

Anti-Prolactin과 다양한 호르몬 투여에 따른 개의 발정 유도 효율 비교

허영, 강은주, 맹근호, 김민정, 조규완, 이성림*
경상대학교 수의과대학 수의학과

Comparisons of Estrus Induction with Anti-Prolactin and Hormones in Bitches

Young Heo, Eun-Ju Kang, Geun-Ho Maeng, Min-Jung Kim, Gyu-Wan Jo and Sung-Lim Lee*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

Domestic bitches are non-seasonally monoestrous; spontaneously ovulate only once or twice occurs at anytime of the year. Estrus induction has been applied infrequent estrus, misleading ovulation, mating difficulties, failure to conceive after normal mating, pregnancy failure and biological research. Protocol of estrus induction which included variable hormones such as FSH, GnRH, and PMSG have been applied for the last decades. Recently, Bromocriptine, one of anti-prolactin/dopamine agonist has been occasionally applied for estrus induction. The study was carried out to investigate the effective method for the induction of estrus in bitches using different hormone treatments, and the initiation time of estrus from hormone treatment by assessments of cytological observation and blood plasma progesterone concentration.

A total of 54 bitches on anestrus were selected for the study and divided randomly into 8 treatment groups as follow. Control, natural estrus; FSH (L), FSH (1.5 mg/kg, twice a day, Falltrophin[®], Vetrepharm); FSH (H), FSH (3.0 mg/kg, twice a day); GnRH + FSH, GnRH (5 ug/kg, once first day, GNADON[®], Dongbang) + FSH (3 mg/kg, SID); PMSG, PMSG (50 IU/kg, every third day FOLLIGON[®], Intevet); GnRH + PMSG, GnRH (5 ug/kg, only first day) + PMSG (50 IU/kg, every third day); GnRH, GnRH (5 ug/kg, only first day); Bromocriptine, bromocriptine (0.3 mg/kg, SID, Parlodel[®], Novartis). The bitches were evaluated clinical sign, cytological exam and OVUCHECK[®] Premate for assessment of estrus induction.

Estrus induction rates were significantly ($P<0.05$) higher in GnRH + PMSG (100%) compared to others. PMSG and GnRH + PMGS (87.5 and 100%) and Bromocriptine (77.8%) were higher than others except GnRH + PMSG. Analysis of vaginal smear has proved to be effective a correct assessment of estrus induction with assay of progesterone concentration by OVUCHECK[®] Premate. Proestrus initiated by the 6th after induction in most case.

In conclusion, bromocriptine is an effective drug for estrus induction in bitches and assay of progesterone concentration by OVUCHECK[®] Premate with examination of vaginal smear that should be useful to detection of estrus induction of estrus induced bitches.

(Key words : bitch, anti-prolactin, hormones, estrus induction)

서 론

개의 번식은 암캐의 발정기를 진단하고 수캐와 자연 교배를 시키는 방법이 일반적으로 이용되고 있으나 최근에 많은 장점을 가지고 있는 인공수정을 이용한 번식 기술 개발에 대한 관심이 높다. 특히 개에서 인공수정 기술의 적용은 번식 장애가 있거나 우수한 형질을 가진 수캐를 효율적으로 번식시킬 수 있을 뿐만 아니라 교배 행위에 의해 기인될 수 있는

질병 감염 및 상해로부터 안전할 수 있어 유용한 번식 기술이다. 그러나 환경, 품종과 개체간의 차이에 의해 안정적이고 효율적인 암캐의 번식 기술 개발이 어려운 실정이고 일반적으로 개에서 발생하는 번식 장애는 수캐보다 암캐에서 높은 비율로 나타나는 것으로 보고되고 있다(Allen과 Stockman, 1979). 암캐에 발생하는 여러 번식 장애는 주로 춘기발정 지연, 발정기 지속증, 비정상적으로 짧은 발정간기로 인한 배란 실패와 발정 미약, 갑상선 기능 저하증 그리고 개에서 흔히 발생하는

* Correspondence : E-mail : sllee@gnu.ac.kr

위임신 등이 있다. 그 밖에도 난소 낭종, 난소 종양과 같은 난소의 질병과 자궁 축농증(pyometra), 자궁 신생종(uterine neoplasm) 등과 같은 자궁 질병, 그리고 질염, 질탈, 질의 신생종과 같은 질과 질 전정의 질환 또한 번식 장애의 원인이 된다(Grundy 등, 2002).

암컷의 번식 장애를 유발하는 원인으로 생식기 질병뿐만 아니라 다양한 호르몬 분비 장애가 직접적으로 영향을 준다고 보고하고 있다(Grundy 등, 2002; Gobello 등, 2001; Allen과 Stockman, 1979). 따라서 번식 효율을 높이기 위한 여러 방법들이 연구되고 있지만 암캐는 비 계절성 단발정 동물로 시기에 상관없이 연중 단 1~2회의 자연 배란이 일어나는 독특한 번식 주기를 가지고 있어 교배 적기를 정확하게 진단하기 어렵다. 특히 단발정 동물인 개는 한번의 발정이 일어나 후 수개월 동안 무 발정기가 지속되지만 예외적으로 바셋 종이 12개월이고 대부분 16주에서 56주로 품종간에 다양한 차이가 있다(Bouchard 등, 1991b). 불임견으로 진단되는 경우 교배 적기를 잘못 판정하여 임신이 실패한 경우가 대부분으로(Grundy 등, 2002), 약 40~50% 정도의 불임견의 경우 번식 기능의 직접적 기능 이상이 아닌 교배 적기 판정에 실패한 경우라고 보고(Johnston 등, 1994)하고 있다. 따라서 암캐의 발정 주기를 인위적으로 유도 및 조정하는 발정 동기화 유도 방법이 번식 효율을 높이는 데 매우 중요하다(Kutzler, 2005). 발정 유도 동기화 방법은 정확한 배란기에 자연교배 및 인공수정을 적용함으로써 상업적으로 연간 여러 배의 산자를 생산해야 하는 경우 번식 효율을 높일 수 있다. 특히 실험 동물로 개를 이용하는 다양한 연구에서 신뢰성 있는 결과를 얻기 위하여 동일한 시기에 태어난 산자를 대조군과 실험군으로 공시하고자 하는데 효율적으로 적용할 수 있다. 따라서 개의 발정 유도 기술의 확립은 여러 분야에 매우 유용하게 적용할 수 있는 기술이다.

여러 종류의 호르몬을 다양한 방법으로 적용시켜 개에서 효율적으로 발정을 유도하여 발정 주기를 조정하고 교배 적기의 정확한 예측이 가능한 발정 유도 기술에 대한 여러 연구가 이루어지고 있다. 암캐에 hCG(human chorionic gonadotrophins)와 eCG(equine chorionic gonadotrophins)를 투여하여 성공적으로 발정을 유도하였다는 보고(Thun 등, 1977) 이후 FSH(follicle stimulating hormone; Bouchard 등, 1991a) 또는 PMSG의 병용 투여, PMSG(pregnant mare serum gonadotrophins) 단독 투여(Arnold 등, 1989) 또는 bromocriptine과 병용 투여(Van Haaften 등, 1989), HMG(human menopausal gonadotropin) 투여(Jones 등, 1973), 항 prolactin 제제 또는 dopamine agonist 제제(bromocriptine과 cabergoline) 투여(Okkens 등, 1997; Zoldag 등, 2001), GnRH-agonist 투여(Concannon 등, 2006) 등 여러 방법들이 보고되고 있으나 아직 확립된 기술이 없는 실정으로 다양한 호르몬 투여 방법에 대한 비교와 검증이 필요하

다(Kutzler, 2005).

따라서 본 연구는 무 발정기의 개를 대상으로 발정 유도에 이용할 수 있는 FSH, GnRH, PMSG와 bromocriptine의 투여량과 병용 투여 방법에 따른 암캐의 발정 주기 변화와 발정 유도 효율을 임상적, 세포조직학적, 호르몬 분석 등 다양한 방법으로 판정하여 효율적인 발정 유도 방법을 비교 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 공시견

본 실험에 공시한 암캐는 총 54 마리로 백신과 구충을 실시하고 신체 검사를 통해 임상적으로 건강하다고 판정된 실험견을 각 대조군과 7개의 서로 다른 실험군에 공시하였다. 실험에 공시한 암캐들은 2~4년령의 체중 3~10 kg의 잠종견으로 자연 발정이 유도된 5 마리의 실험견을 실험 대조군으로 공시하였다. 일곱 개의 실험군에는 각 8마리씩의 무 발정기의 암캐를 저농도 또는 고농도 FSH 단독 투여, FSH와 GnRH 병용 투여, PMSG 단독 투여, PMSG와 GnRH의 병용 투여, GnRH 단독 투여군에 공시하였으며 bromocriptine 단독 투여군에는 9마리의 암캐를 공시하였다. 실험에 공시한 암캐는 모두 성숙이 완료되었으며 독립된 케이지에서 물과 사료를 자유 급식하였으며 정기적인 운동을 실시하였다. 발정 유도 실험을 위해서 발정 유도 약물 투여 전 자연 발정이 유도된 대조군을 제외하고 각 실험군에 공시된 암캐는 질 점막 상피세포 도말 검사와 호르몬 검사를 통하여 무 발정기인 것만을 실험에 공시하였다.

2. 약물 투여에 의한 발정 유도법

실험에 공시된 암캐에 투여한 모든 호르몬 및 약물은 수의 임상에서 상용되는 것으로 Table 1에 구체적으로 소개하였으며 항prolactin제인 bromocriptine은 인의용을 실험에 공시하였다. 자연 발정 유도된 실험 대조군(Control)을 제외한 7개의 실험군의 호르몬 투여 간격과 질 점막 상피세포 도말 검사 및 호르몬 분석을 위한 혈액 채취 스케줄은 Fig. 1과 같다. FSH(L) 처리군은 FSH를 1일 2회 1.5 mg/kg을 피하 주사하였고 FSH(H) 처리군은 FSH를 2배인 3 mg/kg을 1일 2회 피하로 투여하였다. GnRH + FSH 처리군은 첫째 날 GnRH 5 ug/kg을 정맥투여하고 FSH 3 mg/kg을 1일 1회 피하로 주사하였다. PMSG 처리군은 PMSG 50 IU/kg을 3일 간격으로 총 3회 투여하였으며, GnRH + PMSG 처리군은 GnRH + FSH 처리군과 같이 첫째 날 GnRH 5 ug/kg을 정맥투여하고 PMSG는 PMSG처리군과 같이 50 IU/kg을 3일에 한번 피하로 투여하였다. GnRH 처리군은 GnRH 5 ug/kg을 정맥으로 실험 첫날에만 주사하였다. Bromocriptine 처리군은 bromocriptine 0.3 mg/kg을 경구로 1일

Table 1. Chemicals and hormones used estrus induction.

Drug	Trade name	Distributor
FSH	Folltropin-V	Vetrepharm
PMSG	Folligon	Intervet
hCG	Chorulon	Intervet
GnRH (Gonadorelin acetate)	Conadon	Dongbang
Prolactin antagonists		
Bromocriptine	Parlodel	Novartis
Anti-emesis		
Metoclopramide HCl	Macperan	Dongwha pharm

*Metoclopramide was approached administration with bromocriptine for anti-emesis.

1회 투여하였으며, 이 약제의 부작용인 구토가 발생할 것을 예방하고자 항 구토제인 metoclopramide(맥페란, 동아약품, 한국)를 bromocriptine을 투여하기 30분전에 경구 투여하였다. 실험 10일째 대조군을 제외한 모든 실험군에서 배란을 유도하기 위해 hCG 500 IU/dog을 근육주사하였다(Fig. 1). 각 약물의 투여 용량과 방법은 예비 연구 결과와 기존 보고를 바탕으로 하였다(Kutzler, 2005; Kutzler, 2007).

3. 발정 진단 방법

각기 다른 약물 투여 방법을 적용한 암개의 발정 주기와 정확한 발정 유도 판정을 위해서 질 점막 상피세포의 변화 분석 방법(Fáy 등, 2003; Post, 1985)과 혈중 progesterone 농도를 간편하게 측정할 수 있는 OVUCHECK® Premate(BIOVET, USA) 진단법으로 비교 분석하였다.

1) 세포학적 변화 분석

질 점막 상피세포 도말 검사는 발정전기 시작부터 발정후기가 시작되는 시기까지 2회/주 실시하였다. 암개의 질 점막 상피세포를 생리식염수를 문힌 면봉으로 채취하고 슬라이드에 도말 후 메탄올로 고정하고 Diff-Quick 염색하였다. 염색된 질 점막 상피세포 핵의 응축 정도와 세포질의 각화 및 적혈구와 백혈구 출현 등을 광학현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다. 상피 세포는 parabasal cell(small, medium, large) intermediate cell, superficial cell, anuclear cell로 구분하여 무 발정기, 발정후시기, 발정전기, 발정기 그리고 발정후기로 분류를 하였다(Post, 1985).

2) 호르몬 농도 분석

각기 다른 호르몬 투여 방법에 따른 혈중 progesterone 농도 분석을 위해서 장액성 혈액 샘플물이 관찰되는 시기를 발

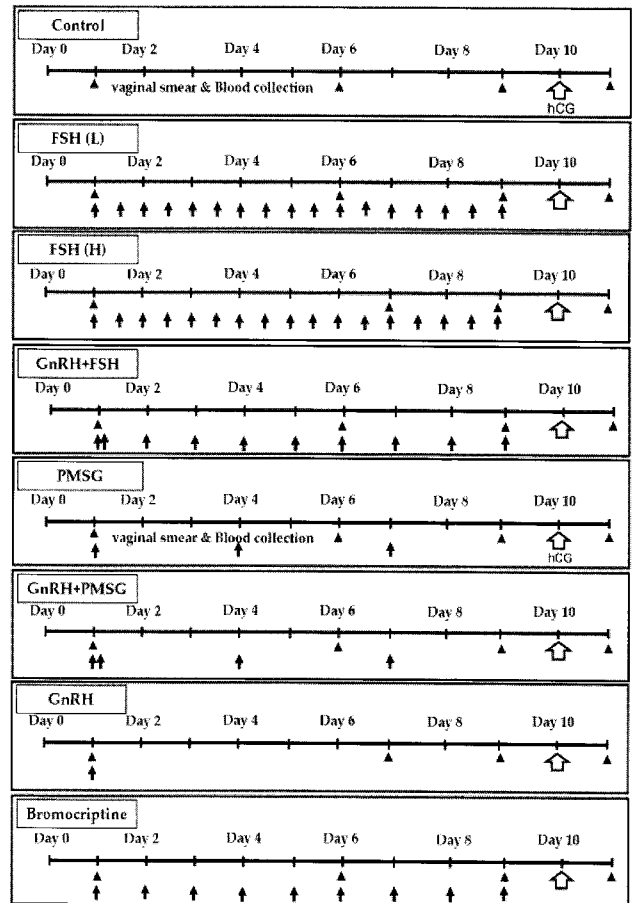


Fig. 1. Time schedule for hormone induction by different treatments in bithches. Control, Natural estrus; FSH (L), FSH (1.5 mg/kg; SC, twice a day); FSH (H), FSH (3 mg/kg; SC, twice a day); GnRH + FSH, GnRH (5 ug/kg; IV) + FSH (3 mg/kg; SC, SID); PMSG, PMSG (50 IU/kg; SC, every third day); GnRH + PMSG, GnRH (5 ug/kg, IV) + PMSG (50 IU/kg; SC, every third day); GnRH, GnRH (5 ug/kg, IV); Bromocriptine, bromocriptine (0.3 mg/kg; PO, metoclopramide before 30min.). Black arrows head represent vaginal smear and blood collection and black arrows represent hormone treatments. Blank arrows represent hCG administration.

정전기로 정하고, Fig. 1에 표시된 것처럼 호르몬 투여 첫째 날, 여섯째 날, 아홉째 날 그리고 실험의 마지막 날인 열한째 날에 각각 요골측 피정맥이나 경정맥에서 혈액을 0.5~1 ml을 채취하여 총 5번 혈액을 항응고제가 처리된 튜브에 채취하였다. 채취된 혈액은 500 ×g로 5분간 원심분리하여 상층의 혈장만을 분리하였다. 혈중 progesterone 농도 측정은 상용화되어 OVUCHECK® Premate로 시행하였다. OVUCHECK® Premate kit 내 연결된 3개의 well 중 2개의 well에 각각 Low(3 ng/ml)와 High(10 ng/ml) standard progesterone을 넣고 남은 한 개의 well에 채취한 혈장 샘플 넣어 Low와 High standard

progesterone well의 색깔과 비교하여 progesterone 농도를 측정하였다. 먼저 첫 번째와 두 번째 well에 Low와 High standard progesterone을 세 번째 well에 혈장 샘플을 kit 내의 피펫으로 한 방울 첨가하였다. 그 위에 progesterone에 대한 1차 항체를 4방울을 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후 증류수에 3번 수세하였다. 다음으로 발색 부분이 결합되어 있는 1차 항체에 대한 2차 항체를 4방울 첨가하고 다시 15분 정도 반응시켜 증류수로 3번 수세 후 10분 정도 관찰하며 색의 변화를 관찰하였다. Progesterone의 농도가 높을수록 붉은색이 연하고 progesterone 농도가 낮을수록 붉은색이 진하게 발색되어 샘플의 색깔이 Low standard의 색과 유사하게 발색되면 progesterone 농도가 3 ng/ml인 발정전기, Low와 High의 중간 색으로 발색되면 3~10 ng/ml 배란기, High에 가까우면 10 ng/ml로 하루 이틀 후를 교배 적기로 High 보다 연하게 발색되면 10 ng/ml 이상인 즉시 교배나 다음 발정기를 기다려야 함을 나타내는 progesterone이 존재함을 판정하였다(Fig. 2).

4. 통계학적 분석

본 실험의 대조군과 실험군간의 데이터는 SPSS의 Analysis of Variance(ANOVA)로 분석하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

결 과

1. 호르몬 투여에 의한 질 점막 상피세포의 변화

실험건의 발정 유도 판정은 무핵 각화된 질 점막 상피세포의 출현 비율을 'Cornification Index'(van der Holst와 Best, 1976)를 기준으로 해서 판정하였다(Fig. 3). 자연 발정 유도견인 대조군의 경우 20%의 암캐에서 발정이 진단되었다. 서로 다른 농도(1.5 mg/kg과 3.0 mg/kg)의 FSH 투여군의 경우 각각 50%의 암캐에서 발정이 유도되어 FSH 투여 농도에 따른 유의적 ($P < 0.05$)인 차이가 없었다. GnRH와 FSH 병용 투여군(62.5%)과 GnRH 단독 투여군(62.5%)의 경우 FSH 단독 투여군(50.0%)보다 다소 높은 경향을 보였으며, GnRH와 PMSG 병용 투여군(100.0%)의 경우 모든 실험견에서 질 점막 상피세포의 무핵

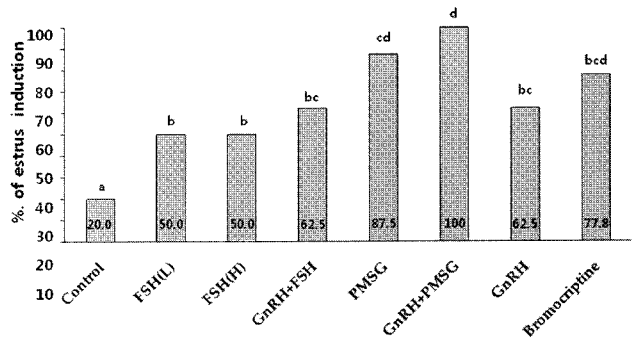


Fig. 3. Estrus detection by classification of exfoliative cell types in the vaginal smear of bitches.

^{a-d} Percentages with different superscripts within a column are significantly different ($p < 0.05$).

각화 변화로 발정 유도를 판정하였다. Bromocriptine 단독 투여군(77.8%)은 PMSG 단독 투여(87.5%)나 GnRH와 병용 투여군(100.0%)보다 낮은 경향을 보였으나 그 외의 다른 처리군보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

2. 혈중 Progesterone 농도 변화

OVUCHECK® Premate를 이용하여 실험견의 혈중 progesterone 농도를 3단계로 측정하여 발정 유도를 판정하였다. Low standard의 progesterone 농도는 3 ng/ml, High standard의 progesterone 농도는 10 ng/ml로 샘플의 발색 정도와 비교하여 3 ng/ml일 경우 1, 3~10 ng/ml일 때는 2, 그리고 10 ng/ml 이상일 때는 3으로 표시하여 분석하였다. 호르몬 투여 첫째 날, 여섯째 날, 아홉째 날 그리고 실험의 마지막 날인 열한째 날 채취한 혈액으로 호르몬 농도를 측정된 결과 모든 처리군에서 첫째 날에 3 ng/ml보다 낮게 나타나 무 발정기로 판정하였다. 호르몬 투여 6일 후 대조군을 제외한 모든 처리군에서 progesterone 농도 3~10 ng/ml로 발정전기에 도달했음을 판정하였다. 호르몬 투여 9일째는 PMSG와 GnRH + PMSG 투여군에서 progesterone 농도가 10 ng/ml 이상으로 다른 처리군에 비해 조기에 상승하였다. 호르몬 투여 11일째는 대조군과 FSH(L), FSH(H) 그리고 GnRH + FSH 처리군에서 progesterone 농

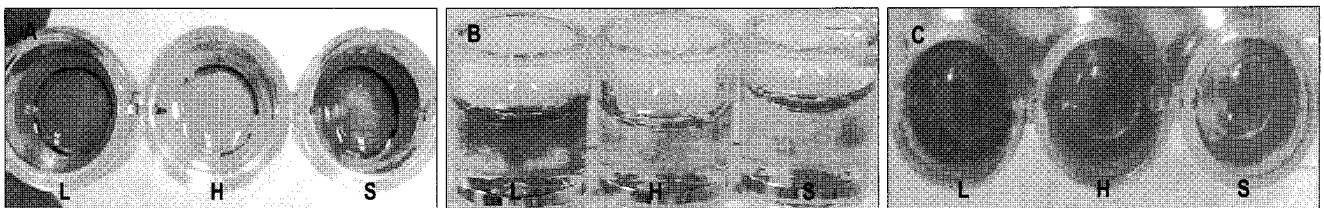


Fig. 2. Progesterone concentration assay using OVUCHECK® Premate (BIOVET, USA). Progesterone concentration was appeared through comparing L with H. L is low standard (3 ng/ml) and H is high standard progesterone (10 ng/ml). S indicated samples and A represented < 3 ng/ml, B represented 3~10 ng/ml and C represented > 10 ng/ml of progesterone concentration.

도가 3 ng/ml로 모든 FSH 처리군은 무 발정으로 판정되었으나 그 외의 처리군인 PMSG, GnRH + PMSG, GnRH 그리고 bromocriptine 처리군에서는 progesterone 농도가 10 ng/ml 이상으로 나타났다.

3. 질 점막 상피세포와 Progesterone 농도 변화의 연관성 관찰
여러 호르몬 투여 방법에 의한 발정 유도율, 질 점막 상피세포 도말 검사와 혈중 progesterone 농도 측정 결과와 비교하였다. 호르몬 투여 한 실험건의 혈중 progesterone 농도가 OVU-CHECK[®] Premate로 측정 결과 10 ng/ml로 나타난 경우 무핵 각화상피세포의 발현 비율을 비교한 결과 대조군과 FSH를 투여한 실험군들은 유의적($P<0.05$)으로 낮은 일치성을 보였으나, PMSG가 투여된 실험군들에서는 유의적($P<0.05$)으로 높은

일치성이 나타났다(Fig. 5). 자연 발정건인 대조군의 경우 질 점막 상피세포가 무핵각화로 관찰되면서 동시에 progesterone 농도가 10 ng/ml로 측정되어 발정기로 판정이 일치하는 경우가 60%, 1.5 mg/kg와 3.0 mg/kg FSH를 투여한 FSH(L)과 FSH(H)의 경우 모두 50%, GnRH 처리군과 GnRH + FSH 처리군의 경우 75%의 일치성을 보였다. 반면 PMSG 처리군의 경우 87.5%로 GnRH + PMSG 처리군의 경우 질 점막 상피세포의 무핵 각화 상피세포 발현과 progesterone 농도 진단 결과가 100% 일치하여 두 진단 방법 간의 일치성이 높은 것으로 나타났다. Bromocriptine 처리군의 경우 두 진단 방법 간의 일치성이 77.8%로 나타났다.

고 찰

개는 단발정 동물로 발정 주기는 16주에서 56주로, 무 발정 이기는 개체에 따라 2개월에서 10개월까지 다양하게 보고 되고 있다(Okkens and Kooistra, 2006; Wanke 등, 2006). 이처럼 긴 발정 주기와 무 발정기 및 개체 차이로 인하여 개의 번식 효율은 낮은 편으로 효율적인 발정 유도를 위하여 다양한 약물 투여 방법 등이 연구되고 있다. 그러나 개 발정 유도 연구에서 다양한 방법에 따라 각기 다른 결과가 보고되고 있으며 유사한 호르몬 처리에서 서로 다른 결과가 보고 되기도 하였다(Kutzler, 2007). 이는 계절, 환경, 영양 상태 그리고 호르몬을 투여하는 방법 등에 따라 호르몬 처리 효율에 차이가 발생할 수 있으며, 특히 동일한 조건의 무 발정기와 발정 유도율을 검증하는 방법의 정확도에 따라 효율성 판정에 차이가 발생할 수 있다. 본 연구에서는 인공수정이나 자연 교배 등의 효율을 향상시킬 수 있는 발정 유도 동기화를 위하여 FSH, GnRH, PMSG 그리고 bromocriptine을 여러 방식으로 투여하여 효율성을 비교하였다.

개의 번식 효율을 높이기 위한 발정 유도 방법으로 FSH를 투여하였을 때 암개의 외음부 변화, 질 점막 상피세포의 무핵 각화, 혈중 estradiol-17 beta와 progesterone의 농도로 발정 유도를 판정한 결과 효율적인 발정 유도 방법으로 보고하였다(Shille 등, 1984). FSH의 농도에 따른 발정 유도 효율이 0.077 mg/kg과 1.78 mg/kg의 FSH 농도에서 유사하게 발정이 유도되어 개에 있어서 FSH 농도에 대한 약물 감수성이 크지 않음을 보여주고 있다(Shille 등, 1984). 본 실험에서도 저농도(1.5 mg/kg)와 고농도(3 mg/kg)의 FSH 투여군, GnRH와 병용 투여한 처리군에서 모두 50% 이상의 발정 유도율이 나타나지만, FSH 농도에 따른 차이와 GnRH의 병용 투여에 따른 유의적인($P<0.05$) 차이는 보이지 않았다. 또한 FSH 투여 방법을 첫째날 10 mg/kg, 둘째날 7.5 mg/kg, 셋째와 넷째날 5 mg/kg, 다섯째날 7.5 mg/kg을 투여하여 총 35 mg/kg의 FSH를 투여시 발정이 유도되지 않았다고 보고(Paisley와 Fahning, 1977)하고 있어

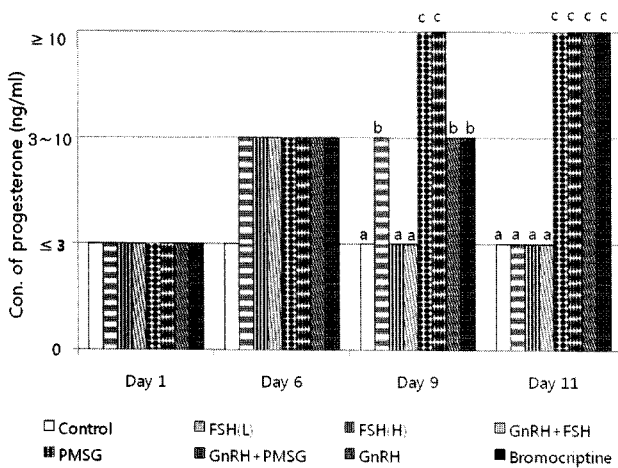


Fig. 4. Assay of progesterone concentration of plasma in induced bitches.

^{a-c} Concentrations with different superscripts within a column are significantly different ($p<0.05$).

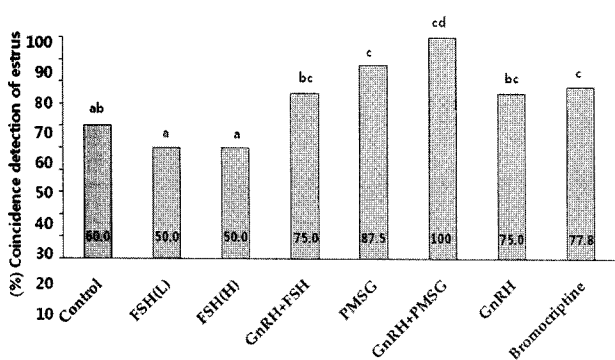


Fig. 5. The correlation between cytological assay by the vaginal smear and progesterone concentration in estrus bitches.

^{a-d} Percentages with different superscripts within a column are significantly different ($p<0.05$).

FSH 투여량을 증가시키는 것이 발정 유도 효율을 향상시킬 수 없는 것으로 보인다. 따라서 FSH를 발정 유도에 적용할 경우 저 농도의 FSH를 사용하여 고 농도의 FSH와 유사한 효율의 발정을 유도할 수 있고 PMSG 등의 다른 호르몬 제제에 비해 대체로 효과가 낮다. 또한 비교적 고가이면서 반감기가 짧은 FSH는 투여 회수가 빈번해야 하므로 저 농도의 FSH를 투여시 경제적인 측면에서 효율적이다.

본 연구에서 FSH의 경우 호르몬 투여 기간인 9일 동안 투여군에 따라 총 9회(GnRH + FSH 처리군)에서 17회(저농도 및 고농도의 FSH 처리군)에 걸쳐 투여를 하였는데, 이는 실험견에 스트레스를 유발할 수 있을 뿐 아니라 시술자에게도 번거로운 방법이다. 또한 FSH 처리군의 경우 호르몬 투여 6일째와 9일째에는 3~10 ng/ml에 도달하였다가 호르몬 투여 11일째는 대조군과 FSH(L), FSH(H) 그리고 GnRH + FSH 처리군에서 progesterone 농도가 3 ng/ml로 모든 FSH 처리군은 무발정으로 판정되었다. 이는 FSH 처리군이 검사하지 않은 6일째와 9일째 사이에 progesterone 농도가 배란이 유도되는 농도에 도달한 것으로 추정되어 다른 호르몬 처리군들의 progesterone 농도가 상승하는 9일째의 시점에서 감소하여 하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 임상적인 소견이나 질 점막 상피세포 도말 결과에는 발정이 확인되었으나 임신율이나 출산율이 낮은 것과 연관이 있을 것을 보인다(Shille 등, 1984).

OVUCHECK Premate를 통하여 발정 적기라고 판정된 실험견 중 질 점막 상피세포 도말검사로 무핵 각화상피세포의 비율을 확인해 본 결과 대조군 FSH를 사용한 군들에서는 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 상관관계를 보였다. England와 Allen(1991)은 질 점막 상피세포 도말 검사로 교배 적기를 판정하였을 때 기준이 명확하지 않다고 보고하고 있으나, 본 연구에서 자연 발정견인 대조군에 비해 호르몬 투여군의 경우 질 점막 상피세포 도말 검사법을 이용한 진단의 정확도가 유의적($P < 0.05$)으로 높은 것으로 나타났다. 이는 호르몬 투여에 의한 발정 유도의 경우 질 점막 상피세포 도말 검사법의 신뢰도가 높은 것으로 보인다.

이에 반하여 GnRH와 PMSG를 투여한 처리군들의 경우 투여횟수가 처리군에 따라 1회에서 4회로 FSH 군들에 비하여 현저히 낮고 FSH에 비해 가격도 저렴하여 경제적인 방법으로 고려될 수 있다. 특히 적은 투여 횟수가 시술견의 스트레스를 줄일 수 있을 뿐 아니라 시술자의 노동력도 절감할 수 있는 장점이 있다. 그러나 PMSG와 GnRH에 의한 개의 발정 유도 방법은 가장 널리 사용되는 것으로 보고(Weilenmann 등, 1993; Nakao 등, 1985; Jones 등, 1973)되지만 시술견에 내성이 생겨 재사용하였을 시 발정 효율이 낮아지는 문제점이 있다(Inaba 등, 1996; Mc Rae 등, 1985). 예비 실험으로 여덟 마리의 무 발정 이기 암개에 PMSG를 200과 300 IU/kg 투여하였지만 발정 유도에 효과가 없었으나, Thun 등(1977)은 PMSG를 250 IU/kg

투여하여 발정이 유도되었다고 보고하였다. PMSG 500 IU/kg을 5~10일간 피하투여 후 발정 유도율이 100%였다고 보고(Renton 등, 1981)하였으나 Arnold 등(1989)은 500 IU/kg의 PMSG를 피하로 10일간 투여 시 혈액 내 estrogen의 농도가 비정상적으로 상승하였고 황체기 단축으로 비정상적인 배란이 발생하였고, thrombocytopenia, 자궁 내 질환, 유산과 같은 부작용이 유발되었다고 보고하였다. 따라서 PMSG는 FSH에 비해서 발정 유도에는 효율적이지만 내성 발생이나 여러 부작용이 발생하는 것으로 보인다.

Bromocriptine은 맥각 유도물(ergot derivatives)로서 개에서 다발하는 자궁 축농증과 위임신 치료제(Gobello 등, 2002; Gobello 등, 2001)로 사용되어 왔으나 치료된 개에서 발정 주기의 단축과 발정이 유도됨을 관찰하게 되면서 발정 유도제로 적용하게 되었다. Dopamine agonist인 bromocriptine과 cabergoline은 prolactin 농도를 급격히 억제하여 황체기를 종료시키고 발정휴지기를 줄여 발정을 유도한다고 보고되고 있다(Gobello, 2006; Gobello 등, 2002; Van Haaften 등, 1989). Bromocriptine과 같은 anti-prolactin 약물의 투여 방법은 사료와 함께 섞어 줄 수 있어 투여의 번거로움이나 시술견의 스트레스 없이 처방이 가능하고 가격 또한 다른 호르몬 제제에 비하여 저렴한 편이다. 그러나 부작용으로 구토 증세(Mizokawa 등, 1993; Janssens, 1986)를 일으키기도 하지만 구토 방지제를 병용 투여함으로써 예방할 수 있다. 본 연구에서는 0.3 mg/kg의 bromocriptine을 경구로 1일 1회 경구투여하였을 경우 질 점막 상피세포 도말 검사법과 progesterone 농도 검사를 병용 진단하여 77.8%의 발정 유도 효율을 보였다. Zoldag 등(2001)은 0.3 mg/마리의 bromocriptine을 3일간 경구 투여하였을 때 100%의 발정 유도율과 83%의 임신율을 보였다고 보고하였으나, Beijerink 등(2003)은 0.02 mg/kg과 0.05 mg/kg의 bromocriptine을 발정전기까지 경구 투여하였을 때 모두 100%의 발정 유도율을 보였다고 보고하여 다른 호르몬 제제에 비해 높고 안정된 발정 유도 효율을 보여주고 있다.

암개의 번식 효율을 높이기 위해서는 효과적인 발정 유도 방법을 적용하는 것뿐만 아니라 발정기를 정확하게 진단하는 것도 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 여러 호르몬 투여 방법에 의해 발정이 유도된 암개의 교배 적기를 일반적으로 이용되고 있는 질 점막 상피세포 도말 검사법과 혈중 progesterone 농도 변화로 진단하였다. 질 점막 상피세포 도말 검사법으로 진단하였을 때 FSH 투여군에 비해 GnRH + FSH 처리군과 GnRH 처리군이 유의적으로 높았으나 PMSG 처리군, GnRH + PMSG 처리군 그리고 bromocriptine 처리군이 유의적으로 높은 발정 유도율을 보였다. 질 점막 상피세포 도말 검사법은 가장 일반적인 진단 방법(Fáy 등, 2003; Post, 1985)으로 암개의 외음부 출혈 시기와 종창 정도를 동반 확인하여 정확도를 높일 수 있지만 발정기의 질 점막 상피세포가 무핵 각

화되는 변화를 관찰하고 진단하는 방법은 정확도가 비교적 낮은 편이다(Bell 등, 1973).

혈중 progesterone 농도의 변화로 발정기를 진단하기 위해서 Ovulation timing test kit인 OVUCHECK[®] Premate를 병행하여 교배 적기를 확인하였다. 이 배란 진단 키트의 원리는 발정기가 되면 혈중 estrogen 농도가 감소하고 LH peak가 일어나고 2일 후 progesterone 농도가 상승(Jeffcoate와 England, 1997)하고 배란기 농도가 5 ng/ml 이상으로 상승(Jeffcoate와 Lindsay, 1989)하는 것을 응용한 것이다. 일반적으로 호르몬 수치를 측정하여 발정 진단을 할 경우 정확도가 높지만 실험실적인 시설과 기술이 필요하여 임상에서 응용하기가 어려운 한계가 있다. 그러나 OVUCHECK[®] Premate은 진단 방법이 간편하고 단시간에 결과를 진단할 수 있어서 임상에서 적용하기에 많은 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 질 점막 상피세포 검사 결과와 배란 진단 키트 검사 결과를 비교하여 정확도를 비교해 본 결과 자연 발정견인 대조군, FSH 처리군, GnRH + FSH 처리군, 그리고 bromocriptine 처리군의 경우 일치성이 각각 60, 50, 75, 그리고 77.8%였으나 PMSG 처리군과 GnRH + PMSG 처리군의 경우 87.5%와 100%로 높은 일치성을 보였다. 또한 OVUCHECK[®] Premate를 이용한 발정 진단의 경우 PMSG를 처리시 progesterone 농도 상승이 다른 군에 비하여 지속적으로 일어남을 알 수 있으며, 반면 bromocriptine는 PMSG 처리군에 비해 다소 천천히 상승함을 알 수 있다. 따라서 anti-prolactin계 약물을 적용하였을 때 발정 유도율이 FSH과 GnRH 투여에 비해 발정 유도 효율도 높은 경향을 보이고 PMSG 투여에 비해 부작용 발생도 적으며 경구 투여로 투여 방법도 간편하며 투여량과 횟수도 소모적이지 않아 경제적인 측면에서도 가장 효과적인 방법으로 보인다. 또한 번식효율을 높이기 위하여 교배 적기의 검사는 질 점막 상피세포 도말 검사와 더불어 호르몬 검사를 병행하여 정확도를 높일 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서 개의 번식 효율을 높이기 위해 적용된 호르몬 투여 방법들은 효율성의 차이는 있지만 발정을 유도할 수 있다. PMSG 처리군의 경우 가장 효율적이었으나, 개의 경우 산업동물과 달리 지속적인 발정 유도와 산자 생산이 필요하다. 따라서 FSH 투여로 발생하는 비용 부담과 많은 노동력 소모를 줄이고 PMSG 투여로 발생할 수 있는 부작용을 최소화 할 수 있으면서 효율성도 높은 편인 anti-prolactin계 약물인 bromocriptine을 이용하는 것이 효과적인 것으로 사료된다. 교배 적기 진단은 질 점막 상피세포 도말 검사와 OVUCHECK[®] Premate로 progesterone 농도 측정 방법을 병행해서 비교적 간편하게 정확도를 높일 수 있다.

참고문헌

- Allen NE and Stockman A. 1979. Pseudopregnancy in bitch. *Vet. Record.* 104:22.
- Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Dobeli Fairburn A, Eggenberger E and Rusch P. 1989. Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hyper-oestrogenism in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39: 115-122.
- Beijerink NJ, Dieleman SJ, Kooistra HS and Okkens AC. 2003. Low doses of bromocriptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology* 60:1379-1386.
- Bell ET, Bailey JB and Christie DW. 1973. Studies on vaginal cytology during the canine oestrous cycle. *Res. Vet. Sci.* 14: 173-179.
- Bouchard G, Youngquist RS, Clark B, Concannon PW and Braun WF. 1991a. Estrus induction in the bitch using a combination diethylstilbestrol and FSH-P. *Theriogenology* 36:51-65.
- Bouchard G, Youngquist RS, Vaillancourt D, Krause GF, Guay P and Paradis M. 1991b. Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. *Theriogenology* 36:41-50.
- Christie DW and Bell ET. 1972. Studies on canine reproductive behaviour during the normal oestrous cycle. *Anim. Behav.* 20:621-631.
- Concannon PW, Temple M, Montanez A and Newton L. 2006. Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release. *Theriogenology* 66:1488-1496.
- England GC and Allen WF. 1991. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophins-induced oestrus in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 93:443-448.
- Fáy J, Mezö T, Solti L, Wölfling A and Abonyi-Tóth Z. 2003. Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch. *Acta. Vet. Hung.* 51:385-394.
- Gobello C, Castex G, Corrada Y, Klima L, de la Sota RL and Rodriguez R. 2002. Use of prostaglandins and bromocriptine mesylate for pregnancy termination in bitches. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:1017-1019.
- Gobello C, de la Sota RL and Goya RG. 2001. Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *Anim. Re-*

- prod. Sci. 66:257-267.
- Gobello C. 2006. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: a review. *Theriogenology* 66:1560-1567.
- Grundy SA, Feldman E and Davidson A. 2002. Evaluation of infertility in the bitch. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 17: 108-115.
- Inaba T, Umerhara T, Mori J, Torri R, Tamada H and Sawada T. 1996. Reversible suppression of pituitary testicular function by a sustained release formulation of GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology* 46:671-677.
- Janssens LA. 1986. Treatment of pseudopregnancy with bromocriptin, an ergot alkaloid. *Vet. Rec.* 119:172-174.
- Jeffcoate IA and England GC. 1997. Urinary LH, plasma LH and progesterone and their clinical correlates in the periovulatory period of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil.* 51: 267-275.
- Jeffcoate IA and Lindsay FE. 1989. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39:277-287.
- Johnston SD, Olson PN and Root MV. 1994. Clinical approach to infertility in the bitch. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 9:2-6.
- Jones GE, Boyns AR, Bel ET, Christie DW and Parkes MF. 1973. Immunoreactive luteinizing hormones and progesterone during pregnancy and following gonadotrophin administration in beagle bitches. *Acta. Endocrinol.* 72:573-581.
- Kutzler MA. 2005. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64:766-775.
- Kutzler MA. 2007. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology* 68:354-374.
- Mc Rae GI, Roberts BB, Worden AC, Bajka A and Vickery BH. 1985. Long term reversible suppression of estrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil.* 74:389-397.
- Mizokawa T, Akai T, Nakada Y, Yamaguchi M, Nakagawa H, Hasan S, Rettig KJ and Wachtel H. 1993. Terguride as a new anti-hyperprolactinemic agent: characterization in rats and dogs in comparison with bromocriptine. *Jpn. J. Pharmacol.* 63:269-278.
- Nakao T, Aoto Y, Fukushima S, Moriyoshi M and Kawata K. 1985. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Nippon Juigaku. Zasshi.* 47:17-24.
- Okkens AC and Kooistra HS. 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod. Domest. Anim.* 41:291-296.
- Okkens AC, Kooistra HS, Dieleman SJ and Bevers MM. 1997. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anestrus in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 51:55-58.
- Paisley LG and Fahning ML. 1977. Effects of exogenous follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in bitches. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171:181-185.
- Post K. 1985. Canine vaginal cytology during the estrus cycle. *Can. Vet. J.* 26:101-104.
- Renton JP, Munro CD, Heathcote RH and Carmichael S. 1981. Some aspects of the aetiology, diagnosis and treatment of infertility in the bitch. *J. Reprod. Fertil.* 61:289-294.
- Shille VM, Thatcher MJ and Simmons KJ. 1984. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184:1469-1473.
- Thun R, Watson P and Jackson GL. 1977. Induction of estrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins. *Am. J. Vet. Res.* 38:483-486.
- Van der Holst W and Best AP. 1976. Een beschouwing over het meest geschikte tijdstip voor de dekking van de teef. *Tijdschr. Diergeneesk.* 19:125-133.
- Van Haften B, Dieleman SJ, Okkens AC, Bevers MM and Willemse AH. 1989. Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. *J. Reprod. Fertil.* 39:330-331.
- Wanke MM, Loza ME and Rebuelto M. 2006. Progestin treatment for infertility in bitches with short interestrus interval. *Theriogenology* 66:1579-1582.
- Weilenmann R, Arnold S, Dobeli M, Rusch P and Zerobin K. 1993. Estrus induction in bitches by the administration of PMSG and HCG. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 135:236-241.
- Zoldag L, Fekete S, Csaky I and Bersenyi A. 2001. Fertile estrus induced in bitches by bromocriptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* 55:1657-1666.