

염색체 이수성과 관련된 비정상적 임신이 예상되는 환자에서 착상전 유전진단의 결과

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과¹, 불임연구실², 유전학 연구실³

김진영¹ · 임천규² · 차선화¹ · 박수현¹ · 양광문¹ · 송인옥¹
전진현² · 박소연³ · 궁미경¹ · 강인수¹

Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy Screening in Patients with Poor Reproductive Outcome

Jin Yeong Kim¹, Chun Kyu Lim², Sun Hwa Cha¹, Soo Hyun Park¹, Kwang Moon Yang¹,
In Ok Song¹, Jin Hyun Jun², So Yeon Park³, Mi Kyoung Koong¹, Inn Soo Kang¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, ²Laboratory of Reproductive Biology and Infertility,

³Laboratory of Genetics, Cheil General Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine

Objectives: The risk of aneuploidies of embryos increases in advanced maternal age or parental karyotype abnormality and it results in poor reproductive outcomes such as recurrent spontaneous abortion (RSA) or repeated implantation failure (RIF). Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening (PGD-AS) can be applied for better ART outcome by selecting chromosomally normal embryos. The aim of this study is to evaluate the clinical outcome of PGD-AS and which group can get much benefit from PGD-AS among the patients expected to have poor reproductive outcome.

Methods: In 42 patients, 77 PGD cycles were performed for aneuploidy screening. Patients were allocated to 3 groups according to the indication of PGD-AS: group I-patients with old age (≥ 37) and RIF more than 3 times ($n=11$, mean age=42.2 yrs.), group II-patients with RSA (≥ 3 times) associated with aneuploid pregnancy ($n=19$, mean age=38.9 yrs.), group III-parental sex chromosome abnormality or mosaicism ($n=18$, mean age=29.6 yrs.) including Turner syndrome, Klinefelter syndrome and 47,XYY. PGD was performed by using FISH for chromosome 13, 16, 18, 21, X and Y in group I and II, and chromosome X, Y and 18 (or 17) in group III.

Results: Blastomere biopsy was successful in 530 embryos and FISH efficiency was 92.3%. The proportions of transferable embryos in each group were $32.5 \pm 17.5\%$, $23.0 \pm 21.7\%$ and $52.6 \pm 29.2\%$ (mean \pm SD), respectively, showing higher normal rate in group III (group II vs. III, $p < 0.05$). The numbers of transferred embryos in each group were 3.9 ± 1.5 , 1.9 ± 1.1 and 3.1 ± 1.4 (mean \pm SD), respectively. The clinical pregnancy rates per transfer was 0%, 30.0% and 20.0%, and it was significantly higher in group II (group I vs. group II, $p < 0.05$). The overall pregnancy rate per transfer was 19.6% (10/51) and the spontaneous abortion rate was 20% (2/10) of which karyotypes were euploid. Nine healthy babies (one twin pregnancy) were born with normal karyotype confirmed on amniocentesis.

Conclusion: Our data suggests that PGD-AS provides advantages in patients with RSA associated with aneuploidy or sex chromosome abnormality, decreasing abortion rate and increasing ongoing pregnancy rate. It is not likely to be beneficial in RIF group due to other detrimental factors involved in implantation.

Key Words: PGD, Aneuploidy, FISH, RIF, RSA

주관책임자: 강인수, Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Mook Jung-Dong 1-19, Chung-Ku, Seoul, 100-380, Korea.

Tel: (02) 2000-7581, Fax: (02) 2000-7790, e-mail: ikang67@yahoo.co.kr

*본 논문은 2005년 대한불임학회 제49차 추계학술대회 포스터부문 우수발표상을 수상하였음.

배아의 염색체 이수성은 착상실패 및 자연유산의 원인이 되며, 자연유산의 약 50~60%까지 염색체 이수성에 기인하는 것으로 보고되고 있다.¹² 배아의 이수성의 위험은 고령의 임신에서 증가되어, 고령에서의 착상실패나 자연유산과 관련되며,³⁻⁵ 습관성 유산의 원인으로서 배아 이수성은 특발성 유산에서 보다 빈도가 낮다고 보고되기도 하지만, 일정 부분 습관성 유산과 관련된다.⁶⁻⁸ 또한 터너 증후군이나 클라인펠터 증후군 등 성염색체 이상에서도 성선기능 부전으로 임신 확률이 매우 낮으며 임신의 경우 유산율도 매우 높는데, 이는 대부분 태아의 염색체 이상과 관련되는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 클라인펠터 증후군의 경우 특히 수술적 고환 정자채취술 (testicular sperm extraction, TESE) 및 세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)의 발전으로 보조생식술을 이용한 임신이 보고되고 있으나,^{11,12} 역시 채취되는 정자 및 배아의 이수성 위험이 제기되고 있다.^{13,14}

착상전 유전진단 (PGD: preimplantation genetic diagnosis)은 착상전의 배아에서 염색체 이상이나 유전자 이상을 진단하여 정상적인 배아만을 선별하여 이식할 수 있는 방법으로 지금까지 다양한 단일 유전자 질환이나 염색체 구조적 이상, 성염색체 이상 등에서 널리 시행되고 있다.^{15,16} 나아가 고령이나 습관성 유산 등 염색체 이수성의 위험이 높은 환자들에서 정상적인 배아를 선별 이식하면 착상율을 증가시키고 자연유산율을 감소시킬 수 있을 것으로 생각되어, 배아에서 발생하는 주요 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단이 시도되고 있다.^{17,18} 이에 본 연구에서는 염색체 이수성과 관련되어 불량한 임신 예후가 예상되는 환자들에서 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단의 결과를 분석하고, 가장 큰 효용성을 얻을 수 있는 적절한 환자군을 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1999년 5월 부터 2004년 12월까지, 42명의 환자, 77주기에서 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단을 시행하였다. 환자들은 착상전 유전진단을 시행하

게 된 주 적응증에 따라 3군으로 나누어, 제 1군은 37세 이상, 정상 염색체 핵형을 가지며, 체외수정에서 3회 이상 반복 착상실패를 한 반복 착상실패 (repeated implantation failure) 환자군 (n=6, 평균 나이 42.2±3.6세), 제 2군은 3회 이상의 습관성 유산 환자로 유산아의 염색체 이수성이 있었던 경우 (n=20, 평균 나이 39.6±3.6세), 제 3군은 성염색체 이상이나 모자이시즘을 갖는 환자로 하였으며 이들의 염색체 핵형은 45,X/46,XX, 47,XXX/45,X/46,XX, 47,XXY, 47,XYY, 47,XXY/46,XY, 48,XXXY/47,XXY/46,XY 등이었다 (n=16, 평균 나이 30.8±3.4세). 이들에게서 체외수정 시술 후 발달중인 배아로부터 1~2개의 할구 세포를 생검하여 FISH를 통한 착상전 유전진단을 시행하고 그 결과를 비교하였다. 통계학적 방법으로는 Chi-square test, ANOVA 분석을 이용하였다.

2. 난자의 채취 및 수정

과배란 유도는 Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist (Suprefact[®], Aventis, France, 또는 Leucrin[®], Abbott, France)를 이용한 황체기 중간 장기 요법을 이용하였다. FSH/hMG 제재로는 연구 초반기에는 highly purified Follicular stimulating hormone (Metrodin[®], Serono, Switzerland) 및 human menopausal gonadotropin (Pergonal[®], Serono, Switzerland)를 이용하였고 최근에는 recombinant FSH (puregon[®], Organon, Netherland 또는 Gonal-F[®], Serono, Switzerland)를 이용하였다. 초음파로 난포의 크기를 관찰하여 최소한 18 mm 이상의 난포가 2개 이상, estradiol 농도가 500 pg/ml 이상 되었을 때 human chorionic gonadotropin (Pregnyl[®], Serono, Switzerland) 10,000 IU를 주사하였고, hCG 투여 36시간 후 질식 초음파를 이용하여 난자채취를 하였다. 채취된 난자는 10% HSA가 첨가된 G-Fert[™] 배양액 (Vitrolife, Gothenburg, Sweden)에 넣어 37°C, 6%CO₂, 94% 공기 중 배양기에서 3~4시간 배양하였다. 배양 후 성숙된 난자에서 세포질내 정자주입술 (ICSI, Intracytoplasmic Sperm Injection)을 시행하였으며, 16~18시간 후에 수정을 확인하였다.

3. 할구의 분리와 핵의 준비

수정이 확인된 수정란은 G-1[™] version 3 배양액

(Vitrolife, Gothenburg, Sweden)에서 3일간 배양한 후 배아를 mineral oil로 덮은 biopsy media (MediCult, Denmark)에 이전하였다. 할구세포의 생검을 위해 30 µm의 pipette을 이용하여 acidified Tyrode 용액 (MediCult, Denmark)으로 투명대에 작은 구멍을 만들고, 같은 glass needle을 이용하여 조심스럽게 할구 세포를 흡인하여 생검하였다. 할구가 분리된 배아는 세척 후 G-2™ version 3 배양액 (Vitrolife, Gothenburg, Sweden)에서 37°C, 5%CO₂, 공기 중에서 배양하였다. 분리해낸 할구는 배양액으로 세척 후 hypotonic solution (0.5% sodium citrate in 0.4 mg/ml bovine serum albumin)에 이전하여 10초간 배양 후, Tween 20 용액내에 Superfrost plus 슬라이드에 옮겨 Tween 20 용액을 소량씩 계속 첨가하여 세포막이 터지도록 하였다. 슬라이드를 공기 중에서 완전히 건조시킨 후 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하고 건조시켰다. 슬라이드를 0.01% pepsin과 0.01 N HCl로 37°C에서 10분간 배양한 후, 실온에서 H₂O 및 1×PBS 용액으로 세척하였다. 그 후 1% paraformaldehyde에 4°C에서 10분간 두었다가 PBS 및 H₂O로 세척하고, 70, 85, 100% ethyl alcohol을 각각 2분씩 처리하여 탈수시켰다.

4. 할구세포에서 FISH의 시행과 결과 확인

염색체 13 (LSI 13 green), 16 (CEP 16 green, orange), 18 (CEP 18 aqua), 21 (LSI 21 orange), X (CEP X orange, aqua), Y (CEP Y green, aqua)에 대한 FISH probe (Vysis, Inc, Illinois, USA)를 이용하였고, 성염색체 이상을 가진 군에서는 X, Y와 18 또는 17번 염색체에 대한 probe를 이용하였다. 10 microliter의 probe 혼합액을 12 mm 원형 cover glass에 넣고, 할구의 핵이 준비된 slide glass에 올려놓고 rubber cement로 밀봉하였다. DNA의 denaturation은 75°C hot plate에서 10분간 시행한 후 humidified chamber에서 37°C에서 overnight으로 hybridization 시켰다. Hybridization 후 50% formamide/2X SSC, 2X SSC로 42°C에서 10분간 세척하여, 잔여 probe를 제거하였다. 세척 후 125 ng/ml DAPI가 첨가된 Vectashield mounting medium (Vysis, USA)을 각 슬라이드에 첨가하고 22×22 mm cover slip을 덮었다. 10분 후 형광현미경 (Optiphot-2, Nikon)으로 ×1,000 배율로 FISH signal을 확인하였다. 결과 확인시 2개 이상의 signal이 근접해 있을 경우에 2 signal의 거리가 signal 크기의 2배 이상이면 2개의 signal로, 2배 이하이면 한 개의 signal로 판정하였다.¹⁹ 정상으로 판정된 배아를 난자채취 4일째

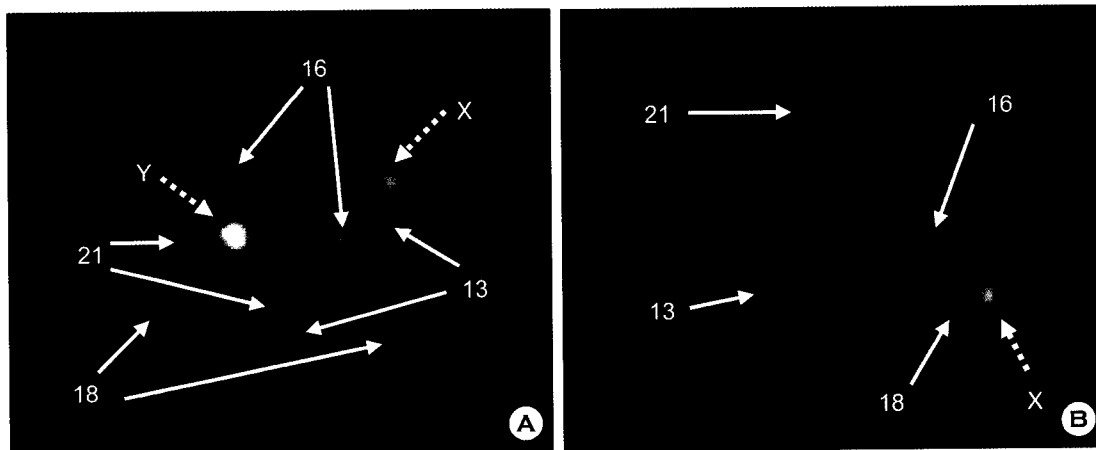


Figure 1. FISH signals in the blastomeres in preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening. **A)** Euploidy embryo showing two green signals for chromosome 13 (LSI 13), two aqua signals for 18 (CEP 18), two orange signals for 21 (LSI 21), two green/orange signals for 16 (CEP 16 green/orange), one orange/aqua signal for X (CEP X orange/aqua), and one green/aqua signal for Y (CEP Y green/aqua). **B)** Abnormal embryo showing FISH signals of one green signal for chromosome 13, one aqua signal for 18, one orange signal for 21, one green/orange signal for 16, and one orange/aqua signal for X, indicating monosomy.

Table 1. Results of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening

	Group I	Group II	Group III
No. of patients	6	20	16
Age	42.2±3.6	39.6±3.6	30.8±3.4*
No. of cycles	11	41	25
No. of transfer cycles	11	20	20
Transferable embryo rate (%)	32.5±17.5	23.0±21.7	52.6±29.2*
No. of transferred embryo	3.9±1.5	1.9±1.1	3.1±1.4
Clinical PR (%) per transfer	0 (0/11)	30.0* (6/20)	20.0 (4/20)
Implantation rate (%)	0 (0/43)	21.6* (8/37)	6.0 (4/62)
Abortion rate (%)	0	33.3 (2/ 6)	0
Delivery rate (%) per transfer	0 (0/11)	20.0 (4/20)	20.0 (4/20)

Values are mean ± SD. RP: pregnancy rate. *: p<0.05

에 자궁내 이식하였다.

결 과

총 548개의 배아에서 할구 생검을 시도하여 530개 배아에서 성공적으로 할구의 생검이 가능했으며 (96.7%), 이중 FISH 분석으로 진단이 가능하였던 경우가 489개로 FISH 효율은 약 92.3%였다. 각각의 FISH signal을 분석하여 배아의 이수성을 진단하여 정상으로 진단된 배아를 이식하였다 (Figure 1). FISH 상 염색체 이상으로 진단된 배아들의 경우를 보면, 하나의 염색체 이상을 보인 경우가 46.5%, 두 개의 염색체에 대해 이상을 보인 경우가 37.6%, 세 개의 염색체 이상을 보인 경우가 10.9%, 네 개의 염색체 이상을 보인 경우가 4.0%, 진단한 다섯 개의 염색체에 대해 동시에 모두 이상을 보인 경우도 1.0%였다. 착상전 유전진단의 임상적 결과는 Table 1과 같다. 전체 배아 중 FISH 진단 상 정상 염색체를 가진 경우로 진단된 배아의 비율은 각각 제 1군에서 32.5±17.5 (%), 제 2군에서 23.0±21.7 (%), 제 3군에서 52.6±29.2 (%)로 습관성 유산 환자군에서는 의미있게 낮게 나타났으며, 성염색체 이상 환자들에서는 정상 배아율이 의미있게 높았다. 총 10주기에서 임상적 임신이 이루어져, 전체적으로 이식 주기당 임상적 임신율은 19.6% (10/51)였으며 착상율은 8.5%였다. 각 군별로는 제 1군에서는 임신된 예가 없었

Table 2. Confirmation of pregnancy outcome of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening

Case	Age	Indication	Outcome	Karyotyping
1	36	RSA	Term delivery	46,XY
2	42	RSA	Term delivery	46,XY
3	38	RSA	Miscarriage	46,XX*
4	38	RSA	Miscarriage	46,XX*
5	38	RSA	Term delivery	46,XX
6	36	RSA	Term delivery, twin	46,XX and 46,XY
7	24	47,XXY	Term delivery	46,XY
8	29	47,XXY	Term delivery	46,XX
9	33	47,XXY	Term delivery	Not done
10	38	Turner mosaic	Term delivery	46,XX

RSA: recurrent spontaneous abortion.

*: karyotyping of abortus, 2 miscarriages in the same patient.

고, 제 2군에서 30%, 제 3군에서 20%로 나타났다. 습관성 유산이군 중 한 환자에서 두 번의 임신이 모두 유산이 되어 유산율은 20% (2/10)를 나타냈으며, 유산아의 염색체 핵형은 정상이었다. 임신이 진행된 8예에서 모두 임신 16주경 양수검사를 시행하여 착상전 유전진단 결과를 확인하였으며, 모두 정상으로 판명되어 만삭 분만을 하였고, 이중 1예는 쌍

태임신으로 총 9명의 건강한 정상아가 출생하였다 (Table 2).

고 찰

배아의 염색체 이수성은 배아의 착상실패나 유산, 기형아 출생을 초래하며 고령이나 반복적인 착상실패, 성염색체 모자이시즘이나 염색체 전좌에서 위험이 증가된다. 체외수정 전 극체 생검을 통한 난자의 염색체 검사상 35세 이상의 고령에서는 난자의 염색체 이수성 비율이 33~43% 정도로 높아 유전적 진단이 필요하며,²⁰ 비정상적인 발달 양상을 보이는 배아에서는 약 70%에서 염색체 이상이 있으며, 정상적으로 발달하는 배아라도 고령이나 반복 착상실패 환자의 배아에서는 57% 정도에서, 특히 40세 이상에서는 대부분 염색체 이상을 갖는 것으로 보고되고 있다.^{21,22}

착상전 유전진단은 착상전의 배아에서 염색체 이상이나 유전자 이상을 진단하여 정상적인 배아만을 선별하여 이식할 수 있는 방법이다. 유전병에 이환된 배아의 착상 예방을 위해 시행된 이래,²³ 지금까지 다양한 단일 유전자 질환이나 염색체 구조적 이상, 성염색체 이상 등에서 유전병을 예방과 자연유산율 감소의 효과를 얻는 방법으로 그 시행이 증가되고 있다.²⁴ 최근에는 그 적용이 점차 확대되어, 습관성 유산이나 염색체 이수성의 위험이 높은 고령 임신, 반복 착상실패 등에서 염색체 이수성에 기인한 착상실패와 자연유산을 감소시켜 임신 유지율을 향상시키기 위해 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단이 시행되고 있다.^{17,18} 특히 35세 이상의 고령에서 체외수정시 착상전 유전진단으로 임신율의 유의한 증가는 없으나 자연유산율을 유의하게 감소시키는 효과가 있다고 보고되었다.^{25,26} 본 연구에서는 고령이나, 염색체 이수성과 관련된 습관성 유산, 반복 착상실패 등 염색체 이수성과 관련되어 불량한 임신 예후가 예상되는 환자들에서 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단의 결과를 살펴보고 어떤 경우에서 가장 큰 효용성을 얻을 수 있는지 알아보고자 하였다. 그 결과 착상전 유전진단으로 정상적인 임신을 얻을 수 있었고, 유산율도 20% 정도로 일반 집단의 수준으로 낮출 수 있었다. 특히 이러한 효과는 염색

체 이수성과 관련된 습관성 유산과 성염색체 이상에서 큰 효용성이 있는 것으로 생각된다. 습관성 유산군에서는 환자의 나이가 고령 (평균 39.6세)임을 감안하더라도 특히 정상 배아율이 23.0%로 다른 군에 비해 낮아, 이러한 환자들에서 염색체 이수성과 관련되어 정상적인 임신 확률이 낮을 것을 예상할 수 있다. 따라서 이러한 환자군에서 염색체 이수성을 스크리닝 함으로써 정상적인 임신결과를 얻는데 효용성이 클 것으로 생각된다. 그러나 1예에서 정상 염색체 핵형을 갖는 자연유산이 2회 연속 발생하여, 이들에서 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단으로 유산의 예방에 한계점이 있으며, 유전적 요인 이외의 인자들에 의한 영향도 고려되어야 할 것으로 생각된다. 비정상적으로 진단된 배아들의 염색체 이상의 양상에 있어서는 두 개 이상의 염색체에 대해 동시에 이상을 갖는 배아들도 많이 나타났으며 특히 5개 모두 이상을 나타낸 경우도 1% 정도로, 복합적인 비정상을 나타내는 배아들이 많음을 알 수 있었다. 반복 착상실패 군에서는 임신된 예가 없었는데, 환자군이 매우 고령이었으며 반복적인 착상실패에 관련되는 다양한 요인들이 복합적으로 관련되어 염색체 이수성 스크리닝만으로 효과를 얻지 못한 것으로 생각된다. 그러나 시행된 예가 너무 적고 환자의 나이가 매우 고령 (평균 42.2±3.6세)이었으므로, 추후 적절한 연령기준을 설정하여 더 많은 예에서 연구가 필요할 것으로 생각된다.

염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단에 대해서 아직 명확한 전향적 무작위 연구가 없고, 체외수정 시행 시 염색체 이수성에 대한 스크리닝으로 착상율과 임신율이 기대만큼 현저히 증가되지 않는다는 논란도 있다.²⁷ 그 제한점으로는 FISH로 스크리닝할 수 있는 염색체의 수가 제한적이며, 배아의 할구 생검이나 생검된 배아의 배양에서 배아의 발달에 영향을 받을 수 있고, 배아의 모자이시즘이 있을 수 있어 FISH 진단의 정확성에 영향을 줄 수 있다는 점들이 제기되고 있다.²⁷ 또한 원인불명의 습관성 유산 환자들에서 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단을 시행하여 유의한 효과가 없었으며, 원인이 매우 이질적인 환자군을 대상으로 시행하는 것은 큰 효과가 없을 것으로 생각된다.²⁸ 습관성 유산에서 염색체 이수성과의 관련성을 살펴보면, 산발적 유산과

습관성 유산에서 다음 임신시 염색체 이수성을 비교한 결과 산발적 유산에서는 42.1%에서, 습관성 유산에서는 약 25.4%에서 염색체 이수성이 나타나, 산발적인 유산에서 염색체 이수성 발생률이 더 높고 습관성 유산에서 반복적인 염색체 이수성이 반복적으로 나타나는 경우는 일부에 국한된다고 보고되기도 하며,⁸ 2~4회의 습관성 유산에서는 약 60%에서 염색체 이수성을 보이고 4회 이상의 습관성 유산에서는 염색체 이수성이 29% 정도로 낮으며, 35세 이하에서는 정상 염색체를 갖는 유산이 많고 35세 이상에서는 이수성과 관련된 유산이 증가되는 것으로 보고되고 있다.²⁹ 따라서 염색체 이수성이 원인이 되는 일부군에서 착상전 유전진단이 큰 효과를 얻을 수 있을 것이다. *Stuessen* 등³⁰은 37세 이상의 고령에서 포배기 배아 이식만 시행한 경우와 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단과 함께 포배기 배아 이식을 시행한 경우를 전향적으로 비교한 결과, 정상 배아율은 36.8%였으며 착상전 유전진단을 한 경우에서 이식된 배아의 수는 적었지만 포배기 배아 이식의 경우와 착상율이나 임신율은 차이가 없었다. 따라서 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단은 이식하는 배아의 수가 제한되거나, 다태임신을 피하기 위해 배아를 선별해야할 경우에서 특히 유용하다고 보고하였다. 또한 반복적인 태아의 염색체 이수성이나 고령에서는 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단이 효과적인 것으로 알려지고 있으며,³¹ 특히 38세 이상이나 비정상적 염색체 핵형을 갖는 경우, 3회 이상 체외수정 실패시 착상전 유전진단으로 착상율을 증가시킬 수 있다고 보고되기도 하였다.³² 또한 고령이 아닌 35세 이전에서도 염색체 이수성을 가진 임신의 과거력이 있었던 경우에는 배아의 염색체 이수성 비율이 37.4%, 반복 착상실패군에서는 약 27% 정도로 증가된다고 보고된 바 있어,³³ 염색체 이수성과 관련되어 습관성 유산이 예상되거나 고령 등 적절한 환자군을 대상으로 시행한다면 착상전 유전진단으로 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

착상전 유전진단에서는 단일 세포에서 FISH를 이용하므로 진단하는 염색체가 제한적인데, 일반적으로 자연유산에서 발견되는 염색체 이수성의 약 70%는 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y 등으로 알려지고

있다. 이들에 대한 착상전 유전진단시 고령이나 습관성 유산, 반복 착상실패 등의 환자에서 정상 배아율이 약 42% 정도였으며, 유산율을 일반군에서와 유사하게 감소시킬 수 있다.³⁴ 또한 나이 증가에 따라 현저히 이수성이 증가되는 염색체는 1, 15, 17, 21, 22번으로 보고된 바 있어,³⁵ 35세 이상에서 9개의 염색체, 즉 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y 외에 1, 7, 14 또는 17를 대상으로 착상전 유전진단을 시행하여 유의하게 착상율을 증가시킬 수 있으며, 이때 수정란의 개수가 8개 이상이고 반복 착상실패가 아닌 경우에서 특히 착상율의 향상을 보이며 유산율도 감소될 수 있어,³⁶ 진단 염색체 수를 최대한 증가시키면 그 효과를 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 *Kahraman* 등³⁷은 남성요인으로 ICSI를 시행하는 경우 착상전 유전진단으로 고령과 반복 착상실패군에서 유사한 임신율을 얻을 수 있어 두 군에서 모두 효과적으로 적용될 수 있다고 하였다.

한편, 성염색체 모자이시즘에서의 배아 이수성 증가 위험이 제기되고 있으며, 본 연구에서는 정상 배아율이 다른 군에 비해 비교적 높게 나타났지만, 착상전 유전진단시 염색체 이수성이 증가되며 성염색체뿐 아니라 오히려 상염색체의 이수성도 증가되는 것으로 알려져 있고,³⁸ 클라인펠터 증후군에서 나타난 비정상적인 배아들은 동시에 여러 염색체에 대해 이수성을 갖거나 *chaotic aneuploidy*가 나타나는 경우가 많다고 보고되었다.³⁹ 이외에도 착상전 유전진단을 통해 수술적 교환내 정자채취술이나 미성숙난자의 체외성숙시 염색체 이수성이 증가됨을 알 수 있고, 이전 주기의 정상 배아의 수에 따라 다음 주기 임신의 가능성을 예측할 수 있는 방법으로서도 효용성이 제시된 바 있다.⁴⁰

결론적으로 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단은 염색체 이수성에 기인하는 착상실패나 자연유산을 예방할 수 있는 방법으로서, 염색체 이수성과 관련되어 불량한 임신예후가 예상되는 적정한 환자군에서 시행하여 착상율을 증가시키고 자연유산을 감소시켜 보조생식술의 효율을 높일 수 있다. 특히, 이수성과 관련된 습관성 유산, 성염색체 모자이시즘 환자군에서 효용성이 클 것으로 생각된다. 추후 더욱 포괄적으로 염색체 진단을 할 수 있는 기법을 적

용하여 더 많은 예에서의 전향적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Simpson JL. Genes, chromosomes and reproductive failure. *Fertil Steril* 1980; 33(2): 107-16.
2. Sanchez JM, Franzi L, Collia F, De Diaz SL, Panal M, Cubner M. Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi. *Prenat Diag* 1999; 19: 601-3.
3. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 2185-91.
4. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 64: 382-91.
5. Kuliev A, Cieslak J, Ikewitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 oocytes in preimplantation diagnosis of age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 54-9.
6. Stern JJ, Dofman AD, Gutierrez-Najar MD. Frequency of abnormal karyotype among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1996; 65: 250-3.
7. Carp H, Toder V, Aviram A, Daneily M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2001; 75: 678-82.
8. Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Proter TF, Branch DW. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 784-8.
9. Tarani L, Lampariello G, Raguso F, Colloridi F, Pucarrelli I, Pasquino AM, et al. Pregnancy in patients with Turner's syndrome: six new cases with review of literature. *Gynecol Endocrinol* 1998; 12: 83-7.
10. Swapp GH, Johnston AW, Watt JL, Couzin DA, Stephen GS, et al. A fertile woman with non-mosaic Turner's syndrome. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96: 876-80.
11. Ron-El R, Friedler S, Strassburger D, et al. Birth of a healthy neonate following the intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 1999; 14: 368-70.
12. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Bern O, Ron-El R. Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16 (12): 2616-20.
13. Denschlag D, Tempfer C, Kunze M, Wolff G, Keck C. Assisted reproductive techniques in patients with Klinefelter syndrome: a critical review. *Fertil Steril* 2004; 82(4): 775-9.
14. Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munne S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003; 79(1): 30-8.
15. Harper JC, Boelaert K, GeraedtsJ, Harton G, Kearns WG, Moutou C, et al. ESHRE PGD consortium data collection V: Cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* 2006; 21(1): 3-21.
16. 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선, 등. 유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. *대한불임학회지* 2002; 29(4): 269-78.
17. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 2185.
18. Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2191-9.
19. Munne S, Marquez C, Magli C, Morton P, Morrison L. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 863-70.

20. Munne S, Sepulveda S, Balmaceda J, Fernandez E, Fabres C, Mackenna A, et al. Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenat Diagn* 2000; 20: 582-6.
21. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8(12): 2185-91.
22. Magli M, Gianaroli L, Munne S, Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor prognostic patients. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(5): 297-301.
23. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Edlhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; 18: 347-9.
24. Kuliev A, Verlinsky. Thirteen years' experience of preimplantation diagnosis: report of the Fifth international symposium on preimplantation genetics. *Reprod Biomed Online* 2003; 8(2): 229-35.
25. Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L. Positive outcome after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2191-9.
26. Munne S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J, et al. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006; 85: 326-32.
27. Hill David H. Ten years of preimplantation genetic diagnosis-aneuploidy screening: review of a multicenter report. *Fertil Steril* 2004; 82(2): 300-1.
28. Plateau P, Staessen C, Michiels A, Steirteghem AV, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005; 83(2): 393-7.
29. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002; 17: 446-51.
30. Staessen C, Platteau P, Assche EV, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004; 19(12): 2849-58.
31. Obasaju M, Kadam A, Biancardi T, Sultan K, Fateh M, Munne S. Pregnancies from single normal embryo transfer in women older than 40 years. *RBMonline* 2001; 2: 98-101.
32. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72(5): 837-44.
33. Munne S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004; 24: 638-43.
34. Munne S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L. Preimplantation diagnosis of the aneuploies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1459-66.
35. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombeta C, Boudjema E. The role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies. *RBMonline* 2001; 4.suppl.3: 31-6.
36. Munne S, Sandalina M, Escudero T, Velilla E, Walmesley R, Sadowy S. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *RBMonline* 2003; 7: 91-7.
37. Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakism K, Cengiz G, et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2000; 15(9): 2003-7.

38. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Feliciani E. Impact of parental gonosomal mosaicism detected in peripheral blood on preimplantation embryos. RBMonline 2002; 5(3): 306-12.
39. 김진영, 임천규, 전진현, 박소연, 서주태, 차선화, 등. 클라인펠터 증후군 환자에서 착상전 유전진단의 결과. 대한불임학회지 2004; 31(4): 253-60.
40. Ferraretti AP, Magli MC, Kopcow L, Gianaroli L. Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. Hum Reprod 2004; 19(3): 694-9.

= 국문초록 =

목적: 배아의 염색체 이수성은 착상실패나 자연유산과 관련되며 이는 고령이나 부부의 염색체 이상이 있는 경우 그 위험이 증가되어 습관성 유산이나 반복 착상실패 등 불량한 임신결과를 초래한다. 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단은 정상 염색체를 갖는 배아를 선별적으로 이식할 수 있으므로 이러한 환자들에서 효과적으로 적용될 수 있다. 이에 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단의 임상적 결과를 알아보고 어떠한 환자군에서 가장 큰 효용성을 얻을 수 있는지 알아보려고 하였다.

연구방법: 총 42명의 환자에서 77주기의 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단을 시행하였다. 환자군을 적응증에 따라 세 군으로 나누어 제 1군은 37세 이상이며 3회 이상 반복 착상실패를 보인 경우 (11예, 평균 나이 42.2세), 제 2군은 3회 이상의 습관성 유산 및 이 중 1회 이상 염색체 이수성을 보인 경우 (19예, 평균 나이 38.9세), 제 3군은 터너 증후군이나 클라인펠터 증후군, 47,XXY 등 성염색체 이상이나 모자이시즘을 가진 환자였다 (18예, 평균 나이 29.6세). 착상전 유전진단은 제1군과 2군에서는 13, 16, 18, 21, X, Y염색체에 대한 FISH를, 제 3군에서는 X, Y 및 18 또는 17번 염색체에 대한 FISH를 시행하였다.

결과: 총 530개의 배아에서 할구 생검이 가능하였고 FISH 진단 효율은 92.3%였다. 정상 배아의 비율은 각 군에서 32.5±17.5%, 23.0±21.7%, 및 52.6±29.2% (mean ± SD)였으며 제 3군에서 유의하게 높았다 (group II vs. III, p<0.05). 배아 이식은 51주기에서 시행하였으며 이식된 배아의 수는 각각 3.9±1.5, 1.9±1.1 및 3.1±1.4개 (mean ± SD)였다. 임상적 임신율은 각 군에서 0%, 30.0% 및 20.0%로 제 2군에서 유의하게 높았다 (p<0.05). 전체적인 임신율은 19.6% (10/51)였고 자연유산율은 20% (2/10)였으며 유산된 경우의 염색체는 정상이었다. 쌍태아 1예를 포함하여 총 9명의 정상아가 출생되었으며, 양수검사로 정상 염색체 핵형을 확인하였다.

결론: 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단은 염색체 이수성과 관련된 불량한 임신예후가 예상되는 환자에서 유용하게 이용될 수 있으며, 특히 이수성과 관련된 습관성 유산이나 성염색체 이상에서 효용성이 있으며, 반복 착상실패에서는 착상에 관련되는 다른 원인들의 복합적인 영향으로 큰 효용성이 없는 것으로 생각된다.

중심단어: 착상전 유전진단, 염색체 이수성, 착상실패, 습관성 유산