



## Ethylene Glycol이 포유류 초기배자의 생존성에 미치는 독성 효과 분석

김현<sup>1</sup> · 유대중<sup>2</sup> · 최창용<sup>1</sup> · 성환후<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터, <sup>2</sup>전라남도 농업기술원 축산연구소

## Toxic Effects of Ethylene Glycol on Mammalian Embryo Survivability

Hyun Kim<sup>1</sup>, Dae Jung Yu<sup>2</sup>, Changyong Choe<sup>1</sup> and Hwan-Hoo Seong<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>Livestock Research Institute, Jeollanam-do Agricultural Research & Extension Service, Gangjin 527-822, Korea

### ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effects of embryonic stage and toxicities of cryoprotectant on the rates of survival and development of the cryopreserved mouse early embryo and finally to establish the cryopreservation method of surplus embryos obtained during assisted reproductive technology. Toxicities of two cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG) were investigated using a murine embryo model. Female F-1 mice were stimulated with gonadotropin, induced ovulation with hCG and mated. Two cell embryos were collected and cultured after exposure to either DMSO or EG. Embryo development was evaluated up to the blastocyst stage. The total cell count of blastocysts that were treated with DMSO (68.1±24.1) at the 2-cell stage was significantly lower than that were treated with EG (81.2±27.0) or the control (99.0±18.3) ( $p<0.001$ ). On comparison of two cryoprotectant treated groups, the DMSO treated group showed a decreased cell count compared with the EG treated group ( $p<0.05$ ). Both DMSO (15.4±1.5) and EG (10.2±1.4) treated groups showed higher apoptosis rates of cells in the blastocyst compared with the control (6.1±0.9,  $p<0.0001$ ). In addition, the DMSO treated group showed more apoptotic cells than the EG treated group ( $p<0.001$ ). The potential toxicity of cryoprotectants was uncovered by prolonged exposure of murine embryos to either DMSO or EG at room temperature. When comparing two cryoprotective agents, EG appeared to be less toxic than DMSO at least in a murine embryo model.

(Key words : Cryoprotectant, DMSO, EG, Toxicity, Embryo)

### 서 론

동결보존의 기본 원리는 초기배아를 비롯하여 세포나 조직, 개체 등의 고유한 형태를 유지하면서 내부의 수분을 고농도의 동결 보호제(cryoprotective agents: CPAs)의 삼투압 원리를 이용하여 점진적으로 제거하고, 이로 인해 얼음결정(icecrystal)을 최소화하여 세포를 보호하는 것이다(Yoon 등, 2007). 배아 및 세포의 동결 보존은 삼투압, 세포 내외의 얼음결정 형성 및 동결 보호제의 독성 등에 의해서 다양한 세포의 손상을 일으킬 수가 있다. 생식능력보존의 새로운 기술인 난소조직 동결 보존술은 아직 초기 단계이어서 사람에게 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만, 무엇보다 성공적인 동결보존을 위해서는 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결-융해 과정 중 사용되는 동결 보호제의 종류, 농도 및 처리 시간이다(Friedler

등, 1988; Mandelbaum 등, 1988; Dumoulin 등, 1994; Nowshari 등, 1995). 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동결 보호제로서 dimethyl sulfoxide(DMSO), glycerol 그리고 propandiol(1,2-PROH)를 사용하였다(Lovelock 등, 1959; Boutron 등, 1984). 그러나 최근에는 Martino 등(1996)은 소 성숙난자를 ethylene glycol(EG)을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 낮은 분자량과 높은 침투능력(Gilmore 등, 1995) 그리고 비교적 독성이 적은 특징이 있는 EG을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동결 보호제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 알부민이 있으나, glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Zhu 등, 1993; Rayos 등, 1994; Kim 등, 1996).

냉각 속도와 융해 속도는 얼음결정 형성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Sutton 등, 1991; Gardner 등, 2000). 냉각 속도가 너무 빠를 때 얼음결정 형성의 증식이 과다해지고, 또한 너무 느려도 심한 탈수로 인한 염분의 침착

\* Corresponding author : Phone: +82-63-620-3521, E-mail: seonghh@korea.kr

이 문제가 된다. 느린 용해는 결정이 크게 자라는 기회를 주어 세포에 손상을 주게 되지만, 급속 용해는 얼음 결정이 자라는 시간을 단축해 얼음결정의 용해를 촉진한다 (Hey 등, 1996). 냉동과 용해가 세포에 주는 손상을 줄이기 위해 동결 보호제는 매우 중요한 역할을 하지만, 독성 또한 세포에 손상을 줄 수 있기 때문에 조심해 사용해야 한다. 동결보호제의 독성은 크게 화학적 독성과 삼투압적 상해로 나눌 수 있다(Newton 등, 1999). 생식 세포에 끼치는 동결 보호제 독성은 아직도 밝혀지지 않은 것들이 많다. 동결 보호제의 독성을 줄이기 위해서는 동결 보호제에 노출시간을 최소한도로 줄여야 하는 것으로 알려졌으며(Kuleshova 등, 2001), 일반적으로 수정관과 같은 단세포 동결 시 동결 보호제 처리시간은 20분 미만이다. 그러나 난소조직은 다양한 여러 세포로 이루어졌기에 동결 보호제 노출 시간이 30분 이상 되어야 적절한 동결보호제 침투를 이룰 수 있다고 알려져 있다(Newton 등, 1998).

본 연구에서는 DMSO와 EG 간의 독성의 확립을 위해 생쥐 2-세포기 배아를 장기간(60분) 동결 보호제에 노출시킨 후 포배기까지 배 발달을 시키면서 나타나는 세포 사멸의 정도와 배 발달 지연현상을 각각 비교 및 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물의 사양관리

본 연구에 사용된 실험동물은 일본 도쿄대학교 수의과학대학 동물실험 윤리위원회의 A-10-1214 승인 하에 진행하였으며, 항온 및 항습이 유지되면서 낮 12시간, 밤 12시간이 조절되는 실험동물 사육실에서 생쥐 제 1세대 잡종(C57BL ♀ × CBA ♂)으로 생후 6주된 암컷과 6-8주된 생식력이 확인된 수컷에게 충분한 사료와 물, 공간을 제공하면서 사육하였다.

### 시약 및 배양액

배양액은 glutamine(0.1 mM/ml)이 포함된 KSOM을 사용하였고, 동결 보호제의 비교 대상인 DMSO와 EG는 1.5 M Leibovitz-L15(Gibco BRL, UK)를 기본 배양액으로 사용하였다. 본 실험에 이용된 그 외 시약들은 Sigma(St Louis, Mo, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다.

### 수정란 준비

#### 1) F1 생쥐의 준비

생후 6 주령의 암컷 F<sub>1</sub> hybrid mice(C57BL/6×CBA) 생쥐에 10 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG)를 복강 주사하여 과배란을 유도하였다. PMSG 주사 후, 48시간 때 10 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG)를 복강에 주사한 후, 수컷과 합사하여 교배를 유도하였다. 이튿날 아침 암컷의 질전을 통하여 교배 여부를 확인하고 질전이 확인된 개체만을 분리 사육하였다. hCG 주사 후, 48시간째에 교배가 확인된 개체만을 경추탈골 방

법으로 죽인 후, 외과적 수술 방법으로 난관을 떼어내었다. 그리고 인슐린 주사기를 이용하여 난관 관류법으로 2-세포기의 배아를 획득하였다.

#### 2) 배양액 제조

배 발달을 위한 기본 배양액은 Potassium Simple Optimized Medium(ARK Resource, Japan)을 제조하여 사용하였으며, 단백질원은 0.3% BSA를 첨가하여 사용하였다. 동결 보호제의 독성 평가를 위한 배양액은 Leibovitz-L15에 1% BSA를 포함한 기본 배양액에 각각의 1.5 M DMSO 그리고 1.5 M EG를 첨가하여 사용하였다.

#### 3) 수정란의 동결 보호제 처리

실험 30분 전에 1.5M DMSO 그리고 1.5M EG의 배양액을 실온도로 보정하였다. 획득한 2-세포기 수정란을 실온에서 60분 동안 각각의 동결 보호제가 포함된 배양액에 넣어 처리하였다. 처리가 끝난 수정란은 배 발달 배양접시로 옮기기 전에 배 발달 배양액에 3회 세척을 실시하여 수정란에 남아있는 동결 보호제를 깨끗이 제거한 후, KSOM 배양액 20 µl 소적을 만들고, oil을 피복한 배양접시로 옮긴 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 5일간 체외배양을 통해 배 발달을 유도하였다.

#### 배 발달을 분석

2-세포기에서 얻은 수정란을 실온에서 60분 동안 동결 보호제에 노출 후, 배양기로 옮겨 24시간 주기로 배반포 발생시까지 배 발달을 관찰하였다. 96시간 동안 배양하여 형성된 배반포는 bis-benzimide(Hoechst 33342)로 염색하여 세포수를 계수하여 배 발달을 조사하였다. 동결 보호제에 노출시킴으로써 나타나는 배 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PMSG 주사 후 96시간을 기준으로 세포수가 40개 미만은 A군, 40~70개 미만은 B군으로, 70개 이상인 C군으로 나누어서 분석하였다.

#### 통계적 분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료들의 통계적 유의성은 배 발달을 분석은  $\chi^2$  test로 하였고, 그 이외는 Student's *t*-test를 사용하였으며, *P*값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

## 결 과

### 동결 보호제에 따른 배아 발달을 비교 분석

배아 발달율은 대조군에서 93.7%가 정상적으로 발달하였으며, 먼저, DMSO 처리군에서는 A 군이 14.7%, B 군이 35.1%, C 군이 54.2%로 각각 나타났으며, EG 처리군에서는 각각 8.9%, 31.1%, 63.2%로 나타났다. Fig. 1과 같이 정상 배아 발달율은 대조군보다 동결 보호제 처리군에서 유의하게 낮게 나타났으나( $p < 0.001$ ), 처리군 간에는 차이가 없었다. 특히 DMSO 처리군에서 C 군이 다른 군에 비해 가장 낮은 비율을 냈다( $p < 0.001$ ). 24시간 주기로

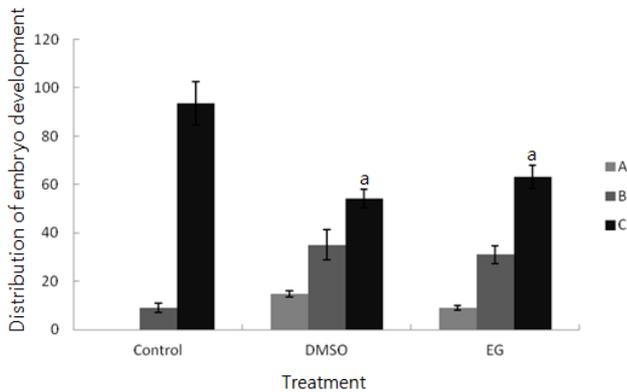


Fig. 1. Comparison of embryo development after 60 minutes exposure of 2-cell murine embryo to 1.5 M DMSO and 1.5 M EG. Data represent mean  $\pm$  S.D.; <sup>a</sup>  $p < 0.001$  versus control. Cell number A:<40, B: 40-70, C:>70.

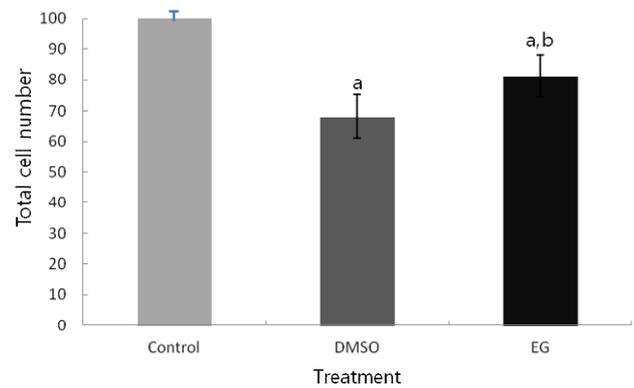


Fig. 3. Comparison of total cell number of murine blastocysts which were treated with 1.5 M DMSO, 1.5M EG, and Leibovitz solution (control) at the 2-cell embryo stage. Data represent mean  $\pm$  SEM; <sup>a</sup>  $p < 0.001$  versus control, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus DMSO.

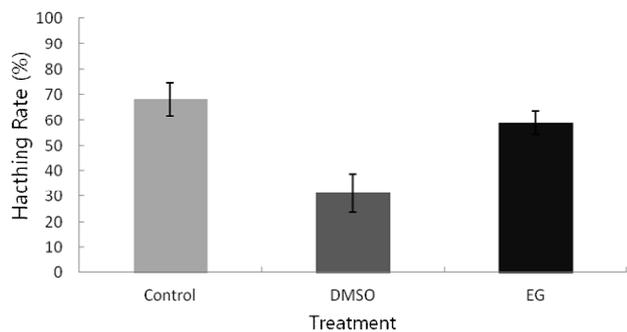


Fig. 2. Comparison of hatching rates of embryos that were exposed to cryoprotectants at the 2-cell embryo stage. Data represent mean  $\pm$  S.D.; <sup>a</sup>  $p < 0.001$  versus control.

배아 발달을 확인해 본 결과, DMSO 처리군 그리고 EG 처리군 모두 대조군에 비해 배아발달의 속도가 늦은 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히 부화시기인 배양 4일째의 경우 처리군 중 DMSO 처리군에서 유의하게 낮은 부화율이 관찰되었다( $p < 0.001$ ).

#### 동결 보호제에 따른 배반포 세포수 비교 분석

배반포 세포 수는 DMSO 처리군( $68.1 \pm 24.1$ )과 EG 처리군( $81.2 \pm 27.0$ ) 모두 대조군( $99.0 \pm 18.0$ )에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타냈다( $p < 0.0001$ ). 처리군 간에는 DMSO 처리군이 EG 처리군에 비해 유의하게( $p < 0.05$ ) 적게 나타났다(Fig. 3).

#### 동결 보호제에 따른 세포사멸 비교 분석

세포 사멸된 세포수를 분석한 결과에서도 DMSO 처리군( $15.4 \pm 1.5$ )과 EG 처리군( $10.2 \pm 1.4$ ) 모두 대조군( $6.1 \pm 0.9$ )에 비해 유의하게 높게 나타났으며( $p < 0.001$ ), 처리군 간에는 DMSO 처리군이 EG 처리군에 비해 유의하게( $p < 0.001$ ) 세포 사멸된 세포의 비율이 높은 것으로 각각 나타났다(Fig. 4).

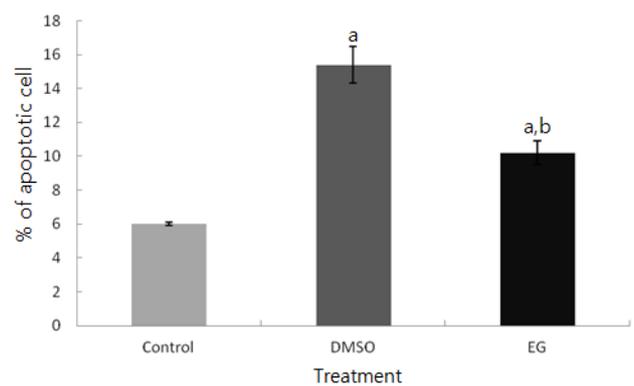


Fig. 4. Comparison of the apoptotic rates of cells in blastocysts which were treated with 1.5 M DMSO, 1.5 M EG for 60 min at the 2-cell embryo stage. Data represent mean  $\pm$  SEM; <sup>a</sup>  $p < 0.001$  versus control, <sup>b</sup>  $p < 0.01$  versus DMSO.

## 고찰

본 연구는 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 두 가지 동결 보호제, 즉 DMSO 그리고 EG의 독성을 비교하고자 생쥐 수정란 모델을 이용해 포배기까지 배아 발생을 시키면서 나타나는 세포 사멸의 정도와 배아 발달 지연현상을 비교 및 검토하였다. 생식능력보존의 새로운 기술인 난소조직 동결 보존술은 아직 초기 단계이어서 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만, 사람에게 무엇보다 성공적인 동결보존의 핵심요소는 동결 보호제의 선택에 있는 것으로 추정된다. 동결 보호제로 많이 사용되어온 EG, PG, DMSO, glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 침투성 동결 보호제와 당 또는 polyvinylpyrrolidone(PVP), 혈청 알부민, 혈청 polyethylene glycol (PEG), ficoll 거대분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비 침투성 동결 보호제로 구분된다(Lovelock 등, 1959;

Boutron 등, 1984). 동결 보호제의 독성은 화학 약품의 고유 특성들, 노출기간과 온도에 의존한다. 독성을 최소화하기 위해 저온에서 세포내로 동결 보호제를 급속한 침투시키는 것이 바람직하다. 37°C에서 PROH에 노출된 경우는 실온에 비해 배반포의 형성이 상당히 감소했으며, 37°C에서 5분 이상 전핵기 수정란을 동결 보호제에 노출하면 배의 발달이 감소한다고 보고되어 왔다(Mahadevan 등, 1997). Takagi 등(1993)은 소 배아의 연구에서 동결 보호제의 독성은 노출 시간과 비례한다고 보고하였다. 다세포로 이루어진 조직들이 평형에 도달하기 위해서는 더 긴 노출 시간이 필요하고, 결과적으로 조직에 대한 동결 보호제 독성의 위험성이 증가될 것으로 생각되어진다. 실온에서 60분 동안 EG에 노출된 경우에는 원시난포(primordial follicles)의 생존율이 감소되었다는 보고가 있으며, 이는 노출된 동결보존제의 화학 독성에 기인한다고 추론하였다(Cohen 등, 1985; Candy 등, 1997).

동결 보호제는 성공적인 동결을 하기 위한 필수불가결한 물질이기 때문에 이러한 동결 보호제에 대한 초기배아세포 독성을 확인하고자 하였다. 초기배아세포의 동결 보호제 노출 시간을 본 연구팀의 이전 연구에서 30분 노출로는 확인할 수 없었기 때문에 잠재적인 독성을 발견하기 위해서 본 연구에서는 의도적으로 노출시간을 60분으로 연장을 시켰다. 그 결과, DMSO 그리고 EG 처리군과 대조군 사이에는 배아 부화율에 있어서 차이가 있었으며, 이는 배아에 대한 동결 보호제의 잠재적인 독성을 확인한 결과였다. 이번 연구에서 장기간 처리했을 때 EG 처리군보다 DMSO 처리군에서 배아발달과 세포수가 저하된 결과로부터 DMSO의 독성이 더 높을 것으로 사료되며, 이전의 연구결과(Mahadevan 등, 1997; Demici 등, 2001)와 일치하는 결과를 나타내었다.

한편, 부화 지연 현상은 동결 보호제의 독성을 배아 세포가 극복하는 시간 차이를 나타내 주는 것으로 사료되는데, 일반적으로 세포는 세포주기에 따라 체크 포인트를 두어 내재적인 결함을 치유하는 기전을 가지고 있기 때문이다. EG 처리군과 DMSO 처리군 간의 부화율을 비교해 보면 EG 처리군이 유의적으로 높은 것으로 나타나는데, 이는 초기 배아 발달단계에서 DMSO 처리군에서는 상해를 입은 배아는 포배기까지 상해를 입은 상태로 존재하는 반면, EG 처리군에서는 시간이 경과함에 따라 발생이 재개되어 부화에 이르는 것으로 추정할 수 있다. 전반적인 배아 발달 양상을 보면 DMSO 처리군에서 부화된 배아보다 팽창포배의 수가 많은 것으로 관찰되었는데, 이는 부화에 관여하는 기전에도 동결 보호제가 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또 한 가지 동결 보호제의 세포 독성은 수정란에 있어서 부화기전에 영향을 미치는 것으로 추론된다. 최근에 많은 연구에서 배아에 의해서 배반포 팽창에 분비되는 투명대의 용해소(lysin) 이론이 확인되었다. 'Strypsin'이라고 불리는 trypsin을 담은 단백질 가수분해효소는 분리된 쥐의 배반포의 부화에 직접 포함된다고 보고되었다(Gardner 등, 2000). Schiewe 등(1995)은 배반포 anti-hatching 모형을 이용하여 연구한 결과, 배반포의 부화는 물리적인 팽창 또는 투명대의 강화가 아니라, 배아의 투명대 용해소 분비의 차이에 기인한다고 보고하였다. 이런 연구 보고들과 본 연구를 함께 연관지어

분석해 보면 DMSO의 독성에 의한 투명대 용해소의 분비 장애로 인해 DMSO 처리군이 EG 처리군보다 부화가 늦어졌을 가능성도 배제할 수 없다.

아직까지 동결 보호제의 독성에 대해 많은 부분이 밝혀지지 않고 있으므로, 동결 보호제의 독성을 알아보는 추가연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다. 특히 생식(germ) 세포에 대한 성장과 발달에 있어서 저해 효과를 최소화 할 수 있도록 분자 수준에서의 비 치사성 동결 보호제 손상에 대해 더욱더 세밀한 연구 조사가 필요하다고 사료된다. 또한 동결 보호제의 알려지지 않은 독성을 감소시키기 위해서 가능하면 동결 보호제에 노출되는 시간을 최소화하는 것이 중요하다고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서 배아의 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 두 가지 동결 보호제, 즉 DMSO와 EG의 독성을 비교하고자 생쥐 수정란 모델을 이용한 실험을 하였다. 생후 6주령의 암컷 생쥐 F<sub>1</sub> hybrid mice에 10 IU의 PMSG를 복강 주사하여 과배란을 유도하고, 2-세포기 배아를 획득하고 DMSO와 EG 각각 노출시킨 후, 배양을 하였다. 배반포의 전체 세포수는 2-세포기 단계에서 DMSO(68.1±24.1)로 EG(81.2±27.0) 혹은 control(99.0±18.3)( $p<0.001$ ) 처리군에 비해서 유의적으로 낮았다. DMSO 처리군이 EG 처리군에 비해 세포수가 적었다. DMSO(15.4±1.5)와 EG(10.2±1.4) 두 처리군은 대조군(6.1±0.9,  $p<0.0001$ )과 비교해서 배반포에서 세포사 비율이 더 높음을 확인했다. 또한, DMSO 처리군은 EG 처리군( $p<0.001$ )보다 더 많은 세포사멸된 세포가 확인되었다. DMSO 또는 EG 처리군과 대조군 사이에는 배아 부화율에 있어서 차이가 있었으며, 이는 배아에 대한 동결 보호제의 잠재적인 독성을 확인한 결과였다. 이번 연구에서 장기간 처리했을 때 EG 처리군보다 DMSO 처리군에서 배아발달과 세포수가 저하된 것은 DMSO의 독성이 더 높을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ00941 8022014)와 국립축산과학원 2014 PostDoctoral Fellowship Program에서 연구비를 지원받았습니다.

## REFERENCES

1. Boutron P (1984) A more accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propandiol aqueous solutions: Comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21:183-191.
2. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG (1997) Effect

- of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil* 110:11-19.
3. Cohen J, Simons RE, Edwards RG, Fehilly CB, Fisher FB (1985) Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 2:59-64.
  4. Demici B, Lomage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF (2001) Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 75:754-762.
  5. Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geraedts JP, Evers JL (1994) The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil Steril* 62:793-798.
  6. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ (1988) Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 49:743-764.
  7. Gardner DK, Lane M (2000) Embryo culture systems. In "Handbook of *In Vitro* Fertilization" 2<sup>nd</sup> Ed CRC Press Boca Raton FL 2:205-264.
  8. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW (1995) Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 53:985-995.
  9. Hey JM, MarFarlane DR (1996) Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 33:205-216.
  10. Kuleshova LL, Shaw JM (2001) Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43:21-31.
  11. Lovelock JE, Bishop MW (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394-1395.
  12. Kim MK, Lee SJ, Uhm EU, Yoon SH, Park SP, Chung KS, Lim JH (1996) Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *J Animal Reprod* 20:119-126.
  13. Lovelock JE, Bishop MW (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394-1395.
  14. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Tibi C, Cohen J, Salat-Baroux J (1988) Solutions provided by the freezing of embryos and questions posed by the freezing of human oocytes. *Rev Fr Gynecol Obstet* 83:619-622.
  15. Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996) Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol Reprod* 54:1059-1069.
  16. Mahadevan MM, Miller MM (1997) Deleterious effect of equilibration temperature on the toxicity of propanediol during cryopreservation of mouse zygotes. *J Assist Reprod Genet* 14:51-54.
  17. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG (1998) Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 13:376-380.
  18. Newton H, Pegg DE, Barrass R, Gosden RG (1999) Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocyte. *J Reprod Fertil* 117:27-33.
  19. Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JK (1995) Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Hum Reprod* 10:3237-3242.
  20. Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H (1994) Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil* 24:100-123.
  21. Schiewe MC, Hazeleger NL, Scimint DF, Maceda JP (1995) Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. *Fertil Steril* 63:288-294.
  22. Sutton RL (1991) Critical cooling rate to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J Chem Soc Faraday Trans* 87:101-105.
  23. Takagi M, Boediono A, Saha S, Suzuki T (1993) Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology* 30:306-312.
  24. Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS, Cha KY (2007) Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 88:952-956.
  25. Zhu SE, Kasai H, Otoge T, Sakurai T, Machida T (1993) Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fert* 98:139-145.

(Received: August 12 2015/ Accepted: August 23 2015)