

인간 미성숙난자의 동결·융해후 체외 배양된 난자에 대한 염색체 분석

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

박성은 · 정창조 · 손원영 · 정형민 · 이숙환 · 이우식 · 고정재 · 윤태기 · 차광열

Chromosome Configurations of Human Oocytes Matured *in vitro* following Cryopreservation at the Germinal Vesicle Stage

S.E. Park, C.J. Chung, W.Y. Son, H.M. Chung, S.H. Lee, W.S. Lee, J.J. Ko,
T.K. Yoon and K.Y. Cha

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul, 135-081, Korea

= Abstract =

Objective: To investigate effects of cryoprotectant and cryopreservation on the chromosome of the human immature oocytes.

Design: Intact cumulus-enclosed immature oocytes were collected from unstimulated ovaries and divided into three groups, such as no treatment as control (group 1), only 1,2-propanediol (PROH)-treated (group 2), and cryopreserved oocytes (group 3). Oocytes in group 1, 2, and survived oocytes after cryopreservation in group 3 were cultured for 48 hours.

Setting: Infertility Medical Center at the CHA General Hospital, Seoul, Korea.

Patients: Oocytes were obtained from patients undergoing gynecological surgery.

Main Outcome Measures: Maturation rate, abnormality in chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Results: There was no effect of PROH only treatment on the chromosomal abnormalities in group 2 compared to control oocytes (41.4% and 31.8%, respectively). Whereas significantly increased abnormalities in chromosome (77.8%) were found in group 3.

Conclusions: Human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle (GV) stage showed increased incidence of chromosomal abnormalities. These abnormalities may impair the capacity for further development of the embryos derived from frozen-thawed oocytes.

Key Words: 1,2-propanediol, human immature oocytes, unstimulated ovaries, cryopreservation, chromosome, spindle

서 론

인간 미성숙난자는 성숙과정에서 일어나는 다양한 생리현상을 규명할 수 있는 연구재료로서 이용될 수 있을뿐만 아니라 인간 생식보조기법에

있어서 동결보존에 의한 난자은행을 이용하여 조기폐경, 방사선조사 혹은 화학치료 및 유전자 이상 등으로 난소기능이 상실되거나 자신의 난자를 이용할 수 없는 환자에 대해 난자공여가 가능해 질 수 있다는 점에서 이 분야에 관한 관심이 고조되고 있다. 특히 동결보존에 의한 난자은행

의 확립은 배아동결에 따른 윤리적, 법적문제를 해결할 수 있는 대안으로서 임상적 응용가능성이 매우 크며 (Capron, 1992; Perry와 Schneider, 1992) 또한 동물학 분야에서도 멸종위기의 희귀동물이나 경제적 가치가 큰 동물의 생식세포를 장기간 보존할 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 하겠다. 인간 난자의 동결보존에 관한 연구는 Chen (1986)과 Van Uem (1987)에 의해서 최초로 성숙난자를 동결융해한후 체외수정을 통해 작성된 배아를 이식하여 임신과 출산을 보고한 이래 여러 연구자들에 의해 성숙난자의 동결보존 연구가 수행되었으나 극히 제한적인 성공만이 보고되었다 (Al-Hasani 등, 1987; Siebzehruebl 등, 1989). 대부분의 연구보고에서 성숙난자를 동결보존할 경우 생존율이 매우 낮고 이후의 수정과 배아발생이 극히 저조한 것으로 알려져 있다 (Chen, 1986, 1988; Al-Hasani 등, 1987; Hunter 등, 1991; Imoedehe와 Sigue, 1992). 동물과 인간난자를 이용한 연구를 통해서 동결융해 난자의 저조한 생존율과 발생의 원인은 성숙난자의 경우 염색체에 부착되어있는 미세소관인 방추사가 온도의 변화에 매우 민감하여 동결융해 과정에서 미분리 (non-disjunction)가 발생하여 염색체의 이상 특히 이수현상 (aneuploidy)이 증가되기 때문이라고 보고하였다 (Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988; Pickering 등, 1990). 또한 성숙난자의 경우 항동해제의 노출이나 동결융해시 난세포질 표면에 존재하는 표층과립이 조기방출되거나 (premature cortical granule exocytosis; Schalkoff 등, 1989) 투명대의 물리적 손상이나 경화현상 (zona hardening)이 발생하여 융해후 난자의 생존율 및 수정율의 저하나 이상수정 혹은 염색체 이상의 발생빈도가 높아진다고 보고 (Carroll 등, 1990; Al-Hasani 등, 1987)되고 있어 성숙난자를 이용한 동결보존은 아직까지 많은 문제점을 노출하고 있다. 이에따라 성숙난자 동결보존기술의 대안으로서 방추사가 형성되기 전단계인 미성숙 난자의 동결이 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 제시되었다. 미성숙 난자의 동결은 마우스 (Van der Elst 등, 1992; Schroeder 등, 1990; Candy 등, 1994), 쥐 (Pellicer 등 1988), 햄스터 (Mandelbaum 등, 1988b) 와 인간 (Mandelbaum 등 1988a; Mandelbaum 등 1988b; Toth 등 1994) 에서 보고되었다. 그러나 인간 미성숙 난자의 동결에 관한 보고는 매우 적으며, 동결·융해한 미성숙 난자로부터

산자를 얻은 경우는 마우스에서만 보고되었다 (Candy 등, 1994). 이전의 저자들은 항동해제로서 1,2-propanediol을 이용하여 인간 미성숙 난자의 동결보존에 관한 연구를 수행한 결과 동결보존된 미성숙 난자에서도 융해후 낮은 생존율과 발달율을 나타내었다 (Son 등, 1996). 이에 본 연구에서는 미성숙 난자의 동결보존시 나타나는 저조한 생존율과 발생율의 원인을 규명하기 위한 기초연구로서 항동해제의 노출과 동결·융해 후의 체외수정된 난자에서의 염색체 이상을 알아보기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난자의 준비

미성숙 난자는 차병원을 내원한 환자중 부인 과적 수술을 받은 환자로부터 적출된 난소에서 회수하였다. 적출된 난소는 난소표면의 혈액과 지방질 등을 제거한 다음 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 난소표면의 2~5 mm의 가시난포를 흡입하므로써 미성숙 난자를 채취하였다. 회수된 미성숙난자는 실체현미경 (Wild, Swiss)하에서 난세포질이 균일하고 투명대 주위에 난구세포가 치밀하게 부착된 난자만을 선별하여 본 연구에 이용하였다. 이때 나화되었거나 퇴화된 난자는 실험에서 제외시켰다. 회수된 미성숙 난자는 동결전까지 20% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco/BRL, USA)가 함유된 DMEM 배양액 (Gibco/BRL, USA)에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 미성숙난자의 동결융해

회수된 미성숙난자는 연구의 목적에 따라 대조군 (Group I), 항동해제 노출군으로 동결과정없이 실온에서 1.5 M 1,2-propanediol (PROH; Sigma, USA)에서 10분간 노출후 1.5 M PROH와 0.1 M sucrose에서 5분간 노출시킨 난자 (Group II) 그리고 동결융해 시킨 난자 (Group III)로 분류하였다.

동결방법은 변형시킨 Lassalle 방법 (Lassalle 등, 1985)을 이용하였는데 난자를 PBS (Gibco/BRL, USA)로 세척시킨후 1.5 M PROH에 10분 노출후 1.5 M PROH와 0.1 M sucrose가 첨가된 동결액에 5분간 노출시킨 후 straw에 난자를 넣어 동결기 (Planner, UK)에 장착시켰다. 동결방법은 -7°C까지는 -2°C씩 하강시킨 후, -7°C에서 0.25 ml straw

Table 1. Comparison of chromosomal abnormalities of human oocytes matured in vitro for 48hrs after cryopreservation at the GV-stage

Groups*	No. of oocytes (%)						
	Used	Survived	MII	Analyzed	Aneuploidy	Polyploidy	Total abnormality
1	91	91 (100)	74 (81.3)	44	11 (25.0)	3 (6.8)	14 (31.8)
2	76	76 (100)	49 (64.5) [†]	29	9 (31.0)	3 (10.3)	12 (41.4)
3	128	77 (60.2)	47 (61.0) [‡]	27	12 (44.4)	9 (33.3) [§]	21 (77.8) [§]

* Group 1; control (no treatment), group 2; PROH treatment only, group 3; cryopreseved

[†] Group 2 significantly different from group 1 (p<0.05)

[‡] Group 3 significantly different from group 1 (p<0.01)

[§] Group 3 significantly different from group 1 and 2 (p<0.01).

의 윗부분을 LN₂에서 냉각시킨 pincet을 이용하여 seeding한 후 5분간 유지시킨 후 -7℃에서 -39℃까지 -0.3℃씩 하강시킨 후 액체 질소에 침지하여 동결시켰다. 융해 방법은 실온에 40초간 방치시킨 후 30℃ 온수에서 융해한 다음 1.0 M PROH에 0.1 M sucrose, 0.5 M PROH에 0.2 M sucrose, 0.2 M sucrose에서 단계적으로 5분씩 노출시켰으며, PBS로 세척하고 실체현미경하에서 난자를 관찰하여 생존율을 조사하였다. 융해후 생존한 난자는 DMEM (Gibco/BRL, USA)에 20% FBS (Gibco/BRL, USA), 10IU/ml PMSG (Sigma, USA), hCG (Sigma, USA)가 첨가된 배양액 내에서 48시간동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙이 유도된 난자는 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 함유된 PBS용액에 1분간 침지하여 난구세포를 제거 시킨다음 신선배양액으로 세척한 다음 제1극체의 방출을 확인함으로써 체외성숙의 유무를 확인하였다.

4. 염색체 분석을 위한 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Tarkowski (1966)의 air-drying 방법을 변형하여 난자의 염색체를 준비하였다. 난자를 0.9% sodium-citrate 저장용액에 15분간 침지한 후 난자를 작은 점적으로 slide에 올려놓고 2단계로 염색체를 고정하였다. 먼저 고정액 I (메탄올 : 빙초산 : 증류수 = 5 : 1 : 4)을 난자가 있는 작은 점적에 부가하여 약 1분 동안 난자의 투명대를 제거한 후 고정액 II (메탄올 : 빙초산 = 3 : 1)를 천천히 난자가 있는 점적에 부가하여 염색체를 고정시켰다. Slide를 70%, 85%, 100% ethanol에 각각 2분씩 세척시킨 후 target DNA를 70% formamide와 2

× SSC가 첨가된 용액 내에서 73℃에서 5분간 변성화시켰다. probe는 난자의 23쌍의 염색체를 표적화하는 biotin으로 표시된 인간 DNA probe (Oncor, USA)를 사용하였다. probe가 첨가된 혼성화 용액을 각 slide에 첨가시키고, cover glass로 덮고 rubber cement로 밀봉시킨 후 37℃ 암소에서 1시간 동안 반응시켰다. cover glass를 제거시킨 후 72℃ 2 × SSC 용액 내에서 5분간 세척후 fluorescence labeled avidin 용액 (Oncor, USA)을 첨가시키고 15분간 반응시키고 counter stain을 위해 propidium iodide 용액을 첨가 후에 cover slip으로 덮은 후 형광현미경하 (Olympus, Japan)에서 관찰하였다.

결 과

본 연구의 결과를 요약하면 표1에서 보는 바와 같다. 먼저 생존율의 경우 대조군과 항동해제 노출군의 경우 모든 난자가 생존하여 본 연구에 사용된 항동해제가 인간 미성숙난자의 생존에 영향을 미치지않는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 동결보존군의 경우 60.2% (77/128)의 생존율을 보여 상기 두처리군에 비해 유의적으로 낮은 생존율을 나타내어 동결융해과정이 미성숙난자의 생존율에 영향을 미치는 것으로 판명되었다. 융해후 생존된 미성숙난자의 체외성숙을 유도한 결과 각 처리군당 체외성숙율은 대조군의 경우 81.3% (74/91), 항동해제 노출군은 64.5% (49/76) 그리고 동결융해군은 61.0% (47/77)으로서 대조군에 비해 항동해제 노출군과 동결융해군의 체외성숙율이 유의하게 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 항동해제 처리나 동결융해가 미성숙난자의 체외성

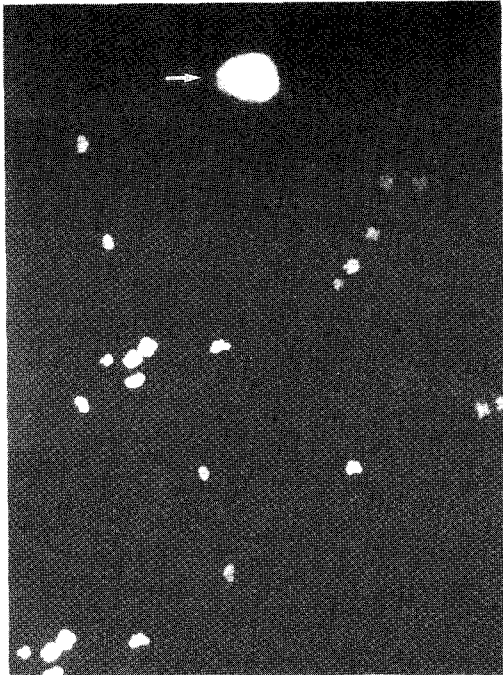


Fig. 1. Chromosomes analyzed by FISH. Normal haploidy human oocyte with human total chromosome. Arrow indicates polar body chromosomes.

숙에 억제작용을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 한편, 체외성숙이 이루어진 난자의 염색체 이상 유무를 확인하기 위해 염색체 표본을 작성한 결과 판독이 가능하였던 난자의 수는 대조군의 경우 44개, 항동해제 처리군은 29개 그리고 동결융해군은 27개였다. 나머지의 난자는 고정 중 염색체가 손실되거나 염색체의 분산이 이루어지지 않았거나 너무 많이 분산되어 염색체 분석을 시행할 수 없었다. 판독이 가능했던 난자의 염색체 이상 빈도는 대조군의 경우 31.8%, 항동해제 노출군은 41.4% 및 동결융해군은 77.8%로 관찰되었다. 염색체 이상 중 *aneuploidy*의 빈도는 대조군에서 25.0% (11/44), 항동해제 노출군에서 31.0% (9/29), 동결융해군에서 44.4% (12/27)였으며 *polyploidy*의 빈도는 각각 6.8% (3/44), 10.3% (3/29) 및 33.3% (9/27)였다. 동결융해후의 난자에서 염색체 이상의 빈도가 유의적으로 높았으며, 특히 *aneuploidy*의 빈도가 높게 관찰되었다. 그림 1은 정상적인 반수체의 염색체를 보여주고 있으며, 그림 2는 염색체이상인 *aneuploidy*의 난자를 보여주고 있다.

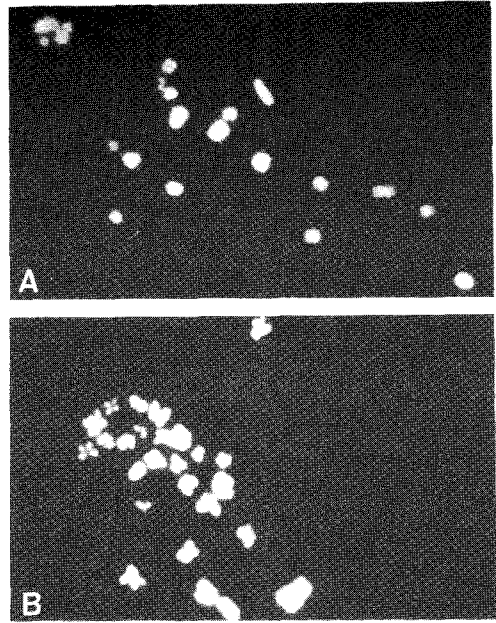


Fig. 2. Chromosomes analyzed by FISH. (A), Hypohaploidy human oocyte with human total chromosome probe. (B), Hyperhaploidy human oocyte with human total chromosome probe.

고 찰

저자들은 미성숙난자를 이용하여 체외성숙과 수정을 통하여 작성된 배아를 *ovum donation program*을 통해 성공적으로 태아의 분만을 보고하여 인간 *ovum donation program*에 있어 미성숙난자의 임상적 가능성을 제시하였다 (Cha 등, 1991, 1992). 이후 저자들은 *ovum donation program*을 위한 *ovum bank*의 설립을 위해 난소로부터 회수한 미성숙난자의 동결을 위한 연구를 수행하였고 미성숙난자가 동결·융해후 성숙, 수정과 발달이 될 수 있음을 보고하였다 (Son 등, 1996). 인간 미성숙난자의 동결보존에 관한 연구는 Mandelbaum 등 (1988a)에 의해 최초로 보고되었으나 이 분야에 관한 연구는 연구재료의 제한성으로 인해 극히 제한적인 연구만이 수행되고 있는 실정이다. 다만 Toth 등 (1994a)은 호르몬유기를 받은 난소와 자연주기의 난소로부터 회수한 미성숙 난자의 동결융해후의 성숙율과 수정율을 비교하였는데 호르몬유기를 받은 난소로부터 회수된 미성숙난자의 성숙율이 74.8%과 수정율이 56.5%인 반면 동결융해한 난자의 성숙율과 수정율은 83.3%와 57.7%를 나타내어 두군간의 차이

가 나타나지 않았다고 보고하였다. 또한 이들은 상이한 두가지 동결보존 방법을 이용하여 용해후 생존율과 성숙율을 비교하였는데 방법 1 (slow freezing, slow thawing)의 경우 동결용해후 낮은 생존율 (15.6%)을 나타냈었으나 체외성숙률 (58.3%)은 높았으며 방법 2 (rapid freezing, rapid thawing)에서는 높은 생존율 (43.3%)은 나타낸 반면 낮은 성숙율 (27.3%)을 나타내었다고 보고하여 미성숙 난자의 동결용해방법에 따라 생존율과 성숙율에 차이가 나타남을 지적하였다 (Toth 등, 1994b). 이에 비해 저자들의 이전 연구결과에서는 비교적 높은 생존율 (55.1%)과 성숙율 (59.3%)을 보고하였으나 수정율 (42.9%)과 발달율 (16.7%)은 낮은 것으로 나타났다 (Son 등, 1996). 수정율과 발달율이 낮은 원인에 대해서는 아직 명확하지 않지만, 동결용해후의 염색체, 방추사의 구조, 세포질기관들의 변화에 의한 것으로 추정되어진다. 따라서 본 연구는 이러한 결과가 미성숙난자의 항동해제 처리과정에서 기인하는것인지 또는 동결용해과정에서 기인하는것인지를 알아보기 위한 기초연구로서 체외성숙된 난자의 염색체이상을 분석하였다. 염색체의 수적인 이상을 관찰하기 위해 fluorescence in situ hybridization (FISH) 방법을 이용하였다. FISH 방법은 일반적인 aneuploidy와 관련된 염색체 이상을 살펴보기 위한 방법으로 보고되고 있다 (Griffin 등, 1992). 이전의 기초연구를 통해 난자의 염색체 분석을 위한 FISH와 Giemsa method를 비교하였으며 그 결과 정확성과 신속성에서 FISH 방법이 더욱 유용함을 확인할 수 있었다. FISH 방법은 양질의 probe를 이용하므로써 민감하고 빠르며 효율적인 방법이다.

미성숙난자의 동결보존은 성숙난자에 비해 방추사의 형성이 없고 염색체가 비교적 안정된 상태이기 때문에 저온충격이나 항동해제 처리에 따른 염색체 이상을 예방할 수 있다는 가정하에서 시도되었다. 그러나 본 연구결과 성숙난자에서와 마찬가지로 동결용해된 미성숙 난자에서도 높은 비율 (77.8%)의 염색체의 이상을 나타내었다. 그러나 1.5 M PROH에서 노출시킨 난자에서는 염색체 이상 (41.4%)은 대조군의 그것 (31.8%)과 큰차이가 없었다. 이러한 결과로 미루어 보아 미성숙 난자의 저온에서의 노출이 2차 감수분열의 방추사의 이상을 초래하여 결국 염색체이상을 유도하는 것으로 사료된다. 동물난자를 이용한 연구에서 저온노출 후에 방추사의 파괴와 비

중합반응의 유도가 aneuploidy와 polyploidy를 유도하는 것으로 보고 (Van der Elst 등 1988, sathanathan 등, 1988)되었으며 마우스의 미성숙 난자의 동결용해후 전자현미경을 이용한 미세구조 연구에서도 세포질과 핵과 핵인, 염색체의 구조와 조직이 변화됨을 보고하였다 (Van Blerkom, 1989). 그러나 대부분의 연구에서 동결과정중의 세포질과 핵의 변화는 용해후 배양동안 정상적으로 회복되는 것으로 보고하였으나 본 연구에서는 미성숙 난자의 동결용해 후의 변화들이 배양과정에서 회복되지 않은 것으로 관찰되었다. 따라서 인간미성숙 난자의 동결용해후 체외배양시킨 난자에서 높은 빈도의 염색체이상이 관찰되고 이러한 영향이 이후의 체외성숙, 수정, 및 배발달을 감소시키는 원인으로 설명하기에는 불충분하다 (Trousion 등 1989). Van der Elst 등 (1992)은 핵성숙과 관련된 동결용해후의 결손이 미성숙난자의 발달을 저하의 원인으로 설명하기에는 부족하므로 동결후의 난자의 세포질의 손상에 관한 보다 심도깊은 연구가 필요하다고 제시하였다. 따라서 molecular level 혹은 biochemical level에서의 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편, Carroll 등 (1990)은 동결용해후 수정률이 감소되는 것은 난자의 투명대의 변화에 의한 것으로 보고하였다. 그들은 동결용해후의 투명대가 있는 난자에 비해 투명대의 일부를 제거한 난자에서 높은 수정율을 나타내므로 동결과정에서 난자의 투명대 경화현상이 나타난다고 보고하였다.

현재 저자들은 미성숙 난자의 동결용해후 세포소기관 및 투명대의 변화를 관찰하고 있으며, 또한 생존율, 성숙율 및 발달율을 증가시킬 수 있는 새로운 동결방법의 연구가 진행중이다.

참 고 문 헌

- Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Krebs D: Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987, 2, 695-700.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG, Merriman JA, Choudhury N: Cryopreservation of immature mouse oocytes. *Hum Reprod* 1994, 9, 1738-42.
- Capron AM: Parenthood and frozen embryos. More than property and privacy. *Hastings Centre Rep* 1992, 22, 32-33.

- Carroll J, Depypere H, Matthews CD: Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990, 90, 547-53.
- Cha KY, Do BR, Chi HJ, Yoon TK, Choi DH, Koo JJ et al: Viability of human follicular oocytes collected from unstimulated ovaries and matured and fertilized *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1992, 4, 695-701.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK: Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Sterile* 1991, 55, 109-13.
- Chen C: Pregnancy after human oocyte cryopreservation: *Lancet* 1986, I, 884-886.
- Chen C: Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Ann NY Acad Sci* 1988, 541, 541-549
- Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RML, Delhanty JDA: Dual fluorescent *in situ* hybridization for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 1992, 89, 18-22.
- Hunter JE, Bernard AG, Fuller BJ, Shaw RW: Fertilization and development of the human oocyte following exposure to cryoprotectants, low temperatures and cryopreservation. *Hum Reprod* 1991, 6, 1460-1465.
- Imoedemhe DG, Sique AB: Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *J Assist Reprod Genet* 1992, 9, 323-327.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, et al: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988a, 3, 117-9.
- Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, Plachot M, Alnot MO, Rime H, et al: Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. *Ann New York Acad Sci* 1988b, 541, 550-61.
- Pellicer A, Lightman A, Parmer TG, Behrman HR, De Cherney AH: Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil Steril* 1988, 50, 805-10.
- Perry C, Schneoder LK: Cryopreserved embryos: who shall decide their fate? *J Leg Med* 1992, 13, 463-500.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J: Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990, 54, 102-8.
- Rime H, Jessup C, Ozon R: Distribution of microtubules during the first meiotic cell division in the mouse oocytes: Effect of taxol. *Gamete Res* 1987, 17, 1-3.
- Sathanathan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J et al: The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988, 21, 385-401.
- Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD: Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservation. *Bio Reprod* 1989, 40, 370-393.
- 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.
- Siebzehnuebl 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 propanediol. *Hum Reprod* 1989, 4, 312-317.
- Son WY, Park SE, Lee KA, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK et al: Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the *in vitro* developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil Steril* 1996, 66, 995-9.
- Tarkowski AK: An air-drying method for chromosome preparations from mouse egg. *Cytogenetics* 1966, 5, 394-400.
- Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW, Muasher S, Lanzendorf SE: Fertilization and *in vitro* development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril* 1994a, 61, 891-4.
- Toth TL, Lanzendorf SE, Sandow BA, Veeck LL, Hassen WA, Hansen K, Hodgen GD: Cryopreser-

- vation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. *Fertil Steril* 1994b, 61, 1077-82.
- Trouson A, Kirby C: Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril* 1989, 52, 778-86.
- Van Blerkom JV: 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, 883-98.
- Van der Elst J, Nerinckx S, Van Steirteghem AC: *In vitro* maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing; limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Hum Reprod* 1992, 7, 1440-6.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem A: Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1988, 3, 960-7.
- Van Uem JFHM, Siebzehnrbl ER, Schuh B, Kock R, Trotnow S, Lang N: Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987, 1, 752-3.
-