

남자 및 배아동결에 슬러시질소를 이용한 유리화동결의 영향

차의과학대학교 차병원 여성의학연구소

이 동 루 · 윤 태 기*

Effect of Slush-nitrogen on the Cryopreservation of Oocytes and Embryos using Vitrification

Dong Ryul Lee, Tae Ki Yoon*

Fertility Center of CHA General Hospital, CHA University College of Medicine

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(1): 1-7.]

서론: 남자와 배아동결의 필요성

세포나 조직, 개체 등과 같은 생물학적 재료를 형태와 기능적인 변화가 일어나지 않은 상태로 저온에서 장기간 보관하고, 원래 상태의 기능을 회복하도록 해동하는 과정을 동결보존 (cryopreservation) 이라 한다.¹ 이러한 동결보존은 인류의 생활과 매우 밀접한 관련을 맺고 발전해 왔고, 특히 최근 들어 눈부시게 발전하는 생식생물학 (reproductive biology) 과 인간과 동물의 보조생식술 (assisted reproductive technology, ART) 분야에 접목되어 그 중요성이 점점 커지고 있다.

생식생물학 분야에서 동결보존을 필요로 하는 재료는 매우 다양하나, 주로 정자와 난자, 배아 등이 이용되고 있다. 정자의 경우에는 약간 예외가 되지만, 인간을 포함한 포유류의 난자와 배아는 그 수가 매우 적고 발생학적 중요성 때문에 그 어떤 세포보다도 동결보존의 필요성이 높다. 인간배아의

경우에는 배란약제와 보조생식술의 발전으로 잉여 배아의 생산이 증가하게 되고, 따라서 그 필요성이 더더욱 증가하였다. 초기에는 체외배양기술의 부족으로 주로 전핵시기 또는 2-8-세포기 배아를 주로 이용하여 동결보존하였으나, 최근에는 포배기 배아로의 체외발생이 용이해져 점점 동결시기가 이동하는 경향을 보이고 있다. 이러한 배아동결의 발전은 시험관아기기술 과정에서 생산되는 잉여배아를 보관하여 임신시도를 위한 과배란유도 횟수를 줄일 수 있을 뿐 만 아니라 이식되는 배아의 수를 줄여 다태아출산의 방지를 통해 산모와 아기의 건강에 기여할 수 있다.

남자는 자연계에 존재하는 가장 크기가 큰 세포이며, 세포 내에 수분의 함량이 매우 높아 동결보존 시 생존에 가장 해로운 역할을 하는 얼음결정의 형성을 피하기 어렵기 때문에 다른 어떤 세포에 비해서도 동결보존에 어려움을 가지고 있다. 또한 성숙난자의 경우 그들의 염색체나 유사분열기구 (meiotic spindle)가 세포질 내에 직접 노출되어 있어 동결/해동과정 중 손상의 위험성이 높다. 이러한 문제점은 남자동결의 가장 큰 제한점으로 작용하고 있으며, 최근까지 임상에 적용하기 어려운 기

주관책임자: 윤태기, 우) 135-907 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 차의과학대학교 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3403, Fax: (02) 3468-2610
e-mail: tkyoon@cha.ac.kr

술로 여겨지게 했다.^{2~5} 따라서 난자의 동결보존은 그 어떤 세포에 비해서도 기술적인 어려움을 가지고 있으나, 반면 여성의 생식력을 보전하는 데에 있어서는 최고의 가치를 가지고 있다. 예를 들면, 첫째, 최근과 같이 여성의 사회활동의 증가로 인한 만혼과 출산연령의 증가는 임신가능성이 높은 젊고 건강한 난자의 확보를 어렵게 해 임신의 기회를 줄어든다고 하고 있다. 이러한 경우 생식적으로 젊은 시기에 실시하는 난자의 동결보존은 여성들에게 임신과 출산의 기회를 연장할 수 있다. 둘째, 난자의 동결과정은 배아보다는 윤리적 또는 법적인 제약을 덜 받을 수 있다. 실제로 일부 서구 국가에서는 배아동결이 법적으로 금지되어 있고, 오직 난자의 동결만이 가능하다. 셋째, 난자동결은 난자공여프로그램에서 난자공여자와 수혜자간의 생식주기의 불일치를 맞출 수 있는 장점을 가지고 있을 뿐 만 아니라, 공여과정에서 일어날지도 모르는 유전 또는 감염에 의한 질병의 전달을 피할 수 있는 시간적인 여유를 가질 수 있게 한다. 마지막으로 난자동결은 항암치료나 난소절제술을 받는 환자에게 생식력을 보전할 수 있는 기회를 제공할 수 있다.¹ 이상과 같은 이유들은 수많은 연구자들에게 난자동결의 발전을 위한 연구동기를 부여하고 있다.

배아동결과 난자동결에서 완만동결-급속동결의 장점과 단점

일반적인 체세포에 비해 수분의 함량이 높은 배아와 난자의 동결보존을 위해 연구자들은 우선적으로 일반적인 완만동결-급속해동법 (slow cooling-rapid thawing)을 도입하여 사용하였다. 완만동결을 위해서는 우선 세포질 내 수분의 일부와 투과 동결억제제 (permeable cryoprotectant)를 치환하여 평형시킨다. 이후 세포 동결기에 넣어 세포외부의 수분을 천천히 동결시키는 과정을 통해 세포외부의 동결억제제의 농도를 올려 삼투압을 발생시키고, 이 힘을 이용하여 세포 내에 남아있는 물을 천천히 제거함으로써 최소한의 수분만을 남겨 얼음결정의 생성

을 최소화시키는 기술이다. 완만동결은 비교적 그 기술이 단순하여 손쉽게 사용 가능한 장점을 가지고 있으나, 상대적으로 고가의 장비와 많은 액체질소의 사용량, 많은 시간의 소요, 얼음결정에 의한 동결상해 (cryoinjury)와 같은 단점을 가지고 있다.

1970년대 Whittingham 등 (1977)에 의해 생쥐배아에서 완만동결법의 도입과 산자의 생산이 가능하였고,⁶ 곧 인간배아에서도 임신과 출산을 획득할 수 있었다.⁷ 이 기술은 전세계 불임치료센터로 전파되어 시험관아기기술 (in vitro Fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 후 잉여배아의 동결보존에 많은 기여를 하였다. 완만동결법은 배아뿐 만 아니라 난자의 동결에도 도입되어 인간에서도 산자의 획득에 성공하였다.⁸ 하지만 배아와는 달리 완만동결을 이용한 난자동결과정에서 유발되는 몇 가지 부작용 [1. 난자 내 과립체 (cortical granule)의 조기 방출에 의한 투명대경화 (zona pellucida hardening)⁹ 2. 조기 난활성화 (parthenogenesis)^{10,11} 3. 세포 내 소골격계 (cytoskeletal structure)의 손상^{12~14} 4. 염색체 감수분열기구 (meiotic spindle)의 손상^{15,16}] 등에 의해 임상적 효율이 매우 저조하였고, 따라서 이 방법은 난자동결에 널리 이용되지 못하였다.

1990년대 중반에 들어서면서 몇몇 연구자들은 완만동결 시에 일어나는 동결상해의 원인을 분석하고 해결방법을 고안하였다. 세포질 내 수분의 신속한 이동을 위해 보다 투과율이 높은 동결억제제가 선택되었고, 동결/해동 시 세포 내 독성을 감소시키는 동결배양액의 개발, 얼음결정시기의 조절, 투명대 경화를 극복하기 위한 난자세포질 내 정자주입술이 도입되었다 (Porcu et al., 1997).^{17~22} 실제로 이러한 기술들은 완만동결을 이용한 난자동결의 효율을 배아동결의 수준으로 끌어 올려 많은 불임치료센터에서 사용하게 되었다.

유리화동결의 장단점과 슬러시질소의 이용

유리화동결은 초저온으로 동결하는 과정을 통해 세포 내에 존재하는 수분을 액체상태에서 얼음결

정인 고체상태로 보내지 않고 점도를 끌어올려 유리가 녹은 상태와 유사한 상태로 유지하게 하는 기술이다.²³ 세포 내 수분을 이러한 유리화상태로 보내기 위해서는 고농도의 투과성 동결억제제에 의한 세포질 내 평형과 초급속냉각속도 ($-3,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. 이상)가 필요하다. 유리화동결을 도입할 경우 동결보존되는 세포 내 수분은 얼음결정을 형성하지 않아 기계적인 상해를 일으키지 않는 장점을 가지고 있다. 이 방법은 동결을 위한 소요시간이 매우 짧고, 별다른 장비가 필요하지 않다는 또 다른 장점을 가지고 있다. 하지만 이 방법이 가진 무엇보다도 가장 큰 단점은 전술한 바와 같이 세포질 내 평형을 위해 처리하는 고농도의 동결억제제의 독성이다. 또한 초급속냉각속도의 획득을 위해서는 일반적으로 동결매개체 (cryo-vehicle)에 부착하여 액체질소에 직접 노출하게 되므로, 이때의 기계적인 충격이나 오염의 위험이 존재한다. 그리고, 완만 동결에 비해서는 상당히 숙련된 인력이 필요하며, 실제적으로 작업자의 숙련도에 의해 그 효율의 차이가 많다는 단점을 가지고 있다.

전술한 바와 같이 유리화동결법은 여러 가지 장점에도 불구하고 고농도의 동결억제제에 의한 독성문제 때문에 이용에 제한을 받았다. 하지만 1980년대 들어 세포동결억제제의 종류와 처리시간을 조절하여 세포독성을 줄일 수 있는 방법이 개발되고, 이를 이용해 배아와 난자의 동결의 성공이 다수 보고되고 있다.^{24,25} 이들의 연구에 따르면 배아나 난자와 같이 상대적으로 크고 수분함량이 높은 세포의 유리화동결을 위해서는 일반적인 체세포에 비해 고농도의 동결억제제의 노출시간을 줄이거나 냉각속도를 올리는 것이 필수적이다. 따라서 연구자들은 첫째, 투과율이 높고 독성이 적은 동결억제제를 도입하거나 투과성과 비투과성 동결억제제를 조합하여 상대적 농도의 변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 전략을 통해 세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화동결/융해 후 효율을 증진시키고 있다.^{26,27} 둘째, 냉각속도를 올리기 위해 유리화동결하는 세포와 동결억제제의 부피를 줄일 수 있는 여러

가지 동결매개체를 개발하였다. 최근에 널리 사용되고 있는 동결매개체로는 open pulled straw (OPS), electron microscopy (EM) grid, cryoloop, cryotop 등이 있으며,²⁸⁻³⁰ 대부분의 연구자들은 직접 제작해서 사용하거나 상용화된 제품을 구입하여 사용하고 있다. 셋째로 냉각속도의 극대화를 위해서 최근에는 슬러시질소의 사용이 소개된 바 있다. 유리화동결을 위해서 샘플을 액체질소에 직접 노출시키게 되면 그들의 표면에서 액체질소는 끓게 되고 기포를 형성하게 된다. 이때 형성된 기포는 액체질소로부터 동결매개체를 통한 열전달을 방해하게 되어 높은 냉각속도를 얻는데 방해요인으로 작용한다. 액체질소에 강력한 음압을 걸어주게 되면 곧 액체와 고체의 중간상태인 슬러시 상태의 질소 (slush-nitrogen)로 바뀌게 되고, 이때의 질소의 내부온도는 일반 액체질소와 달리 -210°C 에 이르게 된다 (Figure 1).³¹ 더욱이 슬러시질소는 샘플을 노출시켰을 때 기포를 형성하지 않아 보다 높은 냉각속도를 얻을 수 있고, 기계적인 충격을 줄일 수 있는 장점이 있다.

슬러시질소를 이용한 난자동결

유리화동결에서 냉각속도의 증가가 배아와 난자의 융해 후 효율을 증진시킨다는 결과는 여러 연구자들의 결과에 의해 보고된 바 있다. 실제로 Vajta는 conventional straw에 비해 OPS를 사용하였을 때 유리화동결/융해 후 생존율이 높았음을 보고한 바 있고,³² 이러한 결과는 동결상해가 많이 일어나는 초파리 배아나 소 난자에서도 확인된 바 있다.^{31,33} 따라서 본 연구진은 이러한 슬러시질소를 이용하여 냉각속도를 올렸을 때 유리화동결을 이용한 인간난자 동결프로그램의 효율을 비교하였다. 본 연구에서는 인간난자를 위한 동결매개체로 gold grid를 사용하였다. 총 30례의 인간 난자의 동결프로그램에서 본 연구진이 슬러시질소를 사용하여 냉각속도를 증진시켰을 때, 83.0% (302/364)의 난자가 생존하였으며, 그 중 218개의 난자에 세포질 내

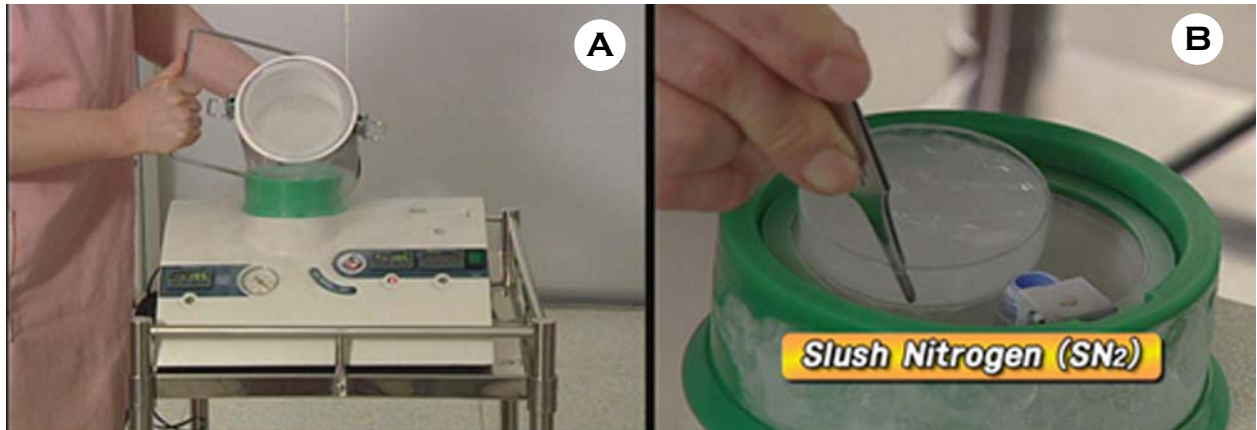


Figure 1. Production of slush nitrogen (SN₂). **A;** Three-quarters of the chamber of Vit-Master™ (slush-maker) was filled with liquid nitrogen (LN₂) and then vacuum pump was switched on. **B;** LN₂ in chamber was transformed into SN₂.

Dong Ryul Lee. Vitrification using Slush-nitrogen. Korean J Reprod Med 2009.

정자주입술을 시행한 결과 77.1% (168/218)가 수정되었다. 정상적인 배아발생을 보인 120개의 배아를 30주기에 이식한 결과 13주기에서 임상적 임신(43.3%)이 성공되었으며, 14.2% (17/120)의 착상율을 얻었다. 이상의 결과는 액체질소를 이용한 본 그룹의 이전 보고에서의 생존율과 임신율, 착상율(68.6% (325/474), 21.4% (6/28), 6.4% (8/125))에 비해 괄목할 만큼의 발전을 보였다.^{34,35} 그리고 이 환자들을 대상으로 한 분석연구에서 여러 가지 이유로 신선주기에 이식을 못하고 바로 난자동결주기를 시행한 환자의 임신율은 66.7% (8/12)로 동결이전 신선주기에 임신에 실패한 군의 27.8% (5/18)에 비해 매우 높았다. 이 결과는 슬러시질소를 이용한 유리화동결을 통해 동결보존된 난자의 질이 신선주기에 동결을 하지 않은 난자에 비해서도 뒤떨어지지 않을 정도로 우수함을 보여준다. 또한 슬러시질소에 의한 냉각속도의 증가는 난자와 함께 유리화동결/융해된 난구세포의 높은 생존율과 낮은 세포자멸사를 유도하였다.¹ 이러한 결과는 슬러시질소를 이용한 유리화동결이 일반 체세포의 동결보존에도 적용될 수 있음을 의미하고 있다.

슬러시질소를 이용한 배아동결

배아의 유리화동결에 슬러시질소의 효용성에 관한 연구는 난자에 비해 다소 논란이 있다. Nowshari와 Brem (2001)은 슬러시질소에 의한 냉각속도의 증가가 생쥐수정란의 동결보존에 별다른 영향을 주지 않는다고 보고한 반면,³⁶ 난자와 배아의 생존률을 증진시킨다는 보고도 있다.^{30,35,37} 이러한 논란은 슬러시질소에 의한 냉각속도의 증가가 세포질 내 수분의 함유량이 적은 배아보다는 수분의 함유량이 많은 난자의 유리화동결에 영향을 많이 미치는 것으로 여겨져, 세포의 크기나 그 발생상태에 따라 효과에 차이가 있을 것으로 생각된다. 실제로 본 연구진은 일반 생쥐배아를 대상으로 한 연구에서 슬러시질소를 이용한 유리화동결의 장점은 관찰하지 못했다. 그리고 투명대가 절개되거나 할구 중 일부가 생검되거나 퇴화된 배아의 동결보존을 위해 액체질소를 이용한 유리화동결을 도입하였을 때 융해 후 생존율은 매우 저조하였다. 하지만 이러한 배아를 대상으로 슬러시질소를 이용하여 유리화동결을 도입하였을 때의 생존율은 정상배아의 생존율에 거의 육박한다는 결과를 얻었다. 또한 정상 8-세포기 배아를 4개의 할구를 가진 두 개의 배아로 만들어 액체질소와 슬러시질소를 이용한 유

리화동결의 직접적인 효율비교에서 생존율과 배아 발생이 슬러시질소-유리화동결을 사용했을 때가 보다 높다는 결과를 얻었다.³⁸ 이상의 결과는 슬러시질소에 의한 냉각속도의 증가가 동결보존의 대상이 되는 샘플에 정도의 차이는 있으나, 절대적으로 동결상해를 줄여줘 유리화동결의 효율성을 증진시키는 것으로 생각된다. 따라서, 슬러시질소를 이용한 유리화동결의 도입은 항상 우수한 배아나 난자의 동결보존만을 고집할 수 없는 인간의 보조 생식술에서는 보다 효과적인 방법으로 사료된다.

액체질소증기 (Liquid nitrogen vapor)를 이용한 장기간보존법

유리화동결의 도입은 동결 시 세포 내의 얼음결정의 형성을 억제하고, 동결억제제와 저온에 장기간 노출을 막아 동결상해를 줄여주는 등 여러 가지 장점을 가지고 있다. 하지만 이러한 장점들에도 불구하고, 냉각속도의 증진을 위해 도입되는 동결매개체 (OPS, grid, cryoloop, 등등), 액체 (또는 슬러시) 질소와의 직접적인 접촉은 보관 중에 기계적인 상해와 액체질소를 매개로 하는 감염위험 등의 단점을 피할 수 없다.³⁹ 이러한 점들은 보조생식술 전반으로 유리화동결의 이용효율성을 감소시키고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 연구자들은 샘플을 밀폐된 동결매개체를 이용하여 유리화동결을 시도하였다.^{40~42} 하지만 밀폐된 동결매개체의 사용은 동결부피의 증가로 인한 냉각속도의 감소와 작업시간의 연장에 의한 고농도의 동결억제제에의 노출시간 증가와 같은 단점을 내포하고 있어 개선점이 필요하다.

본 연구진은 일반적으로 사용되는 액체질소보존 용기에 15~20%의 액체질소를 담아 나머지 부분은 액체질소증기로 채워지도록 하였다. Straw를 이용한 완만동결법 또는 OPS를 이용한 유리화동결로 동결한 생쥐배아를 이러한 액체질소 증기 내에서 6개월 이상 보관한 후 해동/융해하여 생존율을 분석하였다. 1주일, 1달, 그리고 6개월 이상 보관한

배아의 생존율이나 해동/융해된 배아의 발생율은 액체질소와 액체질소증기에서 동결보관 하였을 때 차이가 없었다. 해동/융해된 배아를 대리모에 이식하였을 때 착상율에도 어떠한 차이를 보이지 않았고, 건강한 산자의 생산이 가능했다.⁴³ 이러한 결과는 액체질소증기에서도 배아의 장기보관이 가능하며, 이러한 시스템의 도입은 유리화동결이 가지고 있는 보관의 단점을 극복하는데 일조를 할 것으로 여겨진다.

결 론

인간 난자와 배아의 성공적인 동결보존은 생식력보전의 중요한 수단으로 사용될 뿐만 아니라 생성 및 이식배아의 수 조절을 가능하게 해 윤리 또는 법적인 문제점을 해결하는데 많은 기여를 할 수 있다. 특히 슬러시질소를 이용한 유리화동결의 도입은 냉각속도의 증가를 통해 기존 유리화동결 방법의 효율을 증진시켜 생존율과 융해 후 발생율, 임신율 증진에 기여를 한다. 또한 냉각속도의 증진은 유리화동결의 필수조건인 동결억제제의 농도를 감소시켜 그 독성을 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 노력들은 여성 생식력의 보전을 위한 유리화동결법의 효율 향상에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Yoon TK, Lee DR, Cha KY. Vitrification of oocytes using gold grid and slush nitrogen. In: Tucker M, Liebermann J, editor. Vitrification in Assisted Reproduction: A User's Manual and Trouble-shooting Guide. London: Informa healthcare; 2007. p.145-51.
2. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH. Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. Hum Reprod 1991; 6: 142-3.
3. Gook DA, Schiewe MC, Osborn SM, Asch RH, Jansen RP, Johnston WI. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-

- propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10: 2637-41.
4. Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril* 1997; 68: 920-6.
 5. Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 449-56.
 6. Whittingham D. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *J Reprod Fertil* 1977; 49: 89-94.
 7. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
 8. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; i: 884-6.
 9. Moller CC, Wassarman PM. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 1989; 132: 103-12.
 10. Trounson A, Kirby C. Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril* 1989; 52: 778-86.
 11. 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* 1990; 89: 253-9.
 12. Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 1995; 53: 780-5.
 13. Hotamisligil S, toner M, Powers RD. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 1996; 55: 161-8.
 14. Le gal F, Massip A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology* 1999; 38: 290-300.
 15. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, 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.
 16. 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.
 17. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci II* 1972; 11: 1071-9.
 18. Leibo SP, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JC Jr. ed. *Methods in mammalian reproduction*. New York: Academic Press; 1978; p.179-201.
 19. Tucker M, Wright G, Morton P, Shanguo L, Massey J, Kort H. Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2-propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 1996; 11: 1513-5.
 20. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68: 724-6.
 21. Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod* 2002; 17: 3149-52.
 22. Boldt J, Cline D, McLaughlin D. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2003; 18: 1250-5.
 23. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1987; 24: 387-402.
 24. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
 25. Critser JK, Arneson BW, Aaker DW, Ball GD. Cryopreservation of hamster oocytes: effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 1986; 46: 277-84.
 26. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 479-83.
 27. Hotamisligil S, toner M, Powers RD. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 1996; 55: 161-8.
 28. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-69.
 29. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to

- reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.
30. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *CryoLetters* 2001; 22: 157-62.
 31. Steponkus PL, Caldwell S. An optimized procedure for the cryopreservation of *Drosophila Melanogaster* Embryos. *Cryo Letters* 1993; 14: 375-80.
 32. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.
 33. Khanna S, Lee DR, Parks JE. Effect of cooling rate on vitrification of immature bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 67 (suppl.1), 338.
 34. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, et al. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2003; 79: 1323-6.
 35. Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS, Cha KY. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2007; 88(4): 952-6.
 36. Nowshari MA, Brem G. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 2368-73.
 37. Huang CC, Lee TH, Chen SU, Chen HH, Cheng TC, Liu CH, et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod* 2005; 20: 122-8.
 38. Lee DR, Yang YH, Eum JH, Seo JS, Ko JJ, Chung HM, et al. Effect of using slush nitrogen (SN₂) on development of microsurgically manipulated vitrified/warmed mouse embryos. *Hum Reprod* 2007; 22: 2509-14.
 39. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral Contamination of Embryos Cryopreserved in Liquid Nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40: 110-6.
 40. Kuleshova LL, Shaw JM. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum Reprod* 2000; 15: 2604-9.
 41. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Zaeva V, Krivokharchenko I, Shafei R, et al. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum Reprod* 2005; 20: 492-6.
 42. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-8.
 43. Eum JH, Park JK, Lee WS, Cha KR, Yoon TK, Lee DR. Long-term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertil Steril* 2009 in press.