

## Fluorescence In Situ Hybridization(FISH) 기법을 이용한 인간 생식세포 및 착상전 배아의 유전이상 검색

방 명 걸

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소

### 서 론

인간 생식세포 및 착상전 배아의 세포유전학적 이상은 수정장애, 배아의 진행시기 발생정지, 초기난할 정지, 임상적으로 인식이 불가능한 시기 즉 착상직후 배아의 사멸, 자연유산, 사산 및 분만후 신생아 사망 같은 인간의 전반적인 생식현상에 악영향을 끼친다.

다른 악영향으로는 후대에서 정신박약, 기형 혹은 불임과 같은 질환을 야기하기도 한다. 마지막으로 전위 (translocation) 혹은 역위 (inversion) 같은 세포유전학적 이상을 부모로부터 유전받은 경우 표현형적으로는 정상일수 있으나 후에 불균형 생식세포를 생산하게 되어 결국 생식현상에 장애를 초래하게 된다. 그러므로 생식학적 연관성 즉 세포유전학적 이상이 인간 생식력에 미치는 영향은 후대에서 더욱 문제시 될 수 있다.

투명대 제거 햄스터 난자와 침체반응이 야기된 인간정자의 융합기술 (sperm penetration assay; 이하 SPA로 약함)에 의해 위의 언급한 현상 중 남성측 공헌도 즉 어느 정도의 이상이 정자에서 기인하는가에 대한 접근을 가능하게 하였다 (Rudak et al., 1978). 그러나 이 방법은 기술상 어렵고, 많은 시간이 소요되며, 난자내에 침투한 소수 수정능력이 있는 정자만의 핵형을 분석할 수 있다는 단점이 있다. 최근들어 개발된 Fluorescence In Situ Hybridization (이하 FISH로 약함) 기법에 의해 특정 염색체 및 염색체 특정 부위를 직접 관찰할 수 있게되었다 (Kearns & Pearson, 1994). 특정 염색체에 대한 특수 DNA probe를 이용하는 이 방법에 의해 인간정자에서도 염색체 수의 이상 (aneuploidy) 및 다배성 (polyploidy)에 대한 연구가 진행되어 오고 있다.

또한 최근 들어 급격히 발전한 보조생식술에 의해 난자의 극체 및 착상전 배아의 분할구에서도 이러한 연구가 가능하게 되었다. 고전적인 세포유전학적 핵형분석이 이용되어 왔으나 기술이 어렵고, 많은 시간이 소요되며, 핵형의 질이 불량하다는 문제를 가지고 있었다. 이 기술은 점차 FISH 기법으로 대체되어 염색체 수의 이상, 다배성 및 mosaicism 등의 귀중한 정보를 제공하고 있다.

본 논문에서는 인간 정자, 난자 및 착상전 배아에 있어서 염색체 수준에서의 이상에 관하여 간

단히 고찰하고자 한다.

### FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)

최근들어 개발된 FISH 기법에 의해 특정 염색체 및 염색체 특정 부위를 직접 관찰할 수 있게 되었다. 특정 염색체에 대한 특수 DNA probe를 이용하는 이 방법에 의해 중기 염색체 및 간기핵에서 염색체 수의 이상 및 다배성에 관한 연구가 진행되어 오고 있다 (Kearns et al., 1996). 이 기술은 크게 간접법과 직접법으로 나눌 수 있다. 직접법은 형광 reporter molecule (fluorochrome)을 직접 DNA probe에 결합시켜 target DNA와 hybridization시킨 후 형광현미경 하에서 hybrid signal을 관찰하는 방법이고, 간접법은 hapten-label된 probe를 affinity cytochemistry에 의해 형광 signal을 탐지하는 방법이다. 최근 이중형광 filter 및 삼중형광 filter의 개발과 더불어 여러색깔의 fluorochrome 개발로 인해 급진전하고 있다.

### 인간 정자의 염색체 수 이상 및 다배성에 관한 연구

저자는 1984년부터 탈응축된 인간 정자핵에서 FISH를 이용한 염색체 수 이상 검색에 관하여 발표된 20여편을 분석하였는데 (Kearns et al., 1996), 염색체 5, 13 및 19번을 제외한 모든 염색체에서의 이염색체 (disomy) 빈도가 보고되어 왔는데 불행하게도 대부분의 저자들은 FISH 시행시 단일 DNA probe만을 이용하였다. 그러므로 특정 염색체에 대하여 2개의 signal이 발현되었을 경우 특정 염색체에 대한 이염색체 인지 이배체 (diploid) 인지를 구별할 방법이 없었다.

몇몇 연구자들은 정자 두부의 크기에 따라 정자의 배체 (ploidy)를 구별하고자 시도하였다. 즉 정자가 2개의 signal을 발현하고 두부의 크기가 정상보다 클 경우 이배체로 구분하였으며 두부의 크기가 정상이며 2개의 signal이 발현되었을 경우 특정 염색체에 대한 이염색체로 간주하였다 (Guttenbach and Schmid, 1990; Coonen et al., 1991). 이 접근방법은 타당하지 못하다. 왜냐하면 이 방법은 매우 주관적이며 정자두부의 크기는 염색질의 탈응축 정도와 관계가 있는 것이지만

체와 무관하기 때문이다.

1993년부터 이배체로부터 이염색체를 구별하고자 다색성 (multicolor) FISH가 적용되어 왔다. 두 개의 상염색체 (autosome) DNA probe를 각기 다른 두 개의 fluorochrome으로 label하여 동시에 탈응축된 정자핵과 hybridization을 시행한 후 이염색체 (염색체A에서 2개의 signal과 염색체B에서 1개의 signal이 발현된 경우 염색체A에 대한 이염색체로 구분)와 이배체 (염색체A와 B에서 각각 2개의 signal이 발현된 경우 이배체로 구분)로 구분하는 방법이다.

정자에 있어서 염색체 수 이상 빈도의 정확한 계산 혹은 추정 은 정자합성의 세포유전학적 이해를 증진시킬 것이다. 인간정자에서 염색체 수 이상 및 이배체 검색을 위한 FISH의 최근 연구 추세는 two-probe, two-color FISH 이다. 또한 몇몇 연구에서는 three-probe, three-color FISH를 성염색체 및 한 개의 상염색체 DNA probe를 동시에 적용하고 있다. 지금까지의 연구들은 주로 정상인을 대상으로 FISH를 시행하였으므로 낮은 염색체 수 이상 빈도가 보고되어 왔다. 정자에서 시행되었던 대부분의 two-color 및 three-color FISH 연구들은 무염색체 (nullisomy) 혹은 총 염색체 수 이상 빈도를 보고하지 않고 있다. 대신 이염색체 빈도만을 강조하고 있다.

예외적인 보고 중 Bischoff 등 (1994)과 Martin 등 (1995)의 광범위한 연구에서 단지 무염색체와 이염색체 빈도만을 보고하였다. Bischoff 등 (1994)은 1개의 상염색체와 성염색체를 이용하여 총 72,001개의 정자에서 252개 (0.35%)의 무염색체와 203개의 이염색체 (0.28%)를 관찰하였다. Martin 등 (1995)도 225,846개의 정자분석에서 0.43%의 무염색체와 0.23%의 이염색체 빈도를 관찰하여 Bischoff 등과 다소 비슷한 결과를 보고하였다. Chevret 등 (1995)만이 기초적인 모든 자료를 제시하였다. 그러므로 현재에는 인간정자에서 총 염색체 수 이상 빈도 혹은 이중 염색체 수 이상을 가지는 정자의 빈도를 직접 계산하기에 정확한 양의 자료는 미비한 실정이다.

Two-color 및 three-color FISH를 이용한 12편의 연구에서 무염색체에 대한 자료의 빈약함과는 반대로 이염색체 빈도는 폭넓게 잘 정돈되어 있다. 개개 상염색체의 이염색체 빈도는 0.06에서 0.26%이고 성염색체의 평균 이염색체 빈도는 0.4% 이다. 만약에 무염색체와 이염색체의 빈도가 동일하게 발생한다면, 즉 이염색체 빈도의 2배는 염색체 수 이상 빈도와 같다는 가설을 설정한다면 총 염색체 수 이상 빈도를 계산할 수 있다.

이 계산법에 의하면 정상인에서 7.5%의 정자가 염색체 수 이상이다. 만약에 총 염색체 수 이상 빈도를 Martin과 Rademaker (1995)의 conservative scoring criteria를 이용한 연구에 한정시킨다면 정상인에서 6.6%의 정자에서 염색체 수 이상이 검

색된다.

만약에 Bischoff 등 (1994)과 Martin 등 (1995b)의 보고와 같이 무염색체 빈도가 이염색체 빈도에 비해 좀더 일반적이라면 이 계산치는 과소평가 되었을 것이다. 저자 (Pang, 1996a)는 two-color 및 three-color FISH를 이용한 13편의 논문을 고찰하였는데 지금까지 연구된 19개의 염색체의 평균 이염색체 빈도를 이용하여 그들이 개발한 등식에 의거 총 염색체 수 이상 빈도를 계산한 결과 약 6.6에서 7.5%의 정자가 염색체 수 이상을 보였다. 이는 SPA 후 발생한 정자전핵의 세포유전학적 결과에 비해 약 3배 높은 결과이다.

FISH 결과는 보고자간에 심한 변이를 나타내고 있다. 이러한 심한 변이 때문에 몇몇 보고자들은 인간정자에서 FISH를 이용한 염색체 수 이상 빈도의 정확성에 대해 회의론적 의견을 제시하고 있다. 그러나 실제로 이러한 문제는 시행방법의 차이, 염색체 수 이상 산정기준의 차이 및 FISH 시행 후 형광 signal의 scoring criteria 차이에 기인한다. Scoring시 특정 염색체에 대하여 두 개의 형광 signal이 발현되었을 때 이 signal이 실제로 2개인가 혹은 인위적인 것인가를 구분하기가 어렵다. Martin과 Rademaker (1995)는 두 개의 signal을 발견했을 경우 두 signal간의 거리차에 의해 1 domain과 1/2 domain criteria에 의해 이염색체를 분석하였다. 분석한 결과 1/2 domain에 비해 1 domain criteria를 이용한 경우 이염색체 빈도가 현저히 감소하였다. 그러므로 그들은 두 개의 signal을 발견시 두 signal의 거리가 1 domain 미만일 때는 한 개의 signal로 간주하였다.

저자 (1996a)도 그들과 유사한 scoring criteria를 소개하였다. 이 방법은 정자핵이 과탈응축 (over-decondensed) 되어있지 않고, 정자핵끼리 겹치지 않은 정자핵 중 선명한 형태를 유지하는 정자만의 signal을 score한다. 만약에 특정 염색체에 대한 두개의 signal을 발견시 두 signal의 거리가 1 domain 이상일 경우 특정염색체에 대한 이염색체로 판단하고 두 signal의 거리가 1 domain 미만일 경우 한 개의 signal로 판단한다.

SPA 시행 후 발생한 정자전핵의 세포유전학적 결과와 FISH 결과의 연관성을 얻기는 매우 어렵다. SPA 시행 후 발생한 정자전핵의 세포유전학적 결과는 성공적으로 햄스터 난자를 침투하여 탈응축할 수 있는 정자 즉 수정능력을 가진 정자의 세포유전학적 접근이고 반대로 FISH는 사출된 모든 정자를 대상으로 한다. 만약에 염색체 수 이상이 정자의 수정능력에 영향을 미치지 않고 저자 (Pang et al., 1995)에 의해 계산된 평균 염색체 수 이상 빈도가 맞다면 두 연구의 결과는 서로 일치한다. SPA기법에 의한 핵형결과를 분석하여 보면 4.7%의 염색체 수 이상 빈도를 얻게된다. 저자 (Pang et al., 1995)의 결과에 의하면 정상인 정자의 FISH 시행 후 염색체 수 이상 빈도는

5.3% 이다.

저자 (Pang et al., 1994)는 남성불임증 중 가장 극심한 경우의 하나인 희소무력기형정자증 (oligoasthenoteratozoospermia; 이하 OAT로 약함) 환자 15명의 정자에서 FISH기법을 이용하여 염색체 1번과 성염색체의 수 이상 (aneuploidy) 빈도가 정상 가임군 정자에 비해 현저히 증가되었음을 보고하였다. 이는 OAT환자에서 감수분열 불분리 (meiotic nondisjunction) 현상이 정상인에 비해 현저히 증가되었음을 시사하는 결과이다.

Moosani 등 (1995)은 정상적인 체세포 핵형을 가지는 5명의 불임남성에 있어서 정자핵형 분석 및 FISH를 이용하여 염색체 1번, 12번 및 성염색체의 수 이상 빈도를 분석하였다. FISH 결과는 저자 (Pang et al., 1994)와 비슷하였으며 정자핵형 분석에서도 염색체의 수 이상 빈도가 정상인에 비하여 현저히 증가되었음을 보고하였다.

또한 저자 (Pang, 1996a,b,c)는 OAT환자에서 좀 더 명확한 유전적 구성을 이해하기 위하여 FISH 기법을 이용하여 염색체 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21번 및 성염색체의 수 이상 빈도 및 총 염색체 수 이상 빈도를 조사하였다. 44 명의 OAT 환자정자의 총 염색체 수 이상 빈도는 33-74%로 정상인 정자의 총 염색체 수 이상 빈도 4.1-7.7%에 비해 현저히 높았다. 한가지 주목할만한 점은 대상환자인 불임남성에서 체세포의 핵형검사는 모두 정상이었다는 것이다.

OAT 환자 정자의 높은 염색체 수 이상 빈도는 시험관 아기 시술시 swim-up처리에 의해 감소되지 않았으며, 다만 이배성 (diploid) 정자의 빈도는 swim-up 방법에 의해 현저히 감소되었다 (Pang, 1996d). 또한 OAT를 동반하지 않는 남성불임 환자 정자에서 염색체 18번 이염색체 (disomy) 빈도가 정상인에 비해 유의적으로 높았으며 특히 흥미로운 현상은 swim-up 시행 후 상층액에서의 염색체 18번 이염색체 빈도가 정액이나 정자과 (sperm pellet)에서 보다 현저히 증가되었다는 사실이다 (Francisco et al., 1998). 이는 18번 이염색체를 가지는 정자의 운동성 속도가 다른 정자에 비하여 빠르므로 난자와 결합할 기회를 더 가지게 된다는 사실을 간접적으로 시사한다.

OAT 환자 및 정상인의 정자에서 성염색체 수 이상 빈도의 증가를 제외하고는 염색체 손실 혹은 증가의 일정한 양상은 관찰할 수 없었다. 또한 상염색체 결과에서 특정 염색체의 수 이상과 수정 및 착상과의 분명한 연관성도 관찰할 수 없었다 (Pang, 1996c).

이와같은 결과는 Tournaye 등 (1995), In't Veld 등 (1995), Hoegerman 등 (1995) 및 Van Opstal 등 (1997)에 의해 직·간접 제시된 남성불임 환자 정자의 높은 성염색체 수 이상의 빈도와도 잘 일치된다. 특정 상염색체의 불분리 빈도도 높게 관찰되었는데 이러한 정자에 의해 수정된 배아는 아

마도 생존할 가능성이 희박할 것이다.

그러므로 저자 (Pang, 1996c)는 남성불임 환자에서 보조생식술 시행전 정자의 세포유전학적 연구가 선행되어야 하며 보조생식술에 의하여 발생한 배아에서도 염색체 수 이상, 특히 성염색체 수 이상을 진단하기 위한 착상전 유전진단의 필요성을 제시하였다.

46,XY/45,X의 핵형을 가지는 mosaicism 환자 정자에서 성염색체와 상염색체 이염색체 (disomy) 빈도가 정상인에 비하여 크게 증가되어 있다는 보고도 있다 (Newberg et al., 1998). 또한 (1;11) 상호전위를 가지는 환자의 정자 (Spriggs and Martin, 1994) 및 (2;4;8) 전위를 가지는 환자의 정자 (Lu et al., 1994)에서 해당 염색체에 대한 수 이상 빈도가 정상인에 비하여 현저히 증가되어 있다고 보고되고 있어 체세포 핵형분석시 전위 및 mosaicism을 보이는 환자의 경우 정자에서도 해당 염색체의 수 이상 빈도가 높을 것으로 생각된다.

### 인간 난자의 염색체 수 이상 및 다배성에 관한 연구

과거에는 체외수정 시술 후 수정에 실패한 난자만을 이용하여 간접적으로 염색체 수 이상 및 다배성에 관한 연구를 시행하여 왔다. 최근들어 미세조작술 및 FISH의 도입으로 체외수정시 채취된 난자의 제1극체 혹은 수정 후 제2극체를 생검하여 직접적인 자료를 얻고 있다 (Verlinsky & Kuliev, 1996).

난자 및 극체를 대상으로 유전진단을 시행하는 기술을 Preconception Genetic Diagnosis (이하 PCD라 약함)로 불리고 있다. PCD는 산전유전진단은 이미 유전질환이 이환된 태아 (affected fetus)의 인공유산을 피할 수 있는 선택사양으로 제시되고 있다. 이 기술은 특히 유산을 반대하는 집단에서 더욱 중요한 선택사양일 것이다.

이 기술은 과배란 유도 후 채취된 난자의 제1극체를 생검하여 정상적인 난자만을 보조생식술에 이용하는 기술이다. 제2극체의 부가적인 생검을 피하기 위하여 일반적으로 수정 후 제1극체와 제2극체를 동시에 생검하는 방법이 보편화되어 있다. 생검된 극체의 FISH는 주로 신생아에서 가장 흔히 관찰되는 염색체 수 이상으로 염색체 13번, 염색체 18번, 염색체 21번, 및 성염색체가 대상이 되고 있다.

착상전 배아의 30% 이상이 염색체 이상을 동반한다는 자료들이 보고되고 있어 보조생식술의 실패요인 중 가장 큰 부분을 차지하고 있다. 특히 보조생식술 시행시 환자 부부 중 여성이 전위를 가지고 있어 염색체 이상을 가지는 아이를 임신할 가능성이 높은 고위험군 및 다른 적응증 (나이가 든 여성, 반복유산 경험자 등)을 가지는 환자에서 PCD의 임상적인 가치가 크다. 이러한 고위

협군 극체의 FISH 시행 결과 여성측 원인에 의한 삼체성 (trisomy) 중 77.1%가 제1차 감수분열시 불분리 (nondisjunction)에 의하여 22.9%가 제2차 감수분열시 불분리에 의하여 발생한다 (Antonarakis et al., 1992).

Verlinsky 등 (1996)은 193명의 환자에서 PCD를 시행하였으며 생검된 극체 중 76.8%의 극체에서 FISH 결과를 얻을 수 있었다. 제1극체, 제2극체 및 제1과 제2극체의 염색체 수 이상 빈도는 각각 57.6%, 29.6% 및 12.8% 이었다 (표1). 대부분의 제1극체에서는 한 개 혹은 두 개의 염색체가 소실된 경우가 많았으며 (59.1%), 제2극체에서는 부가적으로 첨가된 염색체들이 많았다 (53.3%). 총 33%의 염색체 수 이상을 보고하였다.

Table 1. Results of preconception FISH analysis using probes for chromosomes X, 13/21, and 18.

Couples	Cycles	Total oocytes studied	Oocytes with FISH results	Normal oocytes	Abnormal oocytes
193	235	1293	993	665(67%)	328(33%)

(Verlinsky et al., 1996)

저자 (Pang et al., 1991)는 체외수정 후 수정에 실패한 난자에서 세포유전학적 연구를 시행하였는데 63%의 난자에서 염색체 수 이상을 발견하였다. 위의 Verlinsky 등 (1996)의 연구와 비교하여 볼 때 매우 높은 빈도임을 알 수 있다. 물론 수정에 실패한 난자에서의 빈도이므로 채취직후의 난자와는 차이가 있으리라 생각된다. 그러나 간과해서는 안될 문제는 Verlinsky 등 (1996)의 FISH 연구는 단지 염색체 13, 18, 21 및 X 염색체 단4개 염색체의 이상빈도만을 잊어선 안된다.

신생아나 배아에 있어서 염색체 수 이상은 여성측 (난자)에서 기원되는 경우가 많으나 남성측 (정자)에서 기원되는 것도 무시할 수 없다 (Verlinsky et al., 1997). PCD의 큰 결점은 염색체 수 이상의 남성측 기원에 대한 정보는 전혀 얻을 수 없다는 단점이 있어 PCD의 임상적 적용은 논쟁거리로 남아있다.

### 인간 착상전 배아의 염색체 수 이상 및 다배성에 관한 연구

착상전 배아의 생검된 할구에서 유전진단을 시행하는 기술을 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis; 이하 PGD로 약함) 이라 한다. 현재까지 나이와 연관된 염색체 수 이상을 검색하기 위하여 염색체 13, 18, 21과 성염색체 probe를 이용하여 FISH를 시행하고 있다.

1997년까지 413쌍의 부부에서 523예의 PGD가 시행되어 왔으며 주로 여성의 나이가 35세 이상일 경우가 대부분이다. 115예의 임신이 보고되었으며 그 중 56명의 정상아가 태어났다. 또한 8명의 전위를 가지는 환자에서 PGD가 적용되어 3명

의 정상아가 태어났으며 1예의 진행성 임신이 보고되고 있다 (Verlinsky et al., 1997).

초기 배아 중 8-세포기가 생검에 가장 적합한 것으로 알려져 왔다. 그 이유는 1) mitotic index가 가장 높으며 생검후 4-세포기에 비하여 빨리 손상을 극복하고 (Krzyminska et al., 1990), 2) 2개의 할구를 생검하여도 생존율에 큰 영향을 끼치지 않으며 (Hardy et al., 1990), 3) 내부세포괴 (inner cell mass)와 영양막외배엽 (trophectoderm)의 비율을 변화시키지 않고 (Hardy et al., 1990), 4) 1개 혹은 2개의 할구를 생검한 배아를 이식 후 임신 및 분만이 보고되고 있으며, 5) 8-세포기의 배아는 할구간에 연결이 잘되어 있어 생검 후 배아의 본래모양을 잘 유지하므로 배아 이식시 유리하고 (Dale et al., 1991), 6) 심지어 3개의 할구를 생검하여도 발생능에 영향을 끼치지 않기 때문이다 (Wilton et al., 1989). 반면에 4-세포기 혹은 8-세포기 배아할구의 PGD는 1) 단 1개 혹은 최대 3개의 할구만을 이용할 수 있으며, 2) mosaicism을 검색할 수 없고, 3) 체외수정 및 배아 이식이라는 상황에서 시간적으로 분열중기의 핵형을 얻기가 불가능하다는 단점이 있다.

배반포기의 배아는 내부세포괴와 영양막외배엽으로 분화되는데 영양막외배엽을 생검하여 PGD에 이용할 수 있다. 10개에서 30개 정도의 할구를 얻을 수 있으나 (Dokras et al., 1990) 10개 이상의 할구를 생검할 경우 배아의 hCG 생산을 현저히 감소시킬 수 있다.

Table 2. Morphological abnormalities related to chromosomal abnormalities.

Embryo Morphology	FISH Results	References(s)
Normal Morphology		
20 to 34 years old	16% abnormal	1
35 to 39 years old	37% abnormal	1
40 to 45 years old	53% abnormal	1
Dysmorphic Zygotes		
3PN after IVF	80-100% abnormal	2, 3
3PN after ICSI	100% abnormal	2, 3
Cleaving 1PN after IVF	34-50% abnormal	3, 4
Cleaving 1PN after ICSI	70-85% abnormal	3, 4
Uneven PNs	87% abnormal	5
Cleaving 0PN	43% abnormal	6
Dysmorphic Embryos		
Giant embryos (>200mm)	triploid	7
Dominant single blastomere	polyploid	7
>20% fragment with normal development	56% abnormal	8
Multinucleated embryos	74% abnormal	9

References- 1: Munne et al., 1995, 2: Cohen et al., 1995, 3: Staessen & Van Steirteghem, 1997, 4: Sultan et al., 1995, 5: Sadowy et al., 1996, 6: Manor et al., 1996, 7: Munne et al., 1994, 8: Munne, unpublished, 9: Kligman et al., 1996.

지금까지 시행된 연구결과 배아에서의 염색체 수 이상 빈도는 20%-40% 이다. 표2에서는 배아의 형태학적 특징에 따라 염색체 수 이상을 FISH

기법으로 검색한 결과이다.

표2에서 보듯이 정상적인 형태를 가지는 배아에서도 환자의 나이가 증가함에 따라 염색체 수 이상 빈도도 증가하는 것을 볼 수 있다. 비정상 형태를 가지는 배아의 경우 대부분의 배아가 염색체 이상을 가지고 있음을 알 수 있다.

표3은 본인이 체외수정 후 8-세포기 배아에서 1개의 할구를 생검한 후 FISH를 시행한 결과이다. 현재까지 염색체 13, 18, 21 및 성염색체 이상에 대한 제한된 정보만이 보고되고 있으나 본인은 염색체 1번과 16번을 추가하여 배아에서 염색체 이상 빈도를 검색하였다.

FISH의 효용성은 88%이었으며, 43%의 배아가 염색체 수 이상을 동반하고 있었다. 비정상 배아 중 삼체성 빈도가 일체성 빈도에 비하여 높았으며, 삼체성 중 염색체 16번 삼체성빈도가 가장 높았다 (Kearns et al., 1997).

Table 3. Results of PGD-FISH analysis using probes for chromosomes X, Y, 1, 13, 16, 18 and 21. References- 1: Murine et al., 1995, 2: Cohen

Total Blastomeres studied	Blastomeres with FISH Results	Normal Embryos	Abnormal Embryos
40	35 (88%)	20 (57%)	15 (43%)
	Trisomy 13 or 21	: 3	
	Trisomy 18	: 2	
	Monosomy X	: 3	
	XXY	: 1	
	Monosomy 13 or 21	: 1	
	Trisomy 16	: 4	
	Trisomy 1	:	

(Kearns et al., 1997)

## 결과 및 논의

서론에서 언급한 것과 같이 인간에서 정자, 난자 및 착상전 배아의 염색체 이상은 전반적인 생식현상에 악영향을 끼친다. FISH 기법의 도입으로 주로 세포분열 간기에 있는 생식세포에서 폭넓은 정보를 얻기 시작하였다.

정자, 난자 및 생식세포에서 얻어진 염색체 수 이상 빈도는 예상보다 훨씬 높았다. 이 이상은 보조생식술 시행시 그 효용성을 감소시킬 수 있으며, 그 이상이 후대로 전파될 위험성이 있다.

정자 혹은 난자 수준에서의 유전진단 보다는 두 생식세포가 결합되어 두 생식세포로부터 유래된 유전구성을 반영하는 배아수준에서의 유전이상 검색이 더욱 효과적일 것이다.

배아수준에서의 정확한 유전이상 검색법이 설정된다면 1) 산전진단 후 인공유산율 감소시킬 수 있으며, 2) 보조생식술 시행시 유전적 이상 배아의 유산율을 감소시킬 수 있어 임신율을 증진시킬 것이며, 3) 배아이식시 이식 배아의 수를 감소시키므로 다태임신을 감소시킬 수 있을 것으로

생각된다.

향후에는 생식세포 및 착상전 배아의 염색체 이상 진단의 정확성을 높여야 하며, FISH의 효용성을 증진시켜야 한다. 특히 염색체 수 이상 검색시 일반적으로 흔히 관찰되는 염색체에만 국한할 것이 아니라 그 외의 염색체에 대한 검색 또한 중요할 것으로 생각된다. 유전이상과 생식현상과의 폭넓은 연구가 시급한 실정이나, 이 기술을 임상적용하기전 고려하여야 할 여러문제 (윤리문제, 환자의 경제적 부담)가 남아 있다.

## 요 약

Tremendous progress has been made over the past quarter-century studying the genetics of gametogenesis and the resulting gametes and embryos. Studies merging molecular techniques and conventional cytogenetics are now beginning to bridge the gap between what we have learned about the meiotic process in males and females and what we know of the mitotic chromosomes of zygotes.

Numerical abnormalities in sperm, oocytes and embryo can now diagnosed by fluorescence in situ hybridization (FISH). "At risk" couples can, therefore, have only unaffected embryos replaced in the uterus and avoid the possibility of terminating a pregnancy that might only be diagnosed as affected later gestation.

Single-cell genetic analysis has also provided powerful tools for studying genetic defects arising during early human development. Recent studies of sperms, oocytes and cleavage-stage human embryos have revealed an unexpectedly high incidence. These genetic abnormalities are likely to contribute to early pregnancy loss and have important implications for improving pregnancy rates in infertile couples by assisted reproduction.

The widespread use of preimplantation genetic diagnosis (PGD) awaits further documentation of safety and accuracy. Other issues also must be addressed. First, the ethical issues regarding germ cell and embryo screening must be addressed including what diseases are serious enough to warrant the procedure. Another concern is the use of this technology for non-genetic disorders such as gender selection. Finally, the experimental nature of these procedure must continually be discussed with patients, and long-term follow-up studies must be undertaken. Development of more accurate and less expensive assays coupled with improved assisted reproductive technology success rates may make PGD a more widely use clinical tool. The future awaits these development.

**Key words:** FISH, aneuploidy, preimplantation

embryo, sperm, oocyte, preimplantation genetic diagnosis

#### 참고문헌

- Antonarakis SE, Peterson MB, and McInnis MG (1992) The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: Determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 50: 544.
- Bischoff FZ, Nguyen DD, and Burt KJ (1994) Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 66: 237.
- Chevret E, Rousseaux S, and Monteil M (1995) Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet* 71: 126.
- Cohen J, Levron J, and Palermo G (1995) Atypical activation and fertilization patterns in humans. *Theriogenology* 43: 129.
- Coonen E, Pieters MHEC, and Dumoulin JCM (1991) Nonisotopic in situ hybridization as a method for nondisjunction studies in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 28: 18.
- Dale B, Gualtieri R, and Talevi R (1991) Intercellular communication in the early human embryo. *Mol Reprod Dev* 29: 22.
- Dokras A, Sargent IL, and Ross C (1990) Trophoblast biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 5: 821.
- Francisco RG, Newberg MT, and Pang MG (1998) Determining aneuploidy, somatic cell karyotypes, and Y chromosome deletions in four infertile, non-oligoteratozoospermic (OAT), males undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Fertil Steril* (in press).
- Guttenbach M and Schimid M (1990) Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 46: 553.
- Hardy K, Martin KI, and Leese HJ (1990) Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 5: 708.
- Hoegerman SF, Pang MG, and Kearns WG (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346: 1095.
- In't Veld P, Brandenburg H, and Verhoeff A (1995) Sex chromosome abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346: 773.
- Kearns WG, Franzitta M, and Gitlin S (1997) Numerical abnormalities for chromosomes 1, 13, 16, 18, 21, X and Y from 40 preimplantation embryos using seven-probe, multiprobe fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 61: 73.
- Kearns WG, Hoegerman SF, and Pang MG (1996) Chromosomes of human spermatoocytes, sperm and the male pronucleus, In: Acosta AA, Kruger TF (eds.) Human spermatozoa in assisted reproduction, New York: Parthenon Publishing, pp 333-343.
- Kearns WG and Pearson PL (1994) Fluorescence in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. In: Choo KHA (ed.), Methods in molecular biology, New York: Humana Press Inc, pp 15-22.
- Kligman I, Benadiva C, and Alikani M (1996) The presence of multinucleated blastomeres in human embryos correlates with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 11: 1492.
- Krzyminska UB, Lutjen J, and O'Neill C (1990) Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod* 5: 203.
- Lu PY, Hammitt DG, and Zinsmeister AR (1994) Dual color fluorescence in situ hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2;4;8)(q23;q27,q21). *Fertil Steril* 62: 394.
- Manor D, Kol S, and Lewit W (1996) Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 11: 2502.
- Martin RH and Rademaker A (1995) Reliability of aneuploidy estimates in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two different scoring criteria. *Mol Reprod Dev* 42: 89.
- Martin RH, Spriggs E, and Ko E (1995) The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet* 57: 1395.
- Moosani N, Pattinson HA, and Carter MD (1995) Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 64: 811.
- Newberg MT, Francisco RG, and Pang MG (1998) Cytogenetics of somatic cells and sperm from a 46,XY/45,X mosaic male with moderate oligoasthenoteratozoospermia (OAT). *Fertil Steril* 69: 146.
- Pang MG (1996a) Theoretical considerations and a comparison of FISH data with the results of studies of the chromosomes of male pronuclei.

- In: Pang MG (ed.), Numerical chromosome abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients and fertile males. Norfolk: Eastern Virginia Medical School Ph D Thesis, pp 29-46.
- Pang MG (1996b) Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X, Y and diploidy in sperm from fertile men. In: Pang MG (ed.), Numerical chromosome abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients and fertile males. Norfolk: Eastern Virginia Medical School Ph D Thesis, pp 47-68
- Pang MG (1996c) Detection of aneuploidy by fluorescence in situ hybridization (FISH) in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients undergoing ICSI. In: Pang MG (ed.), Numerical chromosome abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients and fertile males. Norfolk: Eastern Virginia Medical School Ph D Thesis, pp 69-100.
- Pang MG (1996d) Detection of aneuploidy using fluorescence in situ hybridization (FISH) in sperm from ICSI patients with oligoasthenoteratozoospermia after isolation of the motile sperm fraction. In: Pang MG (ed.), Numerical chromosome abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients and fertile males. Norfolk: Eastern Virginia Medical School Ph D Thesis, pp 101-128.
- Pang MG, Oh SK, and Hwang DY (1991) A new technique for the cytogenetic study of human oocytes. *Seoul J Med* 32: 155.
- Pang MG, Ryu BY, and Moon SY (1994) Aneuploidy detection for chromosomes 1, X, and Y by fluorescence in situ hybridization in human sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients. *Am J Hum Genet* 55: 644.
- Pang MG, Zackowski JL, and Hoegerman SF (1995) Detection by fluorescence in situ hybridization of chromosome 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y aneuploidy in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients of an in vitro fertilization program. *Am Hum Genet* 57: 680.
- Rudak E, Jacobs PA, and Yanagimachi R (1978) The chromosome constitution of human spermatozoa: a method of direct chromosome analysis. *Nature* 274: 911.
- Sadowy S, Alikani M, and Walmsley R (1996) Impaired development of monospermic zygotes with distinctly uneven pronuclei. *Fertil Steril Suppl*: S37.
- Spiggs EL and Martin RH (1994) Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11)(9p36.3;q13.1), by two-color fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 38: 247.
- Staessen C and Van Steirteghem AC (1997) The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12: 321.
- Sultan KM, Munne S, and Reign A (1995) Ploidy assessment of embryos derived from single-cytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 10: 132.
- Tournaye H, Liu J, and Nagy J (1995) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): The Brussels Experience. *Reprod Fertil Dev* 7: 269.
- Van Opstal D, Los FJ, and Ramlakhan S (1997) Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 682.
- Verlinsky Y, Cieslak J, and Freidline M (1996) Polar body diagnosis of common aneuploidies. *J Assist Reprod Genet* 13: 157.
- Verlinsky Y and Kuliev A (1996) Preimplantation polar body diagnosis. *Biochem Mol Med* 58: 13.
- Verlinsky Y, Munne S, and Simpson JL (1997) Current status of preimplantation diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 14: 72.
- Wilton LJ, Shaw JW, and Trounson AO (1989) Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* 51: 513.