

햄스터 난자의 동결보존과 그의 임상적 이용에 관한 연구

경희대학교 의과대학 산부인과학교실(불임클리닉) · 건국대학교 축산학과*

김재명 · 서병희 · 이재현 · 유승환* · 정길생*

Cryopreservation of Hamster Oocytes and its Clinical Uses

Jae Myeoung Kim, M.S., Byung Hee Suh, M.D., Jae Hyun Lee, M.D.,
Seung Hwan Yu, M.S.* and Kil Sheng Chung, Ph.D.*

*Infertility Clinic, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,
Kyung Hee University, Seoul, Korea
Department of Animal Husbandary, Kon Kuk University, Seoul, Korea**

= Abstract =

These studies were carried for evaluation of the efficiency of freezing of hamster oocytes for use in a human sperm penetration assay. The hamster oocytes fully equilibrated in various cryoprotectant agents and inseminated with human sperm. After insemination with hamster oocytes, there was no difference in penetrated rates. Cumulus free oocytes equilibrated in 1.5M various cryoprotective agents and slowly cooled to temperature -30°C before rapid cooling and storage in nitrogen tank.

After rapid thawing, survival rates of frozen oocytes according to cryo-protective agents were examined and the human sperm penetration assay with zona free hamster oocytes was conducted.

1. Survival rates of oocytes after cryoprotectants exposure have no significant difference (range 88-91%) and penetration rate was 51.1%.
2. Recovery and survival rate of frozen-thawed oocytes were 85.1 and 66.8%. There was no significant difference on cryoprotective agents.
3. Penetration rates of the frozen-thawed and intact oocytes were 69.0 and 77.0%, respectively.
4. Hamster oocytes cryopreservation provides a convenient way of supplying and transporting hamster oocytes for the assessment of the fertilizing potential of human spermatozoa.

서 론

남성 불임진단방법으로 널리 이용되고 있는 투명대제거 햄스터난자와 인간정자의 이중간 체외수정에 의한 정자의 침투능 검사법(hamster penetration test)은 인공수정 및 체외수정 프로그램에 선행하여 실시할 수 있는 남성가임 능력의 검사법으로 널리 시행되고 있다(Yanagimachi and Rodgers, 1976; Roger, 1979;

Barros, 1979; Overstreet, 1980; Hall, 1981 and Wolf et al., 1983). 이들 검사방법의 증가, 다배란 처리시간, 햄스터 사육유지에 필요한 시설 및 경비를 줄이며, 실험동물 사육시설이 없는 소규모의 클리닉 및 검사에 필요한 수 이상의 잉여난자의 효율적인 이용을 위해 난자의 보존방법이 요구되고 있다.

난자의 동결보존 방법은 Whittingham 등(1972)이 생쥐의 수정란을 동결보존한 후 융해하여 위임신 생쥐에 이식하여 정상적인 산자를 생산한 이후 여러연구자들에 의해서 팔목할만한 성적을 거두었으며 최근에는 소의 동결수정란을

* 이 논문은 경희대학교 교수 연구비 보조로 이루어진 것임.

산업적으로 이용하고 있는 실정이다 (Walladsen et al., 1978). 난자의 동결보존에는 난자의 발달 단계 (Maurer and Haseman, 1976; Leibo, 1981; Rall and Polge, 1984; Trounson and Mohr, 1983; Wilmut, 1962) 그리고 항동해제의 종류와 제거방법등 (Kojima et al., 1985; Lassalle et al., 1974; Miyamoto and Ishibashi, 1981; Parkening et al., 1976; Renard et al., 1984) 여러 요인이 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

Whittingham등 (1972)과 Wilmut (1972)는 동해방지제로 DMSO나 glycerol을 사용할 경우 분당 0.2-0.8°C 비율로 완만동결과 분당 4-25°C의 비율로 완만융해가 생쥐 수정란의 생존성에 좋다고 하며, 여러 연구자들에 의해서 이와 유사한 방법에 의해서 쥐 (Whittingham et al., 1972), 토끼 (Renard et al., 1984), 양 (Willadsen, 1977), 소 (Leibo, 1984)의 난자를 성공적으로 동결보존하였으나 시간을 요하는 단점이 있다. Lassle등 (1985)은 인간난자의 동결보존에 있어서 전핵기와 2-4세포기에는 1, 2-propanediol이 좋으며, 4-16세포기의 동결에는 DMSO가 적합하다고 하였다. 宮本元和 石稿武등 (1976)은 생쥐배를 0.3°C의 비율로 -79°C까지 동결을 실시하였을 때 높은 생존율을 얻었고, Farrant (1977)과 Willadsen (1977)은 양의 난자를 분당 0.3°C씩 -33°C와 -36°C까지 냉각한 후 액체질소에 침지하였을 때 높은 생존율을, Quinn등 (1982)은 햄스터난자를 분당 0.3°C의 속도로 -40°C에서 액체질소에 침지하였을 때 75%의 생존율을 그리고 -80°C에서 침지하였을 때 80%의 생존율을 얻었다고 하며 인간정자의 침투율에 있어서는 두 군간에 유의성이 없었다고 하였고, Crister (1986)도 이와 유사한 성적을 보고하였다.

이에 저자들은 햄스터난자를 동결보존하여 남성의 가임능력검사에 일상적으로 사용하는 것을 목적으로 하여 동해방지제의 종류에 따른 햄스터난자의 생존성, 동결보존후 융해하였을 때 동해방지제의 종류에 따른 난자의 회수율과 생존율 및 인간정자에 의한 난자의 침투율을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 경희대학병원 실험동물실에서 사육하고 있는 8-12주령의 미경산 golden ham-

ster를 사용하였다. 사양관리는 N.R.C. 사양기준에 맞추어 배합된 사료를 자유급식시켰으며 사육실의 조건은 19-20°C, 자연주기의 일조시간에서 사육하였다.

2. 다배란 처리

다배란을 유도하기 위하여 12:00에 30 IU의 PMSG (Folligon, Intervert Co, Holland)를 주사한 후 52-56시간 후에 동량의 hCG (Colluon, Intervert Co, Holland)를 주사하였다.

3. 난자의 회수

hCG 주사후 14-16시간후에 경추과열법으로 도살하여 난관을 분리절단하여 각각을 개별의 petridish에서 관류하여 난자를 회수하였다. 이에 사용된 배양액은 0.3%의 BSA가 함유되어 있는 m-Tyrode용액으로 사용직전 0.2um의 milipore filter로 여과 멸균하였다.

4. 과립세포와 투명대 제거

회수된 난자는 0.1%의 hyaluronidase가 함유되어 있는 배양액에 5-10분간 배양하여 과립세포를 제거하였으며, 과립세포가 제거된 배양액은 2-3회 신선배양액으로 세척한 후 동결보존하거나 또는 투명대를 제거한 후 인간정자와 이종간 체외수정을 실시하였다. 과립세포가 제거된 난자는 0.1%의 Trypsin이 함유되어 있는 배양액에 난자를 노출시켜 투명대가 거의 연화되었을 때 미세피펫으로 물리적인 압박을 가함으로써 투명대를 제거하였고 신선배양액으로 3회이상 세척한 후 사용하였다.

5. 난자의 동결보존

(1) 동해방지제의 첨가

난자의 보존액은 m-Tyrode용액에 FBS가 20% (v/v) 함유되어 있는 배양액에 1.5M DMSO, 1.5M Glycerol, 1.5M 1,2-propanediol이 들어있는 배양액을 사용하였다. 동해방지제의 첨가는 0.5M, 0.1M 및 1.5M의 동해방지제를 함유한 배양액에 각각 10분씩 배양한 다음 수세하여 실시하거나 또는 0.5ml의 plastic straw에 20-25개의 난자를 옮긴 후 straw powder로 봉하였다.

(2) 난자의 동결

햄스터난자가 주입된 straw는 곧바로 자동세포동결기 (R-204 Cell Freezer, Planer Products, England)에 옮겨 동결을 실시하였다. 동결과정

은 상온으로부터 -7°C 까지는 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 하강시킨 후 식빙하여 10분간 정치한 다음, -30°C 까지 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 비율로 온도를 하강시킨 후 액체질소에 침적시켜 보존하였다.

(3) 동결난자의 용해 및 동해방지제의 제거

용해는 액체질소에서 곧바로 37°C 의 수조에 옮겨 얼음결정이 사라질때까지 조심스럽게 저어서 용해를 실시하였다. 용해된 미수정란은 동해방지제를 제거하기 위하여 0.5 M의 sucrose가 함유되어 있는 배양액에 10분간 노출시켜 동해방지제를 제거한 후 신선배양액으로 3회이상 세척하였다. 세척된 난자는 실체현미경하에서 형태학적으로 정상적인것만 골라 사용하였다.

6. 인간정자의 수정능획득 및 이종간 체외수정

수음법에 의해 채취된 정액은 일정시간동안 상온에 방치하여 정액을 액화시킨 다음 800 rpm 8-10분간 원심분리하여 상층액을 제거시킨 후 배양액으로 정자를 재부유하였다. 재차 원심분리하여 상층액을 제거한 후 배양액을 첨가시켜 1시간 30분이상 배양하여 정자의 수능을 획득시킨 후 $3-4 \times 10^6/\text{ml}$ 로 정자수를 조정한 후 투명대 제거 햄스터난자와 체외수정을 실시하였다.

7. 난자의 고정 및 염색

3시간동안 배양된 난자는 신선배양액으로 2-3회 세척하여 정자를 제거한 뒤 95%의 ethanol로 세척한 slideglass에 coverglass의 네귀에 맞도록 wasserin소적을 만든 후, 그 중앙에 햄스터난자를 적하시켜 coverglass를 덮어서 조심스럽게 눌렀다. 그후 2.5% glutaraldehyde를 slideglass와 coverglass사이에 침투시켜 일차고정을 실시한 후 10% formlin용액으로 2차고정하였다. 다음날 증류수로 세척한 후 95%의 ethanol로 탈수한 후에 45% aceto-lacomoid용액을 침투시켜 염색한 후 coverglass주위를 manicure로 봉입한 다음 위상차현미경으로 수정 여부를 판정하였다.

연구 성적

동해방지제를 첨가한 배양액에 난자를 일정시간 배양한 후 난자의 생존율과 정자의 침투율은 표 1과 같다. 난자의 생존율은 1.5 M DMSO사용군이 88.7%, 1.5 M Glycerol군이 97.0%, 1.5 M 1, 2-PROH군이 91.0%로 Glycerol사용군에서 가장 높은 생존율이었으나 각 군간의 유의차는 없었다. 정자의 침투율에 있어서 동해방지제를 첨가하지 않은 대조군의 침투율은 58.5%, 1.5 M DMSO군은 52.8%, 1.5 M Glycerol군은 54.0%, 1.5 M 1, 2-PROH군은 49.4%로 대조군보다 침

Table 1. Hamster penetration assay and survival rate of hamster oocytes exposed to cryoprotective agents

Treatment	No. of treated oocytes	No. of oocytes with normal morphology after exposed CA*	No. of oocytes penetrated (%)
Control	142	140 (98.5)	82 (58.5)
1.5 M DMSO	98	87 (88.7)	46 (52.8)
1.5 M Glycerol	103	100 (97.0)	54 (54.0)
1.5 M 1,2-PROH	100	91 (91.0)	45 (49.4)
Sub total	302	284 (94.0)	145 (51.1)

Chi-square : Non significant,

CA* : Cryoprotective agents

Table 2. Effect of cryoprotectants on recovery and survival of hamster oocytes frozen and thawed

Treatment	No. of frozen oocytes	No. of recovered oocytes at thawing (%)	No. of oocytes surviving (%)
1.5 M DMSO	320	286 (89.3)	195 (68.0)
1.5 M Glycerol	210	174 (82.8)	122 (70.1)
1.5 M 1,2-PROH	210	170 (80.9)	104 (61.2)
Total	740	630 (85.1)	421 (66.8)

Chi : square : Non significant

투율이 낮았으나 각 군간의 유의차는 없었다.

동해방지제의 종류에 따라 난자를 동결보존한 후 융해하였을 때 햄스터난자의 회수율 및 생존율에 대한 성적은 표 2와 같다. 동해방지제로 1.5M의 DMSO를 사용한 군에 있어서 난자의 회수율은 320개중 286개가 회수되어 89.3%, 1.5M의 Glycerol군에서는 210개중 174개가 회수되어 82.8%, 1.5M 1, 2-PROH군은 210개중 170개가 회수되어 80.9%의 회수율을 나타냈다. 또한 난자의 생존율에 있어서는 1.5M DMSO군이 286개중 195개의 난자가 정상적으로 생존하여 68.0%, 1.5M Glycerol군은 174개중 122개가 생존하여 70.1%, 1.5M 1, 2-PROH군은 171개중 104개가 생존하여 61.2%의 생존율을 나타냈다. 즉 740개의 난자를 동결하여 융해시 603개가 회수되어 85.1%의 회수율 및 회수된 난자중 421개가 생존하여 66.8

%의 생존율을 나타냈다.

한편 인간정자의 침투율에 있어서 DMSO사용군은 195개중 125개의 난자에 정자가 침투하여 64.1%의 침투율을, glycerol사용군은 122개의 난자중 90개의 난자에 정자가 침투하여 73.8%, PROH군은 104개의 난자중 72개의 난자에 정자가 침투하여 69.2%의 침투율을 나타냈는데 이는 대조군의 77%의 침투율보다 낮은 수치이지만 각 군간에 유의차가 존재하지 않았다(표 2).

표 4에는 본 클리닉에 내원한 환자를 대상으로 동결하지 않은 신선난자와 동결보존한 난자를 이용하여 이종간 체외수정을 실시한 결과가 나타나 있다. 일반적으로 신선난자를 이용한 군이 동결보존된 난자를 이용한 군보다 높은 정자의 침투율을 나타냈으나 3, 7, 10, 12번에 있어서는 동결보존된 난자의 침투율이 높았다. 신선난자를 이용하였을 때는 22.5개중 9.3개가 침투하여 41.3%의 침투율을 동결보존 난자를 이용하였을 때는 20.5개중 7.3개가 침투하여 35.6%의 침투율을 나타냈는데 12번을 제외하고 두 군간에 유의성이 인정되지 않았다.

Table 3. Hamster penetration assay of cryopreserved hamster oocytes

Treatment	No. of oocytes	No. of oocytes penetrated (%)
Control	96	74 (77.0)
1.5 M DMSO	195	125 (64.1)
1.5 M Glycerol	122	90 (73.8)
1.5 M 1,2-PROH	104	72 (69.2)
Sub total	421	287 (69.0)

Chi-square : Non significant

고 찰

가축의 증식 및 개량의 효율성을 극대화시키는 수단으로 수정란 이식기술의 산업적 이용이 증가하고, 불임시술치료의 일환으로서 시행되는

Table 4. Hamster penetration assay of patients with fresh and cryopreserved hamster oocytes

Patients	Fresh oocytes		Cryopreserved oocytes	
	No. of oocytes	No. of penetrated oocytes (%)	No. of oocytes	No. of penetrated oocytes (%)
1	20	10 (50.0)	24	8 (33.3)
2	21	7 (33.3)	20	4 (20.0)
3	20	11 (55.0)	21	13 (61.9)
4	25	6 (24.0)	20	3 (15.0)
5	25	0 (0.0)	20	0 (0.0)
6	23	18 (78.2)	20	6 (30.0)
7	22	21 (95.4)	20	20 (100.0)
8	21	14 (63.6)	19	10 (52.6)
9	25	2 (8.0)	20	0 (0.0)
10	20	4 (20.0)	23	8 (34.7)
11	24	18 (75.0)	20	11 (55.0)
12	24	1 (4.1)	20	4 (20.0)
Mean ± SEM	22.5 ± 2.06	9.3 ± 7.1 (41.3)	20.5 ± 1.4	7.3 ± 5.7 (35.6)

체의수정 및 배아이식 프로그램이 실시됨에 따라 잉여난자의 보존적 처리문제가 대두되어 동결보존에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

그러나 지금까지는 난자의 발달단계, 배양액의 종류, 동결 및 융해속도, 동해방지제의 종류 및 제거방법등에 따라 난자의 생존 및 발달에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Whittingham등(1972)과 Wilmut(1972)는 동해방지제로 10%의 FCS가 함유되어 있는 배양액에 1.5M DMSO나 Glycerol을 사용할 경우 0.2-0.8°C/min의 동결속도와 4-25°C/min의 융해속도가 수정란의 생존성에 좋은 결과를, 그리고 Parkening등(1976)은 1.5M의 DMSO를 동해방지제로 사용하였을 때 가장 좋은 생존성을 얻었다. Lassle등(1985)은 인간난자의 동결에 있어서 전핵시기와 2-4세포기의 초기배에는 PROH와 sucrose, 4-16세포기에는 DMSO와 Glycerol을 사용하여 -7°C까지 2°C/min의 비율로 동결시킨 후 -40°C 또는 -80°C까지 완만동결시 완만융해를 실시하였을 때 가장 좋은 성적을 얻었다.

그러나 Miyamoto와 Ishibashi(1981)에 의하면 급속동결과 급속융해시 생쥐 수정란의 생존성을 높일 수 있고, Quinn등(1982)은 햄스터 미수정난을 -80°C까지 완만동결시 -40°C까지 완만동결한 것보다 높은 생존율을 나타냈으나 인간정자의 침투율에 있어서는 유의한 차이를 나타내지 않는다고 하였고 Crister(1986)는 -80°C까지 완만동결을 실시한 군에서 높은 난자의 회수율을 나타냈다고 하였다. 동해방지제의 최종 농도에 따라 Whittingham등(1981)과 Leibo(1981)은 1.0M, Wilmut(1972)와 Whittinghams등(1972)은 1.5M, Maurer와 Haseman(1976)은 2.0M의 Glycerol 또는 DMSO가 좋다고 하였다.

Leibo등(1974)은 난자내의 자유수의 탈수는 동해방지제 첨가후 5분이내 이루어지며, 세포내와 평형상태가 된다고 한 반면, Willadsen등(1978)은 수정란의 동결시 삼투압변화 및 수정란내 자유수를 줄이고 충분히 탈수시키기 위하여 6단계의 Glycerol평형을, Rall과 Polge(1984)는 1단계 평형을, Kojima등(1985)은 1단계와 3단계 평형을 실시하였으나 각 구간에 유의한 차이를 발견할 수 없다고 하였다.

완만동결은 빙정이 형성되는 동안 매액의 수분이 동결됨에 따라 세포내 탈수에 의해서 세포내의 빙정형성을 피하기 위한 방법으로서 세포외액에 큰 빙정을 형성하며, 난자로부터 자

유수가 유출되어 결빙되고 전해질의 농도가 증가한다. -30°C - -40°C의 운동영역에서 액체질소에 침지되었을 때 급속융해가 생존율에 높은 영향을 끼치는데 이는 융해시 불완전한 탈수에 의해 형성되는 빙정의 형성을 억제하기 때문이며, -60°C - -80°C까지 완만동결을 실시하였을 때는 탈수된 세포에 삼투압의 영향을 줄이기 위하여 완만융해를 실시해야 한다고 하였다.

Willadsen(1977)에 의하면 동결수정란을 공란우에 이식시 여러시설 및 기구가 갖추어져 있지 않은 소규모의 목장에서 동해방지제의 제거와 같은 번거로운 작업을 제거하기 위해 straw에 sucrose를 함유한 배양액을 미리 분주하여 동결시킨 후 이식시 융해하여 straw내의 배양액과 sucrose를 혼합한 후 공란우의 자궁에 이식하여 송아지를 생산하고 있다.

본 연구는 일반적으로 사용되고 있는 DMSO, Glycerol 및 PROH와 같은 동해방지제를 사용하여 햄스터의 미수정란을 -30°C까지 완만동결을 실시한 후 액체질소에 침지하여 동결보존한 후 37°C의 미온수에서 급속융해를 실시한 바 평균 85.1%의 회수율과 66.8%의 생존율을 얻을 수 있었다. 또한 인간정자와 이종간 체외수정을 실시하여 정자의 침투율을 조사한 결과 평균 66.8%로서 대조군의 77%보다는 낮은 수치를 나타냈으나 유의성이 없는 것으로 보아 햄스터난자를 동결보존한 후 검사시 융해하여 임상적으로 사용할 수 있다는 가능성을 본 실험을 통하여 알 수 있었다.

결 론

본 실험은 동해방지제의 첨가에 따른 난자의 생존율 및 인간정자의 침투율, 동결보존후 융해하였을 때 난자의 회수율 및 생존율을 조사하여 햄스터난자를 동결보존한 후 임상적으로 정자의 수정능검사에 적용할 수 있는지를 알아보고자 본 실험을 실시하였다. 동해방지제로는 DMSO, Glycerol 및 1, 2-PROH를 이용하여 완만동결을 실시한 후 액체질소에 침지하여 보존한 후 급속융해를 실시하여 항동해제를 제거한 후 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동해방지제에 일정시간 노출시켰을 때 난자의 생존율을 Glycerol첨가군에 97%의 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 정자의 침투율은 평균 51.1%로 대조군보다 낮은 수치를 나타냈으나 각 구간의 유의성은 인정되지 않았다.

2. 동해방지제로 DMSO사용군에서 89.3%의 난자의 회수율을 나타냈으며, 생존율에 있어서는 1.5 M Glycerol을 사용한 군이 70.1%로서 가장 높은 성적을 나타냈으나 각 군간의 유의성은 없었다.

3. 햄스터난자를 동결보존후 융해하여 인간 정자의 침투율을 조사한 결과 평균 침투율은 69.0%로서 대조군의 77.8%보다 낮았지만 유의차는 인정되지 않았다.

4. 12명의 불임환자를 대상으로 신선난자와 동결보존후 융해한 햄스터난자를 이용해 정자의 침투율을 조사한 결과 신선난자 사용군에서 41.3%, 동결보존된 남자의 침투율은 35.6%의 정자의 침투율을 나타냈다.

이상과 같은 결과를 토대로 햄스터 미수정란을 동결보존하여 남성불임 검사의 일환으로 시행되고 있는 투명대 제거 햄스터난자에 의한 인간정자의 침투율검사를 검사시 융해하여 검사를 실시함으로써 보다 간편하고, 실험동물 사육시설을 구비하지 못한 소규모의 크리닉에서도 실시할 수 있고, 과배란 유기에 따르는 시간을 절약할 수 있다.

인 용 문 헌

- Barros C: Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrologia* 1979, 11, 197.
- Critser JK: Cryopreservation of hamster oocytes: Effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 1986, 46, 277.
- Farrant J: Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* 1977, 14, 273.
- Hall JL: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1981, 35, 451.
- Kojima T, Soma T, Oguri N: Effect of rapid addition and dilution of dimethylsulfoxide on the viability of frozen-thawed rabbit morulae. *Cryobiology* 1985, 22, 409.
- Lassable B, Testart J, Renard J-P: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 165.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski JC: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell* 1974, 89, 79.
- Leibo SP: Preservation of ova and embryos by freezing. In *New Technologies in Animal Breeding*, Edited by BG Brackett, GE Seidel, SM Seidel New York Academic Press, 1981, p 127.
- Leibo SP: A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984, 21, 767.
- Margalioth EJ: Zona-free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983, 40, 386.
- Maurer RR, Haseman JK: Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol Reprod* 1976, 14.
- Miyamoto H, Ishibashi T: Survival mouse embryos after freezing and thawing in the presence of erythiol. *J Exp Zool* 1981, 216, 337.
- Overstreet JW: Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucide and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. *Ferti Steril* 1980, 33, 534.
- Parkening TA, Tsunoda Y, Chang MC: Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J Exp Zool* 1976, 197, 369.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG: Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1982, 66, 161.
- Rall WF, Polge C: Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J Reprod Fert* 1984, 70, 285.
- Renard JP, Nguyen BX, Garnier V: Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fert* 1984, 71, 573.
- Rogers BJ: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979, 32, 664.
- Trounson AO, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and trans-

- fer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P : Survival of mouse embryos frozen to :196°C and 269 °C. *Science* 1972, 178, 411.
- Wilmut I : The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci* 1972, 11 : 1071.
- Willadsen SM : Transplantation of sheep and cattle embryos after storage at :196. In *The Freezing of Mammalian Embryos* : CIBA Foundation Symposium 52, Edited by K Elliot, J Whelan, Amsterdam, Elsevier, 1977, p 190.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA : In vitro storage of cattle embryos. 1978 In control of reproduction in the cow. J. Sreenan.
- Wolf DP, Socoloski JE, Quilgley MM : Correlation of human in vitro fertilization with the hamster eggs bioassay. *Fertil Steril* 1983, 40, 53.
- Yanagimachi H, Rodgers BJ : The use of zona : free animal ova as a test : system for assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Repord* 1976, 15, 471.
-