

## 진도개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기 판정을 위한 질세포검사의 이용성

손창호<sup>1\*</sup> · 백인석 · 신창록 · 최한선 · 강병규  
전남대학교 수의과대학, 전남대학교 호르몬 연구센터\*

### The Use of Vaginal Cytology for the Determination of Estrous Cycle, Optimal Breeding Time and Ovulation Time in Korea Jin-do Dogs

Chang-ho Son<sup>1\*</sup>, In-seok Paik, Chang-rok Shin, Han-sun Choi and Byong-kyu Kang  
College of Veterinary Medicine and Hormone Research Center,\*  
Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

**ABSTRACT :** The aim of this study was to assess the precision of the estimates of the time of estrous cycle, optimal breeding and ovulation derived by vaginal cytology. The thirteen Korea Jin-do dogs were examined the vaginal cytology, plasma estradiol-17 $\beta$  and progesterone assay during the estrous cycle. Day 0 was the day of the first male acceptance. The main change of vaginal cytology during the estrous cycle was the high proportion of anuclear cell and erythrocyte in proestrus, superficial cell, anuclear cell and erythrocyte in estrus, parabasal cell, large intermediate cell and leukocytes in diestrus, and parabasal cell and small intermediate cell in anestrus, respectively. These data indicated that vaginal cytology was reliable method for estimating estrous cycle in Korea Jin-do dogs. In the cell indices during estrus the maximum eosinophilic index was  $92.0 \pm 2.6$  (Mean  $\pm$  SEM)% at Day 2 and the maximum cornification index was  $96.0 \pm 1.3\%$  at Day 2, respectively. The eosinophilic index and cornification index of up to 70% were found at Day -1 to Day 5 and Day -6 to Day 8, and up to 80% at Day 1 to Day 4 and Day -4 to Day 6, respectively. From these data it was presumed that eosinophilic index was more reliable index for monitoring optimal breeding time than cornification index, because eosinophilic index peak period was shorter than cornification index peak period and Day 2 was the day of ovulation. Therefore, optimal breeding time was the eosinophilic index peak period, more than 80% of eosinophilic index. The estradiol-17 $\beta$  peak had reached at Day -1. Eosinophilic index peak followed the estradiol-17 $\beta$  peak, with 3 days delayed when progesterone concentration was  $4.5 \pm 0.5$  ng/ml. These data estimated that the ovulation time was the day of eosinophilic index peak, Day 2. It was concluded that vaginal cytology was reliable method for estimating estrous cycle, optimal breeding time and ovulation time in Korea Jin-do dogs.

**Key words :** vaginal cytology, estradiol-17 $\beta$ , progesterone, optimal breeding time, ovulation, Korea Jin-do dog

## 서 론

개는 다른 동물과 달리 발정전기와 발정기의 길이가 길고 다양하기 때문에 교배적기 및 배란시기를 정확하게 판정하는데에는 어려움이 있으며<sup>1,17</sup>, 이들을

판정하기 위한 방법으로는 숫개 허용여부<sup>5,23</sup>, luteinizing hormone (LH), estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) 그리고 progesterone (P<sub>4</sub>)과 같은 성 hormone의 농도측정<sup>5,9,10,14,15,21,41</sup>, 초음파검사<sup>6,14,22,39,40</sup> 및 질세포검사<sup>2,5,7,13,28,30,34-36,41-43,47</sup> 등이 있다.

숫개 허용여부는 교배적기를 판정하기 위해 가장 일반적으로 사용되고 있는데<sup>5</sup>, 이것은 검사가 용이하다는 장점이 있으나 개체간의 다양성, 미경산견과 경산견의 발정징후의 차이 그리고 결과를 해석하는 해석자의 주

본 연구는 한국과학재단의 호르몬연구센터 연구비(과제번호 : HRC-96-0401) 지원에 의하여 수행되었음

<sup>1</sup>Corresponding author.

관성 때문에 이 방법의 신뢰도는 낮다고 하였다.<sup>5,23</sup>.

혈중 LH, E<sub>2</sub> 및 P<sub>4</sub>와 같은 호르몬 농도측정은 교배적기 및 배란시기를 관정하는 가장 정확한 방법으로 서<sup>5,9,10, 5,21,41</sup>, 배란은 LH surge 후 1~3일에 일어난다고 보고되었다<sup>9,10,41</sup>. 그러나 이러한 호르몬 농도를 측정하기 위해서는 분석에 필요한 고가의 장비 및 특수한 시설 그리고 1일 2회 이상 채혈을 해야하는 번거로움 등과 같은 단점을 가지고 있어 일반 임상가들이 응용하기에는 한계성이 있다고 보고되고 있다.<sup>5,21</sup>.

최근에는 초음파 진단장치를 이용하여 난소의 구조물을 직접 관찰하여 배란시기를 확인하는 방법이 소개되었다<sup>6,14,15,22,39,40</sup>. 그러나 개의 난포는 다른 동물과 달리 배란전부터 난포내강의 황체화가 이루어지며<sup>10,22</sup>, 난포가 파열(collapse)되지 않은 경우가 있기 때문에 모든 개에서 배란시기를 정확하게 관정할 수 없다고 하였다<sup>6,14,15</sup>.

질세포검사는 각 발정주기별로 질세포의 출현율에 차이가 있기 때문에 발정주기 및 교배적기를 관정하기 위한 방법으로 이용될 수 있다고 하였다<sup>3,4,8,12,19,38,42,45</sup>. 또한 Schutte<sup>34-36</sup>는 발정주기의 각기에 출현하는 질세포를 세포질의 각화유무 및 세포핵의 형태에 따라 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell 그리고 anuclear cell로 분류하여 질세포검사의 진단적 가치 및 임상적 응용성을 강조한 바 있다. 한편 질세포검사에 의한 세포지수 즉, eosinophilic index (EI), cornification index (CI), superficial cell index (SCI) 및 karyopicnotic index (KPI)에 대한 임상적 응용성도 소개되었다<sup>7,13,28,36,42,45</sup>. 그리고 질세포검사는 비정상적인 발정증상 및 발정주기를 보이는 개에서도 교배적기의 관정에 응용되며<sup>16</sup>, 정확한 임신일수의 평가 및 분만일의 예시<sup>20</sup>와 생식기 질환의 진단<sup>18,29</sup>에 응용될 수 있다고 하였다.

이상에서와 같이 개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기를 관정하기 위하여 여러 가지 검사방법 등이 응용되고 있지만, 진도개에서는 이에 대한 연구가 거의 이루어져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 진도개를 보호·육성하기 위한 번식생리의 기초연구로서, 각 발정주기에 따른 질세포의 변화와 발정기 전후의 질세포상 및 세포지수를 검토한 후, 이를 발정주기, 교배적기 및 배란시기의 관정에 응용하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 대상동물

진도개 13두를 대상으로 하였으며, 이중 3두는 미경

산견 그리고 10두는 경산견이었다. 발정개시 예정 2개월전부터 매일 발정출혈 및 외음부 종대여부를 관찰하였고, 발정출혈 개시일부터 발정이 종료될 때까지는 매일 2회(09:00와 18:00) 숫개 허용여부를 관찰하여, 허용후 2일째에 자연교배를 실시하였다.

### 발정주기의 구분

Concannon과 Lein<sup>11</sup> 및 Guyant<sup>20</sup>의 기술에 준하여 발정전기는 발정출혈 개시일부터 숫개 최초 허용 전 날까지, 발정기는 숫개 최초 허용일부터 숫개 최후 허용일까지, 발정휴지기는 숫개 최후 허용일 다음날부터 임신건의 경우 분만일까지 그리고 비임신건의 경우는 혈중 P<sub>4</sub> 농도가 1.0 ng/ml 이하로 하강할 때까지로 하였으며, 그 이후부터 다음 발정출혈 개시 전날까지를 무발정기로 구분하였다.

### 질세포검사

#### 1) 질세포의 채취

Guyant<sup>20</sup> 및 이<sup>49</sup>의 방법에 준하여 멸균면봉에 생리식염수를 묻힌 후 질내에 삽입하여 질진정에서 질점액을 채취한 후 2장의 slide glass에 도말하였다. 2장의 slide glass중 1장은 공기중에서 건조한 후 각 질세포의 비율과 CI를 산출하기 위하여 Wright 염색을 실시하였고, 다른 1장은 EI를 산출하기 위하여 도말후 곧바로 95% ethyl-alcohol에 고정하여 Papanicolaou 염색을 실시하였다. 질세포검사는 발정전기 개시일부터 발정휴지기 개시후 20일까지는 매일, 발정휴지기 개시후 21일부터 다음 발정전기 개시일까지는 주 1회 실시하였다.

#### 2) Wright 염색을 실시한 질세포의 검경

질세포의 구분: Schutte<sup>34</sup>의 기술에 준하여 각 slide의 5개 시야 이상에서 200개의 질세포를 검경, 세포질의 각화유무 및 세포핵의 형태에 따라 5가지 세포, 즉

**Table 1.** The classification employed to grade the numbers of blood cells in the vaginal smears

Grade	Microscopic findings of vaginal smear
0	No cells present
1	An occasional cell in the smear
2	A few cells (2 to 3) in each low power ( $\times 100$ ) field
3	Several cells (approximately 10) in each low power field
4	Many cells in each low power field
5	Erythrocyte and leukocyte obliterate other cells in the field

parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell 그리고 anuclear cell로 분류하였다. 한편 slide상의 적혈구와 백혈구 출현 정도는 Bell과 Christie<sup>4</sup>의 기술에 준하여 Table 1에서와 같이 6가지 등급으로 분류하였다.

Cornification index의 산출: Post<sup>31</sup>와 Schutte<sup>36</sup>의 기술에 따라 각 slide의 5개 시야 이상에서 200개의 질세포를 검경하여 각화된 세포(superficial cell과 anuclear cell의 합계)의 비율을 백분율로 환산하여 CI를 구하였다. CI의 산출공식은 다음과 같다.

$$CI = \frac{\text{Number of cornified cells}}{\text{Total number of epithelial cells}} \times 100$$

### 3) Papanicolaou 염색을 실시한 질세포의 검경

질세포의 구분 및 eosinophilic index의 산출: Post<sup>31</sup>와 Schutte<sup>36</sup>의 기술에 따라 각 slide의 5개 시야 이상에서 200개의 질세포를 검경하여 orange-red color로 염색된 질세포의 비율을 백분율로 환산하여 EI를 구하였다. EI의 산출공식은 다음과 같다.

$$EI = \frac{\text{Number of eosinophilic cells}}{\text{Total number of epithelial cells}} \times 100$$

### 혈장 estradiol-17 $\beta$ 와 progesterone 농도측정

1) 채혈: 발정전기 개시일부터 발정기 개시후 20일까지는 매일, 발정기 개시후 21일부터 분만 예정 6일 전까지는 3일 간격, 분만예정 5일전부터 분만후 10일까지는 매일 그리고 분만후 11일부터 다음 발정전기 개시일까지는 2주에 1회씩 채혈하였다. EDTA병에 채취한 혈액은 4°C에서 3,000 g로 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였고 E<sub>2</sub>와 P<sub>4</sub> 농도를 측정할 때까지 -20°C에서 냉동보관하였다.

2) 혈장 estradiol-17 $\beta$  농도측정을 위한 시료의 추출과 분석: 혈장중의 E<sub>2</sub>를 추출하기 위하여 시험관에 혈장 500  $\mu$ l와 diethyl-ether 4.5 ml를 혼합하여 mechanical shaker로 30분 동안 진탕한 다음 4°C에서 3000 g로 15분 동안 원심하였다. 그후 -20°C에 10분간 동결시킨 후 organic phase를 다른 시험관에 decant한 다음 40°C에서 diethyl-ether만 증발시키고 E<sub>2</sub>는 gelatine-PBS 250  $\mu$ l로 재용해시켜 분석에 이용하였다. E<sub>2</sub> 농도측정은 estradiol-17 $\beta$  kit (Direct estradiol, ICN Biochemicals Inc, USA)를 이용하여 Gamma counter (CRYSTAL™ II, PACKARD Co, USA)로 측정하였다. 즉 E<sub>2</sub> 항체가 부착된 각각의 시험관에 표준액, quality control 또는 시료를 100  $\mu$ l씩 분주한 다음 label hor-

mone (<sup>125</sup>I-estradiol-17 $\beta$ ) 1 ml를 각각 넣어 실온에서 3시간 동안 incubation하였다. Incubation후 결합되지 않은 부분을 decant한 다음 Gamma counter로 측정하였다. 변이계수인 intra-assay는 10.3% 그리고 inter-assay는 12.4%이었다.

3) 혈장 progesterone 농도측정: 손 등<sup>40</sup>의 기술에 준하여 progesterone kit (Direct progesterone, ICN Biochemicals Inc, USA)를 이용하여 Gamma counter (CRYSTAL™ II, PACKARD Co, USA)로 측정하였다. 변이계수인 intra-assay는 4.9% 그리고 inter-assay는 5.9%이었다.

4) 혈장 progesterone 농도측정에 의한 배란일의 판정: 강 등<sup>44</sup>의 기술에 준하여 발정출혈후 혈중 P<sub>4</sub> 농도가 최초로 4.0 ng/ml이상으로 증가한 날을 배란일로 판정하였다.

### 통계처리

각 발정주기의 길이와 발정주기의 간격은 Mean  $\pm$  SD, 발정일수별 각 질세포의 비율과 E<sub>2</sub> 및 P<sub>4</sub> 농도는 Mean  $\pm$  SEM을 구하였다. 그리고 발정주기별 각 질세포 출현율의 비교는 SAS의 GLM (general linear model)을 이용하여 유의성을 검토하였다.

## 결 과

### 발정주기중 질세포상의 변화

진도개 13두를 대상으로 발정전기에 165개, 발정기에 136개, 발정휴지기에 209개 그리고 무발정기에는 144개의 slide glass를 각각 검경하여 얻은 질세포상의 변화는 Table 2와 같다.

1) Parabasal cell: 발정전기와 발정기에 각각 0.7  $\pm$  0.2 (Mean  $\pm$  SEM)%, 1.1  $\pm$  0.3% 이었으나 발정휴지기와 무발정기에 각각 10.4  $\pm$  0.5%, 11.6  $\pm$  0.5%로 유의성 있게 높았다(P < 0.0001).

2) Small intermediate cell: 발정전기와 발정기에 각각 8.6  $\pm$  1.6%, 5.3  $\pm$  0.8% 이었으나 발정휴지기에 41.0  $\pm$  1.1%, 무발정기에 51.3  $\pm$  1.1%로 증가하였는데, 특히 무발정기가 다른 발정주기에 비하여 유의성 있게 높았다(P < 0.0001).

3) Large intermediate cell: 발정전기에 17.8  $\pm$  1.7%, 발정기에 12.5  $\pm$  1.1% 이었으나, 발정휴지기에는 26.9  $\pm$  0.7%로서 유의성 있게 증가하였고(p < 0.0001), 무발정기에 20.0  $\pm$  0.8%로 약간 감소하였다.

4) Superficial cell: 발정전기에 27.5  $\pm$  2.1%, 발정기에 32.9  $\pm$  1.6%로 증가하였으나, 발정휴지기에 11.9  $\pm$

**Table 2.** The percentages (Mean±SEM) of vaginal cells and grades of blood cells in vaginal smears during each phase of the estrous cycle in 13 Korea Jin-do dogs

Cell types	Proestrus	Estrus	Diestrus	Anestrus
Parabasal cells	0.7±0.2	1.1±0.3	10.4±0.5*	11.6±0.5*
Small intermediate cells	8.6±1.6	5.3±0.8	41.0±1.1	51.3±1.1*
Large intermediate cells	17.8±1.7	12.5±1.1	26.9±0.7*	20.0±0.8
Superficial cells	27.5±2.1	32.9±1.6*	11.9±0.7	10.0±0.9
Anuclear cells	45.4±3.3*	48.2±2.1*	9.8±0.7	7.1±0.6
Erythrocytes	3.4±0.1*	3.3±0.1*	1.8±0.1	1.8±0.1
Leukocytes	1.0±0.2	0.8±0.1	3.6±0.1*	3.2±0.1
No. of vaginal smears	165	136	209	144

\*Differences are significant between values indicated with an asterisk and each other values in the same row ( $P<0.0001$ ).

0.7%, 무발정기에  $10.0\pm 0.9\%$ 로 감소하였다. 각 기간 별 비교에서 특히 발정기에 유의성 있게 높게 나타났다( $P<0.0001$ ).

**5) Anuclear cell:** 발정전기에  $45.4\pm 3.3\%$ , 발정기에  $48.2\pm 2.1\%$ 로 높게 나타났으나, 발정휴지기에  $9.8\pm 0.7\%$ , 무발정기에  $7.1\pm 0.6\%$ 로 감소하였고, 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높았다( $P<0.0001$ ).

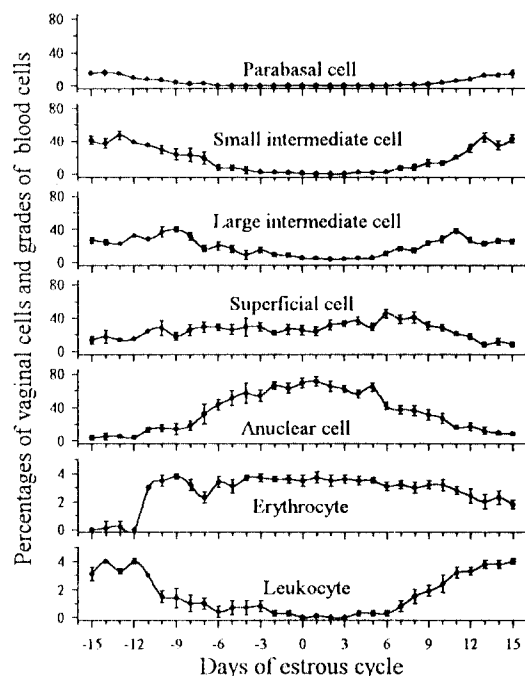
**6) 적혈구와 백혈구:** 적혈구는 발정전기에  $3.4\pm 0.1$ , 발정기에  $3.3\pm 0.1$  그리고 발정휴지기와 무발정기에 모두  $1.8\pm 0.1$ 로 감소하였는데, 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높았다( $P<0.0001$ ). 백혈구는 발정전기에  $1.0\pm 0.2$ , 발정기에  $0.8\pm 0.1$ 이었으나, 발정휴지기와 무발정기에 각각  $3.6\pm 0.1$ ,  $3.2\pm 0.1$ 로 증가하였는데, 특히 발정휴지기에 유의성 있게 높았다( $P<0.0001$ ).

#### 발정기 전후의 질세포상의 변화

숫개 최초 허용일(Day 0)을 기준으로 발정기 개시전 15일(Day -15)에서 발정기 개시후 15일(Day 15)까지의 질세포상의 변화상을 검토한 결과는 Fig 1과 같다.

**1) Parabasal cell:** Day -15에  $15.6\pm 2.3\%$  이었고, 발정전기 개시일 전후인 Day -9에  $4.2\pm 2.5\%$ 로 감소하였으며, Day -6에  $0.4\pm 0.4\%$ 로 이후에는 낮게 지속되었다. Day 7에  $1.1\pm 0.6\%$ 로 증가하였고, 발정휴지기 개시일 전후인 Day 11에  $5.7\pm 1.2\%$ 로 증가하였다.

**2) Small intermediate cell:** Day -15에  $41.1\pm 5.2\%$  이었고, Day -9에  $23.8\pm 7.0\%$  그리고 Day -6에  $8.0\pm 3.8\%$ 로 감소하였다. 발정기 개시일인 Day 0에  $0.8\pm 0.3\%$ 로 이후에는 낮게 지속되다가, Day 9에  $13.1\pm 4.6\%$ , Day 11에  $20.3\pm 1.9\%$  그리고 Day 15에  $42.8\pm 5.0\%$ 로 증가하였다.



**Fig 1.** Profiles (Mean±SEM) of cell types on vaginal cytology from Day -15 to Day 15 in 13 Korea Jin-do dogs. Day 0 is the first day of male acceptance.

**3) Large intermediate cell:** Day -15에  $26.8\pm 3.6\%$  이었고, Day -9에  $39.6\pm 3.3\%$ 로 일시 증가한 후, Day -7에  $16.5\pm 3.7\%$ , Day 0에  $5.3\pm 1.0\%$ 로 감소하여 이후 낮게 지속되다가, Day 8에  $14.4\pm 3.1\%$ , Day 11에  $37.6\pm 2.9\%$ 로 증가하였다.

**4) Superficial cell:** Day -15에  $13.3\pm 4.3\%$  이었고, Day -9에  $18.0\pm 4.3\%$ , Day 0에  $25.3\pm 5.7\%$ 로 증가하

였으며, Day 6에  $45.3 \pm 5.4\%$ 로 최고치를 나타내었다. 이후 감소하여 Day 11에  $20.8 \pm 2.1\%$  이었다.

**5) Anuclear cell:** Day -15에  $3.2 \pm 2.7\%$  이었고, Day -9에  $14.0 \pm 6.7\%$ 로 증가하였고, 이후 급격히 증가하여 Day -2에  $66.0 \pm 4.7\%$ , Day 0에  $69.0 \pm 6.0\%$ 로 증가하였으며, Day 1에  $71.0 \pm 5.7\%$ 로 최고치를 나타내었다. 이후 지속적으로 감소하여 Day 6에  $42.0 \pm 4.6\%$ , Day 14에  $9.2 \pm 1.9\%$ 로 감소하였다.

**6) 적혈구:** Day -15에는 관찰되지 않았고, 발정전기 개시일 전인 Day -11에  $3.0 \pm 0.1$ 로 급격히 증가하였으며, Day -9에  $3.8 \pm 0.2$ , Day 0에  $3.5 \pm 0.4$ 로 높게 나타났다. Day 11에  $2.8 \pm 0.3$  이었고, 이후 서서히 감소하였다.

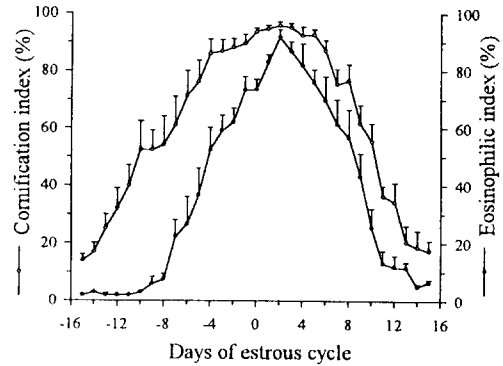
**7) 백혈구:** Day -15에  $3.1 \pm 0.5$  이었으나, Day -9에  $1.4 \pm 0.7$ , Day -6에  $0.4 \pm 0.4$ 로 감소하였으며, Day 0에는 관찰되지 않았고 이후 낮게 지속되었다. Day 8에  $1.5 \pm 0.5$ , Day 11에  $3.2 \pm 0.4$ 로 다시 증가하였다.

### 발정기 전후의 세포지수의 변화

숫개 최초 허용일(Day 0)을 기준으로 숫개 최초 허용전 15일(Day -15)부터 숫개 최초 허용후 15일(Day 15)까지 세포지수인 eosinophilic index (EI)와 cornification index (CI)의 변화는 Fig 2와 같다.

**1) Eosinophilic index:** Day -15에  $2.0 \pm 0.4\%$  이었고, 발정전기 개시일 전후인 Day -9에  $6.0 \pm 2.5\%$ , Day -5에  $36.6 \pm 9.4\%$ 로 증가하여 발정기 개시일인 Day 0에  $73.7 \pm 3.5\%$ , Day 1에  $83.2 \pm 2.7\%$ 로 80% 이상으로 증가하였고, Day 2에는  $92.0 \pm 2.6\%$ 로 최고치를 나타내었다. Day 5에  $76.1 \pm 4.6\%$ 로 80% 이하를 나타내었으며, Day 6에  $69.7 \pm 8.5\%$ , 발정휴지기 개시일 전후인 Day 11에  $13.1 \pm 4.2\%$ , Day 14에  $5.0 \pm 0.8\%$ 로 감소하였으며 그후에는 10% 이하를 나타내었다. EI가 70% 이상을 나타낸 기간은 Day -1에서 Day 5까지(7일간) 이었고, 80% 이상을 나타낸 기간은 Day 1에서 Day 4까지(4일간) 이었다.

**2) Cornification index:** Day -15에  $14.0 \pm 2.1\%$ , Day -13에  $25.0 \pm 5.0\%$ 로 증가하기 시작하였으며, 이후에 지속적으로 증가하여 Day -9에  $52.4 \pm 6.9\%$ , Day -6에  $71.6 \pm 8.6\%$ 로 증가하였다. Day -4에  $86.2 \pm 5.0\%$ 로 80% 이상으로 증가하였으며, Day 0에  $93.9 \pm 1.2\%$ , Day 2에는  $96.0 \pm 1.3\%$ 로 최고치를 나타내었다. Day 7에  $75.5 \pm 5.3\%$ 로 80%이하로 감소하였고, Day 9에  $61.7 \pm 6.5\%$ , Day 11에  $36.4 \pm 3.5\%$ , Day 14에  $18.6 \pm 5.6\%$ 로 급격히 감소하였으며, 그후는 계속 20% 이하를 나타내었다. CI가 70% 이상을 나타낸 기간은



**Fig 2.** Profiles (Mean  $\pm$  SEM) of cornification and eosinophilic index from Day -15 to day 15 in 13 Korea Jin-do dogs. Day 0 is the first day of male acceptance.

Day -6에서 Day 8까지(15일간) 이었고, 80% 이상을 나타낸 기간은 Day -4에서 Day 6까지(11일간) 이었다.

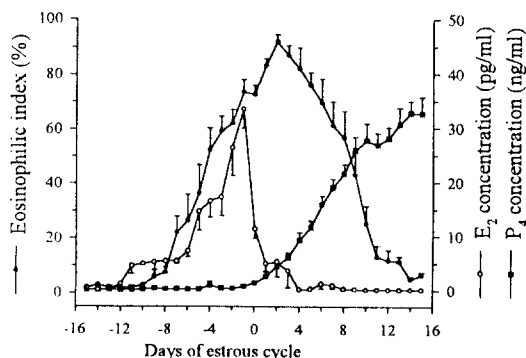
### 발정기간중 혈장 estradiol-17 $\beta$ 와 progesterone 농도의 변화

숫개 최초 허용일(Day 0)을 기준으로 숫개 최초 허용전 15일(Day -15)부터 숫개 최초 허용후 15일(Day 15)까지의  $E_2$ 와  $P_4$  농도 그리고 EI와의 관계를 검토한 결과는 Fig 3과 같다.

**1) Estradiol-17 $\beta$  농도:**  $E_2$  농도는 Day -15에  $0.1 \pm 0.0$  pg/ml 이었고, Day -11에  $4.5 \pm 1.4$  pg/ml, 발정전기 개시일 전후인 Day -9에  $5.2 \pm 1.3$  pg/ml로 증가하였고, 이후 급격히 증가하여 Day -1에  $33.5 \pm 3.5$  pg/ml로 최고치를 나타내었다. 발정기 개시일인 Day 0에  $11.4 \pm 1.8$  pg/ml로 급격히 감소 하였으며, Day 2에  $5.3 \pm 2.8$  pg/ml, Day 4에  $0.16 \pm 0.1$  pg/ml로 감소하여 이후 1.0 pg/ml 이하를 나타내었다.

**2) Progesterone 농도:**  $P_4$  농도는 발정기 개시 2일 전인 Day -2까지 0.5 ng/ml 이하로 낮게 지속되다가, Day -1에  $0.8 \pm 0.2$  ng/ml, Day 0에  $1.4 \pm 0.2$  ng/ml로 처음으로 1.0 ng/ml 이상으로 증가하였으며, 배란일이라 추정되는 Day 2에는  $4.5 \pm 0.5$  ng/ml로 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다. 이후 급격하게 증가하여 Day 8에  $21.6 \pm 1.7$  ng/ml를 나타내었다.

**3) 혈장 estradiol-17 $\beta$  및 progesterone 농도와 eosinophilic index와의 관계:**  $E_2$  농도는 Day -1에  $33.5 \pm 3.5$  pg/ml로 최고치를 나타내었고, EI는  $E_2$  peak후 3일째인 Day 2에  $92.0 \pm 2.6\%$ 로 최고치를 나타내었다. EI가 최초로 80% 이상으로 증가한 날은  $E_2$  peak후 2일째인 Day 1이었고, Day 4까지 80% 이상으로 지속



**Fig 3.** Profiles (Mean  $\pm$  SEM) of plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) and progesterone (P<sub>4</sub>), and eosinophilic index from Day -15 to Day 15 in 13 Korea Jin-do dogs. Day 0 is the first day of male acceptance.

되었다(4일간). EI가 최고치를 나타낸 날에 P<sub>4</sub>는  $4.5 \pm 0.5$  ng/ml로서 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다.

## 고 찰

발정주기중 질세포상의 변화에 대한 보고로서, Schutte<sup>35</sup>는 modified Shorr's trichrome 염색을 실시하여 발정전기에는 large intermediate cell, superficial cell 및 적혈구, 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell 그리고 발정휴지기에는 parabasal cell, small intermediate cell 및 백혈구가 주종을 이루었다고 하였다. Feldman과 Nelson<sup>17</sup>은 발정전기를 더욱 세분하여 발정전기 전반부에는 적혈구, parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell 및 백혈구, 발정전기 중반부에는 large intermediate cell과 superficial cell 그리고 발정전기 후반부에는 superficial cell과 anuclear cell이 주종을 이루었으며, 발정기에는 anuclear cell, 발정휴지기에는 백혈구 그리고 무발정기에는 parabasal cell, small intermediate cell이 주로 출현한다고 하였다.

본 연구에서는 Wright 염색을 실시하여 Table 2 및 Fig 1에서와 같이, 발정전기에는 anuclear cell과 적혈구, 발정기에는 superficial cell, anuclear cell 및 적혈구, 발정휴지기에는 parabasal cell, large intermediate cell 및 백혈구 그리고 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate cell이 높게 나타나 다른 보고<sup>3,17,20,35,47</sup>와 비교하였을 때 거의 동일한 결과를 나타내었다. 이는 실험견종 및 염색방법 등이 서로 다를지라도 발정주기중 질세포의 변화가 비슷한 양상을 보여, 진도

개에서도 질세포검사를 통하여 발정주기를 판정할 수 있음이 시사되었다.

질세포는 estrogens의 작용에 의하여 각화되는데<sup>25,41</sup>, 이러한 각화 정도를 평가하는 방법이 세포지수 즉, CI, EI, SCI, 및 KPI를 평가하는 것이라고 보고되고 있다<sup>7,13,28,34-36,42,43,48</sup>. 이중 SCI는 세포에 대한 자세한 분류가 요구되며 그리고 최고치의 도달시기를 명확하게 확인할 수 없기 때문에 교배적기의 판정에는 사용되지 않고 있다<sup>7</sup>. KPI는 최소한 300개 이상의 많은 세포를 검경하여야 판정이 가능하고<sup>48</sup>, 또한 특징적인 최고치가 인정되지 않아 임상적 응용에는 한계가 있다고 지적하였다<sup>7,36</sup>. 한편 CI의 산출은 염색과정이 간단하여 질점액 채취에서 결과판정까지의 소요시간이 짧기 때문에<sup>7,20</sup>, 임상적으로 매우 쉽게 응용할 수 있는 세포지수이며<sup>48</sup>, EI는 핵의 모양과는 무관하게 세포질의 염색상만으로 판정이 가능하기 때문에 해석자의 주관성을 배제할 수 있는 검사법이다<sup>7,36,48</sup>. 따라서 본 연구에서는 Wright 염색과 Papanicolaou 염색을 실시하여 교배적기 및 배란시기를 판정하는데 응용할 수 있는 CI와 EI를 구하였다.

발정기간중 세포지수의 변화는 Fig 2에서와 같이, CI는 발정전기 개시일 전부터 증가하기 시작한 후 80% 이상을 나타낸 기간이 Day -4에서 Day 6까지(11일간)로서 매우 광범위하였으며, 이 기간중 최고치를 나타낸 Day 2 전후에 증·감 차이가 거의 없어서 교배적기의 판정에 응용할 수 없었다. 그러나 EI는 80% 이상을 나타낸 기간이 Day 1에서 Day 4까지(4일간)로서 CI에 비하여 매우 짧은 기간을 나타내었으며,  $92.0 \pm 2.6\%$ 로 최고치를 나타낸 Day 2 전후의 변화폭이 뚜렷하였다. 이는 EI가 60%에서 100%일 때가 교배적기라는 보고<sup>7,28,36,42,43</sup>와 유사한 결과를 나타내어, 교배적기를 판정하는데에는 EI가 CI보다 더 좋은 지표일 것으로 생각된다. 한편 개에서 배란은 숫개 허용 후 1~3일에 일어나며<sup>5,7,33</sup>, 이때가 교배적기라고 보고되었다<sup>7,40</sup>. 따라서 진도개에서는 EI가 80% 이상을 나타낸 기간이 Day 1에서 Day 4까지(4일간)로서 CI에 비하여 기간이 짧았고, Day 2가 배란일 이었기 때문에 이때가 교배적기라고 추정된다.

EI와 E<sub>2</sub> 농도와의 관계를 비교한 결과는 Fig 3에서와 같이, EI가 80% 이상을 나타낸 기간이 Day 1에서 Day 4로서 4일간이었으며, E<sub>2</sub> peak(Day -1)후 3일째인 Day 2에 EI가 최고치를 나타내었다. 이 결과는 혈장 E<sub>2</sub> peak 후 3~6일에 질세포의 각화정도가 최고를 이룬다는 보고<sup>26,27</sup> 그리고 EI와 E<sub>2</sub>는 밀접한 관계가 있어 E<sub>2</sub> peak 후 2일째에 EI가 최고치를 나타내었다는 보고

<sup>13,28</sup>와 유사한 결과를 나타내었다.

정상적인 개에서 배란시기에 관한 보고로는 E<sub>2</sub> peak 후 1~2일에 LH surge가 일어나며<sup>24,28</sup>, LH surge 후 1~3일<sup>5,9,10,15,40,41</sup>, E<sub>2</sub> peak 후 3~5일<sup>2,24</sup> 그리고 숫개 허용 후 1~3일<sup>5,7,30,33,37</sup>에 배란이 일어난다고 하였다. 특히 혈중 P<sub>4</sub> 농도측정에 의한 교배적기 및 배란시기의 판정은 보고자에 따라 약간의 차이는 있으나, Bouchard 등<sup>5</sup>은 혈중 P<sub>4</sub> 농도가 3.4~6.6 ng/ml 이상으로 증가할 때가 배란 시기라고 하였으며, Post 등<sup>32</sup>은 5.0 ng/ml 이하일 때는 2일후에, 5.0~10.0 ng/ml일 때는 1일 뒤에, 10.0 ng/ml 이상일 때는 당일에 교배를 실시함이 타당하다고 하였다. 또한 Haafte 등<sup>21</sup>은 혈장 P<sub>4</sub> 농도가 12.0 ng/ml 이상일 때는 9시간 이내, 6.0~12.0 ng/ml일 때는 9~33시간 이내, 5.0~6.0 ng/ml일 때는 33~57시간 이내에 교배를 실시하였는데, 이때의 수태율은 94% (105/112)를 나타내어 P<sub>4</sub> 농도측정에 의한 교배적기 판정의 정확성을 강조한 바 있다. 본 연구에서는 Fig 3에서와 같이, EI는 E<sub>2</sub> peak 후 3일째, 즉 숫개 최초 허용 후 2일째인 Day 2에 최고치를 나타내었고, 이때 P<sub>4</sub> 농도는 4.5±0.5 ng/ml를 나타내었으므로 다른 보고들<sup>5,21,28,32,42,44</sup>의 결과를 고려하여 볼 때, 진도개에서는 EI가 최고치를 나타낸 날(Day 2)이 배란일이라 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 발정주기중 질상피 세포의 변화는 발정전기와 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell 그리고 발정후시기와 무발정기에는 parabasal cell, small intermediate cell 및 large intermediate cell이 높게 출현하였다. 한편 질세포지수의 변화는 EI가 80%이상으로 높게 나타낸 기간이 Day 1에서 Day 4까지(4일간)로서 이때가 교배적기이며, 또한 EI가 최고치를 나타낸 날은 E<sub>2</sub> peak (33.5±3.5 pg/ml) 후 3일째인 Day 2이었는데, 이날의 P<sub>4</sub> 농도는 4.5±0.5 ng/ml로서, 이때가 배란일이라 사료된다. 따라서 시설비가 저렴하면서 검사방법이 간단하여 일반 임상가들도 응용이 가능한 질세포검사는 진도개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기의 판정에 응용될 수 있음이 확인되었다.

## 결 론

진도개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기를 정확하게 추정하기 위한 질세포검사법을 확립하기 위하여 진도개 13두를 대상으로 발정주기 동안 질세포검사 및 estradiol-17β와 progesterone 농도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

발정주기별 질세포상의 특징적인 변화로서, 발정전

기에는 anuclear cell과 적혈구, 발정기에는 superficial cell, anuclear cell 및 적혈구가 주종을 이루는 세포이었다. 발정후시기에는 parabasal cell, large intermediate cell 및 백혈구, 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate cell이 주종을 이루는 세포이었다. 따라서 진도개에서도 질세포검사를 통하여 발정주기를 판정할 수 있음이 시사되었다.

발정기 개시일 전후의 세포지수를 살펴보면, 세포지수별 최고치를 나타낸 날은 eosinophilic index와 cornification index 모두 숫개 최초 허용(Day 0) 후 2일째이었고, 이때의 세포지수는 eosinophilic index가 92.0±2.6%, cornification index가 96.0±1.3%이었다. 각 세포지수가 70% 이상을 나타낸 기간은 eosinophilic index가 Day -1에서 Day 5까지(7일간), cornification index가 Day -6에서 Day 8까지(15일간) 그리고 80% 이상을 나타낸 기간은 eosinophilic index가 Day 1에서 Day 4까지(4일간), cornification index가 Day -4에서 Day 6까지(11일간)로서 eosinophilic index가 cornification index에 비하여 기간이 짧았다. 따라서 eosinophilic index가 cornification index보다도 교배적기 판정에 더 좋은 지표가 되며, eosinophilic index가 80% 이상을 나타낸 기간이 Day 1에서 Day 4까지(4일간)이었기 때문에 이때가 교배적기라고 추정된다.

Estradiol-17β 농도는 Day -1에 33.5±3.5 pg/ml로 최고치를 나타내었다. Eosinophilic index는 Day 1에 83.2±2.7%로 80% 이상으로 증가하였고, estradiol-17β peak 후 3일째인 Day 2에 92.0±2.6%로 최고치를 나타내었으며, 이때 progesterone 농도는 4.5±0.5 ng/ml이었다. 따라서 eosinophilic index가 최고치를 나타낸 날이 배란일이라 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 발정주기중 질상피 세포의 변화는 발정전기와 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell 그리고 발정후시기와 무발정기에는 parabasal cell, small intermediate cell 및 large intermediate cell이 높게 출현하였다. 한편 교배적기는 eosinophilic index가 80% 이상으로 높게 나타나는 시기 그리고 배란시기는 eosinophilic index가 최고치를 나타낸 날로 생각된다. 따라서 시설비가 저렴하면서 검사방법이 간단하여 일반 임상가들도 응용이 가능한 질세포검사는 진도개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기의 판정에 응용될 수 있음이 확인되었다.

## 참고문헌

1. Allen WE. Physiology of the oestrous cycle. In: Fer-

- tility and obstetrics in the dog, 1st ed. Cambridge: BlackWell Scientific Publications. 1992: 13-90.
2. Badinand F, Fontbonne A, Maurel MC, Siliart B. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J Reprod Fert (Suppl)* 1993; 47: 63-67.
  3. Bell ET, Bailey JB, Christie DW. Studies on vaginal cytology during the canine oestrous cycle. *Res Vet Sci* 1973; 14: 173-179.
  4. Bell ET, Christie DW. Erythrocytes and leucocytes in the vaginal smears of the beagle bitch. *Vet Rec* 1971; 88: 546-549.
  5. Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist RS, Bierschwal CJ. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and ELISA for progesterone. *Theriogenology* 1991; 35: 603-611.
  6. Boyd JS, Renton JP, Harvey MJA, Nickson DA, Eckersall PD, Ferguson JM. Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J Reprod Fert (Suppl)* 1993; 47: 101-105.
  7. Christiansen IJ. Breeding and mating. In: *Reproduction in the dog and cat*, 1st ed. London: Bailliere Tindall. 1984: 41-54.
  8. Christie DW, Bailey JB, Bell ET. Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *Br Vet J* 1972; 128: 301-309.
  9. Concannon PW, Hansel W, McEntee K. Change in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* 1977; 17: 604-613.
  10. Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* 1975; 13: 112-121.
  11. Concannon PW, Lein DH. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy, and pregnancy in dogs. In: *Current veterinary therapy*, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1989: 1269-1282.
  12. Dore MA. The role of the vaginal smear in detection of metestrus and anestrus in the bitch. *J Small Anim Prac* 1978; 19: 561-572.
  13. Dore MA. The value of vaginal smears in determining ovulation and optimal breeding times in the bitch. *Irish Vet J* 1978; 32: 54-60.
  14. England GCW, Allen WE. Real-time ultrasonic imaging of the canine ovary and uterus. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 91-100.
  15. England GCW, Yeager AE. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fert (Suppl)* 1993; 47: 107-117.
  16. Fayer-Hosken R, Caudle A, Downs M, Miller-Liebl D. Evaluating the infertile breeding bitch. *Vet Med* 1994; 1026-1038.
  17. Feldman EC, Nelson RW. The estrous cycle. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1987: 399-413.
  18. Feldman EC, Nelson RW. Vaginal exfoliative cytology. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1987: 413-417.
  19. Fowler EH, Felman MK, Loeb WF. Comparison of histologic features of ovarian and uterine tissues with vaginal smears of the bitch. *Am J Vet Res* 1971; 32: 327-334.
  20. Guyant L. Canine vaginal cytology. *Veterinary Technician* 1988; 9: 513-520.
  21. Haaften BV, Dieleman SJ, Okkens AC, Willemse AH. Timing the mating of dogs on the basis of blood progesterone concentration. *Vet Rec* 1989; 125: 524-526.
  22. Hayer P, Günzel-Apel AR, Lüerssen D, Hoppen HO. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J Reprod Fert (Suppl)* 1993; 47: 93-100.
  23. Holst PA, Phemister RD. Onset of diestrus in the beagle bitch: Definition and significance. *Am J Vet Res* 1974; 35: 401-406.
  24. Jeffcoate IA, Lindsay FEF. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 277-288.
  25. Jöchle W, Anderson AC. The estrous cycle in the dog. *Theriogenology* 1977; 7: 113-140.
  26. Linde C, Karlsson I. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J Small Anim Prac* 1984; 25: 77-82.
  27. Linde-Forsberg C, Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 299-310.
  28. Mestre J, Wanke M, Sucheire S. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol-17 $\beta$  during oestrus in the bitch. *J Small Anim Pract* 1990; 31: 568-570.
  29. Olson PN, Thrall MA, Wykes PW, Nett TM. Vaginal cytology. Part II. Its use in diagnosing canine reproductive disorders. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1984; 6: 385-390.



30. Phemister RD, Holst PA, Spano YS, Hopwood ML. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* 1973; 8: 74-82.
31. Post K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can Vet J* 1985; 26: 101-104.
32. Post K, Cook SJ, Rawlings NC. The evaluation of an enzyme immunoassay for the assessment of progesterone in canine plasma. *Can Vet J* 1990; 31: 708-709.
33. Renton JP, Boyd JS, Harvey MJA, Ferguson JM, Nickson DA, Eckersall PD. Comparison of endocrine changes and ultrasound as means of identifying ovulation in the bitch. *Res Vet Sci* 1992; 53: 74-79.
34. Schutte AP. Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. *J Small Anim Prac* 1967; 8: 301-306.
35. Schutte AP. Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *J Small Anim Prac* 1967; 8: 307-311.
36. Schutte AP. Canine vaginal cytology. III. Compilation and evaluation of cellular indices. *J Small Anim Prac* 1967; 8: 313-317.
37. Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 269-275.
38. Tsutsui T. Studies on the physiology of reproduction in the dog. III. Observation of vaginal smear in estrous cycle. *Jpn J Anim Reprod* 1975; 21: 37-42.
39. Wallace SS, Mahaffer MB, Miller DM, Thompson FN, Chakraborty PK. Ultrasonographic appearance of the dog ovary during follicular and early luteal phases. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 331.
40. Wallace SS, Mahaffer MB, Miller DM, Thompson FN, Chakraborty PK. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am J Vet Res* 1992; 53: 209-215.
41. Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB, Seager SWJ. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone, and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod* 1978; 18: 561-570.
42. Wright PJ. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. *J Small Anim Pract* 1990; 31: 335-340.
43. Wright PJ. Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Aust Vet J* 1991; 68: 10-13.
44. 강병규, 손창호, 신창록, 최한선, 오기석, 박인철. 진도개에서 임신일령에 따른 임신구조물의 초음파상. I. 태아 및 태아외구조물의 최초 관찰시기. *대한수의학회지* 1996; 36: 235-245.
45. 강병규, 최한선, 나진수, 손창호, 오기석, 이차범. 인공적 발정유기견의 질세포상에 관한 연구. *대한수의학회지* 1988; 28: 203-211.
46. 손창호, 강병규, 최한선, 오기석, 강현구, 김남기. 젖소에서 prostaglandin  $F_2\alpha$  또는 fenprostalene 투여후 초음파 진단장치로 측정된 황체의 크기와 혈장 progesterone 농도와의 관계. *한국임상수의학회지* 1995; 12: 174-185.
47. 유일정, 김용준, 지동범. 인공발정유도견에서 질상피세포의 변화. *한국임상수의학회지* 1996; 13: 30-37.
48. 이종달. *진단세포학*. 2판. 서울: 대학서림. 1986: 118-120.
49. 이종달. *진단세포학*. 2판. 서울: 대학서림. 1986: 613-651.