

PMSG와 hCG 병용투여에 의해 인공발정 유기된 진도개에서 질상피세포 변화상

이주환 · 김나리 · 박인철 · 오기석 · 김세라 · 박상국 · 문진산* · 배춘식 · 김성호 · 김영홍** · 손창호¹

전남대학교 수의과대학, 국립수의과학검역원*, 경북대학교 수의과대학**

Changes of Vaginal Epithelial Cells in Korea Jin-do Bitches after Induction of Estrus with PMSG and hCG

Ju-hwan Lee, Na-ri Kim, In-chul Park, Ki-seok Oh, Se-ra Kim, Sang-guk Park, Jin-san Moon*, Chun-sik Bae, Sung-ho Kim, Young-hong Kim** and Chang-ho Son¹

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

*National Veterinary Research and Quarantine Service

**College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

Abstract : Estrus was induced in 13 anestrus Korea Jin-do bitches by intramuscular injection of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) in a dose of 500 IU once daily for ten consecutive days, followed by an additional single intravenous injection of 1,000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) on the tenth day. Day-changes of vaginal epithelial cells during the hormone treatment were investigated in each experimental bitches and compared with the those of spontaneous estrus bitches. The first days of vulval bleeding and male acceptance after PMSG treatment were on Day 6.0±1.5 (mean±SD) and Day 9.0±1.9, respectively. And in all of 13 bitches, vulval swelling and perineal reflex were shown. The mean durations of proestrus and estrus were 2.9±1.4 (mean±SD, range ; 1-6) and 11.5±1.7 (range ; 8-14) days, respectively, that is, duration of proestrus was significantly shorter than that of the spontaneous estrous bitches but duration of estrus was longer than that of the spontaneous estrous bitches. Characteristic features of vaginal cytology during the estrous cycle were the high proportions of large intermediate cell, superficial cell, anuclear cell and erythrocyte in proestrus, superficial cell and anuclear cell in estrus and parabasal cell, small intermediate, large intermediate cell, and leukocyte in diestrus, respectively. The cornification index (CI) was significantly high proportion in proestrus and estrus, when Day 0 was timed from the first day of male acceptance, the CI was first increased above 80% on Day 0 and maintained above 80% until Day 0 to Day 5 during 6 days and showed a peak on Day 2. Also it was maintained above 90% until Day 2 to Day 3 during 2 days. These results indicated that all 13 experimental bitches showed positive estrus detection by the estrus behavior and vaginal smear test after treated with PMSG and hCG. It suggested that vaginal cytology was used to estimate the optimal mating and ovulation time, in consideration of the day when the CI was maintained above 80% in estrus-induced Korea Jin-do bitches.

Key words : induction of estrus, vaginal cytology, cornification index (CI), optimal mating and ovulation time, Korea Jin-do bitches

서 론

개는 종류와 개체에 따라 발정 간격에 차이가 있지만 평균 7개월(5-8개월)의 단발정 동물로서 긴 발정주기를 갖는다^{13,17,30}. 이러한 개의 특성을 고려하여 긴 번식기간을 인위적으로 조절하여 더 많은 번식기회를 갖고자 하거나 과배란 처리 후 보다 많은 산자수 확보 및 불임증을 치료하기 위해 다양한 방법으로 인공발정유기를 실시하고 있으며 투여 약물의 선택 및 사용방법에 따른 그 응용 범위도 확대된 실정이다.

개의 인공발정유기 방법에 있어서는 FSH, LH, PMSG, hCG 등의 성선자극호르몬 투여^{1,2,15,21,31,32,37,39,40,44}, GnRH나

GnRH-agonist를 이용한 성선자극방출호르몬 투여^{5,9} 및 bromocriptine, cabergolin 등의 prolactin-inhibiting substances 와 ergoline derivatives 투여^{20,23,34} 등과 같은 방법이 제시되었고, 이러한 투여 약물에 대한 용법 및 용량에 따라 다양한 결과들이 보고되었다. 위와 같은 약물의 선택과 사용방법에 따른 다양한 인공발정유기 성적에 있어서 Feldman과 Nelson¹⁷은 호르몬제의 선택시 우선적으로 유효성, 품질성, 일관성, 신뢰성 등을 고려해야 한다고 보고하였으며, 이를 토대로 발정유기 성적을 발정발현율, 배란율, 분만율 등을 기준하여 볼 때 PMSG와 hCG 병용투여에 의한 보고가 다른 방법에 비해 높은 성적을 나타내었으며 임상적 적용가능성이 높은 것으로 보고되었다^{2,10,17,31}.

이러한 인공발정유기견에서 발정주기 일수는 보고자에 따른 차이는 있지만 대부분 자연발정견에 비하여 발정전기의

¹Corresponding author.
E-mail : chson@chonnam.ac.kr

기간은 짧고 발정기의 기간은 긴 양상을 보인다고 보고되었다^{21,40,44}. 따라서 인공발정유기시 발정증상의 관찰 및 정확한 발정시기와 배란시기를 판정하는 것이 매우 중요하다. 질상피세포검사는 발정 진단법의 하나로써 개의 발정주기에 따른 내분비의 영향에 따라 각 발정주기별 질상피세포의 형태 변화와 유형을 토대로 하여 발정전기와 발정기 진행과정의 판단 및 교배적기를 판정하는데 있어 매우 실용적인 검사로 제시되고 있다^{3,8,25,27-29,33,38,40-42,44}.

또한 질상피세포검사에 의한 세포지수, 즉 eosinophilic index (EI), cornification index (CI), superficial cell index (SCI) 및 karyopyknotic index (KPI)에 대한 임상적 응용성도 소개되었다^{7,27-29,38}. 이밖에도 질상피세포검사는 비정상적인 발정주기를 보이는 개에서의 교배적기 판정, 분만일의 예시 그리고 자궁이나 질 등의 생식기 질환 등^{17,19}의 진단에도 응용될 수 있다.

이러한 질상피세포검사와 더불어 교배적기 판정과 배란시기 추정에 또 다른 지표로 쓰이는 혈장 progesterone 농도는 배란 전부터 서서히 증가하기 시작하다가 배란 직후부터 급격히 증가하여 배란 후 20일 전후에 최고치를 나타낸다고 하였다^{12,13,41}. 또한 배란 전 난포벽의 황체화로 혈장 progesterone 농도가 증가하는 현상은 오로지 개에서만 관찰될 수 있다고 하였으며⁴¹, 특히 Concannon 등¹¹은 LH surge 후 배란은 혈장 progesterone 농도증가와 밀접한 관련이 있다고 하였다. 그러므로 일련의 혈장 progesterone 농도를 측정하는 것은 배란시기를 비교적 정확하게 알 수 있고, 아울러 교배적기를 판정하는데도 중요하다고 Post 등²⁶은 보고하였다. 또한 여러 연구자들이 혈장 progesterone 농도를 측정하여 이를 기준으로 일정한 시간에 교배를 실시하여 높은 수태율을 나타냈다고 보고하였다^{22,26}.

이상과 같이 다양한 약물투여 및 방법에 따른 개에서의 인공발정 유기에 대한 보고는 많으나 특정 품종을 대상으로 약물투여 후 임상적 발정증상 관찰과 질상피세포검사를 통한 구체적인 발정시기와 배란시기 판정 및 약물투여 일주간 질상피세포의 변화상에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 무발정기 진도개를 대상으로 인공적 발정유기를 위한 약물투여 후 임상적 발정증상 관찰과 질상피세포검사를 실시하여 발정주기 판정과 질상피세포 변화상을 검토하였다.

재료 및 방법

대상동물

분만경험이 있는 무발정기 진도개 13두를 대상으로 하였으며 연령은 평균 5.8세(범위: 1.5-11세), 체중은 평균 18.6 kg (15.6-22.6 kg)이었다. 모든 실험견은 실험개시전에 구충 및 예방접종을 실시하여 1두씩 격리 사육하였다. 본 실험에서 무발정기의 구분은 전회 발정종료후 3개월 이상된 개와 전회 분만후 2개월 이상된 개중에서 혈장 progesterone 농도가 1.0 ng/ml 이상인 개들로 한정하였다.

인공발정유기 방법

인공발정유기 방법은 Chaffaux⁶와 강 등⁴⁰의 방법을 응용하여 PMSG 500 IU를 매일 10일 동안 근육주사 후 마지막 10일째에 hCG 1,000 IU를 정맥주사 하였다. PMSG 첫 투여일을 실험개시일(Day 0)로 하였다.

발정유기에 사용한 호르몬제는 다음과 같다.

PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) :

D.S PMSG[®], Dae Sung Micro. Lab

hCG (human chorionic gonadotropin) :

D.S hCG[®], Dae Sung Micro. Lab

발정출혈 확인

실험개시(PMSG 첫 투여일) 2주 전부터 매일 발정출혈 및 외음부 종대 여부 등의 임상적 발정증상을 관찰하였으며, 발정출혈 개시일부터 발정이 종료될 때까지는 매일 2회 출혈색, 출혈량 및 점도와 수컷 허용여부를 관찰하였다. 최초 수컷허용 후 1-2일에 동종의 수컷과 2일 간격으로 2-3회 자연 교배를 실시하였다.

발정주기 구분

임상적 증상의 관찰에 의한 발정주기의 구분은 Concannon과 Lein¹² 및 Guyant¹⁹의 기술에 준하여 실시하였다. 발정전기는 발정출혈 개시일부터 최초 수컷허용 전날까지, 발정기는 최초 수컷허용일부터 최후 수컷허용일까지, 발정후지기는 최후 수컷허용 다음날부터 분만일까지로 구분하였다.

배란일 판정

채혈. 실험개시 1주 전부터 최초 수컷허용 후 20일까지 매일 아침 요골쪽피부정맥에서 채혈하였다. 채혈 후 EDTA병에 채취한 혈액은 4°C에서 3000 g로 10분 동안 원심분리하여 혈장을 분리한 후 혈장 progesterone 농도를 측정할 때까지 -20°C에 냉동보관하였다.

혈장 progesterone 농도 측정. 혈장 progesterone 농도 측정은 김 등⁴¹의 기술에 준하여 progesterone kit (Progesterone Coat-A-count, Diagnostic Products Corporation, Los angeles, CA)를 사용하여, 추출하지 않은 100 µl의 혈장을 duplicate로 하여 gamma counter (EG & G Wallace, Finland)로 측정하였다. 즉 progesterone 항체가 부착된 각각의 시험관에 표준액, quality control 또는 시료를 100 µl씩 분주한 다음 125I-progesterone 1 ml를 각각 넣어 실온에서 3시간 동안 반응 시켰다. 반응 후 결합하지 않은 부분을 상층액만 분리한 다음 gamma counter로 측정하였다.

혈장 progesterone 농도에 의한 배란일 판정. Wallace 등³⁶과 김 등⁴¹의 기술에 준하여 발정출혈 후 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 배란일로 판정하였다.

질상피세포검사

질상피세포의 채취 및 도말. Guyant¹⁹ 및 김 등⁴¹의 방법

에 준하여 멸균된 면봉에 생리식염수를 묻힌 후 질내에 삽입하여 질정전에서 질분비물을 채취한 후 2장의 슬라이드에 직접 도말 하였다. 슬라이드는 자연건조 시킨 후 각 유형의 질상피세포 비율과 cornification index (CI)를 산출하기 위해 Wright's 염색을 실시하였다. 질상피세포검사는 실험개시 2주 전부터 분만일까지 매일 실시하였다.

질상피세포검경

질상피세포의 구분. Schutte²⁸의 기술에 준하여 각 슬라이드에 5개 이상의 시야에서 200개의 질상피세포를 검경한 후 세포질의 각화유무 및 세포핵의 형태에 따라 5가지 세포, 즉 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell 그리고 anuclear cell로 분류하였으며, Bell과 Christie³의 기술에 준하여 슬라이드상의 적혈구와 백혈구 출현 정도를 0부터 5까지 6등급으로 분류하였다.

Cornification index (CI)의 산출. Schutte²⁹와 Post²⁵의 기술에 준하여 각화된 세포의 비율을 백분율로 환산하여 CI를 산출하였다. CI의 산출공식은 다음과 같다.

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

통계처리

각 발정주기의 길이와 발정주기의 간격은 평균±표준편차(mean±SD), 각 주기별 질상피세포의 비율 및 혈장 progesterone 농도는 평균±표준오차(mean±sem)로 산출하였다. 그리고 발정주기별 각 질상피세포의 비교는 SAS (statistical analysis system)의 GLM (general linear model)을 이용하여 유의성을 검토하였다.

결 과

인공발정유기된 진도개에서의 발정주기

PMSG와 hCG 병용투여에 의해 무발정기 진도개 13두 모두 음순종대, 발정출혈, 회음부 반사 등의 임상적 발정증상이 관찰되었으며 발정전기 개시를 나타내는 발정출혈은 실험개시일(PMSG 첫 투여일, Day 0)을 기준으로 Day 6.0±1.5(mean±SD)로 나타났고 발정기 개시를 나타내는 최초 수컷허용일은 Day 9.0±1.9로 나타났다. 발정전기와 발정기의 간격은 각각 평균 2.9±1.4일(mean±SD, 범위: 1-6일) 및 11.5±1.7일(범위: 8-14일)을 나타내었다(Table 1).

혈장 progesterone 농도를 기준으로 한 배란일 판정

실험개시일 1주 전부터 최초 수컷허용 후 20일까지 매일 혈장 progesterone 농도를 측정하여 결과, 배란일로 추정되는 혈장 progesterone의 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상을 나타낸 날은 실험개시일을 기준으로 Day 8.6±0.9(mean±SD, 범위: 7-10일)로 이때의 농도는 5.4±0.3 ng/ml(mean±sem, 범위: 3.9-8.2 ng/ml)이었다(Table 1).

Table 1. Clinical responses of 13 Korea Jin-do bitches treated with PMSG and hCG

	Parameter	Day(s)*	Range
Initiation	Proestrus	6.0±1.5	4-8
	Estrus	9.0±1.9	7-10
	CI ≥ 80%	8.6±1.7	6-11
	CI peak	12.2±1.4	9-13
Duration	Progesterone ≥ 4.0 ng/ml	8.6±0.9	7-10
	Proestrus	2.9±1.4	1-6
	Estrus	11.5±1.7	8-14
	CI ≥ 80%	5.9±2.5	2-10
	CI ≥ 90%	3.3±2.71	0-8

*Day 0 is the first day of treatment with PMSG and parenthesis indicate mean±SD

Table 2. The percentages (mean ± sem) of vaginal cells and cornification index, and grades of blood cells in vaginal smears of 13 Korea Jin-do bitches before and after treated with PMSG and hCG

Cell type	Vaginal smear		
	Before treatment	After treatment	
		Proestrus	Estrus
Parabasal	12.8±0.6	3.5±0.9*	4.1±0.7*
Small intermediate	50.2±1.1	17.1±3.0*	16.6±1.5*
Large intermediate	25.3±0.9	26.6±2.2	22.6±1.3
Superficial	7.0±0.6	32.0±3.0*	29.5±1.4*
Anuclear	4.7±0.3	20.8±2.3*	27.3±1.6*
Erythrocyte	1.5±0.1	2.4±0.2	2.0±0.1
Leukocyte	1.7±0.1	0.6±0.2	0.7±0.1
CI	11.7±0.9	52.8±4.9*	56.8±2.8*
No. of vaginal smears	286	76	324

*Significantly different (p < 0.01) compared with before hormone treatment.

발정유기 전후 질상피세포의 변화상

임상적 발정증상에 비추어 약물투여 이전 즉 무발정기와 약물투여 후의 발정전기 및 발정기 기간 동안의 질상피세포상을 살펴보면 Table 2와 같다.

약물투여 전에는 small intermediate cell과 large intermediate cell의 분포율이 각각 50.2±1.1%(mean±sem) 및 25.3±0.9%로 다른 질상피세포에 비해 상대적으로 높은 비율을 차지하였다. 이후 약물투여 후의 발정전기에는 superficial cell과 anuclear cell이 각각 32.0±3.0% 및 20.8±2.3%로 증가하였으며 이에 따라 CI도 증가하였다. 또한 적혈구의 출현율도 2.4±0.2로 증가하였다. 발정기의 기간에는 superficial cell과 anuclear cell이 각각 29.5±1.4% 및 27.3±1.6%로 가장 많은 비율을 차지하였으며 발정전기에 비

해서는 낮은 수치지만 적혈구의 출현율도 2.0 ± 0.1 로 높게 나타났다.

약물투여 일수에 따른 질상피세포의 변화상

인공발정유기 실험개시일을 기준으로 하여 일주간 질상피세포의 변화상을 살펴보면 Fig 1과 같다.

Day 0, 즉 PMSG 첫 투여일을 기준으로 무발정기에 속하는 Day -2부터 Day 0까지의 질상피세포상으로는 small intermediate cell과 large intermediate cell이 각각 $52.8 \pm 1.7\%$ 및 $23.6 \pm 1.7\%$ 로 높은 비율을 차지하였다. 이후 약물투여 일수가 증가됨에 따라 parabasal cell과 small intermediate cell이 점진적으로 감소를 나타낸 반면, superficial cell과 anuclear cell은 증가되는 상반된 양상을 보였으며 large intermediate cell의 경우에는 일자간에 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 한편 혈구세포중 적혈구는 발정전기의 기간의 범위에 속하는 Day 7-9에서 $2.3 \pm 0.2\%$ 의 가장 높은 출현율을 나타냈으며 CI는 각화상피세포 비율의 증가에 따라 유사한 증가를 나타냈다. 모든 약물투여가 끝나는 Day 10 이후의 질상피세포의 일주간 변화상에서는 위의 약물투여 기간에서의 변화상과 반대로 parabasal cell과 small intermediate cell은 다시 증가하고 superficial cell과 anuclear cell은 감소하였다. 최종 투여 호르몬인 hCG의 영향으로 배란시기 및 발정기 전반부의 기간에 속하는 Day 10-12에서는 superficial cell과 anuclear cell이 각각 $42.5 \pm 1.1\%$, $45.8 \pm 2.1\%$ 로 최고치를 이루었으며 이에 따라 CI는 $88.3 \pm 1.8\%$ 로 최고치를 나타냈다. 이후 발정기 후반부를 포함하는 Day 16 이후부터는 anuclear cell의 급격한 감소를 나타냈다.

약물투여 일주간 질상피세포의 변화상을 살펴보면, parabasal cell과 small intermediate cell은 약물투여 일수가 경과됨에 따라 점진적인 감소를 보이다가 PMSG 첫 투여일을 기준으로 Day 6-8에서 급격한 감소를 보였으며 이후 Day 16부터 다시 급격하게 증가하였다. Large intermediate cell은 Day 4-6까지 증가를 보이다가 이후 급격한 감소를 나타냈으며 Day 16부터 증가하였다. Superficial cell과 anuclear cell의 경우는 Day 6-8에서 급격한 증가를 보이다가 Day 16부터 다시 감소하였다.

한편 최초 수컷허용일 및 분만일을 기준으로한 질세포상과 CI의 변화는 Fig 2와 3에 나타난 바와같이 약물 첫투여일을 기준으로 했을 때와 동일한 양상을 보였다.

발정주기중 cornification index (CI)

CI는 실험개시일(PMSG 첫 투여일)을 기준으로 하였을 때 80% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 9부터 Day 14까지 6일 동안이었으며, CI가 최고치이자 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 12이었다. 한편 CI가 최초로 80% 이상의 값을 나타낸 날은 실험개시일로부터 혈장 progesterone 농도가 4.0 ng/ml 이상을 나타내는 날(Day 9)과 동일 하였다(Table 1). 이를 다시 최초 수컷허용일(Day 0)을 기준으로 하여 보면

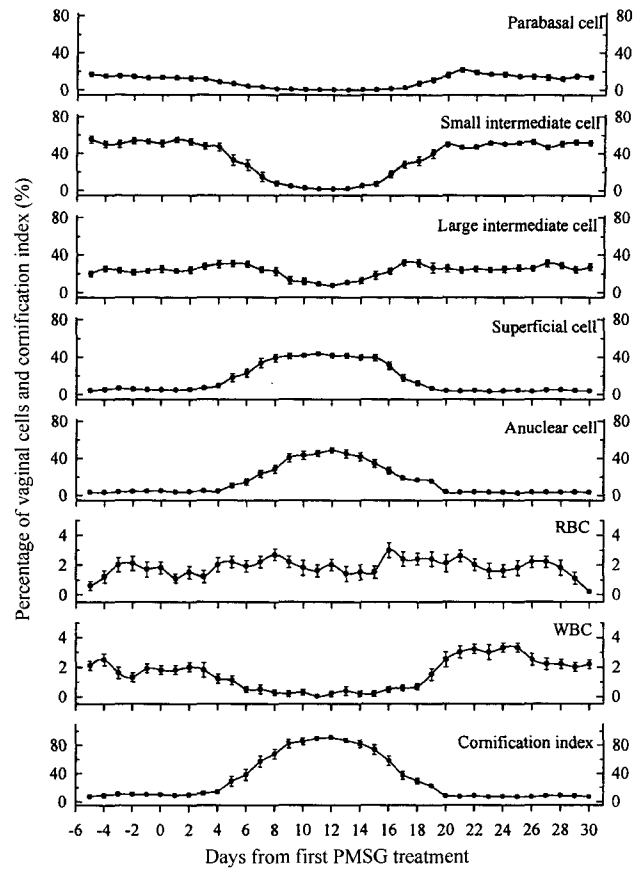


Fig 1. Profiles (Mean±sem) of cell types on vaginal cytology during estrous cycle from Day -5 to 30 in 13 Korea Jin-do bitches treated with PMSG and hCG. Day 0 is the first day of treatment with PMSG.

80% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 0부터 Day 5까지 6일 동안이었으며, 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 2부터 Day 3까지 2일 동안으로 이중 CI가 최고치를 나타낸 날은 Day 2이었다(Fig 2). 한편 분만일을 기준(Day 0)으로 하였을 경우에는 80% 이상의 값을 나타낸 날은 Day -60부터 Day -65까지 6일 동안이었으며, CI가 최고치이자 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day -63이었다(Fig 3).

고 찰

무발정기에 속하는 진도개 13두를 대상으로 PMSG와 hCG를 병용투여하여 인공발정유기 후의 발정주기를 검토한 결과 발정전기와 발정기의 기간은 각각 2.9 ± 1.4 (mean±SD) 일 및 11.5 ± 1.7 일로 나타나 자연발정견에서 각각 평균 9일 7,8,33로 보고한 것과 비교하면 발정전기 기간은 짧은 반면 발정기 기간은 긴 양상을 보였다. 특히 김 등⁴¹과 손 등⁴³에서 각각 36두, 13두의 자연발정 진도개를 대상으로 한 실험에서의 발정주기 중 발정전기와 발정기가 각각 9.1 ± 2.9 일, 10.1 ± 2.4 일과 9.2 ± 1.4 일 및 11.3 ± 2.4 일로 보고된 것에 비

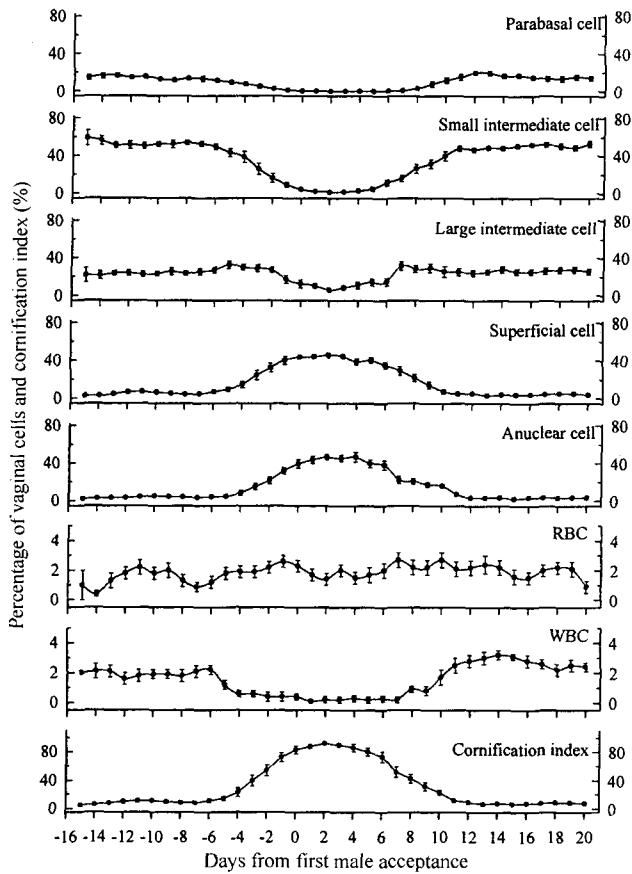


Fig 2. Profiles (Mean±sem) of cell types on vaginal cytology during estrous cycle from Day -15 to 20 in 13 Korea Jin-do bitches treated with PMSG and hCG. Day 0 is the first day of male acceptance.

해 유의성 있는 차이를 나타냈다.

한편 인공발정유기견에서의 발정전기와 발정기의 개시일자 및 기간은 보고자에^{1,6,21,32,40} 따라 차이가 있으나 강 등⁴⁰이 15두의 진도개 및 재래종견을 대상으로 PMSG 500 IU를 매일 10일 동안 근육주사 후 마지막 10일째에 hCG 500 IU를 정맥주사 하여 발정전기와 발정기의 개시일이 PMSG 첫 투여일로부터 각각 5.5±0.6일 및 12.9±0.6일, 발정전기와 발정기의 기간은 6.6±0.7 및 14.6±1.5일이었다고 보고하였다. 본 실험에서는 발정출혈 개시일이 6.0±1.5(mean±SD)일, 최초 수컷허용일은 9.0±0.9일로 나타났으며, 발정전기와 발정기의 기간은 각각 2.9±1.4일 및 11.5±1.7일로 나타나는 보고와 유사한 결과를 나타냈다.

PMSG와 hCG 병용투여에 의한 발정주기 성적은 대상 실험군과 약물의 사용 방법 및 용량 등에 따라 차이가^{1,2,6,15,21,32} 있지만, Thun 등³², 유 등⁴⁴과 강 등⁴⁰의 보고와 같이 본 실험에서도 실험군 13두 모두에서 음순종대, 발정출혈, 회음부 반사, 수컷허용 등의 임상적 발정증상 및 질상피세포검사를 통한 발정증상이 나타났다.

인공발정유기 후 발정주기 동안의 질상피세포의 변화상을

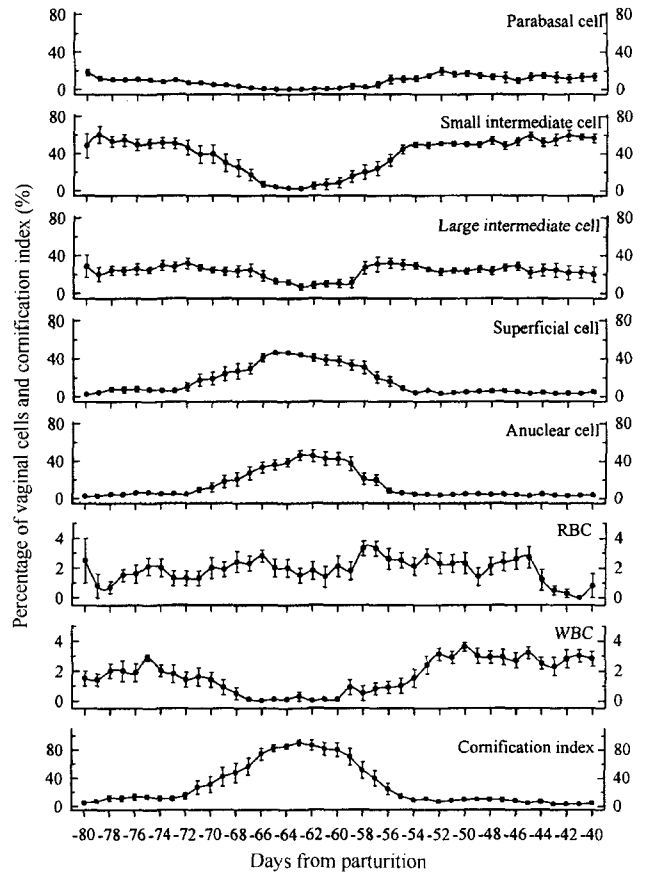


Fig 3. Profiles (Mean±sem) of cell types on vaginal cytology during estrous cycle from Day -80 to -40 in 13 Korea Jin-do bitches treated with PMSG and hCG. Day 0 is the day of parturition.

살펴보면 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell, anuclear cell이 발정전기에는 각각 3.5±0.9, 17.1±3.0, 26.6±2.2, 32.0±3.0 및 20.8±2.3%로, 발정기에는 각각 4.1±0.7, 16.6±1.5, 22.6±1.3, 29.5±1.4 및 27.3±1.6%로 나타나 강 등⁴⁰의 인공발정유기 실험에서 발정전기에 각각 3.2±0.3, 9.6±0.7, 32.8±0.8, 34.8±1.0 및 19.4±0.6%, 발정기에 각각 4.1±0.5, 9.6±0.8, 34.5±0.8, 34.7±0.8 및 16.3±0.5%로 나타난 보고와 유사한 결과를 나타냈다. 반면 김 등⁴¹의 자연발정 진도개를 대상으로 한 경우에서 발정전기에는 각각 0.4±0.1, 6.0±1.1, 11.7±1.9, 29.1±2.2 및 49.0±3.3%로, 발정기에는 각각 2.8±0.6, 11.9±2.0, 15.9±1.5, 29.6±2.0 및 38.5±2.7%로 보고한 것과 비교시 본 실험의 결과와 유의성 있는 차이를 나타냈다. 위와 같이 인공발정유기견과 자연발정견에서 발정전기와 발정기의 기간에 나타나는 질상피세포의 분포율에 있어 차이를 나타내는 이유로는 투여된 호르몬의 영향으로 인공발정유기견에서는 일정한 발정주기 동안의 각각의 질상피세포의 변화율이 급격한 증가와 감소를 나타낸 반면, 자연발정견에서는 완만한 증가와 감소를 보이기 때문인 것으로 사

표되어진다.

약물투여 일자간 질상피세포의 변화상을 살펴보면 호르몬 투여 일수가 경과함에 따라 parabasal cell, small intermediate cell은 점진적으로 감소한 반면 superficial cell, anuclear cell은 증가하고 특히, 발정전기와 발정기에 superficial cell 비율이 증가를 나타낸다는 보고와^{5,15,24,40,44} 본 실험에서의 질상피세포의 변화상과 서로 일치하는 결과를 나타내었다.

최초 수컷허용일을 기준으로 한 발정기간 동안의 질상피세포상과 CI의 변화는 Fig 2에서와 같이 parabasal cell과 small intermediate cell은 발정전기 중반부터 감소하여 발정기에는 거의 관찰되지 않았으나, 발정기 후반부터 증가하기 시작하였다. Large intermediate cell은 발정전기부터 감소하여 발정기에는 지속적으로 낮게 나타났다. Superficial cell은 발정기중 30-45%로 약간 높게 나타났으며, anuclear cell은 발정전기와 발정기에 뚜렷하게 증가된 후 발정휴지기에는 다시 감소하였다. 적혈구는 발정전기에 다소 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 중반부터 현저히 감소하였다. 이는 분만일을 기준으로 하여 역추정한 발정기간 중의 질상피세포상(Fig 3)과 유사한 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 자연발정견에서 발정주기 중 난포호르몬인 estrogen의 영향을 받아 발정전기에는 large intermediate cell, superficial cell 및 적혈구, 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell, 그리고 발정휴지기에는 parabasal cell과 small intermediate cell 및 백혈구가 주종을 이루었다고 한 보고²⁹와 일치하였다. 또한 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 한 보고^{17,18}와도 일치하였다.

혈장 progesterone 농도측정에 의한 교배적기 및 배란시기의 판정은 보고자에 따라 약간의 차이는 있으나, Bouchard 등⁴은 혈장 progesterone 농도가 3.4-6.6 ng/ml 이상으로 증가할 때가 배란시기라고 하였고, Wallace 등³⁵은 혈장 progesterone 농도가 4.0 ng/ml 이상일 때 배란이 일어난다고 하였으며, radioimmunoassay 방법에 의한 경우는 2.5-12.0 ng/ml일 때를 배란시기라고 추정하였고,^{4,12,16,22} enzyme immunoassay 방법에 의한 보고로는 1.5-9.4 ng/ml일 때로 추정하였다.^{4,14}

자연발정 진도개에서 김 등⁴¹은 CI가 최초 수컷허용일로부터 Day -4부터 Day 4까지 9일 동안 80% 이상을 나타냈고, Day -2부터 Day 2까지 5일 동안 90% 이상의 값을 나타냈으며, CI가 최고치를 나타낸 날은 Day 0이고 이후 Day 2

에서 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 CI가 최초 수컷허용일을 기준으로 하여 Day 0부터 Day 5까지 6일 동안 80% 이상을 나타내었고, Day 2부터 Day 3까지 2일 동안 90% 이상을 나타냈으며, CI가 최고치를 나타낸 날은 Day 2로 나타나 인공발정유기 진도개에서는 CI의 임상적 응용 범위인 80% 이상의 값을 나타낸 일수의 범위가 자연발정 진도개에 비하여 유의성 있게 짧았다.

한편 분만일을 기준으로 하였을 경우 김 등⁴¹은 자연발정견에서 CI가 Day -61부터 Day -71까지 11일 동안 80% 이상을 나타내었고, Day -63부터 Day -67까지 5일 동안 90% 이상의 값을 나타냈으며, 최고치를 나타낸 날은 Day -64로 1일후인 Day -63에는 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상을 나타내었다고 하였다. 본 실험에서는 Day -60부터 Day -65까지 6일 동안 80% 이상의 값을 나타냈으며, CI가 최고치이면서 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day -63이었다. 즉 자연발정견과 인공적 발정유기견에서 발정기 전후의 CI 변화상은 최초 수컷허용일을 기준으로 하였을 때 유사한 결과를 나타냈으며, CI값이 최고치를 나타낸 날을 기준으로 하였을 경우에는 임상적 배란시기 및 교배적기 적용에 기준이 되는 일수는 서로 일치하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 불 때 무발정기 진도개 13두를 대상으로 PMSG와 hCG를 병용투여 후 임상적 발정증상 관찰과 질상피세포검사를 실시한 결과 실험군 모두에서 인공발정유기가 인정되었다. 또한 인공발정유기된 진도개에서 질상피세포검사를 실시하여 CI가 80% 이상을 나타내는 날은 임상적 배란시기 및 교배적기 판정에 적용될 수 있음이 확인되었다.

결 론

자연발정주기를 갖는 진도개 중 무발정기에 속한 13두를 대상으로 하여 PMSG 500 IU를 10일 동안 매일 근육주사 후 마지막 10일째에 hCG 1,000 IU를 정맥주사 하여 인공적으로 발정을 유기하였다. 모든 실험기간 동안 매일 질상피세포검사와 혈장 progesterone 농도를 측정하여 이의 변화상을 자연발정견과 비교검토를 통하여 임상적 교배적기 및 배란시기 판정에 응용하고자 하였다.

실험견 13두에서 발정출혈 개시일은 PMSG 투여 후 평균 6.0 ± 1.5 일, 최초 수컷허용일은 평균 9.0 ± 1.9 일 이었으며 음순종대, 회음부반사 등의 임상적 발정증상은 실험견 모두에서 인정되었다. 발정유기된 실험견 13두에서 발정전기와 발정기의 기간은 각각 2.9 ± 1.4 일(1-6일) 및 11.5 ± 1.7 일(8-14일)로 나타나 자연발정견에 비해 발정전기의 기간이 유의성 있게 짧게 나타났으며, 발정기의 기간은 길게 나타났다.

인공발정 유기된 진도개의 발정주기 동안의 질상피세포의 변화로는 발정전기에는 large intermediate cell, anuclear cell, superficial cell과 적혈구, 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell, 발정휴지기에는 parabasal cell, small

intermediate cell, large intermediate cell 및 백혈구가 주종을 이루었으며 자연발정견과 유의성 있는 차이는 보이지 않았다.

실험개시일(Day 0)을 기준으로 발정기간 중 CI와 혈장 progesterone 농도사이의 관계를 비교, 검토한 결과 Day 9에 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가하였으며 이는 CI가 최초 80% 이상으로 증가한 날에 해당된다. 이후 3일 후에(Day 12) CI 최고치를 나타냈다.

최초 수컷허용일(Day 0)을 기준으로 하였을 때 cornification index (CI)는 발정전기와 발정기에 유의성 있게 높게 나타났으며 Day 0에 80% 이상으로 증가하였고, 80% 이상으로 지속된 기간은 Day 0부터 Day 5까지 6일 동안이었으며 Day 2에 최고치를 나타냈다. 또한 90% 이상으로 지속된 기간은 Day 2부터 Day 3까지 2일 동안으로 이는 자연발정견에 비해 짧은 양상을 나타냈다. 한편 분만일을 기준으로 하였을 경우에는 80% 이상의 값을 나타낸 날은 Day -60부터 Day -65까지 6일 동안이었으며, CI가 최고치이자 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day -63이었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 PMSG와 hCG를 병용투여한 실험견 13두 모두에서 임상적 발정증상 관찰과 질상피세포검사를 실시한 결과 인공적으로 발정이 유지 되었음이 인정되었다. 또한 인공발정유기된 진도개에서 질상피세포검사를 실시하여 CI가 80% 이상을 나타내는 날은 임상적 배란 시기 및 교배적기 판정에 응용될 수 있음이 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, Godke RA. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Animal Clinician*. 1980; 228-238.
2. Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Dobeli, Fairburn A, Eggenberger E, Rusch P. Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hyperoestrogenism in dogs. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 115-122.
3. Bell ET, Christie DW. Erythrocytes and leukocytes in the vaginal smears of the beagle bitch. *Vet Rec* 1971; 88: 546-549.
4. 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.
5. Cain JL, Cain GR, Feldmen EC, Lasley BL, Stabenfelt GH. Use of pulsatil intravenous administration of gonadotrophin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1993-1996.
6. Chaffaux S, Locci D, Pontois M, Deletang F, Thibier M. Induction of ovarian activity in anoestrous beagle bitches. *Br Vet J* 1984; 140: 191-195.
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. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J Reprod Fert (Suppl)* 1989; 39: 149-160.
10. 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.
11. Concannon PW, Kirk RW, Bonagura JD. Methods for rapid induction of fertile estrus in dogs. In: *Current Veterinary Therapy XI*. Philadelphia: WB Saunders Co 1992: 960.
12. 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.
13. 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.
14. England GCW. ELISA determination of whole blood and plasma progesterone concentrations in the bitches. *Vet Rec* 1991; 129: 221-222.
15. England GCW, Allen WE. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin induced oestrus in bitches. *J Reprod Fert* 1991; 93: 443-448.
16. England GCW, Allen WE, Porter DJ. A comparison of radioimmunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progesterone detection in bitches. *Vet Rec* 1989; 125: 107-108.
17. 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.
18. Feldman EC, Nelson RW. Canine female reproduction. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1987: 465-466.
19. Guyant L. Canine vaginal cytology. *Veterinary Technician* 1988; 9: 513-520.
20. Kusuma PS, Tainturier D. Comparison of induction of oestrus in dogs using metergoline, metergoline plus human chorionic gonadotrophin, or pregnant mares' serum gonadotrophin. *J Reprod Fert (Suppl)* 1993; 47: 363-370.
21. Nakao T, Aoto Y, Fukushima S, Moriyoshi M, Kawata K. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Nippon Juigaku Zasshi* 1985; 47: 17-24.
22. Okkens AC, Hekerman TWM, De Vogel JWA, van Haften B. Influence of litter size and breed on variation in length of gestation in the dog. *Vet Quart* 1993; 13: 160-161.
23. Onclin K, Verstegen JP. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and -diestrus. *Domest Anim Endocrinol* 1997; 14: 25-38.
24. Paisley LG, Fahning ML. Effects of exogenous follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in bitches. *J Am Vet Med Assoc* 1977; 171: 181-185.
25. Post K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can Vet J* 1985; 26: 101-104.
26. Post K, Cook SJ, Rawlings NC. The evaluation of an enzyme immunoassay for the assesment of progesterone in canine plasma. *Can Vet J* 1990; 31: 708-709.
27. Schutte AP. Canine vaginal cytology. I. Technique and

- cytological morphology. *J Small Anim Pract* 1967a; 8: 301-306.
28. Schutte AP. Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *J Small Anim Pract* 1967b; 8: 307-311.
 29. Schutte AP. Canine vaginal cytology. III. Compilation and evaluation of cellular indices. *J Small Anim Pract* 1967c; 8: 313-317.
 30. Shille VM, Stabenfeldt GH. Clinical reproductive physiology in dog. In: *Current therapy in theriogenology*, ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1980: 571-573.
 31. Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *JAVMA* 1984; 184: 1469-1473.
 32. Thun R, Watson P, Jackson GL. Induction of estrus and ovulation in the bitch using exogenous gonadotropins. *Am J Vet Res* 1977; 38: 483-486.
 33. 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.
 34. Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, Concannon PW. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 1999; 51: 597-611.
 35. 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.
 36. 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.
 37. Weilenmann R, Arnold S, Dobeli M, Rusch P, Zerobin K. Estrus induction in bitches by the administration of PMSG and HCG. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1993; 135: 236-241.
 38. 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.
 39. Wright PJ. The induction of oestrus and ovulation in the bitch using pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *Aust Vet J* 1980; 56: 137-140.
 40. 강병규, 최한선, 나진수, 손창호, 오기석, 이차범. 인공적 발정유기견의 질세포상에 관한 연구. *대한수의학회지* 1988; 28: 203-211.
 41. 김정훈, 정경아, 강현구, 오기석, 박인철, 박상국, 한호재, 손창호. 진도개에서 발정주기 동안 질세포상과 번식호르몬의 관계. *한국임상수의학회지* 2000; 17: 225-233.
 42. 손창호, 백인석, 신창록, 최한선, 강병규. 진도개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기 판정을 위한 질세포검사의 이용성. *한국임상수의학회지* 1997; 13: 114-122.
 43. 손창호, 신창록, 강병규, 최한선. 진도개에서 임신일령에 따른 임신구조물의 초음파상. I. 태아 및 태아의구조물의 최초 관찰시기. *대한수의학회지* 1996; 36: 235-245.
 44. 유일정, 김용준, 지동범. 인공발정유도견에서 질상피세포의 변화. *한국임상수의학회지* 1996; 13: 30-37.