sulphoxide, acetamide, propylene glycol을 사용한 후² glycol과 propylene glycol이 생쥐의 배아를 초자화동결 하는데 효과적이라는 논문들이 발표되었다. Kasai 등³은 ethylene glycol과 Ficoll, sucrose의 혼합액으로 생쥐 배아를 초자화동결하여 적절한 동결보호제의 종류와 농도, 최적의 온도 등을 제시하였다. Kasai의 방법을 변형하여 Takahashi 등²⁰은 ethylene glycol, Ficoll, trehalose의 혼합액을 사용하여 8-에서 16-세포기의 인간 배아를 초자화동결한 후 임신과 분만에 성공하였다. Mukaida 등²¹은 40%의 ethylene glycol과 18%의 Ficoll, 0.3 M의 sucrose를 혼합한 동결액으로 4-에서 8-세포기 인간 배아의 임신과 분만에 성공하였다. Ethylene glycol, Ficoll, sucrose를 이용한 동결액은 세포에 빠른 속도

로 침투하면서 적은 해를 지니고 있으므로 1990년 이후 다양한 종과 다양한 발달단계의 배아를 동결하는데 널리 이용되어 왔다. 본 실험에서도 동결보호제로 ethylene glycol, Ficoll, sucrose의 혼합액을 이용하여 초자화동결을 시행한 결과 생쥐 포배아의 동결-용해 후 좋은 생존율과 부화율을 얻을 수 있었다.

EM grids를 이용하여 생쥐의 포배아를 동결한 뒤 해빙하는 과정에서 EM grids와의 접촉으로 인해 포배아의 투명대가 손상되는 경우가 발생하는데, 난자의 동결은 난구세포를 통해 난자가 물리적인 해로부터 보호되지만 투명대가 얇아진 포배아의 동결에서는 물리적인 접촉이나 상해가 배아의 생존을 방해하는 요인이 될 수 있을 것으로 생각된다. 그러므로 포배아의 동결에는 열린 구조를 지닌 cryoloop를 이용하는 것이 더 적합할 것으로 사료된다. Cryoloop는 저렴하고 간편한 도구로서 동결생물학의 ART에 큰 발전을 가져올 것이며 포유류의 난자나 배아의 동결에 널리 이용될 것으로 기대된다.

본 실험에서는 cryoloop를 이용하여 초자화동결한 생쥐의 포배아가 동결-해빙 후 정상적인 발생을 할 수 있음을 보였고 동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하는 것이 배아의 생존과 발달에 효과적임을 제시하였다. 또한 본 실험의 결과에 기초하여 인간의 포배아를 동결하는 경우에도 cryoloop를 이용한 초자화동결을 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 인간 배아의 초자화동결을 위해서는 다양한 동결 방법의 조건을 최적화하고 그 안정성을 증명할 수 있는 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to 196 degrees and 269 degrees C. *Science* 1972; 178: 411-4.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at 196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990; 89: 91-7.
- Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, Trehalose and Proline. *Cryobiology* 1985; 22: 367-77.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology* 1996; 38: 711-9.
- Vajita G, Holm P, Greve T, Callesen H. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet Scand* 1997; 38: 349-52.
- Lewis I, Lane M, Vajita G. Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by the Open Pulled Straw (OPS) method. *Theriogenology* 1999; 51: 168 abstr.
- Lane M, Forest KT, Lyons EA, Bavister BD. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology* 1999; 51: 167.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999; 72: 1073-8.
- Vajita G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992; 58: 977-80.
- Smorag Z, Gajda B. Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification. *Biotechn Adv* 1996; 12: 449-65.
- Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechn Adv* 1996; 14: 127-49.
- Gardner DK, Vella P, Lane M. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates

- and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 848.
15. Cohen J, Simons RE, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel FB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2: 59-64.
 16. Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991; 6: 136-41.
 17. Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing co-cultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992; 58: 977-80.
 18. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-26.
 19. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, et al. Successful vitrification of bovine blastocysts derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 266-71.
 20. Takahashi T, Ito M, Ohta N, Saito T, Nakahara K, Saito H, et al. Vitrification of human preimplantation stage embryo. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14 (5) Supplement. PP-13-251.
 21. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, et al. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 2874-9.
-