생쥐 모델을 이용한 배아의 할구 생검법과 할구가 생검된 배아의 배양시 공배양 효과에 관한 연구 : 인간에서의 착상 전 유전진단 기술 개발을 위한 동물실험 모델의 개발

서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 의학연구원 인구의학연구소[1],
한국과학기술원 의과학연구센터[2], 울산대학교 의과대학 산부인과학교실[3]

김 석현, 류 범용[1], 지 병철, 최 성미[1], 김 희선[1], 방 명걸[2], 오 선경[1],
서 창석, 최 영민, 김 정구, 문 신용, 이 진용, 채 희동[3], 김 정훈[3]

Effects of Coculture on Development of Biopsied Mouse Embryos as a Preclinical Model for Preimplantation Genetic Diagnosis of Human Embryos

S.H. Kim, B.Y. Ryu[1], B.C. Jee, S.M. Choi[1], H.S. Kim[1], M.G. Pang[2], S.K. Oh[1],
C.S. Suh, Y.M. Choi, J.G. Kim, S.Y. Moon, J.Y. Lee, H.D. Chae[3], C.H. Kim[3]

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Institute of Reproductive Medicine and Population[1], Medical Research Center, Seoul National University, Biomedical Research Center[2], Korea Advanced Institute of Science and Technology, Department of Obstetrics and Gynecology[3], College of Medicine, Ulsan University, Seoul, Korea

= Abstract =

The genetic defects in human gametes and embryos can cause adverse effects on overall reproductive events. Biopsy of embryos for preimplantation genetic diagnosis(PGD) offers a new possibility of having children free of the genetic disease. In addition, advanced embryo culture method may enhance the effectiveness of embryo biopsy for the practical application of PGD. This experimental study was undertaken to evaluate the effects of

coculture on the development in vitro of biopsied mouse embryos as a preclinical model for PGD of human embryos.

Embryos were obtained after in vitro fertilization(IVF) from F1 hybrid mice(C57BL ♀/CBA ♂). Using micromanipulation, 1, 2, 3 or 4 blastomeres of 8-cell stage embryos were aspirated through a hole made in the zona pellucida by zona drilling(ZD) with acidic Tyrode's solution(ATS). After biopsy of blastomeres, embryos were cultured in vitro for 110 hours in Ham's F-10 supplemented with 0.4% BSA or cocultured on the monolayer of Vero cells in the same medium. The frequence of blastocyst formation were recorded, and the embryos beyond blastocyst stage were stained with 10% Giemsa to count the total number of nuclei in each embryo.

There was no significant difference in the blastocyst formation between the zona intact control group and the zona drilling(ZD) only, or biopsied groups. The hatching rate of all the treatment groups except 4/8 group was significantly higher than that of control group. In all the treatment groups, there was a significant reduction in the mean cell number of embryos beyond blastocyst stage(50.2±14.0 in control group vs. 41.2±7.9 in ZD, 39.3±8.8 in 7/8, 29.7±6.4 in 6/8, 25.1±5.7 in 5/8, and 22.1±4.3 in 4/8 groups, $p<0.05$). When the same treatments were followed by coculture with Vero cells, a similar pattern was seen in the blastocyst formation and the hatching rate. However, in all the treatment groups, there was a significant increase in the mean cell number of embryos beyond blastocyst stage with coculture, compared with the parallel groups without coculture. In the cleavage rate of biopsied blastomeres cultured for 110 hours after IVF, there was no significant difference between coculture and non-coculture groups(87.2% vs. 78.7%). However, the mean cell number of embryos developed from the biopsied blastomeres was significantly higher in coculture group(11.5±4.7 vs. 5.9±1.9, $p<0.05$).

In conclusion, biopsy of mouse embryos after ZD with ATS is a safe and highly efficient method for PGD, and coculture with Vero cells showed a positive effect on the development in vitro of biopsied mouse embryos and blastomeres as a preclinical model for PGD of human embryos.

Key Words : Preimplantation genetic diagnosis(PGD), Mouse embryo, Blastomere biopsy, Zona drilling, Coculture, Vero cell, Blastocyst, Hatching

* 본 연구는 1997년도 보건의료기술연구개발사업(HMP-97-B-3-0028)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

This study was supported by a grant (HMP-97-B-3-0028) of the 1997 Good Health Research and Development Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

서 론

인간에서 많은 유전질환이 배아의 착상 전 유전진단의 임상 적응증이 될 수 있으며, 특히 인간 생식세포의 염색체 이상은 수정 장애, 초기 배아의 발생 정지, 착상 직후의 배아 사멸, 자연유산, 사산, 신생아 사망 등과 같은 전반적인 생식현상에 악영향을 미칠 수 있다(Pang et al., 1994; Verlinsky et al., 1996). 염색체 이상의 원인 인자 중 염색체의 수적 이상, 즉 이수배수체(aneuploidy)는 가장 대표적인 세포유전학적 원인이다.

따라서 생식세포 수준에서의 염색체 이상을 진단하기 위한 검사를 실시한 후 체외수정시술(IVF-ET) 등과 같은 보조생식술(assisted reproductive technology, ART) 시행시 염색체 이상이 없는 온전한 정자와 난자만을 선별하여 수정 및 배아 발생을 유도하는 것이 이상적이지만, 특히 온전한 정자만을 선별하여 수정에 이용한다는 것은 실제적으로는 불가능한 실정이다. 한편 배아의 염색체 이상을 기존의 세포유전학적 진단 기술로 검색한다는 것은 불가능하다. 이에 배아의 자궁내막 착상 전 단계에서 염색체 이상 등의 유전질환을 진단하는 기술인 착상 전 유전진단(preimplantation genetic diagnosis, PGD)이 제시된 바 있다(Handyside et al., 1990).

배아의 착상 전 단계에서 염색체 이상 등 유전질환의 진단을 위한 진단 기술의 개발에 있어서 배아의 할구 생검(blastomere biopsy)은 기본적으로 시행되어야 할 시술이다. 또한 배아의 할구 생검 후 배아의 안전성 및 생검된 할구를 이용한 효과적인 진단 기술의 적용 가능성을 확립하기 위한 실험 동물을 이용한 배아의 공배양(coculture) 등과 같은 배양 기술의 개선에 관한 기초연구는 임상적으로 인간 배아에게 적용시 가장 최선의 방법을 고안 창출하는데 있어서 필수적으로 요구되는 연구 과제라고 할 수 있다.

본 연구에서는 인간 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단을 임상적으로 적용하기 위한 전 단계로서 생쥐 동물실험을 개발하여 배아 발달 시기에서의 할구 생검, 생검된 할구의 체외배양, 배아의 체외배양 등의 기술과 지식을 축적함으로써 인간 배아의 착상 전 유전진단을 위한 기반 기술로서 확립하고자 하였다. 즉 본 연구에서는 인간 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단의 임상적 적용에 있어서 가장 적절한 방법을 고안하기 위하여 체외수정된 생쥐의 8-세포기 배아를 대상으로 acidic Tyrode's solution(ATS)을 이용한 zona drilling(ZD) 방법으로 투명대에 구멍을 만들어 배아당 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검한 후 할구가 생검된 배아와 생검된 할구의 체외 발생 정도를 조사 분석하고, Vero cell을 이용한 공배양을 실시하여 배아의 체외 발생 양상을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 제 1대 잡종(F1 hybrid, C57BL ♀xCBA ♂) 생쥐를 이용하였다. 광량(명:암=12:12) 및 온도(22℃) 조절과 환풍 시설이 갖추어진 사육실에서 사육된 생후 6-8주령의 암컷과 생후 12주령 이상의 수컷을 사용하여 체외수정을 실시하여 생성된 배아를 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 체외수정

(1) 정자의 준비

수컷 생쥐를 경추 탈구법으로 희생시킨 후 부정소 미부를 분리하여 Ham's F-10이 담긴 배양접시로 옮겼다. 정자를 회수하기 위하여 26G 주사침으로 조직을 절단한 후 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 10분간 배양하였다. 이후 최상층의 정자 부유액을 회수하여 수정용 및 발생용 배양액인 Ham's F-10(+ 0.4% bovine serum albumin, BSA)에 옮긴 후 10분간 배양하여 정자의 수정능력 획득을 유도하였다.

(2) 난자의 준비

난자 채취를 위하여 PMSG(Sigma, USA) 7.5IU를 암컷 생쥐에 복강 주사하고, 48시간 후 hCG (Sigma, USA) 5IU를 복강 주사하여 과배란을 유도하였다. HCG 투여 14-16시간 후 경추 탈구법으로 희생시킨 후 양측 난관을 채취하였다. 채취된 난관을 수정용 배양액이 담긴 배양접시로 옮긴 후 난관 팽대부를 절제하여 난자-난구세포 복합체(oocyte-cumulus cell complex, OCCC)를 회수하여 수정용 배양액 2ml가 들어있는 배양접시에 옮겨 수정시까지 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 배양하였다.

(3) 수정 및 확인

수정능력 획득이 유도된 정자를 30-40개의 난자가 들어있는 배양접시에 운동성 정자의 농도가 $1x10^6$/ml가 되도록 주입한 후 9시간 체외배양하여 수정시켰다. 수정 후 난자에서 전핵의 형성 여부를 관찰하여 난자의 형태나 세포질에 이상이 없고, 2개의 전핵이 명확하게 형성된 것만을 선별한 후 발생용 배양액 2ml가 들어있는 배양접시에 옮겨 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 배양하였다.

2) 배아의 할구 생검

할구 생검은 체외수정 56-60시간 후 8-세포기로 발생된 배아를 대상으로 역반사현미경(Diaphot 300, Nikon)에 부착된 한쌍의 미세조작기(NT-88, Narishige)를 이용하여 실시하였으며, 할구 생검시 배양액은 Ca^{++}과 Mg^{++}이 제거된 D-PBS(+ 0.4% BSA) 용액을 사용하였다. 좌측 holding pipette으로 배아를 고정한 후 우측 acidic Tyrode's solution(pH 2.3)이 들어있는 pipette을 이용하여 할구 생검을 용이하게 하기 위하여 배아의 투명대(zona pellucida)를 녹여 10-20㎛ 크기의 구멍을 뚫었다(Gordon & Gang, 1990). 이후 투명대의 구멍을 통하여 우측에 acidic Tyrode's solution용 pipette과 평행하게 설치된 할구 생검용 pipette으로 할구를 하나씩 흡입하여 투명대 밖으로 분리하였다. 각각의 8-세포기 배아에서 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검하였다(Wilton & Trounson, 1989; Krzyminska et al., 1990; Geber et al., 1995). 생검된 할구와 할구가 생검된 배아를 각각 멸균된 오일이 덮인 Ham's F-10(+ 0.4% BSA) 10㎕ 배양액 방울에 넣어 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 배양하면서 24시간 간격으로 체외수정 후 110시간까지 배아의 발생을 관찰하였다.

3) Vero cell을 이용한 공배양

(1) Vero cell의 준비

배아의 발생능 향상을 위한 공배양 체계는 세계보건기구(WHO)로 부터 구입되는 virus와 이외 오염 물질에 대한 안전성이 확인된 Vero cell(WHO library, ref Vero 6758)을 이용하여 실시하였다(Wetzels et al., 1991; Menezo et al., 1992b). 구입된 동결보존 상태의 ample을 37℃ 항온수조에서 급속히 융해하고 동결보존액을 제거하기 위하여 MEM(+ 20% Fetal bovine serum, FBS) 9ml로 희석하여 600G로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 상기된 배양액으로 희석한 후 MEM(+ 20% FBS) 10ml가 들어있는 25cm^2 tissue culture flask에 Vero cell의 농도가 2x10^6되게 주입하였다. 이후 flask의 뚜껑을 느슨하게 풀어 주고 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 배양하였다. 배양 48시간 후에 단일층(monolayer)의 형성과 yeast, fungus 등의 오염 물질의 생성 여부를 관찰하여 단일층의 형성이 잘 되어있고 오염에 이상이 없을 경우 전 배양된 신선한 MEM(+ 20% FBS)으로 배양액을 교환하고, 매 48시간 마다 상기 과정을 반복하였다. Vero cell의 단일층이 culture flask의 저면에 완전히 확산되면(>32x10^6 cells) 계대배양(subculture)을 실시하였다(Bongso et al., 1989).

(2) Vero cell의 계대배양

Culture flask의 저면에 Vero cell의 단일층이 완전히 확산되면 flask내의 배양액을 제거하고, 죽은 세포들과 cell debris 등을 제거하기 위하여 신선한 MEM 배양액으로 2-3회 세척하였다. 이후 단일층을 분리하기 위하여 Ca^{++}과 Mg^{++}이 제거된 phosphate-buffered saline(PBS)에 0.05%

trypsin-0.53 mM EDTA가 들어있는 medium 2ml 을 주입하고, 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 5-10시간 배양하여 flask 바닥의 Vero cell의 단일층으로부터 세포를 분리하였다. 역반사현미경하에서 단일층의 분리가 완료되면 trypsin-EDTA를 제거하기 위하여 15ml conical tube에 Vero cell 부유액을 옮겨 MEM(+ 20% FBS) 5ml로 희석한 후 300G로 5분간 원심분리하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후 최초 Vero cell의 준비 방법을 사용하여 culture flask에 Vero cell을 배양하였다. 상기 방법을 사용하여 2회 추가 계대배양을 실시하였다.

(3) Vero cell의 동결보존

계대배양을 통하여 충분한 Vero cell이 배양되면 추후 배아와의 공배양을 위하여 동결보존하였다. Trypsin-EDTA 처리로 culture flask 바닥의 단일층으로부터 회수된 세포의 수를 계산하고, 0.2% trypan blue 염색을 시행하여 생존율을 산정하였다. 이후 15ml conical tube에 회수된 세포 부유액을 옮겨 MEM(+ 20% FBS) 5ml로 희석한 후 600G로 5분간 원심분리하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후 상층액을 제거하고, MEM(+ 20% FBS, + 10% DMSO)으로 살아있는 세포의 수가 $2\text{-}3\times10^6$/ml되게 희석하였다. Cryotube에 1ml의 희석액을 주입하고 상온에서 20분간 동해방지제에 대한 평형을 유도하였다. 이후 자동 세포동결기(Planner, Model CRYO-10)를 이용하여 냉각을 시행하였다. 냉각 방법은 상온에서 -30℃까지 1℃/min씩 냉각한 후 -30℃에서 바로 액체 질소에 넣어 동결을 완료하고 사용시까지 액체질소통에 보관하였다.

(4) 배아와의 공배양

배아와의 공배양 2-3일 전에 cryotubes에 동결보존된 Vero cell을 37℃ 항온 수조에서 급속히 융해한 후 동결보존액을 제거하기 위하여 MEM(+ 20% FBS) 9ml로 희석하여 600G로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세포괴를 상기 배양액 1ml로 희석한 후 MEM(+ 20% FBS) 2ml가 들어있는 2-well organ culture dish에 Vero cell의 농도가 $1X10^5$/ml되게 조정하였다. 사용 당일 배양접시 바닥에 Vero cell 단일층의 확산 정도를 관찰하여 70-80% 정도 확산되어 있으면 공배양을 실시하기에 적합한 상태로 간주하여 사용하였다(Bongso et al., 1989). 배아와의 공배양 전에 Vero cell의 단일층이 형성된 배양접시를 전 배양된 신선한 Ham's F-10(+ 0.4% BSA)으로 2-3회 세척하여 죽은 세포나 이물질을 제거하였다. 각각의 처리 후 배아와 할구를 Vero cell 단일층이 형성된 Ham's F-10(+ 0.4% BSA) 2ml가 들어있는 배양접시로 옮겨 37℃, 5% CO_2 배양기내에서 배양하면서 24시간 간격으로 체외수정 후 110시간까지 배아의 발생을 관찰하였다.

4) 배아의 염색 및 세포 수의 관찰

각각의 처리에서 체외수정 후 110시간에 배반포기(blastocyst) 이상으로 발생된 배아와 생검된 할구로부터 2일간 추가 발생된 배아에서 세포 수의 관찰을 위한 염색을 실시하였다. 각각의 배아를 저장성 용액(150mOsm) 20㎕가 들어 있는 배양접시에 분리 주입하여 10분간 37℃, 5% CO_2

배양기내에서 배양한 후 슬라이드에 옮겨 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 고정액(methanol : acetic acid = 3:1)에 넣어 24시간 고정시킨 후 Gurr's buffer (pH 6.8)에 10% Giemsa가 들어 있는 염색액에 넣어 20분간 염색하였다. 이후 증류수로 슬라이드를 세척하여 잔여 염색액을 제거하고 건조시킨 후 현미경 x200 하에서 염색된 배아의 세포 수를 관찰하였다.

5) 통계학적 처리

Chi-square test, Student's t-test 등을 이용하여 자료 분석 및 유의성 검증을 실시하였으며, $p<0.05$를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 할구가 생검된 배아의 체외 발생율

할구 생검 후 배아 발생에 이상이 없으면서 최대 생검 가능한 할구 수를 규명하기 위하여 과배란유도 후 체외수정으로 생성된 8-세포기 생쥐 배아에서 할구를 1개에서 최대 4개까지 생검한 후 배아의 발생 정도를 분석한 결과는 Table 1과 같다.

투명대에 미세조작을 가하지 않아 투명대가 온전한 대조군과 비교하여 zona drilling만을 실시한 ZD군과 할구를 1개에서 최대 4개를 생검한 배아군, 즉 7/8군, 6/8군, 5/8군, 4/8군에서 상실배(morula) 이하 단계로 발생이 정지된 배아의 비율 및 배반포기(blastocyst) 이상으로 발생한 배아의 발생율에 있어서 각각 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 배아의 부화율(hatching rate)은 4/8군을 제외한 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$). 한편 배반포기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 대조군의 50.2±14.0개에 비하여 모든 처리군에서 각각 41.2±7.9개, 39.3±8.8개, 29.7±6.4개, 25.1±5.7개, 22.1±4.3개로서 유의하게 적은 결과를 나타내었다($p<0.05$).

Table 1. Development of biopsied mouse embryos in vitro

Groups	No. of embryos	≤ Morula (%)	≥ Blastocyst (%)	Hatched blastocyst (%)	No. of cells (mean±SD)
Zona intact	45	2 (4.4)	43 (95.6)	1 (2.2)	50.2±14.0
Zona drilling	36	0	36 (100.0)	17 (47.2)[a]	41.2±7.9[a]
7/8 embryos	37	1 (2.7)	36 (97.3)	15 (40.5)[a]	39.3±8.8[a]
6/8 embryos	36	2 (5.6)	34 (94.3)	16 (44.4)[a]	29.7±6.4[a]
5/8 embryos	38	4 (10.5)	34 (89.5)	8 (21.1)[a]	25.1±5.7[a]
4/8 embryos	39	3 (7.7)	36 (92.3)	4 (10.3)	22.1±4.3[a]

a : $p<0.05$, compared with zona intact group
no. of cells : mean number of nuclei in ≥ blastocyst
zona intact : non-manipulated control embryos
zona drilling : embryos with only single hole in zona
7/8 - 4/8 embryos : biopsied embryos from which 1 to 4 blastomeres were removed

2. 할구가 생검된 배아의 체외 발생능력 향상을 위한 공배양 체계의 효과

Table 1에서 실시한 연구 방법을 동일하게 적용한 Vero cell을 이용한 공배양 결과인 배아의 발생율은 Table 1의 결과와 유사하게 투명대가 온전한 대조군과 비교하여 상실배 이하 단계로 발생이 정지된 배아의 비율 및 배반포기 이상으로 발생한 배아의 비율에 있어서 유의한 차이가 없었으나, 배아의 부화율은 모든 처리군에서 유의하게 높게 나타났다($p<0.05$)(Table 2). 배반포기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 대조군의 94.9±26.2개에 비하여 ZD군에서 91.3±25.1개, 7/8군에서 89.1±22.9개로서 각각 유의한 차이가 없었지만 6/8군에서 68.0±17.2개, 5/8군에서 52.0±11.7개, 4/8군에서 46.3±12.7개로서 각각 유의하게 적었다($p<0.05$).

공배양을 실시하지 않은 Table 1의 각 군과의 상호 평행 비교에 있어서 배반포기 이상의 배아 발생율은 유의한 차이가 없었지만, 배아의 부화율은 ZD군과 4/8군에서 각각 유의하게 높았다($p<0.05$). 배아의 세포 수에 있어서 공배양을 실시한 각 군에서 모두 유의하게 많은 결과를 나타내었다($p<0.05$)(Fig. 1). 또한 Table 1의 대조군에서의 배아 세포 수 50.2±14.0개에 비하여 공배양을 실시한 투명대가 온전한 대조군, ZD군, 7/8군 및 6/8군에서의 배아 세포 수가 각각 유의하게 많았으며($p<0.05$), 5/8군과 4/8군에서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

Table 2. Effect of coculture on development of biopsied mouse embryos in vitro

Groups	No. of embryos	≤ Morula (%)	≥ Blastocyst (%)	Hatched blastocyst (%)	No. of cells (mean±SD)
Zona intact	45	0	45 (100.0)	2 (4.4)	94.9±26.2[b]
Zona drilling	40	0	40 (100.0)	29 (72.5)[a,b]	91.3±25.1[b]
7/8 embryos	39	0	39 (100.0)	16 (41.0)[a]	89.1±22.9[b]
6/8 embryos	39	1 (2.6)	38 (97.4)	17 (43.6)[a]	68.0±17.2[a,b]
5/8 embryos	34	0	34 (100.0)	14 (41.2)[a]	52.0±11.7[a,b]
4/8 embryos	37	3 (8.1)	34 (91.9)	14 (37.8)[a,b]	46.3±12.7[a,b]

a : $p<0.05$, compared with zona intact group

b : $p<0.05$, compared with parallel groups in Table 1

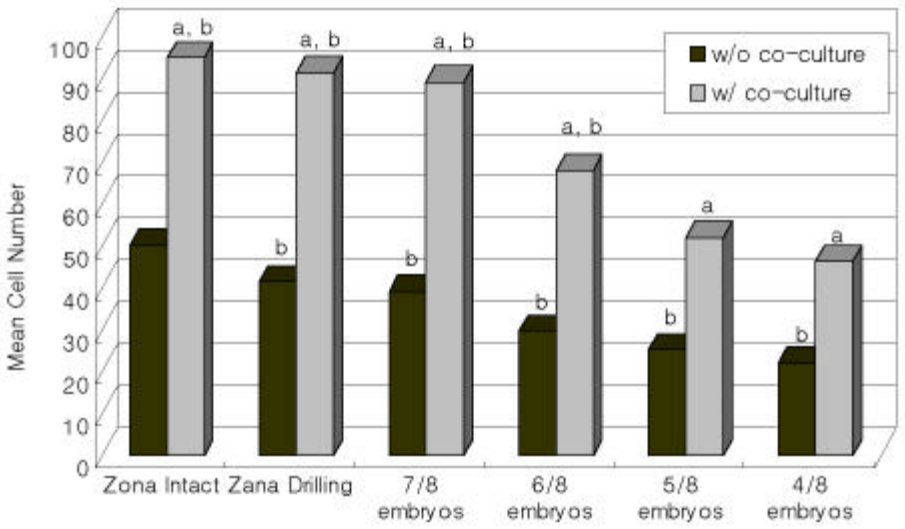

Fig. 1. Cell numbers of embryos cultured without or with coculture and developed beyond blastocysts in 110 hours after IVF.
a : $p<0.05$, compared with the same group without coculture
b : $p<0.05$, compared with zona intact group without coculture

3. 생검된 할구의 체외 발생율

생검된 할구의 체외배양시 공배양을 실시하지 않은 군과 공배양을 실시한 군 상호간의 비교에 있어서 세포분열이 일어난 할구의 비율은 각각 78.7%(96/122), 87.2%(68/78)로서 유의한 차이가 없었으나 분열된 할구의 세포 수는 각각 5.9±1.9개, 11.5±4.7개로서 공배양군에서 유의하게 많았다($p<0.05$)(Table 3).

Table 3. Effect of coculture on development of biopsied mouse blastomeres in vitro

Groups	No. of blastomere	Arrested (%)	Divided (%)	No. of cells (mean±SD)
Without coculture	122	26 (21.3)	96 (78.7)	5.9±1.9
With coculture	78	10 (12.8)	68 (87.2)	11.5±4.7[a]

a : $p<0.05$, compared with group without coculture
no. of cells : mean number of nuclei in divided blastomeres

고 찰

착상 전 유전진단(PGD)은 정자와 난자의 수정 후 발생된 배아가 자궁내막에 착상하기 전 단계에서 미세조작술(micromanipulation)을 이용하여 다세포의 배아에서 생검된 1개, 혹은 다수의 할구를 대상으로 유전진단을 시행하는 최신 진단 기법이다(Munne et al., 1993)

인간에서 배아의 착상 전 유전진단을 시행하고자 할 때에는 체외에서 배아의 일부 세포를 생검한 후 다시 자궁강내로 배아를 이식하여야 하므로 여러 가지 기본적인 기술들이 필요하며, 현재까지 알려진 기법으로는 배아의 발생 과정 중 유전진단의 시행 시기에 따라 극체 생검(polar body biopsy), 배아의 할구 생검(cleavage stage embryo biopsy), 영양외배엽세포 생검(trophectoderm biopsy) 등이 있다. 이러한 방법들은 각각 장단점을 지니고 있는데, 극체 생검의 경우 부계로부터 전달되는 유전 정보 및 성염색체와 관련된 정보는 알 수 없다는 단점이 있으며, 영양외배엽세포 생검의 경우 체외배양을 통하여 분석 대상이 되는 배반포기의 배아 획득율이 상대적으로 낮다는 점, 배반포기의 배아는 즉시 자궁강내로 이식을 하여야 하므로 유전진단을 위한 시간적 여유가 적다는 점 등의 단점이 있다(Bolton et al., 1991). 따라서 현재 착상 전 유전진단 기법 중 발생기 배아에서 할구를 생검하여 유전진단을 실시하는 할구 생검이 보편적으로 이용되고 있다. 인간에 있어서 착상 전 유전진단을 위한 할구 생검의 적용은 Handyside 등(1990)이 X-linked recessive 유전 환자의 배아에서 할구 생검을 이용하여 배아의 성을 감별한 후 여성 배아만을 이식하여 정상 여아의 분만을 유도함에 따라 임상적 유용성이 확인되었다.

착상 전 배아에서의 할구 생검에 대한 안전성 연구는 동물 연구에서 할구 생검에 의하여 분리된 각 할구들이 단독으로 발생하여 하나의 개체를 이룰 수 있다는 totipotency가 입증된(Tarkowski, 1959; Tarkowski & Wroblewska, 1967) 후 활발히 진행되고 있다. Willadsen & Polge(1981)는 소의 8-세포기 배아에서 2개의 할구를 분리한 후 배양하여 배반포기로 발생한 배아를 이식하여 57.7%의 임신율을 보고하였으며, Wilton & Trounson(1989)은 4-세포기의 생쥐 할구를 분리한 후 배양하여 81.4%의 배반포기 발생율을 보고하여 할구 생검의 안전성을 입증한 바 있다.

일반적으로 발생기 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단의 효율성을 높이기 위해서는 우선적으로 생검 후 배아의 발달에 지장이 없으면서 동시에 분석의 정확도를 높이기 위하여 생검 가능한 최대한의 할구 수를 결정하여야 한다. 배아의 발생 단계에 따른 할구 생검의 영향에 있어서 발생 초기 단계인 2-세포기, 4-세포기의 배아에서 1개의 할구를 생검할 경우 이들 단계의 배아는 아직까지 구조적으로 취약하기 때문에 미세조작을 이용한 할구 생검 후 배아의 생존력에 심각한 장애를 초래할 수 있으며, 배반포기까지 발생이 진전되어도 내세포괴(inner cell mass)의 수가 감소될 수 있다. 그러나 8-세포기의 배아에서 1개의 할구를 생검할 경우 배아의 발생에 이상이 없으

며, 최대 3개까지의 할구를 생검할 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Hardy et al., 1990; Krzyminska et al., 1990). 또한 8-세포기 배아는 구조적으로 견고한 형태를 유지하고 있으므로 할구 생검을 위한 acidic Tyrode's solution을 사용한 투명대 조작 등에 의한 영향을 적게 받으며, 세포의 분열 지수(mitotic index)가 가장 높은 시기이므로 할구가 생검된 배아에서도 다음 단계의 발생 속도가 증가되어 궁극적으로 배아 발생이 충분하게 보상될 수 있다(Krzyminska et al., 1990). 따라서 최근 착상 전 유전진단을 위하여 수정 후 3일째, 즉 6-8-세포기로 발생한 배아에서 1-2개의 할구를 생검하는 방법이 가장 유용한 방법으로 제시되고 있다.

배아의 할구를 이용한 착상 전 유전진단시 또 하나 고려하여야 할 것은 할구 생검시 배아가 받게되는 손상을 복구하고, 정확한 분석 결과를 얻기 위한 시간적 여유를 확보하기 위하여 최적화된 배아의 체외배양 체계가 적용되어야 한다는 점이다. 체외배양 조건이 불안정하면 할구가 생검된 배아의 질적 복구가 이루어지지 않아 배아의 발달율, 착상율 등이 영향을 받을 수 있으며, 생검된 할구의 유전진단을 위한 시간적 여유를 가질 수 없으므로 여러 실험 기법을 적용한 정확한 분석이 이루어지지 않을 수 있다. 따라서 최적화된 배아의 체외배양 기술은 성공적인 할구 생검을 이용한 배아의 착상 전 유전진단에 있어서 필수적인 요소라고 할 수 있다.

인간 배아의 체외배양 체계는 생식생리학의 발전, 체외수정시술의 발달 등과 더불어 지속적으로 개선되어 왔으며, 다양한 기법들이 보고되고 있다. 배아의 체외배양 체계는 단순배양과 보조세포(helper cell)를 이용한 공배양으로 대별할 수 있다. 최근 많은 연구 결과 배아의 발생 단계에 따른 배양액의 조성 변화, 성장인자(growth factor)의 배양액내 첨가 등의 단순배양을 이용하여 양호한 배아의 발생 성적이 보고되고 있다(Takahashi & First, 1992; Flood et al., 1993; Gardner & Sakkas, 1993). 그러나 아직까지 동일 발달 단계의 유사한 질로 평가되는 배아에서 단순배양과 공배양의 상호 비교시 단순배양으로 체외배양된 배아에서 공배양으로 체외배양된 배아에 비하여 할구의 수가 상대적으로 적은 것으로 보고되고 있다(Goodeaux et al., 1990; Menezo et al., 1992a).

배아의 체외배양 기술의 궁극적인 목표는 적용이 간편하면서도 최대의 효과를 얻을 수 있는 방법을 사용하는 것이 되겠지만 상기 문제점 등으로 인하여 최근 여러 종류의 보조세포를 이용한 공배양이 활발히 연구되고 있다. 공배양은 이용되는 보조세포에 따라 분류할 수 있는데, 주로 난관 상피세포(Bongso et al., 1992), 자궁내막 상피세포(Desai et al., 1994), 과립막세포(Freeman et al., 1995), 난구세포(Mansour et al., 1992) 등이 이용되고 있다. 공배양 시행시 우선 어떠한 보조세포를 이용할 것인지를 결정한 후 동종(homologous), 혹은 이종(heterologous) 세포 중 어떠한 세포를 이용할 것인지도 결정하여야 한다. 한편 공배양 결과 배아의 발생율, 부화율 등에 있어서 이용한 보조세포의 종류에 따른 유의한 차이가 없었다는 보고도 있다(Feng et al., 1996).

인간 배아의 공배양을 위한 보조세포의 선택에 있어서 유의하여야 할 점은 이종 세포를 이용할

경우 인수 공동 감염증을 유발할 수 있는 미생물(microorganism)의 오염 문제를 심각히 고려하여야 하며, 동종인 인간의 보조세포를 이용할 경우에도 타인으로부터 채취된 세포의 경우 간염, 매독, AIDS 등의 감염성 질환의 전파 방지에 완벽한 주의를 기울여야 한다. 따라서 공배양의 시행은 현실적으로 매우 번거롭고, 대상 보조세포의 확보에 있어서 어려움이 많은 실정이다. 이러한 문제점을 개선하기 위하여 확보하기 용이하면서도 검역 결과가 확실하게 보장된 보조세포를 필요로 하게 되었으며, 이와 같은 조건에 부합되는 공배양을 위한 보조세포로서 Vero cell이 제시되었다 (Menezo et al., 1992b).

Vero cell은 원숭이 신장의 상피세포(monkey renal epithelial cell)에서 유래된 세포로서 발생학적으로 내생식기와 동일한 세포에서 유래되었으므로 배아의 발생 및 부화를 촉진하는 물질을 생성 분비하는데 있어서 내생식기 세포와 유사한 기능을 하는 것으로 생각되고 있다. 이러한 Vero cell을 이용하여 공배양을 시행하였을 때 다른 내생식기 상피세포에서 유래된 세포로 공배양을 시행하였을 때와 마찬가지로 배아의 발생율 및 부화율의 증진을 도모할 수 있다고 보고되었다 (Menezo et al., 1992b). 또한 Vero cell은 세포주가 확립되어 있어 구하기 쉽고, 철저한 검역을 거쳐 WHO의 인증을 받은 상태이다. 따라서 Vero cell을 이용하여 공배양을 시행하는 것은 동물에서 유래된 세포를 이용하는데에 따른 윤리적 문제를 제외하고는 다른 보조세포를 이용하는 것에 비하여 많은 장점을 지니고 있다.

공배양이 체외배양의 환경을 개선하는 기전에 관하여는 명확하게 규명되어 있지는 않으나 첫째, 배아의 발생을 촉진하는 물질(embryotrophic factor)을 생성 분비하여 배아의 성장과 발달을 촉진하며, 둘째, 공배양에 이용되는 상피세포가 배아에 해로운 물질을 제거하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 인지되고 있다(Bongso et al., 1991). 즉 발생 환경의 개선 측면에서 공배양은 hypoxanthine 등과 같은 발생 억제제를 제거하고, 산소대사 수준(oxygen metabolic levels)을 낮추며, 배양액내 pH의 안정화와 glucose의 분해 증진으로 lactate의 수준을 증가시켜 주는 등 대사물질의 조정에 효과가 있으며, taurine 등과 같은 항산화제, 여러 당단백질, 세포의 성장인자로서 TGF-β_1, IGFBP-1, IGF 등을 생성 분비하여 배아의 발생에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Menezo et al., 1992b; Bongso & Fong, 1993).

본 연구에서 인간 배아를 대상으로 한 최적의 착상 전 유전진단 기술을 개발하기 위한 일환으로 생쥐 배아를 대상으로 할구 생검 후 배아의 발생능력을 조사 분석한 결과 할구가 생검된 배아의 체외배양시 단순배양을 실시한 경우 투명대에 미세조작을 가하지 않아 투명대가 온전한 대조군과 비교하여 배반포기 이상으로의 배아 발생율에 있어서 ZD만을 실시한 군과 할구를 1개에서 최대 4개를 생검한 배아군, 즉 7/8군, 6/8군, 5/8군 및 4/8군에서 모두 유의한 차이가 없었으나 배아의 부화율에 있어서는 4/8군을 제외한 모든 군에서 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 할구 생검을 위하여 투명대에 구멍을 뚫어준 것이 보조부화술(assisted hatching)을

실시한 것과 유사한 효과로서 배아의 부화 현상을 효율적으로 증진시킨 것에서 기인할 수 있을 으로 사료된다(Cohen et al., 1992; Dokras et al., 1994, Hoover et al., 1995; 김석현 등, 1997a, 1997b). 그러나 배아의 발달 충실도를 나타내는 할구 수, 즉 세포 수에 있어서는 미세 조작을 가한 모든 군에서 대조군에 비하여 유의하게 낮은 결과를 나타내었다. 특히 ZD군에서도 배아의 세포 수가 낮았던 것은 Depypere & Leybaert(1994)의 보고에서 ZD 과정 중 배아의 세포질 내가 산성화됨에 따라 세포질 퇴행(cytoplasmic degeneration)이 발생될 수 있다는 연구 결과를 고려하면 acidic Tyrode's solution이 정도에 따른 차이는 있지만 배아에 손상을 유발하였을 가능성이 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서 할구가 생검된 배아의 체외배양시 Vero cell을 이용한 공배양을 실시한 경우 단순 배양시와 유사하게 대조군과 비교하여 배반포기 이상으로의 배아 발생율에 있어서 모두 유의한 차이가 없었으나 배아의 부화율에 있어서는 모든 군에서 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 또한 배아의 발생율과 부화율에 있어서 단순배양시의 각 군과 평행 비교를 하였을 경우에도 ZD군과 4/8군을 제외한 모든 군에서 유의한 차이가 없었다. 반면 배아의 세포 수에 있어서는 단순배양시와는 다소 상이한 양상을 보였는데, 대조군과 비교하여 ZD군과 7/8군에서 유의한 차이가 없었으며, 단순배양시의 대조군과 비교하여 ZD군, 7/8군, 6/8군, 즉 할구를 2개까지 생검한 군에서 유의하게 높았고, 5/8군과 4/8군에서는 유의한 차이가 없었다. 또한 배아의 세포 수에 있어서 단순배양시의 각 군과 평행 비교를 하였을 경우 모든 군에서 유의하게 많았다. 이러한 결과는 Vero cell을 이용한 공배양이 할구 생검 과정에서 발생되는 배아의 손상을 효과적으로 복구한 결과라고 사료되며, 8-세포기 배아에서 할구를 2개까지 생검하여도 추후 배아의 발생에는 별다른 문제점이 없었던 것으로 사료된다.

체외배양 후 배아의 세포 수에 관한 연구 결과는 생검된 할구에서도 유사한 경향이 관찰되었다. 생검된 1개의 할구를 48시간 체외배양한 후 관찰된 세포의 수는 단순배양시 평균 5.9±1.9개 이었으나 공배양시에는 평균 11.5±4.7개로서 유의하게 많았다. 그러나 생검된 할구의 난할율은 단순배양시 78.7%, 공배양시 87.2%로서 양군간에 유의한 차이가 없었다. 생검된 할구의 체외배양에 관한 본 연구 결과는 Li 등(1992)의 생쥐 8-세포기에서 생검된 할구의 난할율 68-78%, Geber 등(1995)의 인간 배아에서 생검된 할구의 난할율 73% 등과 유사하였다. 한편 이들 연구에서는 생검된 할구의 체외배양 후 세포 수에 관한 결과는 없었지만, 본 연구 결과와 여러 연구자들의 결과를 고려하면 생검된 할구를 대상으로 단순배양만을 시행하여도 착상 전 유전진단 분석에 이용될 수 있는 세포의 수를 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 할구가 생검된 배아에 있어서 효과적인 동결보존 기술이 개발 확립된다면 생검된 할구의 체외배양 기법은 배아의 착상 전 유전검사의 신뢰도를 높일 수 있는 유용한 방법으로 이용 가능하다고 사료된다.

본 연구 수행 결과 인간 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단을 임상적으로 적용하기 위한

전 단계로서 생쥐 동물실험을 개발하여 인간 배아의 착상 전 유전진단을 위한 기반 기술로서 확립하였다. 본 연구에서는 1차년도에 최적화된 할구 생검법을 이용하여 실제 임상 적용에 있어서 할구 생검 후 배아 발생에 이상이 없으면서 최대 생검 가능한 할구 수를 규명하기 위하여 체외수정을 통하여 생성된 8-세포기 생쥐 배아에서 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검하여 발생정도를 조사 분석하였다. 8-세포기 배아에서 생검된 할구 수가 증가하여도 만족할만한 배아의 생존율과 발생율을 얻었으므로 본 연구에서 적용된 할구생검법은 임상 적용을 위한 안전한 시술방법이라고 사료된다. 한편 할구가 생검된 배아에서 세포 수가 급격히 감소되는 결과가 관찰되어 단순 체외배양 기술의 적용은 할구 생검시 배아가 받을 수 있는 손상을 효율적으로 극복할 수는 없을 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 배아의 할구 생검 후 배아의 체외배양 체계 개선을 위한 방법으로서 Vero cell을 이용한 공배양 체계를 구축하였다. 1차년도에 구축된 공배양 체계를 최적화하여 할구가 생검된 배아의 체외배양에 적용한 결과 배아의 발생율이 증진됨을 확인할 수 있었으며, 특히 단순 체외배양시의 결과와 비교하여 배아의 세포 수가 현저히 증가됨이 관찰되었다. 따라서 개선된 공배양 체계를 활용하면 보다 많은 수의 할구를 생검하여도 배아 발생이 보상될 수 있으므로 착상 전 유전검사의 효율성을 향상시킬 수 있는 적절한 체외배양 체계가 확립되었다고 사료된다. 결론적으로 본 연구 결과 공배양 체계를 이용한 생검된 배아의 체외배양시 높은 난할율과 세포 수의 증진이 확인되어 할구가 생검된 배아의 동결보존 기술이 적정화될 경우 할구 및 배아의 배양을 이용하여 상대적으로 많은 수의 세포를 유전진단에 이용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

결 론

인간 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단의 임상적 적용에 있어서 가장 적절한 방법을 고안하기 위하여 체외수정된 생쥐의 8-세포기 배아를 대상으로 acidic Tyrode's solution(ATS)을 이용한 zona drilling(ZD) 방법으로 투명대에 구멍을 만들어 배아당 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검한 후 할구가 생검된 배아와 생검된 할구의 체외 발생 정도를 조사 분석하고, Vero cell을 이용한 공배양을 실시하여 배아의 체외 발생 효율을 검증하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 할구 생검 후 배아 발생에 이상이 없으면서 최대 생검 가능한 할구 수를 규명하기 위하여 과배란유도 후 체외수정으로 생성된 8-세포기 생쥐 배아에서 할구를 1개에서 최대 4개까지 생검한 후 배아의 발생율을 분석한 결과 투명대가 온전한 대조군에 비하여 zona drilling만을 실시한 ZD군과 할구를 생검한 7/8군, 6/8군, 5/8군, 4/8군에서 상실배 이하 단계로 발생이 정지된 배아의 비율 및 배반포기 이상으로 발생한 배아의 비율에 있어서 각각 유의한 차이가 없었다. 그러나 배아의 부화율은 4/8군을 제외한 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 높았다. 배반포기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 대조군에 비하여 모든 처리군에서 유의하게 적었다.

2. Vero cell을 이용한 공배양을 실시한 결과 대조군에 비하여 상실배 이하 단계로 발생이 정지된 배아의 비율 및 배반포기 이상으로 발생한 배아의 비율에 있어서 유의한 차이가 없었으나, 배아의 부화율은 모든 처리군에서 유의하게 높았다. 배반포기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 대조군에 비하여 ZD군과 7/8군에서는 유의한 차이가 없었지만, 6/8군, 5/8군 및 4/8군에서는 유의하게 적었다.

3. 공배양을 실시하지 않은 각 군과의 상호 평행 비교에 있어서 배반포기 이상의 배아 발생율은 유의한 차이가 없었지만, 배아의 부화율은 ZD군과 4/8군에서 유의하게 높았다. 배아의 세포 수는 공배양을 실시한 각 군에서 모두 유의하게 많았다. 또한 공배양을 실시하지 않은 대조군에서의 배아 세포 수에 비하여 공배양을 실시한 대조군, ZD군, 7/8군 및 6/8군에서의 배아 세포 수가 유의하게 많았으며, 5/8군과 4/8군에서는 유의한 차이가 없었다.

4. 생검된 할구의 체외배양시 공배양을 실시하지 않은 군과 공배양을 실시한 군 상호간의 비교에 있어서 세포분열이 일어난 할구의 비율은 유의한 차이가 없었으나 분열된 할구의 세포 수는 공배양군에서 유의하게 많았다.

결론적으로 본 연구에서 실시한 배아의 할구 생검법은 안전한 시술 방법이라고 사료되며, 착상 전 배아에서의 유전진단을 위한 할구 생검시 Vero cell을 이용한 공배양은 진단의 효율성을

증진시킬 수 있는 유용한 체외배양 체계라고 사료된다.

인 용 문 헌

김석현, 김광례, 채희동, 이재훈, 김희선, 류범용, 오선경, 서창석, 최영민, 김정구, 문신용, 이진용: 체외수정시술시 배아의 보조부화술을 이용한 임신율 향상에 관한 연구. ***대한불임학회지*** 1997a, 24, 119-133.

김석현, 채희동, 김광례, 이재훈, 류범용, 오선경, 서창석, 최영민, 김정구, 문신용, 이진용: 배아의 자궁내이식시 보조부화술을 이용한 자궁내막 착상율의 증진에 관한 연구. ***대한산부인과학회지*** 1997b, 40, 262-274.

Bolton VN, Wren ME, Parson MD: Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril* 1991, 55, 830-832.

Bongso A, Fong CY: The effect of coculture on human zygote development. *Curr Opinion Obstet Gynaecol* 1993, 5, 585-593.

Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S: Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992, 58, 569-574.

Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S: Coculture: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991, 56, 179-191.

Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 706-713.

Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992, 7, 685-691.

Depypere HT, Leybaert L: Intracellular pH changes during zona drilling. *Fertil Steril* 1994, 61, 319-323.

Desai NN, Kennard EA, Kniss DA, Friedman C: Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertil Steril* 1994, 61, 760-766.

Dokras A, Sargent IL, Ross C, Barlow DH, Gosden B: Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994, 61, 514-520.

Feng HL, Wen XH, Amet T, Presser SC: Effect of different co-culture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 1996, 11, 1525-1528.

Flood MR, Gage TL, Bunch TD: Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Theriogenology* 1993, 39, 823-833.

Freeman MR, Whitworth CM, Hill GA: Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995, 10, 408-414.

Gardner DK, Sakkas D: Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition. *Hum Reprod* 1993, 8, 288-295.

Geber S, Winston RML, Handyside AH: Proliferation of blastomeres from biopsied cleavage stage human embryos in vitro: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. *Hum Reprod* 1995, 10, 1492-1496.

Gordon JW, Gang I: Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocytes and embryos. *Biol Reprod* 1990, 42, 869-876.

Goodeaux LL, Thibodeaux JK, Voelkel S, Anzalone CA, Russel JD, Cohen JC, Menezo Y: Collection, co-culture and transfer of rhesus preimplantation embryos. *ARTA* 1990, 1, 370-379.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM: Pregnancy from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification. *Nature* 1990, 344, 768-770.

Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH: Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990, 5, 708-714.

Hoover L, Summers D, Check JH, Nazari A, O'Shaughnessy A: Pregnancy after zona drilling of cryopreserved thawed embryos: case report. *Fertil Steril* 1995, 63, 401-403.

Krzyminska UB, Lutjen J, O'Neill C: Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod* 1990, 5, 203-208.

Li LY, Denniston RS, Hansel W, Godke RA: Enhanced development of 8-cell stage blastomeres in vitro by intact mouse embryos. *Theriogenology* 1992, 37, 246.

Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbaas A: Coculture of human fertilized oocytes with its own

cumulus cells[abstract no. O-034]. In: Program and Abstracts of the 48th Annual Meeting of the American Fertility Society. 1992, S15.

Menezo Y, Dumont M, Hazout A, Herbaut N, Nicollet B: Regulation and limitation of in vitro blastocyst formation in human. In: International Symposium on Implantation in Mammals. Ares Serono Symposia. 1992a, April, 23-24.

Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B: Coculture of embryos on vero cells and transfer of blastocyst in humans. *Hum Reprod* 1992b, 7, 101-106.

Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grigo J, Cohen J: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993, 8, 2185-2191.

Pang MG, Zackowski JL, Ryu BY, Moon SY, Acosta AA, Kearns WG: Aneuploidy detection for chromosome 1, X, and Y by fluorescence in situ hybridization in human sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients. *Am J Genet* 1994, 55, 644.

Takahashi Y, First NL: In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992, 37, 963-978.

Tarkowski AK: Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 1959, 184, 1286-1287.

Tarkowski AK, Wroblewska J: Development of blastomeres of mouse isolated at 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morph* 1967, 18, 155-180.

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A: Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 157-162.

Wetzels AMM, Janssen HJG, Bastiaans BA, Rolland R, Goverde HJM: Vero cells stimulate human sperm motility in vitro. *Fertil Steril* 1991, 56, 535-539.

Willadsen SM, Polge C: Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 1981, 108, 211-213.

Wilton LJ, Trounson AO: Biopsy of preimplantation mouse embryos: Development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres in vitro. *Biol Reprod* 1989, 40, 145-152.