

진돗개에서 발정주기 동안 질세포상과 번식호르몬의 관계

김정훈 · 정경아 · 강현구 · 오기석 · 박인철 · 박상국* · 한호재** · 손창호¹**
전남대학교 수의과대학, **호르몬 연구센터,
*전라남도 축산기술연구소 동부지소

Relationship Between Vaginal Cytology and Reproductive Hormone During the Estrous Cycle in Korea Jin-do Bitches

Jeong-hun Kim, Kyung-a Jeong, Hyun-gu Kang, Ki-seok Oh, In-chul Park,
Sang-guk Park*, Ho-jae Han** and Chang-ho Son¹**

College of Veterinary Medicine, **Hormone Research Center

*Chonnam National University Eastern Branch of Chonnam Livestock Research Institute

ABSTRACT: The aim in this study was to obtain the basic data for estimation of optimal mating time and ovulation time by finding out the relationship between vaginal cytology and reproductive hormone profiles during the estrous cycle in 36 Korea Jin-do bitches. A characteristic features of vaginal cytology during the estrous cycle were the high proportion of superficial cell, anuclear cell and erythrocyte in proestrus, superficial cell, anuclear cell and erythrocyte in estrus, parabasal cell, small and large intermediate cell and leukocytes in diestrus, and parabasal cell and small intermediate cell in anestrus, respectively. Cornification index (CI) was the high proportion in proestrus and estrus, then it was decreased in diestrus and anestrus. It indicated that the CI was significantly high proportion in proestrus and estrus in comparison with the other phases. Plasma progesterone concentration was below 1.0 ng/ml at the first day of vulval bleeding in pregnant and non-pregnant bitches, and then it was increased slowly. When Day 0 was timed from the day that plasma progesterone concentration was first increased above 4.0 ng/ml, plasma progesterone concentrations at Day 0 in pregnant and non-pregnant bitches were 5.2 ± 0.3 ng/ml and 5.7 ± 0.5 ng/ml, respectively. Increased constantly, plasma progesterone concentration showed a peak at Day 22 with 46.5 ± 3.3 ng/ml in pregnant bitches and at Day 20 with 39.8 ± 0.1 ng/ml in non-pregnant bitches. It indicated that plasma progesterone concentration was higher in pregnant bitches than in non-pregnant bitches. Hereafter plasma progesterone concentration was decreased steadily. At Day 63 which is parturition day, plasma progesterone concentration was decreased below 1.0 ng/ml with 0.8 ± 0.2 ng/ml in pregnant bitches whereas in the non-pregnant bitches at Day 75 were decreased below 1.0 ng/ml with 0.5 ± 0.4 ng/ml. Plasma progesterone concentrations was maintained below 1.0 ng/ml during anestrus in all of them. The plasma estradiol-17 β concentration was increased above 1.0 pg/ml at the first day of vulval bleeding and it showed a peak Day -1 with 38.2 pg/ml. Thereafter it was sharply decreased after Day 0, which was the day that plasma progesterone concentration was first increase above 4.0 ng/ml, and was maintained below basal levels. In relationship between CI and reproductive hormones, plasma estradiol-17 β concentration showed a peak at Day -3 and CI showed a peak at Day -1 which was the second day after plasma estradiol-17 β peak, and plasma progesterone concentration was first increased above 4.0 ng/ml at Day 0 which was the first day after CI peak. CI was first increased above 80% at Day -6 which was the third day before plasma estradiol-17 β peak and it was maintained above 80% between Days -6 and Day 3 during 10 days, and showed above 90% at Day -3 which was the day that plasma estradiol-17 β peak and was maintained above 90% between Day -3 and Day 3 during 7 days. In conclusion, ovulation in Korea Jin-do bitches occurred at the first day after CI

본 연구는 한국과학재단의 호르몬연구센터 연구비(과제 번호 : 1998G0301) 지원에 의하여 수행되었음

¹Corresponding author.

peak, at the third day after plasma estradiol-17 β peak and the day when plasma progesterone concentration was first increased above 4.0 ng/ml. And it was estimated that the optimal mating time was the day when the CI was maintained above 90% and plasma progesterone concentration was between 3.0-8.0 ng/ml. Therefore plasma progesterone concentration measurement was used for determination of an accurate ovulation time and the optimal mating time but also vaginal cytology, which is low-priced with equipment and is the simple examination method, was reliable method for estimating estrous cycle, optimal breeding time and ovulation time in Korea Jin-do bitches.

Key words : vaginal cytology, progesterone, estradiol-17 β , ovulation, optimal breeding time, Korea Jin-do dog

서 론

개에서 난소 호르몬의 표적기관인 질상피는 발정기 동안 다수의 층으로 분화되면서 표층 상피세포의 박리가 일어난다²⁷. 즉 질상피세포는 발정기 때 증가하는 estrogens의 영향을 받아 각화 및 박리가 일어나게 되는데, 질세포검사법은 이러한 각 발정주기별 질세포의 출현과 비율의 차이를 토대로 하여 발정전기와 발정기의 진행과정 판단 및 교배적기를 판정하는데 이용되어지고 있다^{1,20-23,29,32,38}. 한편 질세포검사에 의한 세포지수, 즉 eosinophilic index(EI), cornification index(CI), superficial cell index(SCI) 및 karyopyknotic index(KPI)에 대한 임상적 응용성도 보고되고 있다^{3,10,16,21-23,29,30}. 이밖에도 질세포검사는 비정상적인 발정주기를 보이는 개에서의 교배적기 판정¹², 분만일의 예시¹⁴ 그리고 자궁이나 질 등의 생식기 질환^{13,18} 등의 진단에도 응용되고 있다.

개에서 혈중 LH 농도 측정은 배란시기를 가장 정확하게 알 수 있는 방법이며², 배란은 LH surge 후 1~3일에 일어난다고 보고된 바 있다^{3,6,8,27}. Bouchard 등²은 배란 전에 일과성 분비양상을 보이는 혈중 LH 농도 측정은 분석에 필요한 고가의 장비 및 특수한 시설이 있는 실험실에서만 행해질 수 있으며, LH surge를 측정하기 위해서는 1일 2회 이상 채혈을 해야한다는 번거로움이 있어 오직 연구 목적으로만 사용될 뿐 실제 일반 임상가들이 응용하기에는 많은 어려움이 있다고 하였다. 한편 혈중 progesterone 농도 측정에 의한 교배적기 판정과 배란시기 추정에 관한 새로운 지견들이 보고되고 있는데, 혈중 progesterone 농도는 배란 전부터 서서히 증가하기 시작하다가 배란 직후부터 급격히 증가하여 배란 후 20일 전후에 최고치를 나타낸다고 하였다^{6,7,24}. 또한 배란 전 난포벽의 황체화로 혈중 progesterone 농도가 증가하는 현상은 오로지 개에서만 관찰될 수 있다고 하였으며^{2,5}, 특히 Concannon 등⁵은 LH surge 후 배란은 혈중

progesterone 농도증가와 밀접한 관련이 있다고 하였다. 이러한 일련의 혈중 progesterone 농도를 측정하는 것은 배란시기를 비교적 정확하게 알 수 있고, 아울러 교배적기를 판정하는데도 중요하다고 하였으며¹⁹, 혈중 progesterone 농도를 측정하여 이를 기준으로 일정한 시간에 교배를 실시하여 높은 수태율을 나타내었다고 하였다^{9,19}.

이상 보아온 바와 같이 발정주기와 교배적기 및 배란시기를 판정하기 위한 많은 연구가 보고되어지고 있는 가운데 국내에서 진돗개의 번식생리와 관련된 보고로는 분만 후 자궁수축의 연속적 초음파상³⁵, 혈장 progesterone 농도측정에 의한 배란시기 및 교배적기의 판정³⁷, 발정주기, 교배적기 및 배란시기 판정을 위한 질세포검사의 이용성³⁸, 진돗개에서 임신일령에 따른 임신구조물의 초음파상^{31,39}, 발정유기전의 난소반응과 수정란의 외과적 회수³³, 발정유기된 암캐의 혈중 progesterone 농도변화³⁴, 인공적 발정유기전의 질세포상에 관한 연구³² 등이 이루어졌을 뿐, 진돗개에서 질세포와 번식호르몬 사이의 관계를 종합적으로 비교, 검토한 보고는 없는 실정이다.

본 연구는 진돗개를 대상으로 발정주기 동안 질세포상의 변화와 혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도를 측정하여 이들 사이의 관계를 규명하여 진돗개에서의 번식생리의 기초지견을 확립하고, 배란 및 교배적기의 판정에 대한 정확한 기초자료를 제공하고자 수행되었다.

재료 및 방법

대상동물

진돗개 36두를 대상으로 하였으며, 이중 임신견은 33두(경산견은 27두, 초산견은 6두) 그리고 비임산견은 3두 이었다. 체중은 평균 18.6 Kg(범위: 15.6~22.6 Kg), 연령은 평균 5.6세(1.5~9세) 이었다. 실험대상견은 실외에서 일반적인 관행으로 사료는 제한급여, 물

은 자유음수도록 하여 1두씩 격리 사육하였으며, 실험개시전에 예방접종 및 구충을 실시하였다.

발정출혈 확인

발정출혈 개시 예정 2개월 전부터 매일 발정출혈 및 외음부 증대여부를 관찰하였으며, 발정출혈 개시일부터 발정이 종료될 때까지 매일 2회 출혈색, 출혈량 및 점도와 교배허용여부를 관찰하였다. 최초 교배허용 후 1~2일에 동일 종의 수컷과 2일 간격으로 2~3회 자연교배를 실시하였다.

발정주기의 구분

임상적 증상의 관찰에 의한 발정주기의 구분은 Concannon과 Lein⁷ 및 Guyant¹⁴의 기술에 준하여 실시하였다. 발정전기는 발정출혈 개시일부터 최초 교배허용 전날까지, 발정기는 최초 교배허용일부터 최후 교배허용일까지, 발정휴지기는 최후 교배허용 다음날부터 임신견의 경우 분만일까지, 비임신견의 경우 혈장 progesterone 농도가 1.0 ng/ml 이하로 하강할 때로 하였으며, 그 이후부터 다음 발정출혈 개시 전날까지를 무발정기로 구분하였다.

질세포검사

질세포의 채취 및 질세포의 도말: Guyant¹⁴ 및 손등³⁸의 방법에 준하여 멸균 면봉에 생리식염수를 묻힌 후 질내에 삽입하여 질진정에서 질분비물을 채취한 후 2장의 slide glass에 직접 도말하였다. Slide glass는 자연건조 시킨 후 각각의 질세포 비율과 CI를 산출하기 위해 Wright's 염색을 실시하였다. 질세포검사는 발정출혈 개시일부터 최후 교배허용 후 20일까지는 매일, 최후 교배허용 후 21일째부터 다음 발정출혈 개시일까지는 주 1회 실시하였다

질세포의 검경

1) **질세포의 구분:** Schutte²¹의 기술에 준하여 각각의 slide의 5개의 시야 이상에서 200개의 질세포를 검경한 후 질세포는 세포질의 각화유무 및 세포핵의 형태에 따라 5가지 세포로, 그리고 Bell과 Christie¹의 기술에 준하여 slide상의 적혈구와 백혈구 출현정도는 0부터 5가지 6등급으로 분류하였다.

2) **CI의 산출:** Schutte²³와 Post²⁰의 기술에 준하여 각화된 세포의 비율을 백분율로 환산하여 CI를 산출하였다. CI의 산출공식은 다음과 같다.

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

혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도 측정

채혈: 발정출혈 개시일부터 최초 교배허용 후 20일까지는 매일, 임신견의 경우 최초 교배허용 후 21일부터 분만예정 6일전까지는 3일 간격으로, 분만예정 6일전부터 분만 후 10일까지는 매일 그리고 분만 후 11일부터 다음 발정출혈 개시일까지는 2주에 1회씩 먹이를 주기 전 아침에 채혈하였다. 비임신견의 경우 교배 후 21일부터 혈장 progesterone 농도가 1.0 ng/ml 이하일 때, 즉 교배 후 80일째까지는 3일 간격으로, 이후부터 다음 발정출혈 개시일까지는 2주에 1회씩 채혈하였다. 채혈 후 EDTA병에 채취한 혈액은 4°C에서 3000 g로 10분 동안 원심분리하여 혈장을 분리한 후 혈장 progesterone과 estradiol-17 β 의 농도를 측정할 때까지 -20°C에 냉동보관하였다.

혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도 분석: 손등³⁶의 기술에 준하여 progesterone kit(Progesterone Coat-A-count, Diagnostic Products Corporation, Los angeles, CA) 및 estradiol-17 β kit(Estradiol Coat-A-count, Diagnostic Products Corporation, Los angeles, CA)를 사용하여 Gamma counter(BG & G Wallace, Finland)로 측정하였다. 혈장 progesterone에 대한 변이계수(coefficients of variation)는 intra-assay는 5.1%, inter-assay는 8.2% 이었고, 혈장 estradiol-17 β 에 대한 변이계수는 intra-assay는 9.6%, inter-assay는 11.8% 이었다.

통계처리

각 발정주기별 질세포의 비율과 혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도는 Mean \pm SEM으로 산출하였다. 그리고 발정주기별 각 질세포의 비교는 SAS의 GLM(General Linear Model), 각 그룹별 혈장 progesterone과 estradiol-17 β 농도의 비교는 student's t-test를 이용하여 유의성을 검토하였다.

결 과

발정주기중 질세포상의 변화

진돗개 36두를 대상으로 발정전기에 124개, 발정기에 176개, 발정휴지기에 126개 그리고 무발정기에는 216개의 slide glass를 각각 검경하여 얻은 질세포상의 변화는 Table 1 및 Fig 1과 같다.

1) **Parabasal cell :** 발정전기와 발정기에 각각 0.4 \pm 0.1(Mean \pm SEM)%, 2.8 \pm 0.6% 이었으나 발정휴지기와 무발정기에 각각 10.1 \pm 0.5%, 11.5 \pm 0.5%로 유의성 있게 높았다(p<0.01).

Table 1. The percentages (Mean \pm SEM) of vaginal cells and grades of blood cells in vaginal smears during each phase of the estrous cycle in 36 Korea Jin-do bitches

Cell types	Proestrus	Estrus	Diestrus	Anestrus
Parabasal cells	0.4 \pm 0.1	2.8 \pm 0.6	10.1 \pm 0.5*	11.5 \pm 0.5*
Small intermediate cells	6.0 \pm 1.1	11.9 \pm 2.0	39.0 \pm 1.1	51.0 \pm 1.1*
Large intermediate cells	11.7 \pm 1.9	15.9 \pm 1.5	28.1 \pm 0.7*	20.1 \pm 0.8
Superficial cells	29.1 \pm 2.2*	29.6 \pm 2.0*	10.3 \pm 0.7	9.7 \pm 0.9
Anuclear cells	49.0 \pm 3.3*	38.5 \pm 2.7*	9.5 \pm 0.7	7.1 \pm 0.6
Erythrocytes	3.6 \pm 0.1*	3.1 \pm 0.1*	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
Leukocytes	1.0 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	3.9 \pm 0.3*	2.9 \pm 0.6
CI	78.6 \pm 2.9	76.0 \pm 2.8	22.9 \pm 3.2	16.9 \pm 2.3

*Differences are significant between values indicated with asterisk and each other values in the same row ($p < 0.01$).

2) Small intermediate cell : 발정전기와 발정기에 각각 6.0 \pm 1.1%, 11.9 \pm 2.0% 이었으나 발정휴지기에 39.0 \pm 1.1%, 무발정기에 51.0 \pm 1.1%로 증가하였는데, 특히 무발정기가 다른 발정주기에 비하여 유의성 있게 높았다($p < 0.01$).

3) Large intermediate cell : 발정전기 11.7 \pm 1.9%, 발정기 15.9 \pm 1.5% 이었으나, 발정휴지기에는 28.1 \pm 0.7%로서 유의성 있게 증가하였고($p < 0.01$), 무발정기에 20.1 \pm 0.8%로 약간 감소하였다.

4) Superficial cell : 발정전기에 29.1 \pm 2.2%, 발정기에 29.6 \pm 2.0%로 증가하였으나, 발정휴지기에 10.3 \pm 0.7%, 무발정기에는 9.7 \pm 0.9%로 감소하였다. 각 기간별 비교에서 특히 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높게 나타났다($p < 0.01$).

5) Anuclear cell : 발정전기에 49.0 \pm 3.3%, 발정기에 38.5 \pm 2.7%로 높게 나타났으나, 발정휴지기에 9.5 \pm 0.7%, 무발정기에 7.1 \pm 0.6%로 감소하였고, 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높았다($p < 0.01$).

6) 적혈구와 백혈구 : 적혈구는 발정전기에 3.6 \pm 0.1, 발정기에 3.1 \pm 0.1 그리고 발정휴지기와 무발정기에 모두 1.6 \pm 0.1로 감소하였는데, 발정전기와 발정기에 높았다($p < 0.01$). 백혈구는 발정전기에 1.0 \pm 0.2, 발정기에 0.6 \pm 0.1 이었으나, 발정휴지기와 무발정기에 각각 3.9 \pm 0.3, 2.9 \pm 0.6으로 증가하였는데, 특히 발정휴지기에 유의성 있게 높았다($p < 0.01$).

7) 발정주기별 질세포상의 변화

발정전기에는 superficial cell과 anuclear cell 그리고 적혈구가 각각 29.1 \pm 2.2%, 49.0 \pm 3.3%, 3.6 \pm 0.1로 주종을 이루었으며, 발정기에는 superficial cell, anuclear cell 및 적혈구가 각각 29.6 \pm 2.0%, 38.5 \pm 2.7%, 3.1 \pm 0.1로 주종을 이루는 세포이었다. 발정휴지기에는 parabasal cell, small intermediate cell, large

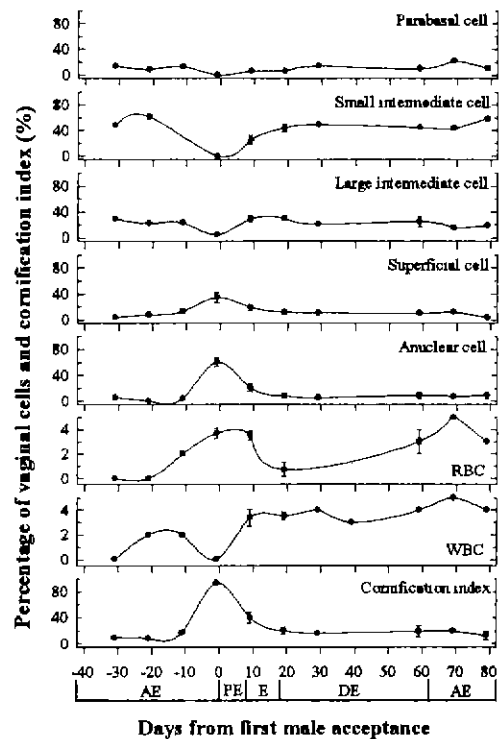


Fig 1. Profiles (Mean \pm sem) of cell types on the vaginal cytology during the estrous cycle from day -40 to day 80 in 36 Korea Jin-do bitches. Day 0 is the first day of male acceptance. AE=anestrus; PE=proestrus; E=estrus; DE=diestrus.

intermediate cell 및 백혈구가 각각 10.1 \pm 0.5%, 39.0 \pm 1.1%, 28.1 \pm 0.7%, 3.9 \pm 0.3으로 주종을 이루었으며, 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate cell 이 각각 11.5 \pm 0.5%, 51.0 \pm 1.1%로 주종을 이루는 세포이었다.

8) CI

발정전기에 78.6±2.9%, 발정기에 76.0±2.8%로 높게 나타났으나, 발정휴지기와 무발정기에는 각각 22.9±3.2%, 16.9±2.3%로 감소하였다. 각 기간별 비교에서 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높았다($p<0.01$).

발정주기중 혈장 progesterone 농도 변화

혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준(Day 0)으로 임신견 33두와 비임신견 3두에서 발정전기부터 다음 발정전기까지의 혈장 progesterone 농도 변화는 Fig 2에 나타낸 바와 같다.

발정전기 개시일인 Day -11에 임신견과 비임신견의 혈장 progesterone의 농도는 각각 0.2±0.1 ng/ml, 0.1 ng/ml로 1.0 ng/ml 이하를 나타내었다 Day 0에는 5.2±0.3 ng/ml, 5.7±0.5 ng/ml로 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다. 이후 지속적으로 증가하여, 임신견의 경우에는 Day 22에 46.5±3.3 ng/ml로 최고치를 나타내었고, 비임신견에서는 Day 20에 39.8±0.1 ng/ml로 최고치를 나타내어 비임신견에 비해 임신견의 혈장 progesterone 농도가 더 높았다. 이후 임신견과 비임신견에서 혈장 progesterone 농도는 지속적으로 감소하였는데, 혈장 progesterone 농도의 최고치를 지난 후에도 계속해서 임신견이 비임신견에 비해 혈장 progesterone 농도가 높게 유지되었다. 분만 하루전인 Day 62에 1.5±0.5 ng/ml로 급격히 감소하였으며, 분만일인 Day 63에는 0.8±0.2 ng/ml로 1.0 ng/ml 이하로 감소하였다. 반면 비임신견의 경우 임신견의 분만일에 해당하는 Day 63에 4.0±0.9 ng/ml를 보여 임신견과는 달리 혈장 progesterone 농도가 1.0 ng/ml 이하로 감소하지 않았으며 이후 Day 75에 0.5±0.4 ng/ml로 임신견에 비해 12일 정도 늦게 1.0 ng/ml 이하로 감소하였다. 임신견과 비임신견 모두 무발정기 동안 혈장 progesterone 농도는 1.0 ng/ml 이하로 낮게 지속되었다.

발정주기중 혈장 estradiol-17β 농도 변화

혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준(Day 0)으로 혈장 estradiol-17β 농도 변화는 Fig 2와 같이 발정전기 개시일부터 기저치 이상으로 증가하여, Day -3에 38.2±10.9 pg/ml로 최고치를 나타내었다. 이후 발정기에는 급격히 감소하였으며, 발정휴지기와 무발정기에는 기저치 이하로 낮게 지속되었다. 특히 혈장 estradiol-17β의 농도는 발정전기에 유의성 있게 높았다($p<0.01$).

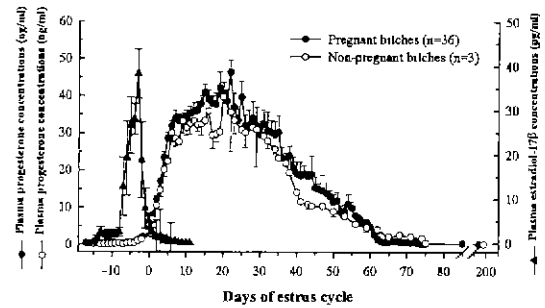


Fig 2. Profiles (Mean±SEM) of plasma progesterone and estradiol-17β, concentrations, and CI during the estrous cycle from Day -14 to Day 200 in 33 pregnant and 3 non-pregnant Korea Jin-do bitches. Day 0 is the day that plasma progesterone concentration was first increased above 4.0 ng/ml after the first day of vulval bleeding

발정주기중 CI와 혈장 progesterone 및 estradiol-17β 농도사이의 관계

혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준(Day 0)으로 CI와 혈장 progesterone 및 estradiol-17β 농도와의 관계를 살펴보면 Fig 3과 같다.

혈장 estradiol-17β 농도는 Day -3에 38.2±10.9 pg/ml로 최고치를 나타내었고, estradiol-17β peak 후 3일째인 Day 0에 혈장 progesterone 농도가 5.2±0.2 ng/ml로 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다. 그리고 CI는 estradiol-17β peak 후 2일째인 Day -1에 96.0±1.3%로 최고치를 나타내었으며, CI가 최초로 80% 이상으로 증가한 날은 estradiol-17β peak 3일전인 Day -6 이었고, Day -6부터 Day 3까지 10일 동안 80% 이

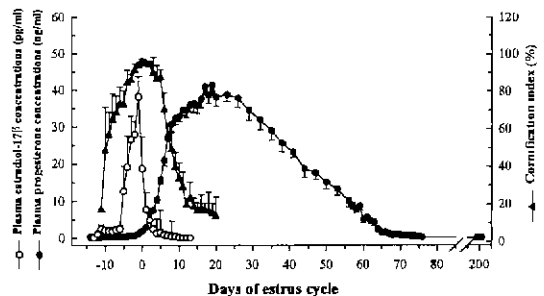


Fig 3. Profiles (Mean±SEM) of plasma progesterone and estradiol-17β, concentrations, and CI during the estrous cycle from Day -14 to Day 200 in 36 Korea Jin-do bitches. Day 0 is the day that plasma progesterone concentration was first increased above 4.0 ng/ml after the first day of vulval bleeding.

상으로 지속되었다. CI가 90% 이상으로 증가한 날은 estradiol-17 β peak 일인 Day -3 이었으며, Day -3부터 Day 3까지 7일 동안 90% 이상으로 지속되었다. 또한 CI가 최고치를 나타낸 후 1일째인 Day 0에 혈장 progesterone 농도가 5.2 ± 0.2 ng/ml로 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다.

고 찰

개에서 발정전기와 발정기의 진행과정 및 교배적기를 판정하는데 있어 질세포검사는 비교적 간단한 방법으로 이용되고 있다^{15,18}. Schutte^{21,22}는 발정주기의 각 시기에 출현하는 질세포를 modified Shorr's trichrome 염색을 실시하여 세포질의 각화유무 및 세포핵의 형태에 따라 5가지 세포, 즉 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell 그리고 anuclear cell로 분류한 후, 발정전기에는 large intermediate cell, superficial cell 및 적혈구, 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell 그리고 발정휴지기에는 parabasal cell, small intermediate cell 및 백혈구가 주종을 이루었다고 보고하였다. 그리고 Feldman과 Nelson¹³은 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. 또한 세포의 형태에 따라 superficial cell과 anuclear cell이 포함된 cornified cell과 parabasal cell, small intermediate cell 그리고 large intermediate cell이 포함된 noncornified cell로 구분하여 질세포검사의 진단학적 가치 및 임상적 응용성이 보고된 바 있다^{3,10,23,29}. 한편 질상피세포의 각화정도를 평가하기 위해 EI, CI, SCI 및 KPI의 값을 산출하여 이용한다고 보고되었으며^{3,10,16,21-23,28,29}, 이 중 SCI와 KPI는 특징적인 최고치가 인정되지 않고 세포의 자세한 분류가 필요하여 임상적 응용에는 어려움이 있다고 하였다^{3,23}. 또한 핵구조물의 염색정도와는 상관없이 각화된 세포는 orange-red로, 비각화된 세포는 blue-green으로 염색되는 세포의 염색상을 기준으로 세포를 구분하여 산출하는 EI는 교배적기의 판정에 있어 CI보다 최고치를 나타내는 기간이 짧고, 변화폭이 뚜렷하여 더 좋은 지표라고 보고^{3,10,16,21-23,28,29} 되었으나, EI를 산출하기 위한

염색법은 시간이 많이 소요되고 복잡하다는 점에서 임상적으로 응용하기에는 어려움이 있다^{13,28}고 하였다.

최초 교배허용일을 기준으로 한 발정주기 동안의 질세포상과 CI의 변화는 Table 1과 Fig 1에서와 같이 parabasal cell과 small intermediate cell은 발정전기 중반부터 감소하여 발정기에는 거의 관찰되지 않았으나, 발정기 후반부부터 증가하기 시작하였다. Large intermediate cell은 발정전기부터 감소하여 발정기에는 지속적으로 낮게 나타났다. Superficial cell은 발정기 중 20~40%로 약간 높게 나타났으며, anuclear cell은 발정전기와 발정기에 뚜렷하게 증가된 후 발정휴지기에는 다시 감소하였다. 적혈구는 발정전기에 급증한 후 높게 지속되다가, 발정휴지기 개시일 이후에 감소하였다. 백혈구는 발정전기 전반부에 감소하여 발정기에 낮게 지속되다가, 발정휴지기 개시일 전후에 다시 현저한 증가를 보이며 재출현하였다. CI는 발정전기 개시일부터 증가하기 시작하여 발정전기 후반부와 발정기 초반부에 최고치를 나타낸 후 발정기 중반부부터 감소하였다. 발정주기별로 살펴보면 발정전기에는 anuclear cell과 적혈구, 발정기에는 superficial cell, anuclear cell 및 적혈구, 발정후기에는 parabasal cell, large intermediate cell 및 백혈구 그리고 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate cell이 주종을 이루었으며, CI는 발정전기와 발정기에 높게 나타나 전술한 바와 동일한 결과를 나타내었다. 이는 발정주기 중 질세포상의 변화가 품종간에 따라 차이가 없음이 시사되었다.

임신견과 비임신견의 혈장 progesterone 농도변화를 비교해 보면 임신견의 혈장 progesterone 농도가 비임신견에 비해 높다^{7,11,26}고 한 반면, Smith와 McDonald²⁵는 임신견과 비임신견 사이에 별 차이가 없다고 하였다. 본 연구의 결과는 Fig 2에서와 같이 임신견과 비임신견에서 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준(Day 0)으로 임신견에서는 Day 22에 46.5 ± 3.3 ng/ml로 최고치를 나타내었고, 비임신견에서는 Day 20에 39.8 ± 0.1 ng/ml를 나타내어 임신견의 혈장 progesterone 농도가 비임신견에 비해 높게 나와 이들의 보고^{7,11,26}와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 임신견과 비임신견에서 혈장 progesterone 농도가 1.0 ng/ml 이하로 감소되는 시기에 대해 Concannon 등⁴은 임신견은 61~65일, 비임신견은 51~82일이라 하였고, LH surge일을 기준으로 임신견은 65 ± 1 일, 비임신견은 50~120일이라 하였으며⁶, Shille²⁴는 혈청 progesterone 농도가 2.5 ng/ml 이상인 황체기의 길이는 임신견은 63일, 비임신견은 75일로

비임신견이 임신견보다 길다고 하였다. 본 연구에서는 Fig 2에서와 같이 임신견의 경우 분만 1일전인 Day 62에 혈장 progesterone 농도는 1.5 ± 0.5 ng/ml를 나타내었고, 분만일인 Day 63에 0.8 ± 0.2 ng/ml로 1.0 ng/ml 이하를 나타내어 혈장 progesterone 농도가 분만 전 24~36시간에 극적인 감소를 보이다가 분만일에는 1.0 ng/ml 이하를 나타낸다는 보고^{7,8}와 유사한 결과를 나타내었다. 반면 비임신견에서는 임신견의 분만일에 해당하는 Day 63에 4.0 ± 0.9 ng/ml를 나타내었으며, Day 75에 1.0 ng/ml 이하를 나타내어 비임신견의 황체가 임신견에 비해 더 길게 나타나 전술한 바와 동일한 결과를 나타내었다.

한편 혈장 estradiol-17 β 농도는 무발정기 후반에 5~10 pg/ml의 기저치로 유지되다가, 발정전기 개시후에는 10~20 pg/ml로 증가를 보이며, 발정전기 후반부와 LH surge 전 1~2일에 50~100 pg/ml로 최고치에 이른 후 발정기 전반을 통해 감소한다고 하였다¹⁷. 또한 임신후반기 동안의 estrogen 농도는 비임신주기를 보이는 개의 황체기 동안의 농도와 차이가 없다고 하였다^{11,17}. 본 연구에서는 Fig 2에서 보는 바와 같이 발정전기 개시일 이후에 기저치 이상으로 증가하였으며 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하기 3일전인 Day -3에 38.2 ± 10.9 pg/ml로 최고치를 보였고, 이후 감소하여 발정휴지기 개시일에는 1.0 pg/ml 이하를 나타내어 위의 보고와 동일한 분비 양상을 보였다.

혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준(Day 0)으로 발정주기중 CI와 혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도 사이의 관계를 비교, 검토한 결과는 Fig 3과 같다. 혈장 estradiol-17 β 농도는 Day -3에 최고치를 나타내었고, 혈장 estradiol-17 β peak 후 2일째인 Day -1에 CI가 최고치를 나타내었다. CI가 최초로 80% 이상으로 증가한 날은 혈장 estradiol-17 β peak 3일전인 Day -6 이었으며, 80% 이상을 나타낸 기간은 Day -6부터 Day 3까지 10일간 이었다. 또한 CI가 최초로 90% 이상으로 증가한 날은 estradiol-17 β peak 일인 Day -3 이었으며, 90% 이상을 나타낸 기간은 Day -3부터 Day 3까지 혈장 estradiol-17 β peak 전후 7일 동안이었다. 이 기간 중 CI가 최고치를 나타낸 Day -1 전후에 CI의 증·감의 폭은 현저하지는 않았으나, 혈장 estradiol-17 β peak 후 2일째에 CI가 최고치를 나타내었으며, 이후 4일 후까지 90% 이상을 나타내었다. 이 결과는 혈장 estradiol-17 β peak 후 3~6일에 질세포의 각화정도가 최고를 이룬다는 보고¹⁵와 유사한 결과를

나타내었다. 또한 80% 이상으로 증가한 날로부터 6일 후, 90% 이상으로 증가한 날로부터 3일 후인 Day 0에 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하여 질상피세포의 각화가 80% 이상인 날로부터 6.9일 후에 배란이 일어난다는 보고³와도 유사한 결과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 질세포와 혈장 progesterone 농도를 기준으로 한 진돗개에서 배란은 CI peak 후 1일째, 혈장 estradiol-17 β peak 후 3일째 그리고 혈장 progesterone 농도가 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날에 일어나며, 최상의 교배적기로는 CI peak 후 90% 이상으로 지속되는 시기와 혈장 progesterone 농도가 3.0~8.0 ng/ml 사이에 있음이 확인되었다. 따라서 혈장 progesterone 농도 측정으로 정확한 배란시기 및 교배적기를 판정할 수 있으나, 시설비가 저렴하고 검사방법이 간단한 질세포검사도 진돗개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기의 판정에 응용될 수 있음을 시사하는 결과라고 사료된다

결 론

질세포상과 혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도 사이의 관계를 규명하여 진돗개에서 번식생리의 기초지견을 확립하고, 배란 및 교배적기의 판정에 대한 정확한 기초자료를 제공하고자 진돗개 36두를 대상으로 발정주기 동안 질세포검사 및 혈장 progesterone과 estradiol-17 β 농도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다

최초 교배허용일을 기준으로 한 발정주기별 질세포상의 변화로는, 발정전기에는 superficial cell, anuclear cell 및 적혈구가 주종을 이루었으며, 발정기에는 superficial cell, anuclear cell 및 적혈구가 주종을 이루는 세포이었다. 발정휴지기에는 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell 및 백혈구가 주종을 이루었으며, 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate cell이 주종을 이루는 세포이었다. CI는 발정전기와 발정기에 높게 나타났으나, 발정휴지기과 무발정기에는 감소하여 각 기간별 비교에서 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높았다

혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준(Day 0)으로 발정주기중 혈장 progesterone과 estradiol-17 β 농도를 살펴보면 혈장 progesterone 농도는 발정출혈 개시일에는 1.0 ng/ml 이하를 보이다가 점진적으로 증가하여 Day 0에는 임신견과 비임신견에서 각각 5.2 ± 0.3 ng/ml, 5.7 ± 0.5

ng/ml로 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다. 이후 지속적으로 증가하여, 임신견의 경우에는 Day 22에 46.5 ± 3.3 ng/ml로 최고치를 나타내었고, 비임신견에서는 Day 20에 39.8 ± 0.1 ng/ml로 최고치를 나타내어 비임신견에 비해 임신견의 혈장 progesterone 농도가 더 높게 나타났다. 이후 혈장 progesterone 농도는 점차적으로 감소하여 임신견의 경우 분만일인 Day 63에 0.8 ± 0.2 ng/ml로 1.0 ng/ml 이하로 감소한 반면 비임신견은 Day 75에 0.5 ± 0.4 ng/ml인 1.0 ng/ml 이하로 감소하였다. 임신견과 비임신견 모두 무발정기 동안 혈장 progesterone 농도는 1.0 ng/ml 이하로 낮게 지속되었다.

혈장 estradiol-17 β 농도는 발정전기 개시일로부터 기저치 이상으로 증가하였으며 이후 급격히 증가하여 Day -3에 38.2 ± 10.9 pg/ml로 최고치를 나타내었다. Day 0에 급격히 감소하여 이후에는 1.0 pg/ml 이하를 나타내었다.

임신견과 비임신견 36두에서 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 기준 (Day 0)으로 CI와 혈장 progesterone 및 estradiol-17 β 농도와의 관계를 살펴보면, 혈장 estradiol-17 β 농도는 Day -3에 최고치를 나타내었고, CI는 혈장 estradiol-17 β peak 후 2일째인 Day -1에 최고치를 나타내었으며, CI peak 후 1일째인 Day 0에 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였다. CI가 80% 이상으로 증가한 날은 Day -6부터 Day 3까지 10일 동안 지속되었고, 90% 이상으로 증가한 날은 Day -3부터 Day 3까지 7일 동안 지속되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 진돗개에서 배란은 CI peak 후 1일째, 혈장 estradiol-17 β peak 후 3일째 그리고 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날에 일어났으며, 최상의 교배적기로는 CI가 90% 이상으로 지속되는 시기와 혈장 progesterone 농도가 3.0~8.0 ng/ml 사이에 있음이 확인되었다. 따라서 혈장 progesterone 농도 측정으로 정확한 배란시기 및 교배적기를 판정할 수 있으나, 시설비가 저렴하고 검사방법이 간단한 질세포검사 또한 진돗개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기의 판정에 응용될 수 있음을 시사하는 결과라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Bell ET, Christie DW. Erythrocytes and leukocytes in the vaginal smears of the beagle bitch. *Vet Rec* 1971; 88: 546-549.
- 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.
- Christiansen IJ. Breeding and mating. In: *Reproduction in the dog and cat*, 1st ed. London: Bailliere Tindall. 1984: 41-54.
- Concannon P, Whaley S, Lein D, Wissler R. Canine gestation length. Variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1819-1821.
- 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.
- Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* 1975, 13: 112-121.
- 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.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 3-25
- Dietrich E, Müller R. Use of a progesterone enzymeimmunoassay to determine the optimal mating time in oestrous bitches. *J Reprod Fert (Suppl)* 1993; 47: 524.
- Dore MA. The value of vaginal smears in determining ovulation and optimal breeding times in the bitch. *Irish Vet J* 1978; 32: 54-60.
- Edqvist LE, Johnson EDB, Kasström H, Olsson SE, Richkind PD. Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrous cycle and pregnancy. *Acta Endo* 1975; 78: 544-564.
- Fayrer-Hosken R, Caudle A, Downs M, Miller-Liebl D. Evaluating the infertile breeding bitch. *Vet Med* 1994; 1026-1038.
- Feldman EC, Nelson RW. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1996: 526-546.
- Guyant L. Canine vaginal cytology. *Veterinary Technician* 1988; 9: 513-520.
- Linde C, Karlsson I. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J Small Anim Pract* 1984; 25: 77-82.
- Mestre J, Wanke M, Sucheyre S. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone.

- luteinizing hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. *J Small Anim Pract* 1990; 31: 568-570.
17. Nett TM, Akbar AM, Phemister RD. Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 148: 134.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Post K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can Vet J* 1985; 26: 101-104.
 21. Schutte AP. Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. *J Small Anim Pract* 1967; 8: 301-306.
 22. Schutte AP. Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *J Small Anim Pract* 1967, 8: 307-311.
 23. Schutte AP. Canine vaginal cytology. III. Compilation and evaluation of cellular indices. *J Small Anim Pract* 1967, 8: 313-317.
 24. Shille VM. Reproductive physiology and endocrinology of the female and male. In Ettinger SJ, ed *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Vol II. Philadelphia: WB Saunders Co. 1989: 1777-1791.
 25. Smith MS, McDonald LE. Serum levels of luteinizing hormones and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. *Endocrinology* 1974; 94: 404-412.
 26. Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ, Lust G. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches : Detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am J Vet Res* 1989; 50: 68-71.
 27. 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.
 28. Wright PJ, Parry. Cytology of the Canine reproductive system. *Veterinary clinics of North America . Small Animal practice* 1989; 19: 851-874.
 29. 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.
 30. 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
 31. 강병규, 손창호, 신창록, 최한선, 오기석, 박인철. 진돗개에서 임신일령에 따른 임신구조물의 초음파상. II. 태아 및 태아외구조물의 측정에 의한 임신일령의 추정 대한 수의학회지 1996; 36: 247-254.
 32. 강병규, 최한선, 나진수, 손창호, 오기석, 이차범. 인공적 발정유기견의 질세포상에 관한 연구. 대한수의학회지 1988; 28: 203-211.
 33. 강병규, 최한선, 나진수, 오기석, 손창호, 이차범. 발정유기견의 난소반응과 수정란의 외과적 회수. 대한수의학회지 1989; 29: 373-381.
 34. 강병규, 최한선, 나진수, 이차범, 오기석, 손창호. 발정유기된 암개의 혈중 progesterone 농도변화. 대한수의학회지 1989, 29: 253-262.
 35. 손창호, 강병규, 최한선, 김기원, 강현구, 신창록, 박인철. 진돗개에서 분만후 자궁수복의 연속적 초음파상. 대한수의학회지 1999; 39: 653-664.
 36. 손창호, 강병규, 최한선, 오기석, 강현구, 김남기. 췌소에서 prostaglandin F2 α 또는 fenprostalene 투여 후 초음파 진단장치로 측정된 황체의 크기와 혈장 progesterone 농도와와의 관계. 한국임상수의학회지 1995; 12: 174-185.
 37. 손창호, 강병규, 최한선, 이나경, 신창록, 한호재, 윤용달. 진돗개에서 혈장 progesterone 농도측정에 의한 배란시기 및 교배적기의 추정. 대한수의학회지 1997; 37: 899-909.
 38. 손창호, 백인석, 신창록, 최한선, 강병규. 진돗개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기 판정을 위한 질세포검사의 이용성. 한국임상수의학회지 1997; 13: 114-122.
 39. 손창호, 신창록, 강병규, 최한선. 진돗개에서 임신일령에 따른 임신구조물의 초음파상. I. 태아 및 태아외구조물의 최초 관찰시기 대한 수의학회지 1996; 36: 235-245.