

생쥐 배아 동결시 액체질소의 분사속도가 해빙후 배아의 발달, 미세섬유, 미토콘드리아 및 세포자연사에 미치는 영향

손인표^{1,3} · 안학준² · 계명찬¹ · 최규완³ · 민철기² · 강희규⁴ · 이호준⁴ · 권혁찬^{4†}

¹경기대학교 자연과학대학 생물학과, ²아주대학교 자연과학대학 생명과학과,
³바이오메드연구소, ⁴을지대학교 의과대학 산부인과, ⁵을지대학교 의과대학 생리학교실

Effect of Different Infusion Frequency of Liquid Nitrogen on Actin Filament, Mitochondria, Apoptosis and Development in Mouse 2-Cell Embryo after Freezing and Thawing

IP Son^{1,3}, HJ Ahn², MC Gye¹, KW Choi³, CK Min², HK Kang⁴, HJ Lee⁵ and HC Kwon^{4†}

¹Dept. of Biology, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon,

²Dept. of Life Science, College of Natural Science, Ajou University, Suwon

³Bio-Med Research Institute, Suwon

⁴Dept. of OB/GYN & ⁵Dept. of Physiology, Eulji University School of Medicine, Taejon, Korea

요약: 컴퓨터 세포동결기를 이용하여 생쥐 배아를 동결할 때 액체질소 (LN₂)의 분사속도가 해빙 후 배아의 미세구조, 기능 및 발달에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 이를 위해 배아는 동결을 하지 않은 대조군 (control) 및 동결군에서 LN₂의 분사속도에 따라 고속분사군 (120 infusion/min; group 1), 저속분사군 (50 infusion/min; group 2)으로 나누었다. ICR 계열의 생쥐의 2 세포기 배아를 사용하였으며, 동결 및 해빙은 저속동결-급속해빙 방법을 사용하였다. 각 군에 따라 해빙 후 배아의 생존율과 세포질이 양호하고 분절화가 없는 2 세포기 배아를 대상으로 포배 발달을 및 할구수를 측정하였다. 공초점 현미경을 이용하여 배아 내에서의 H₂O₂ 활성 미토콘드리아의 분포, 막전위차 및 actin filament를 측정하였으며, TUNEL 방법을 이용하여 DNA 분절화를 확인하였다. 동결-해빙 후 건강한 2 세포기 배아의 회수율은 group 1 (50.7%)에 비해 group 2 (34.6%)에서 현저히 감소했다 ($p < 0.05$). 포배기 배아의 발생률 (86.7%, 76.7% vs. 44.0%)과 할구수 (79.5 ± 12.9 , 71.6 ± 8.0 vs. 62.5 ± 4.7)는 대조군 혹은 group 1에 비해 group 2에서 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). H₂O₂의 상대적 강도는 group 2에서 유의하게 증가하였다 (15.3 ± 3.0 , 16.6 ± 1.6 vs. 23.4 ± 1.8 , $p < 0.05$). 활성 미토콘드리아의 분포는 정상적인 배아에서는 균등하게 분포하는 반면 배발달이 정지된 배아에서는 원형질막 주위에 몰리고 응집된 양상을 보였다. 그러나 대조군, group 1, group 2에서는 모두 균등하게 분포하여 각 군간에 차이가 없었다. 미토콘드리아의 JC-1 염색 결과는 대조군과 group 1의 경우 590 nm의 파장으로 발산되는 미토콘드리아가 group 2에 비하여 유의하게 증가하였다 (17.2 ± 3.8 , 17.4 ± 1.3 vs. 13.2 ± 2.0 , $p < 0.05$). 2 세포기 배아내 미세섬유 (actin filament)는 대조군 및 group 1의 경우 균일하게 분포하는 반면, group 2에서는 부분적인 결손과 응집현상이 관찰되었다. DNA 분절율 (30.8%, 36.0% vs. 65.6%; $p < 0.05$)은 group 2에서 유의하게 증가하였다. 동결시 액체질소의 분사속도는 해빙 후 배아 발달에 매우 중요한 요인으로 작용하며, LN₂의 분사속도의 증가는 동결과정에서 하강 온도의 미세한 변화를 감소시켜 세포내 골격구조와 미토콘드리아의 상해를 감소시켜 H₂O₂의 발생과 DNA 분절화를 감소시켜 배아 발생을 호전시키는 것으로 사료된다.

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effect of the frequency of the LN₂ infusion on the ultrastructure, metabolism and development of the embryo after freezing and thawing by computerized cell freezer. Two-cell embryos of ICR mouse were randomly allocated into fresh (control), high-frequency freezing (group 1) and low-frequency freezing (group 2). For fresh and frozen-thawed intact 2-cell embryos, total cell number in the blastocyst was counted by fluorescent microscope after Hoechst 33258 staining. Relative amount of H₂O₂ was measured by DCHFDA. Intracellular location and membrane potential of the mitochondria were evaluated by staining with rhodamine 123 and JC-1. The structure of actin filament was also evaluated by confocal microscope. DNA fragmentation was assessed by TUNEL method after development into blastocyst. The survival rate of intact embryo was higher in group 1 than group

2 (50.7% vs. 34.6% respectively, $p < 0.05$). The blastocyst developmental rate was significantly low in group 2 (86.7%, 76.7% vs. 44.0% for control, group 1 and group 2 respectively, $p < 0.05$). Total cell number in the blastocyst was also significantly lower in group 2 than control (79.5 \pm 12.9, 71.6 \pm 8.0, and 62.5 \pm 4.7 for control, group 1 and group 2 respectively, $p < 0.05$). The relative amount of H₂O₂ was higher in group 2 than other groups (15.3 \pm 3.0, 16.6 \pm 1.6 vs. 23.4 \pm 1.8, $p < 0.05$). After JC-1 staining, relative intensity of mitochondria with high membrane potential was significantly lower in group 2 than control and group 1 (17.2 \pm 3.8, 17.4 \pm 1.3 vs. 13.2 \pm 2.0, $p < 0.05$). In group 2, partial deletion and aggregation of the actin filament was found. DNA fragmentation rate was also higher for group 2 versus other groups (30.8 %, 36.0 % vs. 65.6 %, $p < 0.05$). The frequency of the LN₂ infusion is an important factor for the development of frozen-thawed mouse embryo. High-frequency infusion may prevent damages of cytoskeleton and mitochondria in the embryo probably by preventing the temperature fluctuation during dehydration phase. We speculate that the application of high-frequency infusion method in human embryo may be promising.

Key words: Cryopreservation, LN₂ infusion, Mitochondria, Membrane potential, Apoptosis.

서론

배아를 동결보존할 때는 냉각과정과 결빙 및 탈수과정으로 진행된 후에 -196°C의 액체 질소에서 보존된다. 이 과정에서 세포의 막 지질 및 골격의 변형과 이에 따른 효소 및 세포막 기능장애, 과량의 반응성 산소종 생성과 이로 인한 세포자연사 (Boveris et al., 1976; Morgan et al., 1976; Aust et al., 1985; Kappus, 1985; Bulkley, 1987; Fuller et al., 1987, 1988), 결빙 및 탈수과정에서 세포내/외의 결빙으로 인한 세포막과 골격, 세포내 소기관들의 상해, 동해억제제의 독성과 삼투압에 의한 세포의 물리 화학적인 손상 (Leibo et al., 1974; Mazur, 1977; Ashwood-Smith et al., 1988) 등이 보고되고 있다. 이후 해빙과정에서도 이동성 재결빙에 의한 손상이 보고되고 있다 (MacFarlane & Forsyth, 1987). 특히 세포내/외의 결빙 상태 및 성장은 열역학적 평형 유지에 영향을 주는 동결속도 (Boutron, 1984; Mazur, 1990; Körber et al., 1991; Karlsson et al., 1993)와 하강온도의 변화 (Scott et al., 1993)에 의해 좌우되며 미세 얼음 입자가 성장하여 얼음 결정체를 형성하면 세포막, 세포골격 및 소기관에 치명적 손상을 준다고 알려지고 있다 (Rall et al., 1980; Takahashi, 1982; Boutron, 1987).

최근의 배아 동결시 다양한 동해억제제의 사용 (Whittingham & Wood, 1984)과 컴퓨터 세포동결기의 이용은 이러한 배아의 손상을 효과적으로 감소시키고 있다고 하나, 해빙시 배아의 생존율, 양질 배아의 발생률과 임신율은 비동결 군에 비해 현저하게 저하되는 것으로 알려지고 있어 (Feichtinger et al., 1991; Menezo et al., 1992; Veeck et al., 1993; Shoukir et al., 1998) 개선의 여지가 있다고 하겠다.

현재 사용되고 있는 세포동결기에서 프로그램 된 동결속도를 조절하는 것은 일정한 속도로 분사되는 액체질소의 가스분압에 의해 조절된다. 이러한 비연속적 분사 방법은 비록

예정된 목표 온도에 도달하기까지 우수한 결빙곡선을 보이지만 결빙시의 발산열에 의한 미세한 온도의 변화가 초래되어 얼음 결정의 상태에 영향을 줄 수 있다 (Scott et al., 1993). 그러나 액체 질소의 분사속도를 증가시키면 온도변화를 상쇄시켜 비교적 일정한 결빙곡선을 유지함으로써 얼음결정체의 형성을 막을 수 있을 것으로 기대된다고 하겠다.

본 연구에서는 저속 (50 infusion/min) 및 고속 액체질소 분사법 (120 infusion/min)으로 액체질소 분사속도가 각각 조절된 자동 세포동결기를 사용하여 2 세포기 생쥐 배아를 일정 시간 동결한 후 해빙하여 각 군에서의 배아에서 배아 발달과 세포의 형태적, 기능적 차이를 확인하고자 하였다.

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 pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG; Folligon; Intervet, Holland)과 human chorionic gonadotrophin (hCG; Choriomon; IBSA, Lugano, Switzerland)을 7.5 IU씩 복강 내로 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰으며, 다음날 아침 질전을 통해 교미를 확인하였다. hCG주사 48시간 후 경추 파괴로 도살하여 수란관을 적출하였으며, 0.4% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA)이 포함된 mHTF 배양액 내에서 난관 내로 배양액을 관류시켜 2 세포기 배아를 획득하였다. 회수된 2 세포기 배아는 동결과정 없이 배아를 발달시킨 군 (control, n=240), 액체질소의 분사속도가 분당 120회인 고속 액체질소 분사 방법을 사용한 군 (group 1, n=204)과 분당 50회인 저속 액체질소 분사 방법을 사용한 군 (group 2, n=171)으로 나누어 동결하였으며, 동결 배아는 7~60일간 보관한 후에 해빙하였다. 투명대와 활

구의 손상이 없는 건강한 2 세포기 배아만을 선별하여 propidium iodide 10 μ g/ml로 염색한 후 할구와 투명대 모양, 세포질의 상태를 기준으로 평가한 배아의 상태와 propidium iodide의 염색을 기준으로 한 배아의 상태의 일치도를 확인하였으며, 37°C, 5% CO₂, 95% 공기가 공급되는 배양기 (Cellstar 2710; Queue Systems Inc., NJ, USA) 내에서 체외 배양한 후에 실험을 시행하였다. 배양액은 pH 7.4, 삼투압 280~285 mOsm/kg이 되도록 하였으며, 5% CO₂, 37°C 배양조건에서 3시간 전에 준비하여 온도와 가스 분압을 일정하게 조절하였다.

2. 배아의 동결보존 및 해빙과정

배아의 동결은 균등한 할구를 가지고 있는 건강한 2 세포기 생쥐 배아를 선택한 후 액체질소의 분사속도가 다른 두 종류의 컴퓨터 세포동결기 [high-frequency infusion (group 1; 120 infusion/min): CryoMagic, Booil Industry, Seoul, Korea; low-frequency infusion (group 2; 50 infusion/min): Kryo-10, Planar, UK]를 이용하여 양군 모두 동일한 프로그램을 이용한 저속 동결 방법으로 동결을 시행하였다. 동해억제제로 1,2-propanediol (PROH; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, N.Y., USA)이 포함된 배양액에 첨가하여 사용하였다.

해빙은 양군 모두 동일한 방법으로 급속 해빙 (500°C/min)하였고, 해빙 후 0.4% BSA가 포함된 mHTF 배양액에 옮겨 배양기에서 배양하였다.

3. 배아의 평가와 발달

해빙 과정을 마친 후 2 세포기 배아의 생존 여부는 현미경 하에서 세포의 모양과 세포질의 상태를 기준으로 2개의 할구가 모두 생존한 배아를 intact, 1개의 할구만이 생존한 배아를 partial, 그리고 1개 이상의 할구가 생존한 배아를 sum으로 구분하여 생존율을 나타냈다.

실험에 사용된 2 세포기의 배아는 현미경하에서 배아를 관찰하여 할구 모양이 둥글고 세포질이 맑고 온전한 투명대를 가진 건강한 배아만을 대상으로 실시하였으며 propidium iodide (10 μ g/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)로 염색하여 생존성 여부를 확인하였다. 배아의 발달은 24시간 간격으로 위상차 도립현미경 (Inverted phase contrast microscope, Diaphot 300, Nikon Co., Tokyo, Japan)하에서 관찰하였고, 2 세포기, 4 세포기, 8 세포기, 상실기, 포배기로 나누어 평가했다. 배양 혹은 해빙 후 72시간째 각 군에서 포배기에 도달한 배아를 0.8% sodium citrate에 5분간 노출시킨 후 carnoy's solution (acetic acid : ethanol = 1: 3)으로 슬라이드 위

에 고정시켰으며 24시간 동안 자연 건조시켰다. 고정된 포배기 배아는 생리식염수로 팽창시켰고, Hoechst 33258 (1 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 5분간 암 처리한 후에 형광현미경하에서 세포수를 계수하였다.

4. 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.)로써 2 세포기 배아를 넣고 15분간 배양하였다. 배아를 mHTF 배양액으로 세척한 후에 490nm의 파장에서 여기시키고, 510nm의 파장으로 발산되는 조건에서 공초점 현미경으로 관찰하여 DCF의 발현 정도를 정량하여 H₂O₂의 농도 차이를 확인하였다.

5. 활성 미토콘드리아의 분포확인

2 세포기 배아들을 rhodamine 123 (10 μ g/ml, Molecular Probes Inc.)을 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 15분 동안 배양하였다. mHTF 배양액으로 세척한 후 490nm의 파장에서 여기시키고, 510nm의 파장으로 발산되는 조건에서 공초점 현미경으로 활성 미토콘드리아의 분포를 확인하였다.

6. 미토콘드리아의 막전위차 (membrane potential) 측정 (Ψ m)

5 μ g/ml의 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocynaine iodide; Molecular Probes Inc.)을 이용하여 2 세포기 배아를 37°C, 5% CO₂에서 30분 동안 배양하였다. mHTF 배양액으로 세척한 후 490nm의 파장에서 여기시키고, 510/590nm 파장으로 발산되는 조건에서 공초점 현미경으로 분석하였다.

7. 세포내 F-actin 변성확인

투명대가 제거된 2 세포기 배아들은 3.7% paraformaldehyde 용액에서 30분 동안 정치되었다. phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후 0.25% Triton-X 100에서 10분, 0.26% NH₄Cl 용액에서 10분 정치하였다. 이후 primary antibody (250 μ l/mln PBS, pH 9, FITC-labeled phalloidin, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA)에서 45분 동안 배양한 후, PBS로 세척하여 490nm 파장에서 여기시키고, 510nm 파장으로 발산되는 조건에서 공초점 현미경 (MR/AG-2 BIO-RAD, Hercules, CA, USA)으로 분석하였다.

8. DNA 분절화 확인

배아에서 DNA 분절화를 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 DNA 분절화를 조사하였다.

9. 통계분석

실험 결과의 통계적 분석은 chi-square test, one way ANOVA 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 회수율 및 생존율

2 세포기 생쥐 배아의 동결 및 해빙 후 배아의 회수율은 group 1에서 95.7% (402/420), group 2에서 95.4% (494/518)로써 양군간에 차이가 없었다 (Table 1). 한 개 이상의 할구가 생존한 배아의 생존율은 group 1에서 75.6% (304/402), group 2에서 65.8% (325/494)였으며, 할구 하나만이 생존한 배아의 생존율은 24.9% (100/402), 31.2% (154/494)로 양군간에 유의한 차이가 없었다. 반면 전체 할구의 상태가 건강한 배아의 비율은 50.7% (204/402), 34.6% (171/494)로 group 1이 group 2에 비하여 생존율이 유의하게 높았다 (p<0.05) (Table 1). 동결보존하지 않은 배아 및 동결보존된 배아에서 할구와 투명

대 모양, 세포질의 상태를 기준으로 평가한 배아의 상태와 propidium iodide의 염색을 기준으로 한 배아의 생존 상태의 일치도는 96.4% (53/55)로써 높은 상관성을 보였다.

2. 배아의 발달

Fig. 1은 동결 및 해빙된 배아를 72시간 배양한 후 배아 발생율을 보여주고 있다. 포배기 배아 발생율은 대조군에서 86.7% (150/173), group 1에서 76.7% (105/137), group 2에서 44.0% (44/100)로 대조군과 group 1에 비하여 group 2에서 유의하게 감소하였다 (p<0.05). 포배기 배아의 세포수는 대조군 (n=21), group 1 (n=20), group 2 (n=20)에서 각각 79.5±12.9, 71.6±8.0, 62.5±4.7로 대조군과 group 1사이에는 유의한 차이가 없었으나 group 2는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 (p<0.05) (Fig. 1).

3. 2 세포기 배아내 H₂O₂의 상대적 강도

H₂O₂의 상대적 강도는 대조군 (n=20), group 1 (n=21) 그리고 group 2 (n=24)에서 각각 15.3±3.0, 16.6±1.6 vs. 23.4±1.8로써 양군에 비해 group 2에서 유의하게 높았다 (p<0.05)

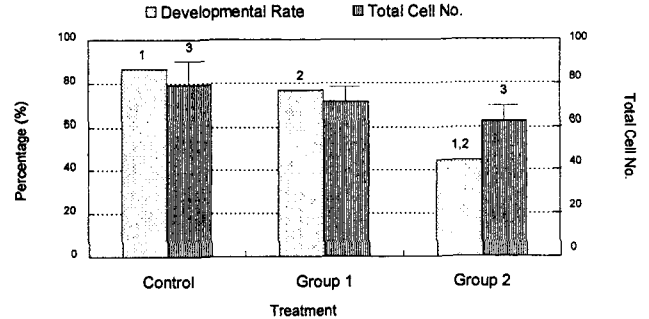


Fig. 1. Development of the 2-cell embryos after 72 h of culture. The percentage of embryos reached to blastocyst stage was significantly low in group 2, while the development rate of group 1 was not significantly different with that of control. Total cell number in the blastocyst was significantly lower in group 2 than control. Data are mean±SD. 1, 2, 3: p<0.05 by Scheffe test.

Table 1. Recovery and survival rates of mouse 2-cell embryos after freezing and thawing

	No. of embryo(%)		No. of survived embryo(%)		
	Frozen	Retrieved	Intact	Partial	Sum
Control	—	240	240	—	240
Group 1	420	402(95.7)	204(50.7)*	100(24.9)	304(75.6)
Group 2	518	494(95.4)	171(34.6)*	154(31.2)	325(65.8)

Control: fresh non-freezing, Group 1: high-frequency infusion freezing, group 2: low-frequency infusion freezing. Intact means an embryo with two intact blastomeres, partial means an embryo mixed with an intact and a damaged blastomeres. *: p<0.05 by Chi-square test.

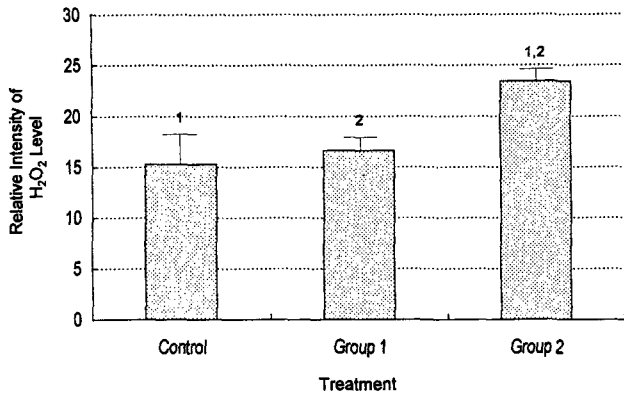


Fig. 2. Relative amount of H₂O₂ level in the 2-cell embryos. The relative level of intracellular H₂O₂ was evaluated by confocal microscopy after staining with DCHFDA. The relative amount of H₂O₂ production was significantly higher in group 2. Data are mean ± SD. 1, 2: p < 0.05 by Scheffe test.

(Fig. 2).

4. 2 세포기 배아내 활성 미토콘드리아의 분포

활성 미토콘드리아의 분포는 정상적인 배아 (A)에서는 균등하게 분포하는 반면 배발달이 정지된 배아 (D)에서는 원형질막 주위에 몰리고 응집된 양상을 보였다. 그러나 대조군 (A, n=11), group 1 (B, n=13), group 2 (C, n=14)에서는 모두 균등하게 분포하여 각 군간에 차이가 없었다 (Fig. 3).

5. 2 세포기 배아내 미토콘드리아의 막전위차 (membrane potential; Ψ_m)

대조군 (A, n=28)과 group 1 (B, n=25)에서는 모든 배아에서 480nm의 파장에서 여기시켰을 때, 핵 주위에 510nm의 파장으로 발산되는 녹색, 황색 미토콘드리아가 있었고 세포막

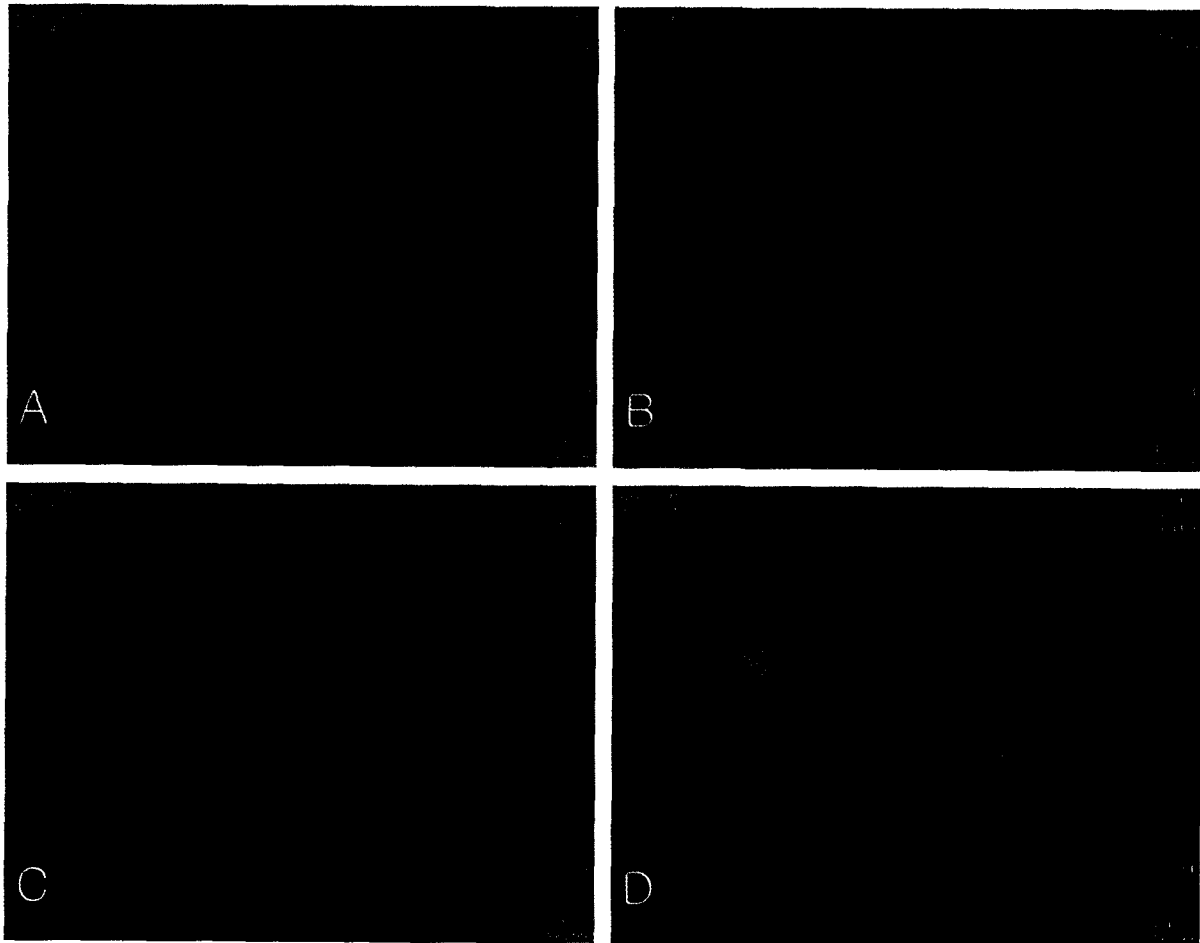


Fig. 3. Intracellular location of active mitochondria evaluated by confocal microscopy after staining with rhodamine 123. The mitochondria in normal embryo (control) were distributed homogeneously while the mitochondria in arrested embryo were aggregated especially along the plasma membrane. The distribution of the mitochondria was homogeneous in the cytoplasm and not different among the control, group 1 and group 2. A: control, B: high-frequency infusion freezing (group 1), C: low-frequency infusion freezing (group 2), D: arrested embryo.

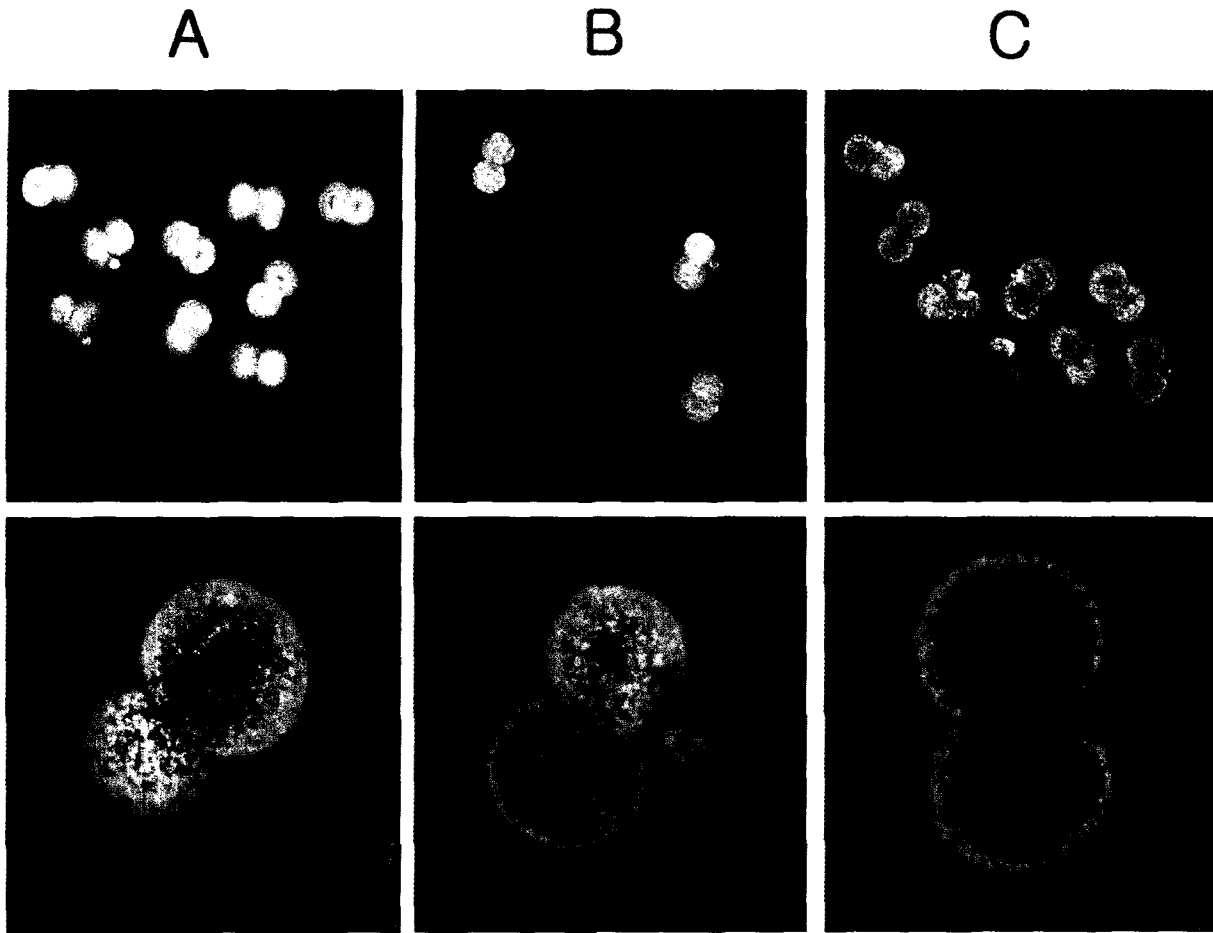


Fig. 4. Transmembrane potential (Ψ_m) of mitochondria evaluated by confocal microscopy after staining with JC-1. In control and group 1 the mitochondria with low membrane potential were found in peri-nuclear region and the mitochondria with high membrane potential were in the cytoplasmic face of the plasma membrane. In group 2, however, the mitochondria having low membrane potential were scattered inside the cytoplasm and there was small amount of mitochondria having high membrane potential. A: control, B: high-frequency infusion freezing (group 1), C: low-frequency infusion freezing (group 2).

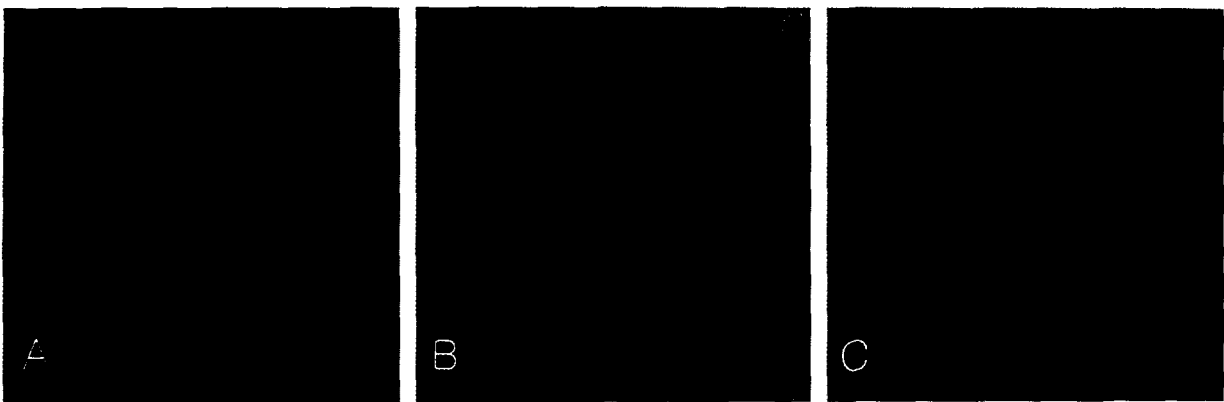


Fig. 6. Distribution of intercellular cytoskeleton (F-actin) evaluated by confocal microscopy after staining with FITC-labeled phalloidin. A: control, B: high-frequency infusion freezing (group 1), C: low-frequency infusion freezing (group 2). A and B, actin filament are distributed homogeneously in 2-cell embryo control and group 1. C, partial deletion and aggregation of the actin filament are noted in group 2.

쪽으로 590nm의 파장으로 발산되는 적색 미토콘드리아가 존재하는 양상을 보였으나 group 2 (C, n=26)에서는 대부분의 배아에서 510nm의 파장으로 발산되는 녹색 미토콘드리아가 세포질에 고르게 분포되었고 590nm의 파장으로 발산되는 적색 미토콘드리아는 적게 관찰되었다 (Fig. 4). 상대적 강도는 각각 510nm의 미토콘드리아가 14.4 ± 0.9 , 11.8 ± 0.9 vs. 10.8 ± 1.2 , 590nm의 미토콘드리아가 17.2 ± 3.8 , 17.4 ± 1.3 vs. 13.2 ± 2.0 으로써 590nm의 파장으로 발산되는 미토콘드리아가 대조군, group 1에 비해 group 2에서 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 5).

6. 2 세포기 배아내 F-actin의 분포

Actin filament의 조성은 대조군 (n=8)과 group 1 (n=8)의 경우 균질하게 분포하는 양상을 보인 반면, group 2 (n=7)의 경우 대부분의 배아에서 부분적인 결손과 응집된 양상을 보였다 (Fig. 6).

7. DNA 분절화

TUNEL 방법으로 DNA 분절화를 확인한 결과, 세포자살사가 일어난 세포의 수는 대조군 (n=21), group 1 (n=20), group 2 (n=20)에서 각각 24.5 ± 10.2 , 25.8 ± 13.9 , 41.0 ± 7.4 로서 전체 세포에 대한 비율이 각각 30.8% ($24.5/79.5$), 36.0% ($25.8/71.6$), 65.6% ($41.0/62.5$)로 group 2에서 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 7).

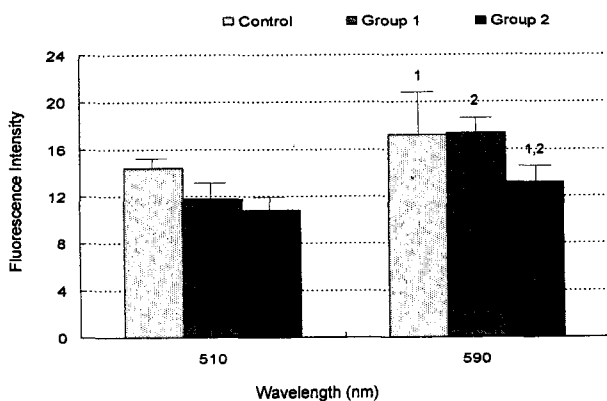


Fig. 5. Fluorescence intensity of emission in 510 and 590 nm wavelength. The relative amount of mitochondria with low membrane potential (510 nm wavelength emission) was not different among the study groups. While the mitochondria having high membrane potential (590 nm wavelength emission) was significantly low in group 2 compared with control or group 1. Data are mean±SD. 1, 2: $p < 0.05$ by Scheffe test.

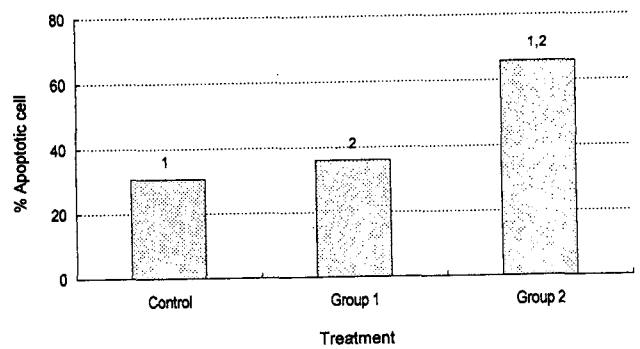


Fig. 7. Percentage of apoptotic cells in blastocysts. DNA fragmentation of blastocyst nuclei was assessed by TUNEL method. Percentage of apoptotic cell was significantly increased in group 2. 1, 2: $p < 0.05$ by Scheffe test.

고 찰

동결 및 해빙과정은 세포의 다양한 기능적 형태적 손상을 준다고 알려지고 있다. 이중 대표적인 것이 미세소관 (Brinkley & Cartwright, 1975)과 미세사 (Porter & Anerson, 1980)의 저온 해중합 (depolymerization) 또는 분해, 결빙 및 탈수과정에서 동해억제제의 삼투압에 의한 과도한 수축 (Mayer et al., 1986), 세포내/외의 얼음 결정체 형성과 성장 (Rall et al., 1983; Sathanathan et al., 1987; Ng et al., 1988; Vincent et al., 1989; Körber et al., 1991), 그리고 해빙과정에서의 이동성 재결정 (Mayer et al., 1986; Sathanathan et al., 1987; Körber et al., 1991; Shaw et al., 1995) 등에 의해 미세소관과 미세사 뿐 아니라 세포막 및 세포 소기관의 손상이 유발되는 것으로 보고되고 있다. 특히 세포내/외의 얼음 결정체의 형성 및 성장은 열역학적인 평형 유지에 영향을 주는 동결속도와 하강 온도 변화에 의해 좌우된다고 보고되고 있다 (Grout, 1991; Scott et al., 1993). 세포질내 얼음 결정체의 형성은 방추사와 세포질 미세소관의 체계를 교란하고 중합된 actin filament를 소실시킨다 (Sathanathan et al., 1987; Ng et al., 1988; Vincent et al., 1989; Körber et al., 1991). 이러한 세포골격의 손상은 이수배수체를 유발하며 (Pickering & Johnson, 1987; Sathanathan et al., 1988), 세포질내의 효소 체계를 유지하고 있는 미세사 (Clegg, 1984)의 해체에 따른 대사경로 구매의 혼란과 단백질 합성장애 (Brinkley & Cartwright, 1975; Burdon, 1987)를 초래한다고 알려지고 있다.

한편 미토콘드리아에서도 세포내의 다른 소기관보다 저온에서 다소 저항성을 갖고 있다고 알려져 있으나 (Chance et

al., 1979; Fuller et al., 1990) 세포나 조직에서 전자수용체로서의 산소가 결핍됨으로 인해 ATP를 생산하지 못하고 대사과정이 원활치 못함으로 인해 약 0°C에 접근하면 ATP를 모두 소모하게 된다 (Warnick & Lazarus, 1977). 이러한 과정에서 세포는 생존을 위해 ATP로부터 ADP, AMP를 거쳐 hypoxanthin, uric acid로 대사 (runaway effect; Buhl & Jorgensen, 1975)가 일어난다. 또한 이러한 과정에서 탈인산화가 일어난 생성물은 쉽게 세포막을 통과하여 사라지므로 해빙 후에 ATP 합성을 위한 전구체의 결핍을 초래한다. 이러한 현상은 막성 지질류 및 단백질의 재분포 및 응집에 의한 막성 효소의 기능저하 (Hesketh et al., 1976; Sinensky et al., 1979; Kachar et al., 1980; Feltkamp et al., 1982)와 더불어 Na^+/K^+ -ATPases, Ca^{2+} -ATPases와 같은 활성 "pumps"를 억압하여 선택적 투과성의 장애를 초래함으로써 전해질 평형이 파괴되고 유리 Ca^{2+} 농도가 증가되며 삼투압이 변화되어 세포 팽창을 초래하게 된다 (Leaf et al., 1973). 이러한 세포 팽창은 0°C에서 처음 낮은 정도로 일어난다. 하지만 미토콘드리아의 초기 팽창과 소포체의 팽창은 동결이 없을 경우 치명적이지 않다 (Trusal et al., 1984). 반면 -10°C에서는 미토콘드리아 및 소포체의 팽창이 더 현저하게 진행되고 (Trusal et al., 1984), 세포질내 얼음 결정체가 증가함에 따라 미토콘드리아의 내막에 결합하고 있던 효소들의 유리가 증가되며 이러한 얼음 결정체 형성은 미토콘드리아의 막 손상의 원인이 된다고 보고되고 있다 (Hamm & Gottesmann, 1985). -15°C에서는 핵막의 분리와 변형, 염색질 분포의 변화, 인의 파괴 등과 같은 핵의 변화가 일어나게 되며, 동결 단계에서 이러한 핵의 변화와 함께 세포질내 기관들의 팽창 증가는 생존을 감소시킬 것이라고 보고되고 있다 (Trusal et al., 1984).

또한 미토콘드리아와 소포체로부터의 유리 Ca^{2+} 농도의 증가는 protease와 phospholipase 등과 같은 분해 (degradative) 효소의 활성화를 초래하여 세포막과 actin filament의 변형을 초래하며, 반응성 산소종에 대한 손상의 감수성을 높인다고 보고되고 있다 (Bygrave, 1978; Cotterill et al., 1989). 또한 runaway 현상은 xanthin oxidase에 의해 hypoxanthine이 uric acid로 진행되는 과정 (Fuller et al., 1988; Maessen et al., 1989) 및 미토콘드리아의 내막 효소체계의 붕괴 (Hamm & Gottesmann, 1985)에 따라 과도한 superoxide 즉 반응성 산소종을 발생시키며 ferritin과 같은 저장 단백질 (storage protein)에 의해 매우 낮은 농도로 유지되고 있던 free metal ions의 증가 (Gower et al., 1989)는 fenton reaction을 통해 hydroxyl radical과 같은 반응성 산소종을 증가 (Fuller et al., 1987; Ashwood-Smith et al., 1988; Tarin & Trounson, 1993)시키게 된다. 반면

미토콘드리아 전자전달체계의 혼란 (Fuller et al., 1988)과 저하된 효소 방어기전 (Green et al., 1986)은 발생된 반응성 산소종을 제거하지 못함으로써 세포막의 지질, 단백질, 핵산과 자동적인 연쇄반응에 의해 2차 반응기를 발생시키며 세포의 기능과 세포막의 선택적 투과성 등에 손상을 준다 (Morgan et al., 1976; Kappus, 1985; Fuller et al., 1987; Aitken & Clarkson, 1988; Aitken et al., 1989; Halliwell & Aruoma, 1991; Halliwell & Chirico, 1993). 또한 배아에서는 규명은 되고 있지 않지만 체세포에서 낮은 농도의 반응성 산소종이라고 해도 막성 수용기에 반응하여 *c-jun* (Devary et al., 1991; Manome et al., 1993), *c-fos* (Manome et al., 1993), *mip-1* (Keyse & Emslie, 1992), *egr-1* (Datta et al., 1992)과 같은 전사 요소에 의한 유전자의 발현과 NF- κ B의 DNA 결합 활동 (binding activity)을 조절 (Schreck et al., 1991)함으로써 DNA 분절화와 caspase 활성화가 유발된다고 알려져 있다 (Turner et al., 1998). 최근에 이러한 세포자연사과정에서 미토콘드리아의 역할은 매우 중요하며 (Kluck et al., 1997; Morita & Tilly, 1999), 세포자연사는 미토콘드리아의 내외막의 소공 (permeability transition pore)의 개방으로 인해 전자전달계에 관여하는 cytochrome c의 세포질 내로의 유리에 따른 caspase family의 활성화에 의해 유도된다고 보고되고 있다 (Adams & Cory, 1998; Green & Reed, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998). 반응성 산소종과 유리 Ca^{2+} 은 세포막의 인지질의 일종인 sphingomyelin을 가수분해하여 ceramide를 형성할 뿐만 아니라 (Goldkorn et al., 1998), 직접적으로 미토콘드리아의 소공을 개방하여 cytochrome c와 apoptosis inducing factor (AIF)를 방출하여 caspase-3과 caspase-9를 활성화 시켜 세포자연사를 유발하며, 삼투압 불균형에 의한 세포의 팽창을 초래하여 반응성 산소종의 생성을 가속화시키고, ATP의 생성과 막전위차를 감소시켜 세포막의 파열과 괴사 혹은 세포자연사를 유발하는 것으로 기전이 설명되고 있다 (Green & Reed, 1998).

세포의 미토콘드리아 내막에서는 에너지 생산을 위한 산화작용 과정에서 전자전달체계에 의해 막전위차 (Ψ_m)가 형성되어 내부가 180~200 mV의 음전하를 띄게 되며 양자의 농도구배 차이 (ΔpH)가 약 1 unit에 이르게 된다 (Chance, 1977). 이러한 막전위차의 형성은 방향족 양이온인 rhodamine 123 (Evenson et al., 1982; Emaus et al., 1986)과 lipophilic cation 혼합물인 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1) 등을 미토콘드리아의 기질내로 선택적으로 이동하게 함으로써 측정할 수 있다. 이중 rhodamine 123은 488nm의 파장에서 여기시키고 515~575nm의 파장으

로 발산되나 JC-1은 자극과 파장의 최대 방출범위가 510~520nm이며, 약 140mV 이상으로 막전위차가 증가되면 적색 파장의 590nm를 발산하는 JC-1 응집체를 형성한다 (Cossarizza et al., 1996; Smiley et al., 1991). JC-1은 막전위차의 차이에 따라 발생하는 파장이 다르므로 인해 정량적 분석이 가능할 뿐 아니라 미토콘드리아에 선택적으로 들어감으로써 배후 염색이 없다는 장점이 있다 (Smiley et al., 1991). 최근 세포자연사 뿐 아니라 괴사하는 세포에서도 이러한 막전위차의 소실을 관찰할 수 있으며 가역적이라고 보고되고 있다.

포유류 배아에서의 미세구조의 변화 (Ng et al., 1988)와 반응성 산소종의 과잉 발생 (Nasr-Esfahani et al., 1990; Noda et al., 1991)은 배아의 발생을 저하시키고 분절화를 촉진하며, 세포자연사 (Jurisicova et al., 1996; Yang et al., 1998)를 유발한다고 보고되고 있다. 배아 세포질의 분절화 현상은 기존에 알려진 세포자연사가 일어나는 세포의 형태학적 특징과 비슷한 양상을 보여준다 (Jurisicova et al., 1996; Yang et al., 1998). 즉, 세포막의 투과성 상실로 인한 세포의 팽창과 과열로 이어지는 세포 괴사 과정과는 다르게 세포질이 수축하면서 여러 조각으로 나누어지고, 염색질이 응축되어 apoptotic body라고 하는 작게 응축된 핵의 형태를 보여준다. 또한 세포자연사가 진행중인 세포의 가장 큰 특징 중에 하나는 DNA가 규칙적으로 핵산 단위의 DNA로 특이적으로 절단됨으로써 185~200 bp 크기의 다중체 절편을 형성한다는 것이다. 이러한 DNA 분절화는 apoptotic body와 핵의 응축과 같은 세포자연사의 형태학적 특징에 선행하여 나타나는 현상으로 인식되고 있다.

현재 세포동결을 위해 사용되는 컴퓨터 세포동결기는 분당 약 50회로 분사되는 액체질소의 가스 분압에 의해 예정 온도까지의 동결속도를 조절하는 방법을 채택하고 있다. 그러나 비연속적인 액체질소의 분사는 결빙 시에 발열반응으로 인해 미세한 온도 상승을 유발하게 되며 이로 인해 세포내/외의 이미 형성된 미세 얼음 입자를 얼음 결정체로 변형시킬 수 있다. 얼음 결정체가 형성되면 세포막과 세포내의 미세구조 및 세포 소기관에 손상을 주게 된다 (Grout, 1991; Scott et al., 1993). 그러나 액체질소의 분사속도를 증가시키면 결빙 시에 발열반응에 의한 온도변화를 상쇄시킬 수 있어 얼음 결정체의 형성에 의한 세포손상을 방지할 수 있을 것으로 기대된다고 하겠다.

본 연구는 2 세포기 생쥐배아를 대상으로 비동결 군과 저속 (50 infusion/min) 및 고속 (120 infusion/min) 액체 질소 분사 방법에 의해 동결하고 해빙한 군에서 생존율과 형태적으로 건강한 배아의 포배배아 발달을 및 할구수, H₂O₂ 상대적

농도, 활성 미토콘드리아의 분포, 미토콘드리아의 막전위차, F-actin filament의 형태적 변화, DNA 분절을 등을 비교하였다. 저속 액체질소 분사 군에서는 비동결 군 및 고속 액체질소 분사 군에 비해 F-actin filament가 부분적인 결손과 응집된 양상을 보였고 미토콘드리아의 막전위차의 전반적인 감소와 H₂O₂의 상승이 관찰되었다. 또한 저속 액체질소 분사 군에서 배아의 생존율과 포배기 배아의 발생율, 할구수 등이 현저히 저하되었고 높은 DNA 분절율을 보였으나 고속 액체질소 분사 군에서는 현저하게 개선되어 비동결 군과 차이가 없었다.

본 연구의 결과를 고려할 때 결빙 및 탈수과정에서 비연속적인 액체질소의 분사로 인한 미세한 온도의 변화 (Scott et al., 1993)는 세포내/외의 이미 형성된 미세 얼음 입자를 얼음 결정체로 변형시켜 해빙시 생존율에 영향을 주며 생존한 배아라 할지라도 세포골격을 구성하는 미세소관의 손상을 유발 (Sathanathan et al., 1987; Ng et al., 1988; Vincent et al., 1989; Körber et al., 1991)하여 효소체계의 혼란과 단백질 합성장애를 초래한다 (Brinkley & Cartwright, 1975; Burdon, 1987). 또한 얼음 결정체 형성은 미토콘드리아 막을 손상시키며 세포질내 얼음 결정체 형성이 증가함에 따라 미토콘드리아의 내막에 결합하고 있던 효소들의 유리가 증가되어 효소의 활성이 저하되게 된다 (Hamm & Gottesmann, 1985). 한편 냉각과정에서 "runaway 현상"에 의해 선택적 투과성 장애가 유발되고 이로 인해 세포 및 미세소기관의 팽창이 초래 (Leaf et al., 1973)되나 이러한 미세소기관의 팽창은 결빙 및 탈수과정에서 더욱 심각하게 진행된다 (Trusal et al., 1984). 이러한 세포 팽창의 결과 유리 Ca²⁺과 반응성 산소종이 세포질내에 증가됨으로써 미토콘드리아 내외막의 소공의 개방을 초래하여 반응성 산소종의 발생을 더욱 증가시키고 막전위차를 감소시킨다. 그 결과 미토콘드리아 내부의 cytochrome c와 AIF가 유리되고 이들에 의해 caspase 족의 효소가 활성화됨으로써 세포자연사가 유발된다 (Green & Reed, 1998)고 설명할 수 있겠다. 그러나 고속으로 액체질소를 분사할 경우에는 결빙시의 방출되는 열을 효과적으로 상쇄시킬 수 있어 더욱 일정하고 온도변화가 없는 결빙곡선을 유지하게 되며 세포질내의 얼음 결정체를 방지함으로써 세포질내의 actin filament와 미토콘드리아의 손상을 감소시켜 배 발생을 호전시키는 것으로 추정된다.

그러나 본 실험에서 실시한 TUNEL 방법은 세포자연사 뿐만 아니라 세포괴사에서 나타남으로써 세포자연사에 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 Ca²⁺,

및 cytochrome c의 동향과 미토콘드리아의 소공의 변화에 의한 팽창 등의 형태적 관찰이 향후 진행되어야 한다고 사료된다. 결론적으로 동결시 액체질소의 분사속도는 해빙 후 배아 발달에 매우 중요한 요인으로 작용하며, 분사속도를 증가시키는 것이 동결시 일어나는 세포내 골격구조와 미토콘드리아의 상해를 줄여 줌으로써 DNA 분절화를 감소시키는 것으로 사료된다.

인용문헌

- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9: 367-376.
- Aitken RJ (1989) The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int J Androl* 12: 95-97.
- Ashwood-Smith MJ, Morris GJ, Fowler R, Appleton TC, Ashorn R (1988) Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 3: 795-802.
- Aust S, Morehouse L, Thomas C (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radicals Biol Med* 1: 3-25.
- Boutron P (1984) More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21: 183-191.
- Boutron P (1987) Non-equilibrium formation of ice in aqueous solutions; efficiency of polyalcohol solutions for vitrification. In: Pegg, D, E., Karow, A.M.(ed.), *Biophysics of Organ Cryopreservation*. Plenum Press, Inc., New York, pp 201.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani A (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 156: 435-444.
- Brinkley B, Cartwright J (1975) Cold labile and cold stable microtubules in the mitotic spindle of mammalian cells. *Ann NY Acad Sci* 253: 428-439.
- Buhl M, Jorgensen S (1975) Breakdown of 5' adenine nucleotides in ischaemic renal cortex estimated by oxypurine excretion during perfusion. *Scand J Clin Lab Invest* 35: 211-217.
- Bulkley GB (1987) Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer* 55: 66-73.
- Bygrave F (1978) Mitochondria and the control of intracellular calcium. *Biol Rev* 53: 43-79.
- Chance B (1977) Electron transfer: pathways, mechanisms, and controls. *Annu Rev Biochem* 46: 967-980.
- Chance B, Nakase Y, Itshak F (1979) Membrane energization at sub-zero temperatures: calcium uptake and oxonol-V responses. *Arch Biochem Biophys* 198: 360-369.
- Clegg JS (1984) Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries. *Am J Physiol* 246: 133-151.
- Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A (1996) Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Exp Cell Res* 222: 84-94.
- Cotterill LA, Gower JD, Fuller BJ, Green CJ (1989) Oxidative stress during cold ischaemia. Evidence of a role for calcium. *Transplantation* 48: 745-751.
- Datta R, Rubin E, Sukhatme V, Qureshi S, Hallahan D, Weichselbaum RR, Kufe DW (1992) Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CAR elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10149-10153.
- Devary Y, Gottlieb RA, Lau LF, Karin M (1991) Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol* 11: 2804-2811.
- Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850: 436-448.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Malamed MR (1982) Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 30: 279-280.
- Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U (1991) Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. *Hum Reprod* 6: 735-736.
- Feltkamp CA, van der Waerden AW (1982) Low temperature-induced displacement of cholesterol and intra-membrane particles in nuclear membranes of mouse leukemic cells. *Cell Biol Int Rep* 6: 137-145.
- Fuller BJ, Lunec J, Healing G, Simpkin S, Green CJ (1987) Reduction of susceptibility to lipid peroxidation by desferri-

- xamine in rabbit kidneys subjected to 24-hour cold ischaemic and reperfusion. *Transplantation* 43: 604-606.
- Fuller BJ, Busza AL, Proctor E, Myles M, Gadian DG, Hobbs KEF (1988) Control of pH during hypothermic liver storage: role of the storage solution. *Transplantation* 45: 239-241.
- Fuller BJ, Gower J, Green CJ (1988) Free radical damage and organ preservation: fact or fiction? A review of the interrelationship between oxidative stress and physiological ion disbalance. *Cryobiology* 25: 377-393.
- Fuller BJ, Busza AL, Procto E (1990) Possible resuscitation of liver function by reperfusion *in vitro* after prolonged (24 hours) cold preservation: a ³¹P NMR study. *Transplantation* 50: 511-513.
- Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchrist D, Wang H, Chan C (1998) H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 111: 3209-3220.
- Gower J, Cotterill L, Fuller BJ, Green CJ (1989) Oxidative damage to kidney membranes during cold ischaemia: evidence of a role for calcium. *Transplantation* 45: 745-751.
- Green CJ, Healing G, Simpkin S, Fuller BJ, Lunec J (1986) Reduced susceptibility to lipid peroxidation in cold ischemic rabbit kidneys after addition of desferrioxamine, mannitol, or uric acid to the flush solution. *Cryobiology* 23: 358-365.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Grout BWW (1991) The effects of ice formation during cryopreservation of clinical systems. In: Fuller, B.J., Grout, B.W.W.(ed.), *Clinical Applications of Cryobiology*. CRC Press, Inc., Florida, pp 81-88.
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281: 9-19.
- Hallivell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57: 715S-725S.
- Hamm R, Gottesmann P (1985) Lipoamide dehydrogenase, citrate synthase and beta-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase in skeletal muscle. VIII. The influence of temperature and rate of freezing of bovine muscle on the activity and subcellular distribution of the enzymes in the thawed tissue. *Z Lebensm Unters Forsch* 181: 210-216.
- Hesketh KR, Smith GA, Houslay MD, McGill KA, Birdsall NJ, Metcalfe J, Wunen G (1976) Annular lipids determine the ATP-ase activity of calcium transport protein complexed with dipalmitoyl-lecithin. *Biochemistry* 15: 4145-4151.
- Juriscova A, Varnuza S, Casper RF (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2: 93-98.
- Kachar B, Serrano JA, da Silva PP (1980) Particle displacement in epithelial cell membranes of rat prostate and pancreas induced by routine low temperature fixation. *Cell Biol Int Rep* 4: 347-356.
- Kappus H (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis enzymology and biological relevance. In: Kappus, H., Sies, H.(ed.), *Oxidative Stress*. Academic Press, Inc., London, pp 273.
- Karlsson JO, Cravalho EG, Borel Rinkes I.H, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M (1993) Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biophys J* 65: 2524-2536.
- Keyse SE, Emslie EA (1992) Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein tyrosin phosphatase. *Nature* 359: 644-647.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136.
- Körber C, Englich S, Rau G (1991) Intracellular ice formation: cryomicroscopical observation and calorimetric measurement. *Journal of Microscopy* 161: 313-325.
- Leaf A (1973) Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation* 48: 455-458.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC (1974) Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 89: 79-88.
- MacFarlane DR, Forsyth M (1987) Devitrification and recrystallisation of glass from aqueous solution. In: Pegg, D.G., Karow, A.M.(ed.), *The Biophysics of Organ Cryopreservation*. Plenum Press, Inc., New York, pp 237.
- Maessen J, Van der Vusse G, Vork M, Koosra G (1989) The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischaemically-injured kidneys.

- Transplantation 47: 409-414.
- Manome Y, Datta R, Taneja N, Shafman T, Shaman T, Bump E, Hass R, Weichselbaum R, Kufe D (1993) Coinduction of c-jun gene expression and internucleosomal DNA fragmentation by ionizing radiation. *Biochemistry* 32: 10607-10613.
- Mayer JF, Lanzendorf SE (1986) Cryopreservation of gametes and pre-embryos. In: Jones, H.W., Jones, Jr. G.S., Hodgen, G.D., Rosenwaks, Z.(ed.), *In Vitro* Fertilization-Norfolk. Waverly Press, Inc., Virginia, pp 260-267.
- Mazur P (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
- Mazur P (1990) Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 17: 53-92.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D (1992) Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 58: 977-980.
- Morgan A, Cone R, Elgert T (1976) The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase. *Nucleic Acid Res* 3: 1139-1149.
- Morita Y, Tilly JL (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 213: 1-17.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH (1990) Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* and *in vivo*. *Development* 109: 501-507.
- Ng SC, Sathananthan AH, Wong PC, Ratnam SS, Ho J, Mok H, Lee MN (1988) Fine structure of early human embryos frozen with 1,2 propanediol. *Gamete Research* 19: 253-263.
- Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T (1991) Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 28: 356-360.
- Pickering S, Johnson M (1987) The influence of cooling on the organisation of meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 2: 207-216.
- Porter K, Anderson K (1980) Structural responses of the microtrabecular lattice to changes in temperature and concentrations of divalent cations and cytochalasin. *Eur J Cell Biol* 22 351.
- Rall WF, Reid DS, Farrant J (1980) Innocuous biological freezing during warming. *Nature* 286: 511-514.
- Rall WF, Mazur P, Mcgrath JJ (1983) Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophys J* 41: 1-12.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L (1987) Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Research* 16: 343-354.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L, Brady T (1988) The effect of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 3: 968-977.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258.
- Scott LF, Sundaram SG, Smith S (1993) The use of a liquid-phase controlled rate freezing system for the successful cryopreservation of mouse pre-embryos. *Fertil Steril* 60: 351-358.
- Shaw JM, Ward C, Trounson AO (1995) Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum Reprod* 10: 396-402.
- Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D (1998) The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Hum Reprod* 13: 676-681.
- Sinensky M, Pinkerton F, Sutherland E, Simon F (1979) Rate limitation of (Na^+-K^+) -stimulated ATP-ase by membrane acyl chain ordering. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 76: 4893-4897.
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 88: 3671-3675.
- Takahashi T (1982) On the role of cubic structure in ice nucleation. *J Cryst Growth* 59: 441.
- Tarin JJ, Trounson AO (1993) Effects of Stimulation or Inhibition of Lipid Peroxidation on Freezing-Thawing of Mouse Embryos. *Biol Reprod* 49: 1362-1368.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- Trusal LR, Guzman AW, Baker CJ (1984) Characterization of freeze-thaw induced ultrastructural damage to endothelial

- cells *in vitro*. *In Vitro* 20: 353-364.
- Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY (1998) Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1789-1801.
- Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, Jones HW (1993) Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 59: 1202-1207.
- Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP (1989) Solvent effects on cytoskeletal organization and *in vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fert* 87: 809-820.
- Warnick CT, Lazarus H (1977) Adenine nucleotides during organ storage. *Transplant Proc* 9: 1575-1577.
- Whittingham DG, Wood M (1984) Bibliography in low temperature storage of mammalian embryos. *Biol Reprod* 43: A1-A12.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13: 998-1002.