

젖소 동결수정란의 비외과적 이식시 수란우의 혈장 progesterone, estradiol-17 β 치 및 혈청화학치가 수태율에 미치는 영향

李柄千 · 趙忠鎬 · 黃禹錫

서울대학교 수의과대학

(1989. 5. 13 접수)

Levels of plasma progesterone, estradiol-17 β and several serum chemical components in recipients at the time of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos

Byeong-cheon Lee, Choong-ho Jo, Woo-suk Hwang
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received May 13, 1989)

Abstract: A total of 13 synchronized dairy cattle(Holstein) were used to determine pregnancy rates in relation to plasma progesterone, estradiol-17 β levels and serum chemical values on the day of last PGF_{2 α} injection and day of frozen/thawed bovine embryo transfer.

The pregnancy rate of recipients with 1.0~4.0ng/ml of progesterone levels at the day of last PGF_{2 α} injection was higher than that of recipients with below 1.0ng/ml or above 4.0ng/ml of progesterone levels. On the day of transfer, optimal progesterone levels were between 1.0ng/ml and 4.0ng/ml coinciding with a pregnancy rate of 88.9%. Pregnancy rate decreased when progesterone levels were below 1.0ng/ml(33.3%) or above 4.0ng/ml(0%).

Corpus luteum grade did not affect pregnancy rate and this result revealed that manual palpation of corpus luteum was not valid criterion of corpus luteum function.

Progesterone levels as well as pregnancy rate did not significantly differ whether the corpus luteum was on the right(1.62 \pm 1.33ng/ml; 63.5%) or left ovary(1.99 \pm 0.61ng/ml; 85.0%).

Estradiol-17 β levels were not significantly different between pregnant and nonpregnant recipients, but estradiol-17 β levels(82.2 \pm 13.5 VS. 72.3 \pm 10.1pg/ml) were higher at below 1.0 ng/ml of progesterone, and pregnancy rates(33.3 VS. 80%) tended to be lower than above 1.0 ng/ml of progesterone.

Total cholesterol levels on the day of last PGF_{2 α} injection and day of transfer did not affect pregnancy rate.

Calcium and inorganic phosphorus levels belonged to normal range in most of the recipients. These range did not affect pregnancy rate.

In reviewing above results, plasma progesterone levels(1.0~4.0ng/ml) at the time of transfer are diagnostic value for screening recipients prior to transfer of frozen/thawed bovine embryos.

Key words: progesterone, estradiol-17 β , embryo transfer, frozen embryos.

서 론

소 수정란이식은 1951년 Willett et al¹이 처음으로 송아지생산에 성공한 이래로 여러단계의 발전을 거듭하여 왔다. 1973년에 이르러 Wilmut과 Rowson²에 의해 동결수정란을 수란우에 이식하여 처음으로 송아지를 얻게 되었으며 그 이후 동결수정란이식은 수송과 보존의 편리성 및 수란우의 자연 발정주기를 이용할 수 있다는 장점으로 인해 산업동물인 소에 있어서 번식 효율을 증가시킬 수 있는 분야로 부상하게 되었다.³⁻⁵ 수정란 이식을 성공적으로 수행하기 위해 수란우의 progesterone 농도와 수태성적과의 관계가 여러 연구자에 의해 조사되어 왔다.⁶⁻⁹

Remsen과 Roussel⁸은 이식시 측정된 혈장 progesterone이 2~5ng/ml 구간일때 2ng/ml 이하의 구간 및 5ng/ml 이상의 구간보다 수태율이 유의성 있게 높았다고 하였고 Northey et al⁷은 신선수정란의 비외과적 이식시에 측정된 progesterone 수준이 2~6ng/ml의 구간일때 수태율이 가장 높았으며 비수태우보다 수태우의 평균 progesterone 농도가 높았다고 하였으며, Voss et al⁹은 동결수정란인 경우에도 외과적 이식시에 측정된 progesterone 평균농도가 비수태우보다 수태우에서 높은 경향을 나타냈다고 하였다. 또한 Henrick et al¹⁰, 그리고 Lukazewska와 Hansel¹¹은 인공수정후 6~7일째 평균 progesterone 농도가 비수태우에서보다 수태우에서 높았다고 하였다.

그러나 Hasler et al¹²은 신선수정란의 외과적방법에 의한 이식시, progesterone 수준과 수태율에는 유의적인 관계가 인정되지 않았다고 하였다. Niemann et al⁶은 동결수정란의 비외과적 이식시 progesterone 농도가 2~5ng/ml 구간에서 가장 높은 수태율을 나타냈으나 progesterone 농도와 수태율간에는 유의적인 관계를 인정할 수 없었다고 하였다. Stubbings와 Walton¹³도 신선수정란과 동결수정란의 비외과적이식시 각각 progesterone 수준과 수태율간에는 유의적인 관계를 인정할 수 없었다고 하였다. Randel et al¹⁴, Folman et al¹⁵, 그리고 Linares et al¹⁶은 수정후 14~16일까지의 progesterone 농도는 수태우와 비수태우간에 유의차가 없었다고 하였다.

한편 수정란 이식시에 estradiol-17 β 치와 수태율과의 관계를 조사한 보고는 접할 수 없었으나, Henricks et al¹⁷, Wettemann과 Hafis¹⁸ 그리고 Randel et al^{14,19}은 수정후 5~9일째의 높은 estradiol-17 β 치는 황체를 퇴행시켜 progesterone의 생산을 감소시키며, 임신초기 자궁의 착상성 증식변화를 방해하여 수정란의 착상에

영향을 준다고 하였다.

이외 젖소의 난소기능 및 번식에 영향을 미치는 요인에 관한 보고로 Kweon et al²⁰⁻²²은 젖소에 있어서 건유증의 혈중 total cholesterol 수준이 정상이하일때 분만후의 질병 발생율이 유의성있게 높았으며 과배란 유기시 난소의 hormone 반응이 좋지않았다고 하였고, 정상치 이상이거나 이하일때 난소낭종치로 목적으로 hormone을 투여시 치료효과가 감소되었다고 하였다. Blood²³는 calcium 부족이 성장의 지연, 유량의 감소 및 불임의 원인으로 될 수 있다고 하였다.

또한 무기인의 결핍은 성성숙의 지연, 분만후 발정의 지연, 발정의 불규칙 및 난소기능저하등의 원인이 된다.²⁴ 그러나 Sreenan과 Diskin²⁵은 수란우 선발시 극단적인 영양상태를 피하면 수정란의 생존에 크게 영향을 미치지 않는다고 하였다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 혈중 progesterone 농도와 수태율과의 관계는 연구자에 따라 다양하게 보고되었고, estradiol-17 β 의 농도와 젖소의 번식 및 난소기능에 영향을 미친다고 보고된 혈청 total cholesterol, calcium 및 무기인치가 수정란 이식시 수태율에 미치는 영향에 대한 구체적인 보고는 접하지 못하였으며, 이들 요인에 대한 국내 연구보고도 전무한 실정이다.

따라서, 저자는 국내 사양조건하에서 사육되고 있는 Holstein 젖소에 동결수정란을 비외과적으로 이식시, 수란우의 혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 치와 혈청 total cholesterol, calcium 및 무기인 등의 농도를 측정함으로써 수란우 선발의 기준을 마련하고 이들 수준이 수태율에 미치는 영향을 조사하여, 궁극적으로 수태율 향상을 위한 기준으로 삼고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

공란우: 日本 北海道 十勝育成牧場에서 사육되고 있는 미경산우 및 경산우를 이용하였다.

수란우: 수란우는 경기도의 한 목장에서 사육중인 Holstein종 젖소 23두로서 생후 18개월(체중 380kg) 이상 되고 임상적 소견과 임상병리학적 검사에 의하여 건강하다고 인정되는 처녀우 9두와, 분만후 60일 이상 경과되고 이식전까지 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 경산우 14두를 공시하였다.

발정 동기화: 수란우는 발정주기에 관계없이 25mg의 prostaglandin F_{2a}(Lutalyse, Upjon Co., USA; 이하 FGF_{2a}라 함)를 11일 간격으로 3회 근육주사 하는 방법으로 발정동기화를 유도하였으며, 처치후 1일 3회,

Table 1. Classification of recipients

Recipient	No. of synchronized	No. of transferred
Cow	14	6
Heifer	9	7
Total	23	13

1회 30분 이상 관찰하여 standing estrus를 보이는 개체를 발정우로 규정하고 임상적 검사에 의해 이식에 적합하다고 인정되는 미경산우 7두와 경산우 6두를 최종 선발하여 수란우로 사용하였다^{26,27}(Table 1).

2. 수정란의 동결 및 융해

수정란의 동결: 수정란은 일본 北海道 十勝育成牧場에서 채란하여 50%의 혈청이 첨가된 Dulbecco's PBS에 1.4M glycerol의 동결보호제가 들어있는 배양액을 이용하여 20°C에서 -7°C까지는 1°C/min로 하강시키

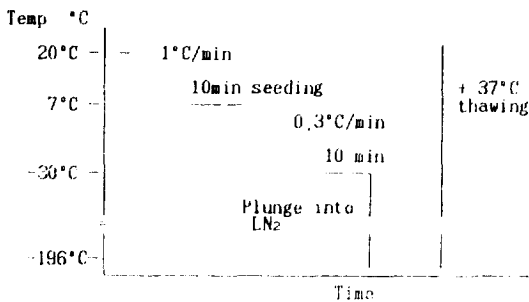


Fig 1. Freezing and thawing curve

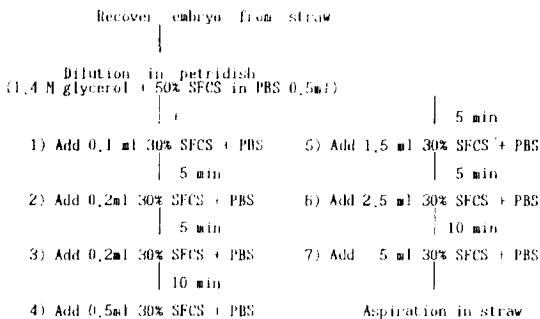


Fig 2. Dilution of cryoprotectants for frozen/thawed bovine embryos.

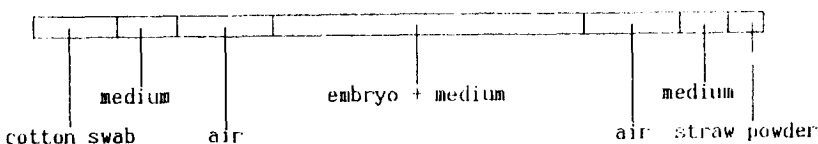


Fig 3. Preparation of straw for transfer.

고 -7°C에서 10분간 식빙시키고 -30°C까지는 0.3°C/min으로 하강시켜, -30°C에 10분 정지후 LN₂에 침지하여 동결보존 하였다²⁸(Fig 1).

수정란의 융해: 동결수정란의 융해는 수정란을 포함한 동결 straw를 37°C의 온수에 넣고 30초간 진탕시키는 급속융해법으로 하였다(Fig 1). 융해후 straw의 끝을 절단, 수정란을 petri dish에 옮겨 실험현미경(Olympus Optical Co., Japan)하에서 수정란의 상태를 검사하고, 1.4M의 glycerol이 함유된 50% Semi-Fetal Calf Serum(이하 SFCS라 함)+PBS액 0.5ml에 수정란을 넣은후 30% SFCS+PBS액을 0.1ml 첨가하여 5분간 정지후, 이어 동일한 액을 0.2ml; 5분, 0.2ml; 10분, 0.5ml; 5분, 1.5ml; 5분, 2.5ml; 10분 그리고 5ml를 첨가하여 동결보호제를 단계적으로 제거하였다²⁸(Fig 2).

3. 수정란의 검사

동결보호제를 제거한 후 각 수정란은 발육단계, 질(質) 그리고 일령별로 분류하여 이식할 수란우를 결정하였다. 이어 각 수정란을 0.25ml 인공수정용 straw에 흡입하여 끝을 straw powder로 봉한 후 이식할 때까지 실온에서 보존하였다(Fig 3).

4. 황체의 위치 및 등급

수란우는 수정란 이식전에 적장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌측 또는 우측난소)를 확인하고, 황체의 크기가 정상(15~25mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 1등급으로, 정상크기이나 crown이 없는 것을 2등급으로, 크기가 정상 이하(<15mm 이하)이고 crown이 없는 것을 3등급으로 분류하였으며, 정상크기 이하이고 난포를 지닌 것을 4등급으로 분류하였으며, 4등급은 수란우에서 제외시켰다^{6,13,29}(Table 2).

Table 2. Classification of corpus luteum grade

Grade	Palpation remarks
1	Normal size(15 to 25mm) and good crown
2	Normal size, without crown
3	Small(<15mm) without crown
4*	Small and additional follicle

* Excepted from recipient.

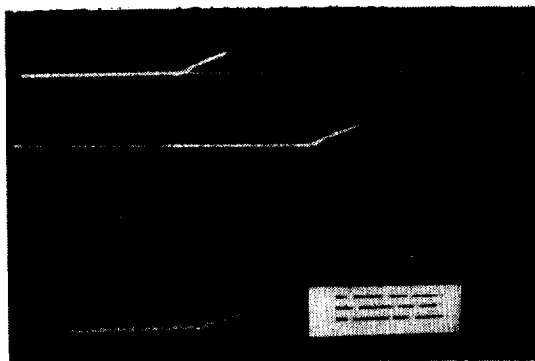


Fig 4. Straw containing embryo placed in a Cassou gun held by sheath and protected by plastic cap.

5. 수정란의 이식

모든 수란우는 이식전 12시간 절식시켰으며, 이식을 용이하게 하기 위해 이식직전 2% Lidocaine액 5ml로 척추경막의 마취를 실시하였다. 주사 후 꼬리를 묶어 앞으로 고정시키고 비눗물과 소독액으로 외음부주위를 세척한 후 멸균 생리식염수로 다시 한번 세정하고 멸균된 tissue paper로 물기를 제거하였다.

이식방법은 straw가 장착된 수정란 이식기를 이용, 비외과적 자궁경관 경유법에 의하여 자궁각 선단부의 자궁난관 접합부 5cm 부위에 수정란을 이식하였다. 사용된 수정란이식기는 질내세균의 자궁내 감염을 막기 위하여 고안된 plastic cap을 Cassou gun에 장착하여 사용하였다(Fig 4). 수정란 이식기가 자궁경에 도달한 다음, 자궁경을 통과하기 직전에 이 plastic cap을 제거하여 이식기만을 자궁내로 삽입하였다.²⁹⁻³¹

6. 수태율 판정

수정란 이식후 90일에 직장검사를 통해 태막 및 태아측진법으로 수태 여부를 판정하였다.

7. 채혈 및 분석

채혈 및 혈장, 혈청의 분리: 첫번째 채혈은 발정동기화를 위한 마지막 PGF_{2α}투여 직전에 경정맥을 통해 하였고 두번째 채혈은 수정란이식 직전에 실시하였다.

혈장을 분리하기 위한 혈액은 EDTA 15mg씩이 첨가된 원심분리관 2개에 10ml씩 채혈하였으며, 혈청을 분리하기 위한 혈액은 원심분리관 2개에 10ml씩 채혈하였다. 채취된 혈액은 ice box에 넣어 실험실로 운반하여, 혈장은 채혈 후 4시간 이내에, 혈청은 실온에서 응고시킨 후 2,500rpm에서 15분간 원심분리하여 측정 항목별 용기에 분주한 후 측정시까지 -80°C로 냉동보존하였다.^{8,12,32}

혈장 progesterone 및 estradiol-17β의 측정: 혈장

내 progesterone의 측정에는 radioimmunoassay(RIA) kit(immuchem direct progesterone kit, USA, Immuchem Co.)를 사용하였다. 0, 0.15, 0.5, 1.0, 5, 20, 80ng/ml씩의 progesterone이 들어 있는 표준액과 실온에서 자연용해시킨 혈장을 progesterone에 대한 항체가 부착되어 있는 anti-progesterone coated tube에 각각 100μl씩 분주후 모든 tube에 1,000μl의 125-I-progesterone용액(40,000cpm)을 첨가한 후 분주한 시료를 vortex mixer로 잘 섞이도록 하였다. 모든 표준용액과 혈장시료는 2배수의 tube로 준비하였다. 이러한 과정이 모두 끝난 tube는 37±1°C의 incubator에서 120분간 반응시킨 후 내용물을 버리고 거꾸로 하여 흡수지에 가볍게 두드린 후 거꾸로 정치시켜 내부의 액체성분을 최대한 제거하여 측정하였다. Progesterone 측정용 kit의 측정내 변동계수는 10.8%였고, 측정간 변동계수는 10.4%였다.

혈장내 estradiol-17β의 측정에는 RIA kit(Immuchem estradiol-17β kit, USA., Immuchem Co.)를 사용하였다. 각각 0, 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000pg/ml씩의 estradiol-17β가 들어있는 표준액과 실온에서 자연용해시킨 혈장시료를 estradiol-17β에 대한 항체가 부착되어 있는 anti-estradiol coated tube에 각각 100μl씩 분주하였다. 분주후 모든 tube에 1,000μl의 125-I-estradiol-17β(40,000cpm)을 첨가하고 분주한 시료를 vortex mixer로 잘 섞이도록 하였다. 모든 표준용액과 혈장시료는 2배수의 tube로 준비하였다. 위 과정이 끝난 tube는 37±1°C의 incubator에서 90분간 반응시킨 후 내용물을 버리고 거꾸로하여 흡수지에 가볍게 두드린 후 거꾸로 정치시켜 내부의 액체성분을 최대한 제거하여 측정하였다. Estradiol-17β측정용 kit의 측정내 변동계수는 15.8%이었고, 측정간 변동계수는 15.4%이었다.

Progesterone 및 estradiol-17β의 radioactivity측정에는 125-I로 조정된 γ-counter(Packard Co. USA)를 이용하여 측정하였고 progesterone 및 estradiol-17β의 측정치는 다음의 공식에 의해 산출하였다.

$$\%B/BD = \frac{\text{Average CPM(sample)} - \text{Average CPM(NSB)}}{\text{Average CPM(0 standard)} - \text{Average CPM(NSB)}}$$

NSB=non-specific binding

혈청화학치의 분석: 혈청 total cholesterol(이하 T-CHO), calcium(이하 Ca) 그리고 inorganic phosphorus(이하 Pi)를 정량하기 위하여 각각 효소-색소법을 이용한 T-CHO 측정용 kit(榮研, 日本), OCP법에 의한 Ca정량 kit(Ansan) 그리고 인올리브린산-색소법에

의한 Pi 측정용 kit(Ansan)를 이용하여 spectrophotometer(Shimazu, UV-100, Japan)로 측정, 계산하였다.

결 과

젖소 동결수정란의 비외과적이식시 수태율을 향상시킬 수 있는 수란우의 선발 기준을 알아보고자 수란우의 혈장 progesterone과 estradiol-17 β 및 T-CHO, Ca과 Pi를 측정하여 얻은 결과는 다음과 같다.

Progesterone 농도와 수태율과의 관계 : 마지막 PGF_{2 α} 투여시 progesterone 농도가 1.0ng/ml 미만인 수란우 1두는 수태되지 않았으며, 1.0~4.0ng/ml 범위와 4.0ng/ml 이상의 범위에서는 수태율이 각각 80%와 50%를 나타냈고, 세 구간의 평균농도는 각각 0.15 \pm 0ng/ml, 2.11 \pm 0.62ng/ml 그리고 5.29 \pm 1.30ng/ml이었다.

이식시 수란우의 progesterone 농도가 1.0~4.0ng/ml인 범위에서 88.9%의 높은 수태율을 보인 반면 1.0 ng/ml 미만의 범위 및 4.0ng/ml 이상의 범위에서는 각각 33.3%와 0%의 낮은 수태율을 나타내었고, 세 구간의 progesterone 평균농도는 각각 0.71 \pm 0.17ng/ml, 1.68 \pm 0.53ng/ml 그리고 4.16 \pm 0ng/ml이었다(Fig 5).

황체등급에 따른 progesterone 농도 및 수태율 : 수란우의 황체를 수정란이식직전 직장검사에 의해 판별한 등급에 따른 progesterone 농도는 1등급에서 1.55 \pm 1.13ng/ml이었고 2등급은 1.80 \pm 0.72ng/ml이었으며,

3등급은 2.06 \pm 0.25ng/ml이었고, 수태율은 각각 75.0%, 33.3% 그리고 100%이었다(Table 3).

황체의 위치에 따른 progesterone 농도 및 수태율 : 이식시 황체가 좌측난소에 위치시 progesterone의 농도는 1.79 \pm 0.61ng/ml이었고, 우측난소에 위치시는 1.63 \pm 1.33ng/ml이었으며, 수태율은 각각 80.0%와 63.5%였다(Table 4).

Table 3. Recipient plasma progesterone levels on the day of transfer and pregnancy rate in relation to corpus luteum grade

CL* grade	No. of transferred	Progesterone levels(ng/ml)	No. of pregnant(%)
1	8	1.55 \pm 1.13	5 (75.0)
2	3	1.80 \pm 0.72	1 (33.3)
3	2	2.06 \pm 0.25	2(100.0)
Total	13	1.69 \pm 1.08	9 (69.2)

* Corpus luteum.

Table 4. Progesterone levels and pregnancy rate of recipient according to site of corpus luteum

Site of CL	No. of recipient	Progesterone levels(ng/ml)	Pregnancy rates(%)
Right ovary	8	1.62 \pm 1.33	63.5
Left ovary	5	1.79 \pm 0.61	75.0
Total	13	1.69 \pm 1.08	69.2

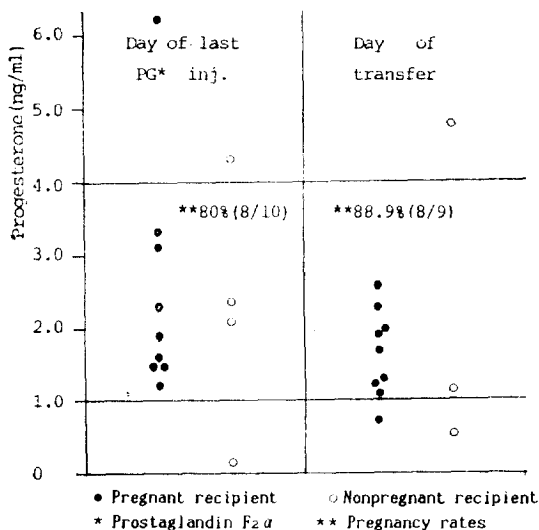


Fig 5. Relationship between plasma progesterone level and the number of recipients.

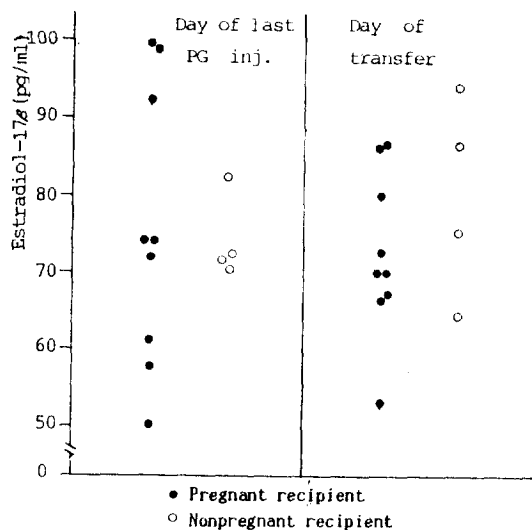


Fig 6. Relationship between plasma estradiol-17 β level and the number of recipient.

Estradiol-17 β 농도와 수태율과의 관계 : 마지막 PGF_{2 α} 투여시 및 이식시에 수태우와 비수태우간의 estradiol-17 β 농도 분포에는 큰 차이가 없었다. 마지막 PGF_{2 α} 투여시에 수태우와 비수태우의 estradiol-17 β 평균농도는 각각 75.5 \pm 17.9pg/ml, 74.5 \pm 5.7pg/ml이었고, 이식시에는 각각 72.3 \pm 10.5pg/ml, 79.8 \pm 12.8pg/ml이었다(Fig 6).

T-CHO 농도와 수태율과의 관계 : 수태우와 비수태

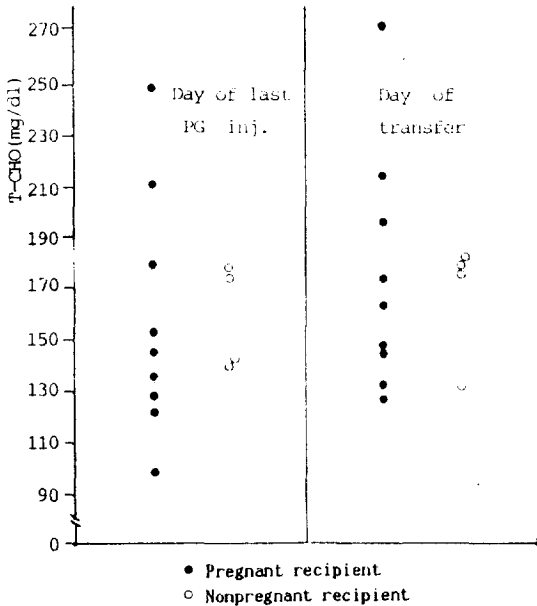


Fig 7. Relationship between serum total cholesterol level and the number of recipient.

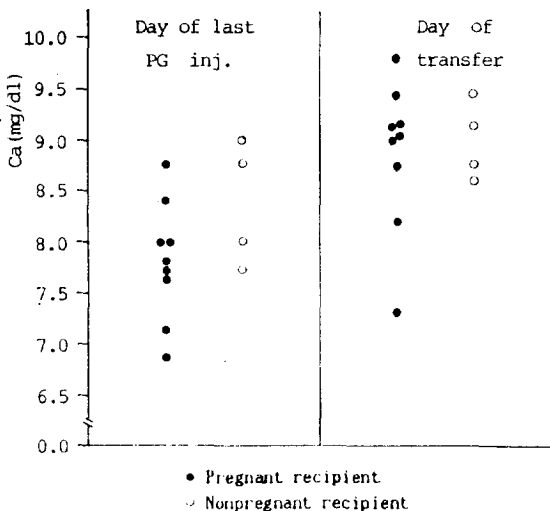


Fig 8. Relationship between serum calcium level and the number of recipient.

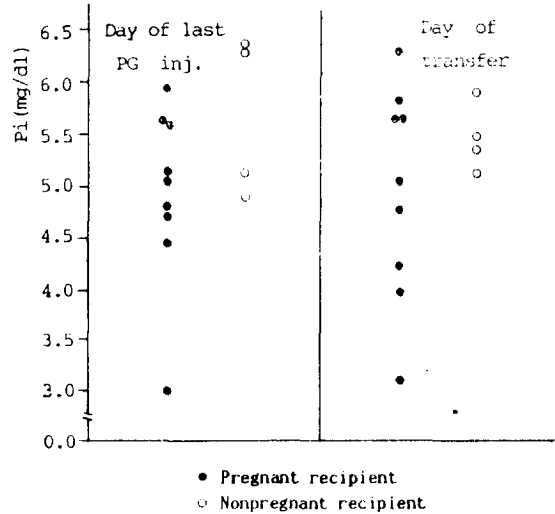


Fig 9. Relationship between serum inorganic phosphorus level and the number of pregnant.

우간의 T-CHO치 차이는 인정할 수 없었으며, 마지막 PGF_{2 α} 투여시 수태우와 비수태우의 평균 T-CHO 농도는 각각 158 \pm 47.5mg/dl, 158 \pm 20.6mg/dl이었고, 이식시에는 각각 173 \pm 46.6mg/dl, 166 \pm 23.5mg/dl이었다(Fig 7).

Ca과 Pi 농도와 수태율과의 관계 : 마지막 PGF_{2 α} 투여시 및 이식시에 적합한 Ca농도 범위는 설정할 수 없었고, 마지막 PGF_{2 α} 투여시 Ca농도는 수태우에서 7.81 \pm 0.58mg/dl이었고 비수태우군은 8.47 \pm 0.61mg/dl이었으며, 이식시 농도는 각각 4.97 \pm 0.98mg/dl, 5.47 \pm 0.31mg/dl이었다(Fig 8).

수태우와 비수태우간에 Pi 농도분포 차이는 인정할 수 없었으며, 마지막 PGF_{2 α} 투여시 Pi 농도는 수태우에서는 4.95 \pm 0.78mg/dl이었고 비수태우는 5.72 \pm 0.58mg/dl이었으며, 이식시에는 각각 4.97 \pm 1.06mg/dl, 5.47 \pm 0.31mg/dl이었다(Fig 9).

고 찰

수정란이식시 수태율을 향상시킬 수 있는 수란우 선발의 객관적인 지표가 제시되어 있어 이를 이용할 수 있다면 산업동물인 소에서는 수정란 이식사업의 이상적 과정으로 평가될 것이다. 그러나 많은 노력에도 불구하고 아직 수란우의 여러 요인에 대한 확실한 기준은 제시되어 있지 않은 형편이다. Sreenan과 Diskin²⁵은 젖소 동결수정란의 이식시 수란우와 공란우의 동기화된 내분비요인 및 자궁환경은 초기수정란의 생존에 필수적 역할을 한다고 하였는데, 이중 progesterone은

임신초기 자궁내막의 선조적을 증식시켜 자궁유의 분비를 촉진하고, 수정란에 영양을 공급하며, 자궁 및 자궁경관의 자극에 의한 oxytocin의 분비를 억제시켜 착상 및 확장에 용이한 자궁환경을 조성하는 것으로 알려져 있다.³³ 이러한 progesterone의 발정주기동안의 변동상을 보면 발정 1~3일 동안은 낮은 농도를 유지한 후 3~4일경 부터 황체의 성숙과 함께 16~18일까지 지속적으로 증가하고(5~9ng/ml), 황체가 퇴행하면서 발정 2~4일 전부터 감소하여 발정기에는 최하수준을 유지한다고 하였다.^{34,35} 수태후 progesterone 농도의 변동상에 관하여 Henricks et al¹⁰, Lukazewska와 Hensel¹¹, Kimura et al¹⁶은 6~7일경부터 비수태우보다 유의성 있게 높은 수준을 유지하며 증가하여, 임신기간동안 6~15ng/ml의 수준을 유지하면서 임신유지의 기능을 담당한다고 하였고, Randel et al¹⁴, Folman et al¹⁵ 그리고 Linares et al¹⁶은 수태후 14~16일 까지는 비수태우와 차이가 없으나 이후 증가하여 임신유지 기능을 담당한다고 하였다.

본 실험에서는 progesterone 수준이 수정란이식후 수태율에 미치는 영향을 조사하기 위해 마지막 PGF_{2α} 투여직전 수란우의 progesterone 농도를 측정된 결과 1.0~4.0ng/ml 범위에서 가장 높은 수태율(80%)을 나타냄을 알았다. 이 때는 발정기의 8~9일에 해당되는 시기로서 본 실험의 성적은 Hasler et al¹²이 보고한 발정기의 8~9일의 평균 progesterone치인 2.9~3.8ng/ml 보다는 낮은 수준이었다. 혈중 progesterone치는 측정시의 조건에 따라 다소 변동상을 나타내는 데, 하절기의 progesterone 농도는 미경산우 및 경산우에서 유의성 있게 낮은 수준을 나타내었고,³⁷⁻³⁹ 황체기의 증가추이도 완만하였다고 하였고, Vahdat et al⁴⁰은 온도, 시간, 항응고제(EDTA, heparin)에 의한 농도감소에 대해 항응고제에 의한 영향은 없었으며, 혈장을 분리하지 않고 전혈을 방치시 혈구의 대사에 의해 progesterone은 4°C에서 1시간 이내에 큰 폭으로 감소하며 12시간 후에는 유의성 있게 감소한다고 하였다. 박 등⁴¹은 4°C에서 heparin첨가 후 전혈을 방치시 8시간 후에 progesterone이 25% 감소하였다고 하였다. 이상의 사실로 미루어 볼 때 본 실험에서의 progesterone의 측정시 조건이 하절기(6월)였고 항응고제로 EDTA를 사용하여 채혈후 4시간 이내에 원심분리하여 측정시까지 -80°C에서 냉동 보관한점을 감안하면 본 실험에서의 측정치가 낮은 이유는 측정시기가 하절기였고 채혈 후 혈장분리까지의 시간에 따른 영향이 작용한 것으로 사료된다. 본 실험에서 progesterone치가 1.0~4.0ng/ml 구간에서 가장 높은 수태율을 보였는데 이

성적은 발정동기화시의 progesterone 농도와 이에 따른 수태율과의 관계에 관한 보고를 접하지 못하여 직접 비교할 수는 없었으나, Folman et al,¹⁵ Rosenberg et al³⁸ 그리고 Fonseca et al³⁵ 자연 발정시 직전황체기의 높은 progesterone치는 높은 수태성적을 나타냈으며, 직전황체기의 높은 progesterone치가 급격히 감소하여 발정현상을 나타내는 것이 완만히 progesterone치가 감소한 후 발정현상을 나타내는 것보다 이어지는 발정기의 교배시 높은 수태성적을 나타냈다는 사실로 보아 본 실험에서의 PGF_{2α} 투여직전에 1.0~4.0ng/ml의 progesterone 농도는 자연발정시 황체기 말기에 비교하면 낮은 수준이지만 PGF_{2α} 투여로 인해 progesterone의 급격한 감소와 이에 따른 발정이 유발되었기에 이러한 감소가 수태율에 영향을 미치지 않았는가 추측된다.

수정란이식 직전에 채혈하여 측정한 수란우의 progesterone치에 대하여 Remsen과 Roussel⁸과 Northey et al⁷은 2~5ng/ml 범위에서 및 이상의 범위보다 높은 수태성적을 나타냈다고 보고하였고, Northey et al⁷과 Arave et al⁴²은 2~6ng/ml 범위에서 가장 높은 수태율을 나타냈다고 하였다. 그러나 Stubbings와 Walton¹³은 이식시 54%의 수란우가 1~4ng/ml의 progesterone 농도를 유지하고 있었다고 보고하였으며, Niemann et al⁶은 수란우의 progesterone치가 2ng/ml 이하의 범위에서도 33.5%의 수태성적을 나타내었고 1ng/ml 이하에서는 수태우가 없었다고 보고하였다. 본 실험에서는 1.0ng/ml 미만범위, 1.0~4.0ng/ml, 그리고 4.0ng/ml 이상의 3구간으로 구분하여 수태율을 조사한 결과 1.0~4.0ng/ml 범위에서 88.9%의 수태율을 나타내어 1.0ng/ml 미만(33.3%) 및 4.0ng/ml 이상(0%) 범위보다 높은 수태율을 나타내는 경향을 보였다.

이와 같이 기준 농도보다 낮은 농도와 높은 농도에서 수태율이 낮은 이유는 estrogen과의 미세한 hormone 균형을 깨뜨려 자궁내 유영상태(free living stage)의 수정란에 영양 공급의 문제 및 부적합한 자궁환경을 조성하기 때문이라고 했고,^{9,43,44} Niemann et al⁶은 수정란의 생존에 필수적 환경을 간섭하기 때문이라고 했으며, Stubbings와 Walton¹³은 수란우의 적절한 발정 동기화가 이루어지지 않은 상태이기 때문이라고 하였다.

비록 연구자간에 농도범위의 설정 및 결과에 약간의 차이는 있지만 본 실험에서 제시하는 수정란의 이식시 1.0~4.0ng/ml 범위의 progesterone 농도 단독 요인만을 고려할때 수태율을 예측한다는 것은 한계가 있지만

이식 후 수태율에 영향을 미치는 커다란 요인으로 인정되며, 이는 수란우 선발의 타당한 지표가 될 수 있다고 생각된다.

이식시 황체등급에 따른 progesterone 농도와 수태율과의 관계는 1등급에서 $1.55 \pm 1.13 \text{ ng/ml}$ 였고, 2등급에서는 $1.80 \pm 0.72 \text{ ng/ml}$, 그리고 3등급에서는 $2.06 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$ 로 등급간에 차이는 없었으며 수태율은 각각 75.0%, 33.3% 그리고 100%로 오히려 3등급에서 수태율이 높은 경향을 나타내었다. 이는 progesterone의 농도를 고려할 목적으로 황체의 등급을 구분하는 것과 수태율 예측을 위해 이식시 황체등급을 판별하는 것은 반드시 일치하지는 않는다는 Hasler et al.^{12,29} Donaldson⁴⁵은 Ott et al.⁴⁶ Stubbings와 Walton,¹³ 그리고 Voss et al.³의 보고와 일치하는 결과였다. 2등급 및 3등급에서 농도간에 유의차가 있었다는 Niemann et al.⁶의 보고와 1등급과 2,3등급간에 수태성적의 차이가 있었다는 보고²⁸와는 일치하지 않는 결과이다. 이상의 보고와 본 실험의 결과로 보아 이식시 적장정사를 통한 황체의 등급과 혈중 progesterone치 및 수태율 사이에는 연관성이 적은 것으로 생각되며 수정란이식시 적장정사에 의해 판별한 황체등급으로 황체기능을 판별하는 것보다 가능하면 progesterone 농도를 측정하여 이식우를 결정하는 것이 더 좋은 수태성적을 얻을 것으로 판단된다.

이식시 황체가 좌측 난소에 존재시 progesterone 농도는 $1.79 \pm 0.06 \text{ ng/ml}$ 였고, 우측 난소에 존재시는 $1.62 \pm 1.33 \text{ ng/ml}$ 였으며, 수태율은 각각 75.0%와 63.5%로 황체 위치에 따른 progesterone의 농도 및 수태율의 차이는 없었으며, 이는 우측 난소에서 배란은 많이 일어나는 경향을 보이지만⁴⁷ progesterone의 농도와는 관련이 적었다는 Hasler et al.¹²의 보고와 일치하는 결과이다.

한편 마지막 PGF_{2α} 투여시 수태우와 비수태우간의 estradiol-17β 농도 차이 및 수태에 적합한 농도 분포는 정할 수 없었다. 이식시 수태우와 비수태우간의 estradiol-17β 농도 차이는 없었다. 이를 설명할 수 있는 수정란이식시의 성적은 짐작할 수 없었으나 Randel et al.^{14,19}과 Henricks et al.¹⁷은 비수태우가 수태우보다 1, 5, 9일에 estradiol-1 수준이 높았다고 하였는데 이는 내인성의 높은 estradiol-17β치가 황체를 퇴행시켜 수정란을 위한 자궁의 착상 증식변화를 방해하기 때문이라고 하였다. 이상의 보고와 본 실험의 결과를 볼 때 수정란 이식시의 높은 estradiol-17β치는 황체기능에 관여하여 이식후의 수태에 영향을 미치는 것으로 추측된다.

이제까지 보고된 바에 의하면 난소기능 및 번식에 영향을 미치는 요인으로 T-CHO, Ca 그리고 Pi 등이 있는데 이중 T-CHO에 대해 Kweon et al.²⁰⁻²²은 T-CHO치가 130mg/dl 이상인 공란우에서 과잉배란유기 후에 이식가능한 수정란의 수에는 유의성이 없었으나, 최수란수는 130mg/dl 이하의 것 보다 유의차있게 높았다고 하였으며, 건유중에 수준이 120mg/dl 이하에서는 분만후 질병발생율이 유의성있게 높았다고 하였다. 본 실험의 수란우에서는 농도분포나 평균농도간의 별다른 차이는 볼 수 없었으며, T-CHO치는 수정란이식 후 수란우의 수태율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

Ca과 Pi치의 수태율과 연관성을 보면, 수란우의 대부분이 마지막 PGF_{2α} 투여시 및 이식시에 Ca 농도는 성우의 평균농도인 8.0~12.0mg/dl의 범위를 벗어나지 않았고, 수태우와 비수태우간의 농도분포간의 차이도 발견할 수 없었다.

Pi의 측정치는 수태우와 비수태우간의 농도분포의 차이가 없었고, 성우의 Pi 혈중평균 농도인 4.0~6.0 mg/dl⁴⁸의 범위에 대부분의 수란우가 위치하고 있었으며 수태율에 영향을 미치지 않은 것으로 판단되며, 이는 Pi의 이상치는 성성숙의 지연 및 발정의 둔화는 보이지만 규칙적 배란 및 수태율에는 간섭하지 않는다는 보고^{48,49}와 일치한다. 본 실험에서의 Ca과 Pi치는 대부분의 수란우에서 수태율에 큰 영향을 미치지 않았으며, 이에 대해 Sreenan과 Diskin²⁵은 수란우의 선발에 있어 극도의 영양 불균형을 피하여 정상적 성장율을 보이는 개체를 택하면 수정란의 생존에 큰 영향은 없을 것이라고 보고하였다.

본 실험의 결과를 종합하여 볼 때 수정란이식시에 수태율에 영향을 미치는 중요한 요인으로는 이식시 혈중 progesterone 농도였고, 이식시 혈중 progesterone치가 1.0~4.0ng/ml인 개체는 수란우로 적합할 것으로 판단되며, T-CHO, Ca과 Pi농도는 수태율에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났고, 발정동기화시의 내분비요인에 대한 것은 앞으로 더 조사되어야 할 과제라고 생각된다.

결론

젖소 동결수정란의 비외과적이식시 수태율에 영향을 미치는 요인 및 수란우의 선발 지표는 다음과 같다.

마지막 PGF_{2α} 투여시 수란우의 progesterone 농도가 1.0~4.0ng/ml 범위(80%)에서 1.0ng/ml 미만(0%) 및 4.0ng/ml 이상(50%)의 범위보다 높은 수태율을 나타내었고, 수정란 이식시 측정된 수란우의 최적 pro-

gesterone 농도는 1.0~4.0ng/ml로 이때 수태율은 88.9%였고, 1.0ng/ml 미만(33.3%) 및 4.0ng/ml 이상(0%) 범위에서는 수태율이 감소하는 경향을 나타내었다.

황체가 존재하는 난소의 左·右 위치에 따른 progesterone 농도와 수태율은 큰 차이가 없었고, 황체의 등급에 따른 progesterone 농도 및 수태율도 등급과 일치하지는 않았다.

수태우와 비수태우에 있어서 마지막 PGF_{2α} 투여시 및 이식시의 estradiol-17β치의 분포에 차이는 없었으나, 수란우의 progesterone 농도가 1.0ng/ml 이하의 군(8.22±1.35ng/ml; 33.3%)에서 그 이상의 군(7.23±1.01ng/ml; 80%)보다 높은 estradiol-17β치와 낮은 수태율을 나타내었다.

마지막 PGF_{2α} 투여시 및 이식시의 T-CHO치의 분포는 수태우와 비수태우간의 큰 차이가 없어 수태에 적합한 구간을 설정할 수 없었다.

Ca와 Pi의 농도는 대부분의 수란우에 있어서 성우의 정상범위에 속하여 있었으며, 수태우와 비수태우간의 측정치의 분포가 비슷하여 수태에 적합한 범위를 설정할 수 없었다.

이상의 성적을 종합할때 이식시 1.0~4.0ng/ml 범위의 progesterone 농도를 지닌 수란우를 선발하는 것이 수태율을 향상시킬 수 있는 지표가 될 수 있으며, T-CHO, Ca 및 Pi는 수태에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Willett EL, Black WG, Casida Le, et al. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951;100:113.
2. Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686~690.
3. Voss HJ, Landmann D, Wilke G, et al. Pregnancy rate after surgical transfer of imported frozen bovine embryos. *Theriogenology* 1986; 25:209(abst).
4. Mahon GD, Rawle JE. The export of deep-frozen bovine embryos. *Theriogenology* 1987;27:21~35.
5. Schneider HJ, Castleberry RS, Griffin JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 1980;13:73~85.
6. Niemann H, Sacher B, Elsaesser F. Pregnancy rates relative to recipients plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1985;23:631~639.
7. Northey DL, Barnes FL, Eyestone WH, et al. Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone, and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology* 1985;23:214(abst).
8. Remsen LG, Roussel JD. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 1982; 18:365~372.
9. Britt JH, Holt LC. Endocrinology screening of embryo donor and embryo transfer recipients: A review of research with cattle. *Theriogenology* 1988;29:189~202.
10. Henricks DM, Lamond DR, Hill JR, et al. Plasma progesterone concentrations. *J Anim Sci* 1971;33:450~454.
11. Lukaszewska J, Hansel W. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in cow. *J Reprod Fert* 1980;59:485~493.
12. Hasler JF, Bowen RA, Neelson LD, et al. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J Reprod Fert* 1980; 58:71~77.
13. Stubbings RB, Walton JS. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. *Theriogenology* 1986; 26:145~155.
14. Randel RD, Garverick HA, Surve AH, et al. Reproductive steroids in the bovine. V. Comparisons of fertile and nonfertile cows 0 to 42 days after breeding. *J Anim Sci* 1971;33:104~105.
15. Folman Y, Rosenberg M, Herz E, et al. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fert* 1973;34:267~278.
16. Linares T, Larsson K, Edqvist LE. Plasma progesterone levels from oestrus through day 7 after AI in heifers carrying embryo with normal or deviating morphology. *Theriogenology*

- 1982;17:125~132.
17. Henricks DM, Dickey JF, Hill JR, et al. Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows. *Endocrinology* 1972;90:1336~1342.
18. Wettemann RP, Hafs HD. LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. *J Anim Sci* 1973;36:51~56.
19. Randel RD, Gaverick HA, Erb RE, et al. Reproductive steroids in the bovine. IV. Urinary estrogen excretion rates from 0 to 9 days after breeding in fertile and nonfertile cows. *J Anim Sci* 1970;32:1183~1189.
20. Kweon OK, Kanagawa H, Takahashi Y, et al. Plasma endocrine profile and total cholesterol level in superovulated cows. *Theriogenology* 1987;27:841~857.
21. Kweon OK, Ono H, Osasa K, et al. Factors affecting serum total cholesterol level of lactating holstein cows. *Jpn Vet Sci* 1986;48:481~486.
22. Kweon OK, Ono H, Seta T, et al. Relationship between serum total cholesterol levels before calving and occurrence rate of disease after calving in holstein heifer and cows. *Jpn J Vet Res* 1985;33:11~17.
23. Blood DC, Henderson JA, Arundel LH, et al. *Veterinary medicine*. 6th. London: Bailliere tindall, 1983:1055~1059.
24. Knickerbocker JJ, Thatcher WW. Endocrine patterns during the initiation of puberty, the estrus cycle, pregnancy and parturition in cattle. In: Morrow DA, ed. *Current veterinary in theriogenology*. 2nd ed Philadelphia: WB Saunders Co., 1986:117~125.
25. Sreenan JM, Diskin MG. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 1987;27:99~113.
26. Coleman DA, Daily RA, Leffel RE, et al. Estrus synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J Dairy Sci* 1987;70:858~866.
27. Tanabe TY, Hann RC. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$. 1. Influence of stage of cycle at treatment. *J Anim Sci* 1984;58:804~805.
28. 황우석, 조충호. 소의 비외과적 수정란이식시에 있어서 수태율에 영향을 미치는 요인. *한국임상수의학회지* 1988;5:1~7.
29. Hasler JF, McCausley AD, Lathrop WF, et al. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 1987;27:139~168.
30. Elsdon RP, Seidel GE Jr, Takeda T, et al. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology* 1982;17:1~9.
31. Tervit HR, Cooper MW, Goold PG, et al. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 1980;13:63~67.
32. Holdsworth RJ. Measurement of progesterone in bovine plasma and preserved whole blood samples by a direct radioimmunoassay. *Br Vet J* 1980;136:135~140.
33. Roberts ST. *Veterinary obstetrics and genital disease* (Theriogenology). 2nd ed, Michigan.: Edwards Brothers Inc, 1971:343~375.
34. Hansel W, Convey EM. Physiology of the estrus cycle. *J Anim Sci* 57 1983;(suppl 2):404~424.
35. Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, et al. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys; Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrus, detection of estrus, conception rate, and day open. *J Dairy Sci* 1983;66:1128~1147.
36. Kimura M, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Luteal phase deficiency of repeat breeding in dairy cows. *Br Vet* 1987;146:560~566.
37. Abilay TA, Johnson HD, Madan M. Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrus cycle. *J Dairy Sci* 1975;58:1836~1840.
38. Mill AC, Thatcher WW, Dunlap SE, et al. Influence of postbreeding thermal stress on peripheral plasma progestin concentrations in heifers. *J Dairy Sci* 1972;55:400~401.

39. Rosenberg M, Herz Z, Davidson M, et al. Seasonal variation in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. *J Reprod Fert* 1977;51:363~367.
40. Vahdat F, Hurtgen JP, Whitmore HL, et al. Decline in assayable progesterone in bovine plasma: Effect of time, temperature anticoagulant, and presence of blood cells. *Am J Vet Res* 1981; 42:521~522.
41. 박전홍, 이남형, Moestl E, 등 저장된 소 혈액의 프로게스테론감소. *한축지* 1987;29:426~429.
42. Arave CW, Bunch TD, Mickelsen CH, et al. Factor affecting survivability of transferred whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology* 1987;28:373~382.
43. Markette KL, Seidel GE Jr, Elsdon RP. Estimation of embryonic losses in bovine embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to estrus. *Theriogenology* 1985;23:45~61.
44. Screenan JM, Diskin MG. Early embryonic mortality in the cow: Its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec* 1983;112: 517~521.
45. Donaldson LE. Recipients as a source of variation in cattle embryo transfer. *Theriogenology* 1985;23:188(Abst).
46. Ott RS, Bretzlaff KN, Hison JE. Comparison of palpable corpora lutea with serum progesterone concentrations in cows. *JAVMA* 1986;188:1417 ~1419.
47. Reece RP, Turner CW, The functional activity of the right and left bovine ovary. *J Dairy Sci* 1938;21:37~39.
48. Morrow DA. Phosphorus deficiency and infertility in dairy heifers. *JAVMA* 1969;154:761~ 768.
49. Morrow DA. Nutrition and fertility in dairy cattle. *MVP* 1980;61:499~503.