

시츄견에서 질세포 검사를 이용한 발정 유기 효과의 확인

박철호, 이숙경², 김방실, 배재한, 류재선, 김상일, 이주환, 박상국², 박인철¹, 김종택¹, 서국현, 오기석, 손창호^{*}
전남대학교 수의과대학, ¹강원대학교 수의(학부)대학, ²전라남도 축산기술연구소

Confirmation of Estrus Induction using Vaginal Cytology in Shih-tzu Bitches

Chul-Ho Park, Suk-Kyung Lee², Bang-Sil Kim, Jae-Han Bae, Jae-Sun Ryu, Sang-Il Kim, Ju-Hwan Lee, Sang-Guk Park², In-Chul Park¹, Jong-Taek Kim¹, Guk-Hyun Suh, Ki-Seok Oh and Chang-Ho Son^{*}

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
¹School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 201-100, Korea
²Jeollanamdo Livestock and Veterinary Research Institute, Gwangju 506-555, Korea

ABSTRACT

To investigate the change of vaginal epithelial cell in estrus-induced Shih-tzu bitch, estrus was induced by PMSG (50 IU/kg, for 10 days) and hCG (1,000 IU, on Day 10) in 12 anestrus Shih-tzu bitches. Day-changes of vaginal epithelial cells during the whole period of hormone treatment were investigated in each experimental bitches.

The first day of vulvar bleeding and the first day of male acceptant was on 6.72±1.38 days (Mean±S.D.), and 10.44±1.63 days after the first PMSG treatment. The duration of proestrus and estrus was 4.36±1.20 days, and 7.58±1.43 days.

Characteristic features of vaginal cytology during the estrous cycle were the high proportion of large intermediate cell, superficial cell, anuclear cell and erythrocyte in proestrus, superficial cell and anuclear cell in estrus, and parabasal cell, small and large intermediate cell, and leukocyte in diestrus, respectively.

When it was timed from the first day of PMSG administration (Day 0), the cornification index (CI) was the high proportion in proestrus and estrus. The CI peak was maintained above 80% between Day 11~14 (4 days) and CI showed a peak at Day 12.

These results indicated that the 12 Shih-tzu bitches showed positive estrus induction by vaginal smear test and observation of clinical estrus sign.

(Key words : vaginal cytology, estrus induction, estrous cycle, Shih-tzu)

서론

개는 다른 동물과 달리 발정전기와 발정기가 각각 3~27일, 3~21일로 길고 다양(Concannon과 Lein, 1989)하며, 평균 7개월(5~8개월)의 긴 발정주기(Concannon과 Lein, 1989; Allen, 1992; Feldman과 Nelson, 1996; Kutzler, 2005)를 갖기 때문에, 이러한 긴 번식 기간을 인위적으로 조절하여 더 많은 번식 기회의 제공 및 불임증의 치료, 과배란 처치를 통한 많은 산자수를 얻기 위해 다양한 방법으로 인공 발정 유기를 실시하고 있다.

개의 인공 발정 유기 방법으로는 FSH, LH, PMSG, hCG, hMG, estrogen 등의 외인성 성선 자극 호르몬 투여(Shille 등, 1984; Nakao 등, 1985; 강 등, 1988; Arnold 등, 1989; England와 Allen, 1991; Weilenmann 등, 1993; 유 등, 1996; Wanke 등, 1997)와 GnRH, GnRH-agonist를 이용한 합성성선자극방출호르몬 단백질 투여(Cain 등, 1988; 1989; Concannon, 1989; Inaba 등, 1998)

및 bromocriptine, cabergoline 등의 dopamine agonist 투여(Kusuma와 Tainturier, 1993; Onclin 등, 1993; Verstegen 등, 1999; Rota 등, 2003) 등의 방법이 제시되었으며, 이러한 투여 약물의 투여 방법과 용량에 따라 다양한 결과들이 보고되었다. 인공 발정 유기의 성적은 다양하게 보고되고 있으며, Feldman과 Nelson(1996)은 호르몬제의 선택시 고려사항으로 유효성, 품질성, 일관성, 신뢰성을 중요시 하였으며, 이를 토대로 발정 유기 성적을 발정 발현율, 배란율, 분만을 등을 기준하여 볼 때 PMSG와 hCG 병용 투여에 의한 보고가 다른 방법에 비해 높은 성적을 나타내었으며, 임상적 적용 가능성이 높은 것으로 보고되었다(Shille 등, 1984; Arnold 등, 1989; England와 Allen, 1991; Concannon 등, 1992; Feldman과 Nelson, 1996).

위와 같은 방법에 따른 인공 발정 유기견에서의 발정주기 일수는 보고자에 따라 다소 차이가 있지만 대부분 자연 발정 견에 비하여 발정전기의 기간은 짧고, 발정기의 기간은 긴 양

* Correspondence : E-mail : chson@chonnam.ac.kr

상을 보인다고 보고되었다(Nakao 등, 1985; 강 등, 1988; 유 등, 1996). 따라서 인공발정 유기시 발정 증상의 관찰 및 정확한 발정 시기와 배란시기를 판정하는 것이 매우 중요하며, 혈장 번식 호르몬의 농도 측정은 교배적기 및 배란시기 판정의 가장 정확한 방법이라고 하였으나, 이러한 호르몬 농도를 측정하기 위해서는 고가의 장비와 특수한 시설이 필요하며, 1일 2회 이상 채혈해야 하는 번거로움이 있어 실제 임상에 응용함에 한계성이 있다(Wright, 1990; 1991; Bouchard 등, 1991; Okkens 등, 1993)고 보고되고 있다.

질상피세포는 발정기 때 증가하는 estrogens의 영향을 받아 각화 및 박리가 일어나게 되며(Wildt 등, 1978) 이러한 각 발정주기별 질세포의 출현율에 차이가 있기 때문에 발정주기 및 교배적기 판정에 이용될 수 있다(Post, 1985; 강 등, 1988; Wright, 1990; 손 등, 1997; 김 등, 2000)고 하였다. 또한 질세포검사에 의한 세포지수, 즉 eosinophilic index(EI), cornification index(CI), superficial cell index(SCI) 및 Karyopycnotic index(KPI)에 대한 임상적 응용성이 보고되고 있다(Christiansen, 1984; Mestre 등, 1990; Wright, 1990; 1991). 그리고 질세포 검사는 비정상적인 발정증상 및 발정주기를 보이는 개에서의 교배적기 판정에 응용되며(Fayrer-Hosken 등, 1994), 분만일의 예시(Guyant, 1988), 생식기 질환의 진단(Olson 등, 1984; Feldman과 Nelson, 1987)에 응용될 수 있다고 하였다.

자연 발정건에서 발정주기별 질상피세포의 변화상은 발정전기 전반부에는 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, 적혈구, 백혈구, 발정전기 중반부에는 large intermediate cell과 superficial cell 그리고 발정전기 후반부에는 superficial cell과 anuclear cell이 주종을 이루며, 발정기에는 anuclear cell, 발정휴지기에는 백혈구 그리고 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate cell이 주로 출현한다고 Feldman과 Nelson(1996)은 보고하였으며, 인공적 발정 유기건에서는 약물 투여 일수가 증가함에 따라 parabasal cell과 small intermediate cell은 감소한 반면 superficial cell과 anuclear cell은 증가한다고 하였다.

이상과 같이 개에서의 인공 발정 유기에 관한 방법 및 보고는 많으나, 특정 품종을 대상으로 한 인공 발정 유기건에서의 질상피세포의 변화상에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 무발정기 소형 애완견을 대상으로 인공적 발정 유기 후 임상적 발정 증상의 관찰과 질상피세포 검사를 실시하여, 인공 발정 유기된 소형 애완견에서 발정주기의 판정과 교배적기를 검토하여 실제 임상에 응용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 대상 동물

무발정기 시츄견 12두를 대상으로 하였으며, 연령은 평균

3.7세(범위 : 3~5세), 체중은 평균 4.6 kg(4.0~5.0 kg)이었다. 모든 실험건은 실험 개시 전 구충 및 예방 접종을 실시하여 1두씩 격리 사육하였다.

2. 인공 발정 유기 방법

인공 발정 유기 방법은 Chaffaux 등(1984)과 강 등(1988)의 방법을 응용하여 PMSG 50 IU/kg를 매일 10일 동안 근육주사 후 마지막 10일째에 hCG 1,000 IU를 정맥주사하였다. PMSG 첫 투여일을 실험 개시일(Day 0)로 하였다.

발정 유기에 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

3. 발정 출혈 확인

실험 개시(PMSG 첫 투여일) 2주 전부터 매일 발정 출혈 및 외음부 종대 여부 등의 임상적 발정 증상을 관찰하였으며, 발정 출혈 개시일부터 발정이 종료될 때까지는 매일 2회 출혈 색, 출혈량 및 점도와 수컷 허용 여부를 관찰하였다. 최초 수컷 허용 후 1~2일에는 동종의 수컷과 2일 간격으로 2~3회 자연교배를 실시하였다.

4. 발정주기 구분

임상적 증상의 관찰에 의한 발정주기의 구분은 Concannon과 Lein(1989) 및 Guyant(1988)의 기술에 준하여 실시하였다. 발정전기는 발정 출혈 개시일부터 최초 수컷 허용 전날까지, 발정기는 최초 수컷 허용일부터 최후 수컷 허용일까지, 발정 휴지기는 최후 수컷 허용 다음날부터 분만일까지로 구분하였다.

5. 배란일 판정

1) 채혈

실험 개시 1주 전부터 최초 수컷 허용 후 20일까지 매일 아침 요골쪽 피부 정맥에서 채혈하였다. 채혈 후 EDTA병에 채취한 혈액은 4℃에서 3,000 g로 10분 동안 원심분리하여 혈장을 분리한 후 혈장 progesterone 농도를 측정할 때까지 -20℃에 냉동 보관하였다.

2) 혈장 Progesterone 농도 측정

혈장 progesterone 농도 측정은 김 등(2000)의 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 µl 씩 분주한 다음 ¹²⁵I-progesterone 1 ml를 각각 넣어 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 결합하지 않은 부분을 상층액만 분리한 다음 Gamma counter로 측정하였다.

3) 혈장 Progesterone 농도에 의한 배란일 판정

Wallace 등(1992)과 김 등(2000)의 기술에 준하여 발정 출혈 후 혈장 progesterone 농도가 최초로 4.0 ng/ml 이상으로 증가한 날을 배란일로 판정하였다.

6. 질상피세포 검사

1) 질상피세포의 채취 및 도말

Guyant(1988) 및 김 등(2000)의 방법에 준하여 멸균된 면봉에 생리식염수를 묻힌 후 질내에 삽입하여 질 전정에서 질분 비물을 채취한 후 2장의 슬라이드에 직접 도말하였다. 슬라이드는 자연건조시킨 후 각 유형의 질상피세포 비율과 cornification index(CI)를 산출하기 위해 Wright's 염색을 실시하였다. 질상피세포 검사는 실험 개시 2주 전부터 분만일까지 매일 실시하였다.

2) 질상피세포의 검경

(1) 질상피세포의 구분

Schutte(1967b)의 기술에 준하여 각 슬라이드에 5개 이상의 시야에서 200개의 질상피세포를 검경한 후 세포질의 각화 유무 및 세포핵의 형태에 따라 5가지 세포, 즉 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell 그리고 anuclear cell로 분류하였으며, Bell과 Christie(1971)의 기술에 준하여 슬라이드상의 적혈구와 백혈구 출현 정도를 0부터 5까지 6등급으로 분류하였다.

(2) Cornification Index(CI)의 산출

Schutte(1967c)와 Post(1985)의 기술에 준하여 각화된 세포의 비율을 백분율로 환산하여 CI를 산출하였다. CI의 산출 공식은 다음과 같다.

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

7. 통계 처리

각 발정주기의 길이와 발정주기의 간격은 평균±표준편차 (Mean±S.D.), 각 주기별 질상피세포의 비율 및 혈장 progesterone 농도는 평균±표준오차(Mean±S.E.M.)로 산출하였다. 그

리고 발정주기별 각 질상피세포의 비교는 SAS(statistical analysis system)의 GLM(general linear model)을 이용하여 유의성을 검토하였다.

결 과

1. 발정주기

PMSG와 hCG 병용 투여에 의해 인공 발정 유기된 무발정기 시추견 12두에서 발정 출혈, 회음부 반사, 음순종대와 같은 임상적 발정 증상이 관찰되었으며, 발정전기 개시를 나타내는 발정 출혈은 실험 개시일 즉 PMSG 첫 투여일을 기준으로 Day 6.72±1.38(Mean±S.D.)로 나타났고, 발정기 개시를 나타내는 최초 수컷 허용일은 Day 10.44±1.63으로 나타났다. 발정전기와 발정기의 길이는 각각 4.36±1.20일(Mean±S.D., 범위 : 2~5일), 7.58±1.43일(범위: 5~10일)로 나타났다(Table 1).

2. 질상피세포의 변화상

무발정기 시추견에서 PMSG와 hCG 투여 전(무발정기)과 투여 후(발정전기, 발정기)의 임신전과 비임신전의 질상피세포의 변화상은 Table 2, Table 3과 같다.

1) 임신전에서 질상피세포의 변화상

인공 발정 유기된 시추견 중 임신된 8두의 질상피세포의 변화상은 Table 2에 보는 바와 같이 약물 투여 전에는 parabasal cell 54.60±2.20%(Mean±S.E.M.), small intermediate cell 29.22±2.58%로 다른 질상피세포에 비해 상대적으로 높은 비

Table 1. Clinical responses of 12 Shih-tzu bitches treated with PMSG and hCG

	Parameter	Day (s)*	Range
Initiation (Day)	Proestrus	6.72±1.38	5~9
	Estrus	10.44±1.63	10~12
	CI ≥ 80%	9.72±0.17	9~11
	CI peak	12.26±0.21	11~13
	Progesterone ≥ 4.0 ng/ml	11.73±1.25	10~14
Duration (Days)	Proestrus	4.36±1.20	2~5
	Estrus	7.58±1.43	5~10
	CI ≥ 80%	6.80±0.82	3~11
	CI ≥ 90%	2.85±0.52	1~5

Day 0 is the first day of treatment with PMSG.

*Parenthesis indicate Mean±S.D.

CI=cornification index.

Table 2. The percentages (Mean±S.E.M.) of vaginal cells and cornification index (CI), and grades of blood cells in vaginal smears of 8 pregnant bitches before and after treated with PMSG and hCG

Cell type	Vaginal smear		
	Before treatment	After treatment	
		Proestrus	Estrus
Parabasal	54.60±2.20	6.92±2.40*	0.33±0.20*
Small intermediate	29.22±2.58	19.38±3.62*	2.68±0.72*
Large intermediate	14.10±2.50	28.56±3.60	11.20±1.10
Superficial	0.40±0.19	28.02±3.62*	38.85±1.62*
Anuclear	0.39±0.36	16.58±6.20*	48.25±1.96*
Erythrocyte	0.24±0.04	1.79±0.46	0.25±0.06
Leukocyte	0.82±0.25	0.32±0.15	0.18±0.09
CI	0.80±0.50	25.54±7.60*	87.10±1.68*

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

Table 3. The percentages (Mean±S.E.M.) of vaginal cells and cornification index (CI), and grades of blood cells in vaginal smears of 4 non-pregnant bitches before and after treated with PMSG and hCG

Cell type	Vaginal smear		
	Before treatment	After treatment	
		Proestrus	Estrus
Parabasal	57.66±3.26	10.15±9.26*	3.46±2.82*
Small intermediate	22.20±1.01	14.26±5.52*	7.49±2.02*
Large intermediate	18.12±1.40	29.60±1.50	13.15±1.32
Superficial	0.72±0.44	35.02±9.25*	36.02±6.54*
Anuclear	0.68±0.52	12.16±4.36*	41.08±5.98*
Erythrocyte	0.26±0.05	2.00±0.38	0.18±0.15
Leukocyte	0.72±0.07	0.68±0.40	0.04±0.02
CI	1.12±0.69	46.67±15.26*	76.18±3.48*

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

을 차지하였다. 이후 PMSG와 hCG 투여 후인 발정전기에는 large intermediate cell 28.56±3.60%, superficial cell이 28.02±3.62%로 증가하였으며, 발정기에는 superficial cell과 anuclear

cell이 각각 38.85±1.62%, 48.25±1.96%로 가장 많은 비율을 차지하였다. 한편, CI는 무발정기에는 0.80±0.50%를 나타내었으며, 이후 발정전기에는 25.54±7.60%, 발정기에는 87.10±1.68%로 증가하였다. 발정전기의 적혈구의 출현율은 1.79±0.46%로 무발정기에 비해 높게 나타났다.

2) 비임신견에서 질상피세포의 변화상

비임신견에서의 질상피세포의 변화상은 Table 3에 보는 바와 같이 약물 투여전인 무발정기에는 parabasal cell과 small intermediate이 각각 57.66±3.26%, 22.20±1.01%로 다른 세포들에 비해 높은 비율을 나타내었으며, 이후 발정전기에는 superficial cell과 large intermediate cell이 각각 35.02±9.25%, 29.60±1.50%, 발정기에는 anuclear cell과 superficial cell이 41.08±5.98%, 36.02±6.54%를 나타내어 다른 세포에 비해 높은 비율을 보였으며, 임신견의 수치에 비해 낮게 나타났다. 발정기에 CI 값은 76.18±3.48%로 임신견에 비해 현저하게 낮게 나타났으며, 적혈구는 발정전기와 발정기에 각각 2.0±0.38, 0.18±0.15를 나타내어 임신견과의 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

3. 약물 투여 일수에 따른 질상피세포의 변화상과 Cornification Index(CI)

1) PMSG 첫 투여일을 기준으로 한 발정 기간 동안의 질상피세포의 변화

실험 개시일을 기준으로 약물 투여 일수에 따른 질상피세포의 변화상을 살펴보면 Fig. 1과 같다.

약물 투여 일자간 질상피세포의 변화상을 살펴보면, parabasal cell은 약물 투여 일수가 경과됨에 따라 점진적인 감소를 보이다가 PMSG 첫 투여일을 기준으로 Day 2~4에 급격한 감소를 보였다. Small intermediate cell은 Day 8까지 일정한 수준을 유지하다가 Day 9부터 급격한 감소를 보였고, Day 14부터 점진적으로 증가하였다. Large intermediate cell은 Day 2부터 증가하다가 Day 9부터 감소를 나타내었고, Day 17부터 다시 증가하였다. Superficial cell과 anuclear cell의 경우는 각각 Day 3과 8부터 증가를 보이다가 anuclear cell은 Day 14~16부터, superficial cell은 이보다 늦은 Day 22부터 다시 감소하였다. 최종 투여 호르몬인 hCG의 영향으로 배란시기 및 발정기 전반부의 기간에 속하는 Day 11~13에서는 superficial cell과 anuclear cell이 각각 37.26±0.16%, 52.66±1.02%로 최고치를 이루었으며, 이에 따라 CI는 89.92±1.04%로 최고치를 나타냈다.

한편, 혈구세포 중 적혈구 출현율은 발정전기의 기간의 범위에 속하는 Day 5~7에서 2.25±0.26%로 가장 높았으며, 이후 발정기에 속하는 Day 11~13에는 0.26±0.16%, Day 14~16에는 0.03±0.04%를 나타내 점차 감소하였다.

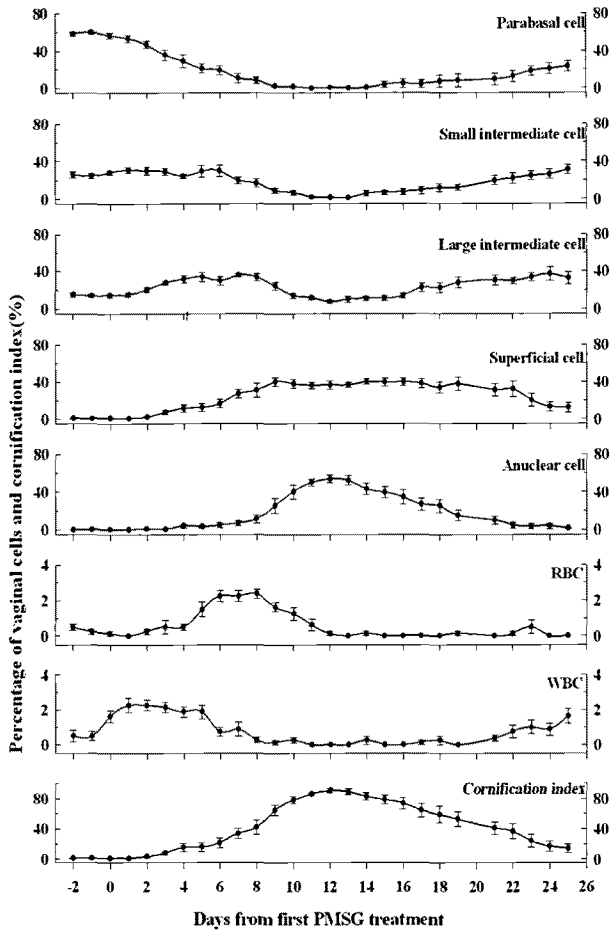


Fig. 1. Profiles (Mean±S.E.M.) of cell type on vaginal cytology from Day -2 to Day 25 in 12 bitches. Day 0 is the first day of PMSG treatment

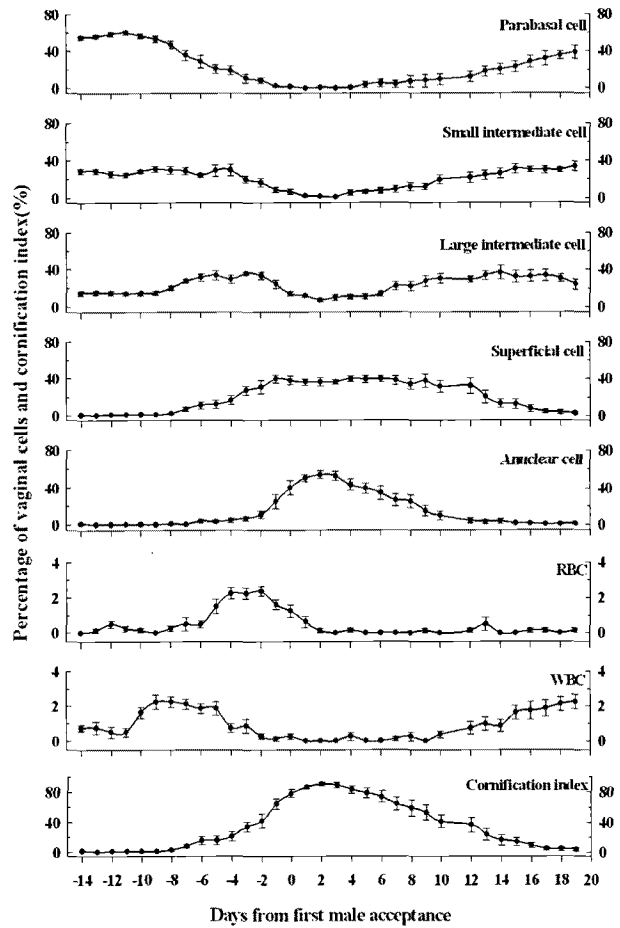


Fig. 2. Profiles (Mean±S.E.M.) of cell type on vaginal cytology from Day -14 to Day 19 in 12 bitches. Day 0 is the first day of male acceptance.

2) 첫 수컷 허용일을 기준으로 한 발정기간 동안의 질상피세포의 변화

첫 수컷 허용일을 기준으로 한 일자간 질상피세포의 변화상을 살펴보면 Fig. 2와 같다.

첫 수컷 허용일을 기준으로 발정전기에 속하는 Day -7~-5까지의 질상피세포의 변화상은 parabasal cell과 small intermediate cell이 각각 40.07±7.96%, 31.76±2.52%로 높은 비율을 차지하였다. 이후 수컷 허용 하루 전후인 Day -1~1에는 superficial cell과 anuclear cell이 각각 34.54±2.53, 30.26±4.23으로 대부분을 차지하였으며, parabasal cell과 small intermediate cell은 3.60±2.04, 10.02±2.01로 감소하였다. 이후 약물 투여 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, 발정기 후반부인 Day 8 이후의 질상피세포의 일자간 변화상에서는 발정전기에서 발정기 초반의 변화상과는 반대로 parabasal cell과 small intermediate cell은 다시 증가하고, superficial cell과 anuclear cell은 감소하였다.

3) 발정주기중 Cornification Index(CI)

PMSG 첫 투여일을 기준으로 하였을 때 CI값이 80% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 11부터 Day 14까지 4일 동안이었으며, CI값이 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 12로 최고치인 91.43±2.25%를 나타내었다. 이후 CI값은 점진적으로 감소를 한 후, Day 21에 42.05±3.32%, Day 24에 15.80±6.54%로 급격히 감소하였다. 또한 최초 수컷 허용일을 기준으로 하여 CI값을 살펴보면, 80% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 1부터 Day 4까지 4일 동안이었으며, 90% 이상의 값을 나타낸 날은 Day 2로 투여일 기준일 때와 마찬가지로 91.43±2.25%로 최고치를 나타냈다.

고 찰

인공 발정 유기전에서의 발정전기와 발정기의 개시일자 및 기간은 보고자(Archbald 등, 1980; Chaffaux 등, 1984; Nakao 등, 1985; 강 등, 1988)에 따라 차이는 있으나, 이 등(2002)과 강 등(1988)에서 각각 무발정기에 속하는 진도개 13두와 진도개 및 재래종견 15두를 대상으로 PMSG 500 IU를 매일 10일 동안 근육주사 후 마지막 10일째에 hCG 500 IU를 정맥주사하여 발정전기와 발정기의 개시일이 PMSG 첫 투여일로부터 각각 2.9 ± 1.4 일, 11.5 ± 1.7 일과 5.5 ± 0.6 , 12.9 ± 0.6 일로 보고된 바 있다. 본 실험에서는 발정전기와 발정기의 개시일이 6.72 ± 1.38 (Mean \pm S.D.)일, 10.44 ± 1.63 일로 나타나 위의 보고와 유사한 결과를 나타냈다. 또한 정(2004)의 보고에서 무발정기의 소형 애완견 24두를 대상으로 PMSG(50 IU/kg, IM)를 10일간 투여하고, hCG(1000 IU, IV)를 마지막 10일째에 투여하여 발정전기와 발정기의 개시일이 PMSG 첫 투여일로부터 각각 4.63 ± 1.67 일, 9.06 ± 1.84 일로 보고된 것과 비교하여 봤을 때에도 유사한 결과를 나타내어, 실험견의 크기는 결과에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 한편, 김 등(2000)과 손 등(1997)은 각각 36두, 13두의 자연 발정 진도개를 대상으로 한 실험에서의 발정주기 중 발정전기와 발정기가 각각 9.1 ± 2.9 일, 10.1 ± 2.4 일과 9.2 ± 1.4 일, 11.3 ± 2.4 일로 보고된 것에 비추어볼 때, 인공 발정 유기전의 발정전기가 자연 발정견보다 유의성 있게 짧은 이유는 PMSG로 인한 난포 발육 촉진과 최종 투여 호르몬인 hCG의 영향으로 급속한 발정기로의 전환 및 배란이 일어났기 때문인 것으로 사료된다. PMSG와 hCG 병용 투여에 의한 인공 발정 유기의 성적은 실험 대상군과 약물의 용량 및 사용 방법에 따라 각각의 보고(Chaffaux 등, 1984; Nakao 등, 1985; Arnold 등, 1989; England와 Allen, 1991)에 있어 차이는 있지만, 유 등(1996)과 강 등(1988)의 보고와 같이 본 실험에서도 인공 발정 유기된 시츄견 12두에서 음순종대, 발정 출혈, 회음부 반사, 수컷 허용 등의 임상적 발정 증상 및 질상피세포검사를 통한 발정 증상이 나타났다.

개에서 발정주기 중 질세포상의 변화에 대한 보고로서 Schutte(1967a, b)는 modified Shorr's trichrome 염색을 실시하여 세포질의 각화 유무 및 세포핵의 형태에 따라 5가지 세포, 즉 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell, superficial cell 그리고 anuclear cell로 분류하였고, 발정전기에는 large intermediate cell, superficial cell 및 적혈구, 발정기에는 superficial cell, anuclear cell 그리고 발정휴지기에는 parabasal cell, small intermediate cell 및 백혈구가 주종을 이루었다고 보고하였다. Feldman과 Nelson(1996)은 발정전기를 더욱 세분하여 발정전기 전반부에는 적혈구, parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell 및 백혈구, 발정전기 중반부에는 large intermediate cell, superficial cell이, 그

리고 발정전기 후반부에는 superficial cell, anuclear cell이 주종을 이루며, 발정기에는 anuclear cell, 발정휴지기에는 백혈구 그리고 무발정기에는 parabasal cell, small intermediate cell이 주로 출현한다고 하였다. 본 연구에서도 발정주기별 질세포들의 출현 패턴은 위의 보고들과 동일한 양상을 보였지만, 발정전기와 발정기 때 superficial cell과 anuclear cell의 출현율은 상대적으로 낮았다. 위와 같이 인공 발정 유기견과 자연발정견에서 발정전기와 발정기의 기간에 나타나는 질상피세포의 분포율에 있어 차이를 나타내는 이유로는 투여된 호르몬의 영향으로 인공 발정 유기견에서는 일정한 발정주기 동안의 각각의 질상피세포의 변화율이 급격한 증가와 감소를 나타낸 반면, 자연발정견에서는 완만한 증가와 감소를 보이기 때문인 것으로 사료되어진다.

약물 투여 일수에 따른 질상피세포의 변화상을 살펴보면 호르몬 투여 일수가 경과함에 따라 parabasal cell, small intermediate cell은 Day 2~4에 $36.15 \pm 5.20\%$, $28.49 \pm 1.65\%$, Day 8~10에 $3.78 \pm 2.04\%$, $11.62 \pm 3.05\%$ 를 나타내어 점진적으로 감소한 반면 superficial cell, anuclear cell은 Day 2~4에 $6.77 \pm 2.53\%$, $1.75 \pm 1.03\%$, Day 8~10에 $35.20 \pm 1.71\%$, $26.40 \pm 7.51\%$ 를 나타내어 발정전기와 발정기에 superficial cell 비율이 증가되어 이전의 보고와 서로 일치하는 결과를 나타내었다(Cain 등, 1988; 강 등, 1988; England와 Allen, 1991; 유 등, 1996).

최초 수컷 허용일을 기준으로 한 발정 기간 동안의 질상피세포상과 CI의 변화는 parabasal cell과 small intermediate cell은 발정전기 중반부터 감소하여 발정기에는 거의 관찰되지 않았으나, 발정기 후반부터 증가하기 시작하였고, large intermediate cell은 발정전기 초기에 증가하다가 발정기에는 낮게 나타났으며, superficial cell은 발정기중 35~40%로 높게 나타났으며, anuclear cell은 발정전기와 발정기에 뚜렷하게 증가된 후 발정휴지기에는 다시 감소하였다. 적혈구는 발정전기에 다소 높게 지속되다가, 발정휴지기 개시일 이후에 감소하였으며, 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 후반부터 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 Schutte(1967b), Feldman과 Nelson(1996)의 결과와 일치하였다. 또한 유 등(1996)에서 인공 발정 유기견의 질상피세포는 호르몬 처리 과정 중 현저한 각화 진행 정도의 차이를 보인다는 결과와도 일치하였다. 따라서 인공 발정 유기견의 발정주기 동안 질상피세포 각각의 출현율은 자연발정견과의 뚜렷한 차이는 보이지 않지만, 호르몬 처리 과정과 유기된 발정주기 간격의 차이에 따른 현저한 각화진행 정도의 차이가 있음이 확인되었다.

질세포검사는 임상적으로 정상 번식 관리(Wright, 1990; Feldman과 Nelson, 1996), 교배적기 판정 및 배란시기의 판정(Ca-

tharina와 Inger, 1984), 임신일수의 평가 및 분만일의 예시 (Holst와 Phemister, 1974; Guyant, 1988), 생식기 질환의 진단 (Olson 등, 1984; Feldman과 Nelson, 1987)에 이용될 수 있다고 보고되고 있다. 또한 교배적기는 superficial cell과 anuclear cell이 100%를 차지할 때(Christianen, 1984; Guyant, 1988)라고 하였으며, 진도개에서 교배적기는 CI가 80%인 시기(손 등, 1997), CI가 90% 이상인 시기(김 등, 2000)라고 하였다. 배란시기는 CI가 80% 이상인 날로부터 6.9일 후(Christianen, 1984)라고 하였으며, CI가 최고치를 나타낸 날(손 등, 1997), CI peak 후 1일째(김 등, 2000)라고 하였다.

자연 발정 진도개에서 김 등(2000)은 CI가 최초 수컷 허용 일로부터 Day -4부터 Day 4까지 9일 동안 80% 이상을 나타냈고, Day -2부터 Day 2까지 5일 동안 90% 이상의 값을 나타내었으며, Day 0에 CI는 최고치를 나타내었다고 보고하였다. 본 실험에서는 CI가 최초 수컷 허용일을 기준으로 하여 Day 1부터 Day 4까지 4일 동안 80% 이상을 나타내었고, Day 2에는 91.43±2.25%로 CI peak가 나타나 CI의 임상적 응용 범위인 80% 이상의 값을 나타낸 일수의 범위가 자연발정견에 비하여 유의성 있게 짧았으나 교배적기의 판정에는 응용할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 무발정기 시츄견 12두를 대상으로 PMSG와 hCG를 병용 투여 후 임상적 발정 증상 관찰과 질상피세포 검사를 실시한 결과, 12두에서 인공 발정 유기가 인정되었다. 또한 인공 발정 유기된 시츄견에서 질상피세포 검사를 실시하여 CI가 80% 이상을 나타내는 날을 기준으로 임상적 배란시기 및 교배적기 판정에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

정상 발정주기를 갖는 무발정기의 시츄견 12두를 대상으로 PMSG(50 IU/kg, IM)를 10일간 투여하고, hCG(1,000 IU, IV)를 마지막 10일째에 투여하여 인공적으로 발정을 유기하였다. 모든 실험 기간 동안 매일 질상피세포 검사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험견 12두에서 음순종대, 회음부 반사 등의 임상적 발정 증상이 인정되었다. 발정이 유기된 실험견 12두에서 발정 출혈 개시일은 PMSG 투여 후 6.72±1.38일(Mean±S.D.), 최초 수컷 허용일은 10.44±1.63일이었으며, 발정전기와 발정기의 기간은 각각 4.36±1.20일, 7.58±1.43일이었다.

발정전기, 발정기, 발정휴지기 동안의 질상피세포의 변화를 보면, 발정전기에는 large intermediate cell, superficial cell과 RBC, 발정기에는 superficial cell과 anuclear cell, 발정휴지기에는 parabasal cell, small intermediate cell, large intermediate cell 및 WBC가 주종을 이루었다.

PMSG 첫 투여일을 기준(Day 0)으로 한 cornification index (CI)는 발정전기와 발정기에 유의성있게 높게 나타났으며, CI가 80% 이상으로 지속된 기간은 Day 11~14까지 4일 동안이었고, CI가 90% 이상으로 지속된 기간은 PMSG 투여일 기준 Day 12로 91.43±2.25%로 최고치를 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 PMSG와 hCG 병용 투여에 의한 시츄견의 인공 발정 유기에 있어 임상적 발정 증상의 관찰과 질상피세포 검사 결과, 실험견 12두에서 인공적으로 발정이 유기되었음이 확인되었다.

참고문헌

- Allen WE. 1992. Physiology of the oestrous cycle. In: Fertility and Obstetrics in the Dog, 1st ed., BlackWell Scientific Publications, Cambridge, pp. 90-113.
- Archbald LF, Baker BA, Clooney LL and Godke RA. 1980. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 75:228-238.
- 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 hyperoestrogenism in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 39:115-122.
- Bell ET and Christie DW. 1971. Erythrocytes and leukocytes in the vaginal smears of the beagle bitch. *Vet. Rec.* 88:546-549.
- Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist RS and Bierschwal CJ. 1991. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and ELISA for progesterone. *Theriogenology* 35:603-611.
- Cain JL, Cain GR, Feldmen EC, Lasley BL and Stabenfelt GH. 1988. Use of pulsatil intravenous administration of gonadotrophin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am. J. Vet. Res.* 49:1993-1996.
- Cain JL, Lasley BL, Cain GR, Feldman EC and Stabenfeldt GH. 1989. Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 39:143-147.
- Catharina L and Inger K. 1984. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J. Small. Anim. Pract.* 25:77-82.
- Chaffaux S, Locci D, Pontois M, Deletang F and Thibier M. 1984. Induction of ovarian activity in anoestrous beagle

- bitches. *Br. Vet. J.* 140:191-195.
- Christiansen IJ. 1984. Breeding and mating. In: *Reproduction in the Dog and Cat*, 1st ed., Bailliere Tindall, London, pp. 41-54.
- Concannon PW and Lein DH. 1989. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. In: *Current Veterinary Therapy*, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1269-1282.
- Concannon PW, Kirk RW and Bonagura JD. 1992. Methods for rapid induction of fertile estrus in dogs. In: *Current Veterinary Therapy XI*. Philadelphia: WB Saunders Co, 960.
- Concannon PW. 1989. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* 39:149-160.
- England GC and Allen WE. 1991. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 93:443-448.
- Fayrer-Hosken R, Caudle A, Downs M and Miller-Liebl D. 1994. Evaluating the infertile breeding bitch. *Vet. Med.* 1026-1038.
- Feldman EC and Nelson RW. 1987. Canine female reproduction. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 465-466.
- Feldman EC and Nelson RW. 1996. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 752-774.
- Guyant L. 1988. Canine vaginal cytology. *Veterinary Technician* 9:513-520.
- Holst PA and Phemister RD. 1974. Onset of diestrus in the beagle bitch: Definition and significance. *Am. J. Vet. Res.* 35:401-406.
- Inaba T, Tani H, Gonda M, Nakagawa A, Ohmura M, Mori J, Torii R, Tamada H and Sawada T. 1998. Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology* 49: 975-982.
- Kusuma PS and Tainturier D. 1993. Comparison of induction of oestrus in dogs using metergoline, metergoline plus human chorionic gonadotrophin, or pregnant mares' serum gonadotrophin. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* 47:363-370.
- Kutzler MA. 2005. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64:766-775.
- Mestre J, Wanke M and Sucheys S. 1990. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. *J. Small. Anim. Pract.* 31:568-570.
- 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, Hekerman TWM, De Vogel JWA and van Haaf ten B. 1993. Influence of litter size and breed on variation in length of gestation in the dog. *Vet. Quart.* 13:160-161.
- Olson PN, Thrall MA, Wykes PW and Nett TM. 1984. Vaginal cytology. Part II. Its use in diagnosing canine reproductive disorders. *Compend Contin. Educ. Pract. Vet.* 6: 385-390.
- Onclin K, Silva LD, Donnay I and Versteegen JP. 1993. Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* 47: 403-409.
- Post K. 1985. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can. Vet. J.* 26:101-104.
- Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G and Vincenti L. 2003. Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrus induction in the bitch. *Reprod. Dom. Anim.* 38:440-443.
- Schutte AP. 1967a. Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. *J. Small. Anim. Pract.* 8:301-306.
- Schutte AP. 1967b. Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *J. Small. Anim. Pract.* 8:307-311.
- Schutte AP. 1967c. Canine vaginal cytology. III. Compilation and evaluation of cellular indices. *J. Small. Anim. Pract.* 8: 313-317.
- 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.
- Versteegen JP, Onclin K, Silva LD and Concannon PW. 1999. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 51: 597-611.
- Wallace SS, Mahaffey MB, Miller DM, Thompson FN and Chakraborty PK. 1992. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during follicular and luteal phases of the estrous. *Am. J. Vet. Res.* 53:209-215.
- Wanke M, Farina J, Loza M, Reuelto M and Concannon P. 1997. Induction of oestrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology* 47:935-42.
- 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.
- Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB and Seager SWJ. 1978. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone, and time of ovulation in the bitch. Bio. Reprod. 18:561-570.
- Wright PJ. 1990. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. J. Small. Anim. Pract. 31:335-340.
- Wright PJ. 1991. Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. Aust. Vet. J. 68:10-13.
- 강병규, 최한선, 나진수, 손창호, 오기석, 이차범. 1988. 인공적 발정 유기견의 질세포상에 관한 연구. 대한수의학회지 28: 203-211.
- 김정훈, 정경아, 강현구, 오기석, 박인철, 박상국, 한호재, 손창호. 2000. 진돗개에서 발정주기 동안 질세포상과 번식호르몬의 관계. 한국임상수의학회지 17:225-233.
- 손창호, 백인석, 신창록, 최한선, 강병규. 1997. 진돗개에서 발정주기, 교배적기 및 배란시기 판정을 위한 질세포검사의 이용성. 한국임상수의학회지 13:114-122.
- 유일정, 김용준, 지동범. 1996. 인공 발정유도견에서 질상피세포의 변화. 한국임상수의학회지 13:30-37.
- 이주환, 김나리, 박인철, 오기석, 김세라, 박상국, 문진산, 배춘식, 김성호, 김영홍, 손창호. 2002. PMSG와 hCG 병용투여에 의해 인공 발정 유기된 진돗개에서 질상피세포의 변화상. 한국임상수의학회지 19:418-425.
- 정학섭. 2004. PMSG와 hCG 병용투여에 의한 소형 애완견에서의 인공 발정 유기. 전남대학교 대학원 석사학위 논문 pp. 1-25.

(접수: 2010. 2. 6 / 심사: 2010. 2. 19 / 채택: 2010. 3. 2)