

Changes of membrane fluidity, cytoskeleton and mitochondria function after freezing and thawing in mouse embryo

HJ Ahn^{1,4}, IP Son^{2,4}, HC Kwon³, MC Gye², DH Jo¹, and CK Min¹

¹Dept. of Molecular Science & Technology, Ajou University, Suwon, ²Dept. of Biology, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon, ³Dept. of OB/GYN, Eulji University School of Medicine, ⁴Bio-Med Institute

서론

일반적으로 세포를 동결보존할 때는 냉각과정 (cooling phase)과 결빙 및 탈수과정 (ice formation and dehydration phase)을 거쳐 -196°C 에서 보존되며 이식을 위해서는 급속해빙과정 (rapid thawing phase)을 거치게 된다. 동결보존 과정에서 일어나는 세포의 손상은 결빙 및 탈수과정에서 세포내 소기관들의 물리적 손상과 이동성 재결정 (migratory recrystallisation), 용존가스 (dissolved gases)에 의한 손상, 동결 억제제의 독성과 삼투압에 의한 배아의 과다한 수축 등의 물리적 손상등이 잘 알려져 있으나, 냉각과정에서도 중요한 물리적, 기능적 손상 (cold shock)이 보고되고 있다 (Ashwood-Smith et al., 1988; Friedler et al., 1988; Leibo et al., 1974; Mazur, 1984). 그러나 최근 포유류 배아의 동결보존 후 이식 프로그램이 점차 보편화되면서 이러한 손상을 최소화 시키기 위해 programmable controlled rate cell freezer와 동결보존제 (cryoprotective agent)를 사용하고 있다.

이러한 노력에도 불구하고 동결 보존 후 해빙시 대부분의 포유류 배아의 생존율, 양질 배아의 발생율과 임신율이 비동결 배아에 비해 현저하게 저하되는 것으로 알려지고 있다 (Veeck et al., 1993; Feichtinger et al., 1991; Menezo et al., 1992). 이는 균질하지 않은 세포질내의 얼음결정과 이동성 재결정 (migratory recrystallization)에 의한 세포질 내의 공동화현상, 미토콘드리아 내부의 과립 (granules) 형성 (Frederik and Busing, 1980) 및 runaway효과로 인한 ATP의 감소 (Rall et al. 1983) 및 반응성 산소종의 증가 (Ashwood-smith et al., 1988; Connor et al., 1973; Cotterill et al., 1989; Healing et al., 1989; Pulito et al., 1983; Tarin et al., 1993) 등이 중요한 요인이라고 유추되고 있으나 아직 확실한 결론을 내리지 못하고 있는 실정이다.

근래에 들어와서 apoptosis와 관련된 세포내 소기관의 손상 중 미토콘드리아의 기능과 활성의 손상에 관한 보고가 증가하고 있으며, 특히 mitochondria는 세포내의 다른 소기관보다 cooling 시 다소 저항성을 갖고 있다고 알려져 있었으나 (Chance et al., 1979; Fuller et al., 1990) 세포나

조직에서 전자수용체 (electric acceptor)로써의 산소가 결핍됨으로 인해 ATP를 생산하지 못하고 약 0°C 에 접근하면 ATP를 모두 소모하게 된다고 보고되었다 (Warnick & Lazarus, 1977). 동결과정시 세포는 생존을 위해 ATP로부터 ADP, AMP를 거쳐 hypoxanthin, uric acid로 대사 (runaway effect; Buhl & Jorgensen, 1975)과정의 전환이 일어난다. 그러나 부가적으로 막성 지질류 및 단백질의 재분포 및 응집에 의한 막성 효소의 기능저하 (Sinensky et al., 1979; Kachar et al., 1980; Feltkamp et al., 1982)와 더불어 sodium/potassium-ATPases, calcium-ATPases와 같은 active "pumps"를 억압하여 선택적 투과성의 장애를 초래하게 된다. 그러므로 전해질 평형이 파괴되고 유리 calcium 농도가 증가되며 삼투압이 변화되어 세포 팽창 (cell swelling)을 초래하게 된다 (Leaf et al., 1973). 이러한 세포 팽창은 0°C (cooling phase)에서 처음으로 low amplitude 일어난다. 하지만 미토콘드리아의 초기 swelling과 rough endoplasmic reticulum의 팽창은 freezing이 없을 경우 치명적이지 않다 (Trusal et al., 1984). 반면 -10°C (freezing phase)에서는 mitochondria 및 RER의 팽창이 발생하고 (Trusal et al., 1984), intracellular ice formation이 증가함에 따라 미토콘드리아의 inner membrane에 결합하고 있던 효소들의 유리가 증가된다고 보고되고 있다 (Hamm & Gottesmann, 1985). -15°C 에서는 nuclear membrane의 separation과 distortion, chromatin distribution의 변화, nucleolus의 disruption 등과 같은 핵의 변화가 일어나게 되며, freezing phase에서 이러한 핵의 변화와 함께 cytoplasmic organelles의 swelling 증가는 생존을 감소를 야기한다고 보고되고 있다 (Trusal et al., 1984).

본 연구에서는 동결 및 해빙과정이 생쥐배아에서 발생하는 배아의 생체막 변성여부를 Fluorescent recovery after photobleaching (FRAP)방법을 이용하여 동결보존 과정에서 생체막의 변성이 일어났음을 관찰하였으며, 체세포내의 미토콘드리아 내, 외막의 막전위차와 손상여부를 확인하기 위하여 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl

lcarbocynaine iodide (JC-1)을 사용함으로써 미토콘드리아의 활동성과 세포내소기관 역시 변성이 일어났음을 확인하였다. 또한 Confocal microscope을 통해 동결보존 및 해빙시 세포질내로의 유리 calcium의 분비현상과 반응성 산소종의 상대적 intensity가 정상 배아에 비하여 2배이상 증가됨을 관찰하였다. TUNEL방법등을 이용하여 DNA분절화를 확인함으로써 배아에서 apoptosis가 일어났음을 관찰하였고 포배기이상의 세포수를 측정함으로써 apoptosis rate 역시 정상 생쥐배아에 비해 높음을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 생쥐 배아의 획득과 배양

생후 6-8주령의 "2-cell block"이 있는 ICR 암컷 생쥐와 생후 8-10주령의 ICR 수컷 생쥐를 사용하였다. 48시간 간격으로 암컷 생쥐에 PMSG(gonadotrophin from pregnant mare's serum; Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA)과 hCG(Choriomon; IBSA, Lugano, Switzerland)을 7.5 IU씩 복강 내로 주사하여 파배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰으며, 다음날 아침 질전(vaginal plug)을 통해 교미를 확인하였다. hCG주사 48시간 후 경추 파괴로 도살하여 수란관을 적출 하였으며, 0.4% BSA(Bovine serum albumin, Sigma, USA)가 포함된 mHTF 배양액 내에서 난관 내로 배양액을 관류시켜 2 세포기 배아를 획득하였다. 실험군의 경우 회수된 2 세포기 배아들은 컴퓨터 세포동결기로 동결하였으며, 7-60일간 보관하며 해빙하였다. 해빙 후 일부는 2 세포기 배아에서 반응성 산소종을 측정하였고, 나머지 일부는 37°C, 5% 이산화탄소, 95% 공기가 공급되는 배양기 (Cellstar 2710; Queue Systems Inc., USA) 내에서 micro-drop 방법으로 체외 배양하였다. 한편 해빙하는 당일 대조군은 위에 서술한 방법으로 2 세포기 배아를 회수하였고, 이들 중 일부에서 반응성 산소종을 측정하였으며 나머지 일부는 앞에 기술한 방법과 동일하게 체외에서 배양하였다. 배양액은 pH 7.4, 삼투압 280-285mOsm/kg이 되도록 하였으며, 5% CO₂, 37°C 배양조건에서 3시간 전에 준비하여 온도와 가스 분압을 일정하게 조절하였다. 배양기의 이산화탄소 농도는 CO₂ analyzer (Bacharach, USA)를 이용하여 정기적으로 측정하며 필요할 경우 재조정하였다.

2. 배아의 동결보존 및 해빙과정

1) 동결 보존 및 해빙과정

균등한 할구를 가지고 있는 건강한 2 세포기 생쥐 배아를 선택한 후 컴퓨터 세포동결기(Kryo-10; Planar, USA)를 이용하여 저속 동결 방법으로 동결을 시행하였다.

동결 억제제로 1,2-propanediol(Sigma, USA)을 20% 제대 혈청이 포함된 배양액에 첨가하여 사용하였다. 동결 배양액 처리 과정은 배양액내 삼투압의 변화를 고려하여 2단계로 시행하였다. 첫 단계로 동결은 동결 배양액 Sol. A(1.5M PROH; Sigma, USA)에서 배아를 15분간 방치한 후 동결 배양액 Sol. B(1.5M PROH + 0.2M sucrose)에 옮겨 15분 경과 후 동결을 시행하였다.

이때 동결 배양액 Sol. B로 처리된 배아는 0.25ml straw 1개당 10개씩 동결 배양액과 함께 넣은 후 동결을 시행하였다. 동결은 세포동결기를 이용 -2°C/min 속도로 -7°C까지 냉각하고, -7°C에서 미리 액체질소에 담가 두었던 forcep을 straw내 동결 액의 표면 수준에 접촉함으로써 식빙(seeding)을 시행한 후 10분간 정지시켰다. -7°C에서부터 -35°C까지 -0.3°C/min 속도로 동결한 후 straw를 액체질소에 침지하고 해빙할 때까지 -196°C 액체질소 통에서 보관하였고, 해빙은 급속해빙(500°C/min)한 후 0.4% BSA(Bovine serum albumin, Sigma, MO, USA)가 포함된 mHTF 배양액에 옮겨 배양기에서 배양하였다.

해빙 과정을 마친 후 배아의 생존 여부는 propidium iodide(BD Pharmingen, USA)로 염색하여 염색이 되지 않고 현미경하에서 배아를 관찰하여 모양이 둥글고 세포질이 맑고 온전한 투명대를 가진 배아를 생존한 것으로 판정하였다, 특히 해빙 후 2개의 할구가 모두 생존한 것(intact embryo; IE), 1개의 할구만이 생존한 것(partial intact embryo; PIE), 그리고 이 둘이 모두 손상된 것(damaged embryo; DE)로 구분하여 생존율을 나타냈다.

3. 배아의 발달 관찰

해빙 후 배아의 모양은 24시간 간격으로 위상차 도립현미경(Inverted contrast microscope, Diaphot 300, Nikon Co., Tokyo, Japan)하에서 관찰하였으며, 2 세포기, 4 세포기, 8 세포기, 상실기, 포배기로 나누어 평가했다.

4. 포배시기의 세포수 측정

해빙 후 72시간째 각 군에서 포배기에 도달한 배아를 0.8% sodium citrate에 5분간 노출시킨 후 carnoy solution (acetic acid : ethanol = 1: 3)으로 slide glass위에 고정 시켰으며 24시간 동안 air dry 시켰다. 고정된 포배기 배아는 saline으로 swelling 시켰고 saline 제거 후 1µg/ml의 Hoechst 33258(Sigma, St. USA)을 5분 동안 암 처리하여 형광현미경 하에서 세포수를 계수하였다.

5. 세포막 및 세포소기관의 변화 확인

1) 막유동성 측정 (FRAP: fluorescence recovery

after photobleaching)

Zona pellucida를 벗겨낸 세포들을 Lectins (fluorescein conjugated wheat germ agglutinin, Vector, USA)stock을 100 μ g/ml로 희석한 용액에서 37 °C에서 60분간 배양한다. 준비된 시료는 현미경에 올려놓고 낮은 강도의 빛(0.4~4KW/cm²)으로 fluorescence emission을 유발시킨 후에 (beam size 5-10 μ m의) 488nm 파장의 Argon laser (INNOVA 90 Plus, Coherent Inc, USA)를 0.5-1초간 높은 강도의 빛(0.8~1.0MW/cm²)을 세포막에 투사하여 형광-광표백 (photobleaching)을 만든다. 이후 1/10초 단위로 형광의 회복량을 고속 관찰한다.

2) 세포내 F-actin 변성 확인

투명대가 제거된 2세포기의 배아들을 3.7% paraformaldehyde solution에서 30분간 고정하였다. PBS로 세척한 후 0.25% Triton X100에서 10분, 0.26% NH₄Cl solution에서 10분간 정치하였다. 이후 fluorescein(FITC)-labeled phalloidin(Molecular Probes Inc., USA) 10 μ l/40 μ l(PBS, pH 9.0) solution에서 45분간 배양한 후, 다시 PBS로 세척하여 490nm excitation, 510nm emission의 조건에서 공초점 현미경(MR-AG/2; BIO-RAD, USA)으로 분석하였다.

3) 세포질내로의 유리 Calcium의 분비 확인

10 μ g/ml의 Fluo-3(Molecular Probe Inc., USA)로 처리한 직후 공초점 현미경(confocal microscope MR-AG/2, BIO-RAD, USA)으로 분석하였다.

4) 미토콘드리아의 막전위차 측정 (Ψ m)

5 μ g / ml 의 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide, Molecular Probe Inc., USA)을 사용하여 37°C에서 15분간 배양한 후에 mHTF로 세척하여 공초점 현미경(confocal microscope MR-AG/2, BIO-RAD, USA)으로 분석하였다. JC-1은 490nm에서 여기하여 각각 510/590nm에서 관찰하였다.

5) 배아 내의 H₂O₂ 농도 측정

배아 내 H₂O₂ 측정은 Nasr-Esfahani 등(1990)의 방법을 변형하여 사용하였다. 10 μ M의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHFDA, Molecular Probes Inc., USA)을 사용하여 2 세포기 배아를 넣고 15분간 배양하였다. 다시 배아를 mHTF 배양액으로 형광을 제거한 다음, 공초점 현미경(Confocal microscope MR-AG/2, BIO-RAD, USA)으로 관찰하여 DCF의 발현 정도를 상대적 수치로 정량하여 H₂O₂의 농도 차이를 확인하였다.

6. DNA 분절화 확인

배아에서 세포자연사의 특징인 DNA 분절화(fragmentation)을 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labelling (TUNEL) 방법을 이용한 ApopTag Kit (Oncor Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다. 먼저 carnoy's solution으로 포배기 배아를 고정시킨 후 tris buffer로 세척하였다. ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)와 dUTP-digoxigenin을 첨가한 후 37°C에서 24시간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 반응 정지 완충액을 상온에서 10분간 처리한 후 tris buffer로 3번 세척한 다음 anti-digoxigenin-fluorescein을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. Tris buffer로 세척하고 형광현미경하에서 검경하여 배아내 세포자연사를 조사하였다.

7. 통계분석

실험 결과의 통계적 분석은 각 품종과 배양 시기 별 배아의 발달을 및 포배기 발달을, H₂O₂ 평균값과 포배내 세포수를 chi-square test, T-test, Mann-Whitney U test 및 Scheffe test를 이용하였다. 실험 값은 평균±표준편차(Mean±SD)로 표시하였고 p값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 배아의 발달

2 세포기 생쥐 배아를 대상으로 동결 및 해빙과정을 시행하고 체외 배양한 군(1군)과 동결 및 해빙과정 없이 체외 배양한 군(2군)의 연구 결과는 다음과 같았다. 1군에서 해빙과정 후에 배아의 생존율(IE+PIE)은 76.1%(344/452)였으며 부분적 배아의 생존율(PIE)은 32.7%(148/452), 배아의 전체상태가 양호한 배아(IE)는 43.8%(198/452)이었다. 동결 및 해빙을 시행한 1군의 실험은 오차를 줄이기 위해 배아의 전체상태가 양호한 배아(IE, n=198)만을 대상으로 실시하였다.

배아의 발달과 포배시기의 세포수 측정을 시행한 결과, 체외 배양 72시간에 포배기 형성의 비율은 1군에서 32.6%(44/136), 2군에서는 74.5%(117/157)였다(p<0.05). 포배시기 배아의 세포수는 1군에서 42.00±11.34개(n=30), 2군에서 95.87±19.14개(n=26)로써 유의한 차이를 보였다(p<0.05).

2. 세포막 변화와 세포내 F-actin 변성 확인

2 세포기 즉 해빙직후의 세포막의 막유동성

(membrane fluidity)을 검사하기 위한 FRAP의 결과는 1군에서 $\tau = 1.46 \pm 0.13 \text{sec}$ (n=5), 2군에서 $\tau = 0.28 \pm 0.04 \text{sec}$ (n=5)로써 1군에서 유의하게 막유동성이 감소하였다(p<0.05). 또한 2 세포기 배아의 actin filament의 조성은 2군(n=8)의 경우 균질하게 분포하는 양상을 보인 반면, 1군(n=7)의 경우 대부분의 배아에서 부분적 결손과 응집된 양상을 보였다.

3. 세포질 내로의 유리 calcium의 분비 및 분포

2 세포기 배아에서 Fluo-3를 사용하여 세포질내의 유리 calcium의 분비 및 분포를 확인한 결과 세포질 내로 분비되어지는 양상을 보였다.

4. 배아 내의 H₂O₂ 농도 측정 및 미토콘드리아의 막전위차 측정 (Ψ_m)

동결 및 해빙 과정 직후에 배아 내의 H₂O₂의 상대농도는 1군에서 62.8 ± 23.5 (n=24), 2군에서 34.2 ± 14.5 (n=20)로써 1군에서 유의하게 높았으며(p<0.05) 미토콘드리아의 막전위차 측정(Ψ_m)을 JC-1으로 시행한 결과, 1군(n=26)에서는 membrane potential이 낮은 green colored mitochondria가 고르게 분포하고 일부의 embryo에서 activity가 높은 red colored mitochondria 및 green, yellow colored mitochondria(relative intensity Green/14.40+0.9 Red/17.16+3.8)가 존재했다. 그러나 2군(n=28)에서는 각각의 배아에 따라 다소의 차이는 있었으나 activity가 높은 red colored mitochondria가 perimembrane(relative intensity Green/10.8+1.2 Red/13.2+2.0)에 존재하여 뚜렷한 차이를 보였다.

5. DNA 분절화 확인

배아에서 세포자연사의 특징인 DNA 분절화 정도는, 1군(n=24)에서는 75%의 배아에서, 2군(n=20)에서는 37%에서 DNA 분절이 확인되었으며, Apoptosis가 진행된 세포수에서도 1군에서 41.0 ± 2.3 개, 2군에서 24.5 ± 2.3 개로써 통계적으로 유의한 차이가 있었다

고찰

본 연구는 생쥐 배아에 있어서 보편화된 동결과 해빙 방법을 사용한 배아에서 발생할 수 있는 발생학적, 물리 화학적인 변화 양상을 비 동결 배아와 비교하여 손상의 양상과 정도를 정성적, 정량적으로 분석함으로써 그 기전을 파악하고자 하였으며 이를 통해 향후 동결 및 해빙과정을 개량 (improvement) 할 초석을 마련하고자 하였다.

각 실험결과에서 볼 수 있듯이 동결 및 해빙과정에서 막성 지질의 변화와 막성 효소의 기능 저하 및 "runaway 현상"에 의해 선택적 투과성 장애가 유발되고 이로 인해 세포 및 미세소기관의 팽창이 초래되어 유리 칼슘과 반응성 산소종이 세포질내에 증가

됨으로써 미토콘드리아 내의 막의 permeability transition pore의 개방을 초래하여 반응성 산소종의 발생을 더욱 증가시키고 막전위차를 감소시키며 미토콘드리아의 내부의 cytochrome c와 AIF를 유리시켜 caspase 족의 효소를 활성화 시킴으로써 세포자연사를 유발한다는 가설을 추정할 수 있겠다.

그러나 본 실험에서 실시한 TUNEL 방법은 자연 세포사 (apoptosis) 뿐 만 아니라 세포괴사 (necrosis)에서도 나타남으로써 자연세포사에 특징적인 전자 현미경 관찰이 필요하며 본 연구의 가설을 증명하기 위해서는 caspase 족과 Apaf-1의 발현, Bcl-2와 BAX 등의 분자 생물학적 정량 분석이 필요하고, 세포질내의 유리 칼슘 및 cytochrome c의 동향과 미토콘드리아의 permeability transition pore의 변화에 의한 팽창 (swelling) 등의 형태적 관찰이 향후 진행되어야 한다고 사료된다.

V. 참고문헌

- Ashwood-Smith MJ, Morris GJ, 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
- Buhl MR, Jorgensen S ; Breakdown of 5' adenine nucleotides in ischaemic renal cortex estimated by oxypurine excretion during perfusion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1975 ; 35:211
- Chance B, Nakase Y, Itshak F ; Membrane energization at sub-zero temperatures: calcium uptake and oxonol-V responses. *Arch Biochem. Biophys.* 1979 ; 198:360
- Connor W, Ashwood-Smith MJ ; Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers: possible mechanisms. *Cryobiology* 1973 ; 10:488
- Cotterill L, Gower J, Fuller BJ, Green CJ ; Oxidative damage to kidney membranes during cold ischaemia, evidence of a role for calcium. *Transplantation.* 1989 ; 45:745
- Feichtinger W, Hochfellner C, and Ferstl U ; Clinical experience with ultrarapid freezing of embryos. *Hum. Reprod.* 1991 ; 6:735-736
- Fredrick PM, Busing WM ; Ice crystal damage in frozen thin section: freezing effects and their restoration. *J. Microscopy.* 1980 ; 121:191-199
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ ; Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.* 1988 ; 49:743
- Fuller BJ, Busza AL, Procto E ; Possible resuscitation of liver function by reperfusion in

- Vitro* after prolonged (24 hours) cold preservation: a 31P NMR study. *Transplantation* 1990 ; 50:511
- Green DR, Reed JC ; Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998 ; 281:1309-1312
- Goto Y, Noda Y, Naromoto K, Umoaka Y, Mori T ; Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 1992 ; 13:47-53
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M ; Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 1993 ; 15:69-75
- Green CJ, Healing G, Simpkin S, Fuller BJ, Lunec J ; Reduced susceptibility to lipid peroxidation in cold ischaemic rabbit kidneys after addition of desferrioxamine, mannitol or uric acid to the flush solution. *Cryobiology* 1986 ; 23:358
- Hesketh KR, Smith GA, Houslay MD, McGill KA, Birdsall NJ, Metcalfe J, Wunen G ; Annular lipids determine the ATP-ase activity of calcium transport protein complexed with dipalmitoyl-lecithin *Biochemistry* 1976 ; 15:41-45
- Kachar B, Serrano J, Pinto de SP ; Particle displacement in epithelial cell membranes of rat prostate and pancreas induced by routine low temperature fixation. *Cell Biol. Int. Rep.* 1980 ; 4:347
- Kang MK, Park Y, Min CK ; Manufacturing fluorescence recovery after photobleaching machine and its application. *Soc. for Kor. Biochemistry Abstr.* 1997 ; 135
- Leaf A ; Cell swelling, a factor in ischemic. *Tissue injury* 1973 ; 48:455-458
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC ; Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell Res.* 1974 ; 89:79
- Mazur P ; Freezing of living cells: mechanisms and implication. *Am. J. Physiol.* 1984 ; 247:C125-C142
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil. Steril.* 1992 ; 58:977-980
- Morita Y, Tilly JL ; Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass, *Dev. Biol.* 1999 ; 213:1-17
- Nancy AT, Yuri L ; Caspases: Enemies within. *Science* 1998 ; 281:1312-1316
- Pulito VL, Miller DL, Sassa S, Yamane T ;, DNA fragments in fneud erythroleukemia cells induced by DMSO. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 1983 ; 80:5912
- Rall WF, Mazur P, McGrath JJ ; Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mice by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophys. J.* 1983 ; 41:1-12
- Sinensky M, Pinkerton F, Sutherland E, Simon F ; Rate limitation of (Na⁺-K⁺)-stimulated ATPase by membrane acyl chain ordering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979 ; 76:4893-4897
- Troyan MB, Gilman VR, Gay CV ; Mitochondrial membrane potential changes in osteoblasts treated with parathyroid hormone and estradiol. *Exp. cell res.* 1997 ; 233:274-280
- Trusal LR, Guzman AW, and Baker CJ ; Characterization of freeze-thaw induced ultrastructural damage to endothelial cell. *In Vitro.* 1984 ; 20:353-364
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS ; Detection of reactive oxygen species(ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human. Reprod.* 1998 ; 13(4):998-1002