

개 발정주기가 미성숙난자의 핵발달에 미치는 영향

최정림 · 조성균 · 공일근*

순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

Effect of Estrus Cycle on the Nuclear Development of Preantral Follicle Oocytes in Canine

Choi, J. L., S. G. Cho and I. K. Kong*

Department of Animal Science, Suncheon National University

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the nuclear development of preantral follicle oocytes in dog following collecting from different estrus ovaries and oocyte diameter. To do this, ovaries were collected from Suncheon livestock station by ovarioectomy and then transported to laboratory in 30°C saline within 2 h. All of the ovaries were washed three times with saline supplemented with 100 IU Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin and then sliced with blade in 100 mm dish. All of the oocytes collected were classified the oocyte size such as over 110 µm or under 110 µm and the estrus status. To induce the nuclear development, oocytes were cultured in TCM199 or α-MEM supplemented with 10% FCS, 0.1 mg/ml sodium pyruvate, 100 ng/ml FSH, 100 ng/ml EGF, 1% ITS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin at 38.5°C, 5% CO₂ incubator for 72 h. After culture, all of the oocytes were stained in 1% orcein following fixed in 45% Acetic acid for 48 h. The oocyte recovery rates of over 110 µm from estrus ovary (63.6%) were significantly higher rather than that in anestrus status (51.5%). Oocyte recovery rate per ovary of over 110 µm in estrus status ovary (22.6/63.8%) was also significantly higher rather than that in anestrus status ovary (8.2/51.6%). Nuclear development to MI of over 110 µm in estrus ovary (24.3%) was significantly higher rather than those in under 110 µm or over and under 110 µm in anestrus (2.5, 6.8 and 0.0%), respectively ($P < 0.05$). Nuclear development to AT and MII of over 110 µm in estrus was more developed in other groups. Nuclear development to MI in TCM199 (21.8%) was significantly higher than in α-MEM (10.0%). Altho µgh the development rate to AT was significantly different between TCM199 (7.3%) and α-MEM (1.1%), but to MII was not different between TCM199 (0.9%) and α-MEM (1.1%).

The results indicated that over 110 µm oocytes was could be recovery from estrus status ovary, bigger oocytes were more developed to MI, AT or MII in TCM199.

(Key words: Dog, Oocyte, Nuclear development, *In vitro* maturation)

† Correspondence author: ikong@sunchon.ac.kr Fax: 061-750-3236

I. 서론

최근 개 미성숙난자의 체외성숙을 위한 여러 가지 배양조건(IVMFC)이 연구되었으나, 특이한 생리현상 때문에 미성숙난자의 체외성숙은 다른 가축에 비해서 매우 낮다 (Robertson 등, 1992; Hewitt and England, 1997a, 1999b; Hewitt 등, 1998). 다른 자연배란동물에서는 혈중 progesterone 농도가 최하수준이 되고, estradiol이 최고수준에 도달했을 때 배란 전 LH peak가 일어나는 것과는 반대로, 개에서는 progesterone 농도가 높은 수준에 도달하고 배란전 난포환경은 estrogen을 지배를 받는다. 또한 대부분의 다른 가축들은 자연배란 시 수정 적기인 Metaphase II (MII)에서 배란되어 난관에서 수정단계에 들어갈 준비단계를 하고 있지만, 개는 특이하게도 미성숙난자 상태인 Germinal Vesicle (GV) - Metaphase I (MI) 상태에서 배란되어 미성숙난자의 MII까지 성숙 즉, 제1극체는 배란 후 난관 중간 부분정도에 도달하는 배란 후 48~72 (2~3일) 시간 때 방출된다 (Mahi와 Yanagimachi, 1976; Tsutsui, 1989; Yamada 등, 1993).

배란 시 난자 주위의 cumulus cell mass는 여러 층으로 견고하게 부착되어 있으며, 세포질은 높은 지질농도 때문에 매우 어둡게 보인다. 난자의 성숙과 더불어 과립막세포는 확장되며, 가장 안쪽의 과립막세포는 상실배까지 부착되어 있다 (Renton 등, 1991). 이와 같은 특이한 개의 번식생리 현상의 연구는 체외에서의 *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), *in vitro* culture (IVC) 및 동결보존 등에 응용될 수 있어 앞으로 더 많은 연구가 요구된다. 난소로부터 회수된 난자 중에는 높은 수치 (20~68%)의 퇴화된 난자가 회수된다 (Metcalf, 1999; Thesis, 1997). 그러나 개 미성숙난자의 체외배양체계 및 이들의 배양 중의 변화 등에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이며 국외의 몇몇 연구그룹에 의해 시도되고 있으나 아직까지 자세히 확립되어 있지 않고 있으며, 포유류 미성숙난자의 체외성숙과 같은 방법을 그대로 개 미성숙난자에 적용한다는 것은 많은 문제점을 내포하고 있다.

따라서 본 연구에서는 수정적기인 MII까지 핵 발달을 유도하기 위한 비발정기, 발정기에 따른 난자의 체외성숙조건을 정립하고, 미성숙난자의 체외성숙 basal medium으로 쓰이고 있는 TCM199과 α -MEM에 각종 hormones, ITS, EGF 등의 첨가에 따른 체외성숙조건을 조사하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난소의 운반

난소는 전남 순천시 전남축산에서 여러 발정주기에 있는 성견으로부터 난소적출 후 이용하였다. 본 실험에 사용된 평균 연령은 2~4세, 평균 체중은 4~6 kg의 암컷이었다. 적출된 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 함유된 30°C saline의 보온병에 넣어 2시간 이내로 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다.

2. Oocytes 회수 및 방법

운반된 난소는 30°C로 유지되어져 있는 saline으로 2~3번 세척 후 clean bench 안에서 멸균된 towel paper에 올려놓고 forcep과 scissors을 이용하여 난소 주위의 지방과 도관 등을 제거하였다. 지방과 도관 등이 깨끗이 제거된 난소는 D-PBS + 0.3% BSA(A-9647, Sigma; D-PBS)가 담겨있는 60 mm dish (Falcon)에 2~3번 세척 후 100 mm dish (Falcon)에 넣어 blade로 세절하였다. 세절된 난소 실질과 혈액 및 조직 등이 미성숙난자가 함께 섞여 있는데 이것을 50 ml tube에 담아 10~15분간 정지 후 하층액을 취하여 100 mm dish (Falcon)에서 난자를 회수하였다. 회수된 난자 중에는 Grade I: 4~5층의 난구세포층이 층만하면서 균일한 세포질을 가진 것, Grade II: 2~3층의 난구세포층을 가진 것, Grade III: 1층의 난구세포층과 부분적으로 나화된 것, Grade IV: 난구세포층이 완전히 나화된 것으로 분류하여 본 실험에는 Grade I, II의 난자-난구세포 복합물 (oocyte cumulus complexes, OCCs)만을 선별하여 이용하였다. 또한 oocytes 직경의 측정에는 inverted-microscope (Nikon, Japan)의

100×에서 oocyte의 세포질만을 측정하여 110 μm 이상과 110 μm 이하로 구분하였다.

3. Oocyte 체외성숙 배양액

Culture medium는 TCM 199 medium (Earle's salts, Sigma, 7528) 및 (-Minimum Essential Medium ((-MEM: Gibco, 11900-024)의 기본배양액에 각각 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 26140-079) + 0.1 mg/ml sodium pyruvate (P-5280, Sigma) + 100 ng/ml FSH (F-2293, Sigma) + 100 ng/ml EGF (E-4127, Sigma) + 1% Insuline-Transferrine-Selenium (ITS: I- 3146, Sigma) + 100 IU/ml penicillin (P-3032, Sigma) + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (S-1277, Sigma)을 각각 첨가하였다. 1~2층 이상의 난구세포층이 충만하면서 균일한 세포질을 가진 oocyte중에서 형태학적으로 정상이면서 inverted microscope 하에서 크기를 측정하여 110 μm 이상과 110 μm 이하를 구분하고 500 μl IVM media가 들어있는 4-well dish (Nunc, Denmark)에 넣어 38.5°C, 5% CO₂ incubator 내에서 72시간 동안 배양하였다

4. Oocyte 염색

체외성숙 후 72시간째에 oocytes를 0.1% hyaluronidase 용액에서 반복적인 pipetting으로 cumulus를 제거한 후 3~4회 세척하였다. Slide glass위에 cover glass의 네 귀에 맞도록 Vaseline 미소적 (Vaseline 9 : paraffin 1)을 만든 다음, 그 중앙에 cumulus가 완전히 제거한 oocyte를 옮겨 cover glass를 덮어 현미경 아래서 난자의 표면적을 넓게 cover glass를 천천히 눌렀다. 난자의 고정을 위해서는 acetic acid : ethanol : chloroform (3:6:2 v/v)에 2~3분 동안 1차 고정 후, acetic acid: ethanol (1:3 v/v)에 48시간 동안 4°C cold room 보관하면서 고정하였다. 핵 발달과정을 조사하기 위하여 고정된 난자는 orcein 용액으로 염색을 실시하였다. 즉, acetic acid: ethanol (1:3 v/v)에 48시간동안 고정 후, oocyte는 acetic-orcein (O-7380, Sigma; 1% orcein in 45% acetic acid)으로 cover glass의 가장 자리에 2~3방울 떨어뜨리고 cover glass의 반대쪽

에 여과지를 대어서 모세관 현상에 의해서 염색액이 이동하도록 하면서 염색을 실시 (Toyoda와 Chang, 1974)하였다.

5. Oocyte 핵발달 조사

광학현미경 400배율 하에서 핵막과 chromosome 윤곽의 모양에 기초하여 Germinal Vesicle (GV)단계에서 Metaphase II (M II)까지 oocyte의 정확한 핵 성숙단계를 구분하였다. 염색액을 깨끗이 제거하고 coverglass 주위에 manicure로 봉입한 다음 phase-contrast microscope 하에서 oocyte의 핵 발달과정을 조사하였다. Oocyte의 염색질 안에 핵 발달 단계를 구분할 수 없거나, 핵 자체가 보이지 않는 oocyte는 'unidentifiable oocyte'로 분류하였다.

6. 통계처리

모든 자료의 통계적 분석은 Generalized Linear Model technique (SAS)에 의하여 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 발정주기에 따른 난자의 회수율

난소를 채취한 개의 발정주기와 난자의 크기에 따른 미성숙난자의 회수율을 조사한 결과는 Table 1에서와 같다. 발정기주기에 따른 난자의 회수율은 발정기 난소에서는 110 μm 이상의 난자 회수율 (63.6%)이 비발정기의 난소에서의 회수율 (51.5%)보다 유의적으로 많이 회수할 수 있었다 ($P < 0.05$). 또한 난소 당 난자의 회수율을 보면 110 μm 이상의 난소는 발정기 (63.8%)가 비발정기 (51.6%)보다, 총 회수된 난자수도 발정기 (35.4개)가 비발정기 (15.9개)보다 유의적으로 높게 회수되었다 ($P < 0.05$). 본 연구에서 난소의 관찰 시 발정기의 난소에서는 난포의 발육현상을 확인할 수가 있었으나, 비발정기의 난소에서는 전혀 난포의 발육현상을 볼 수 없었다. 또한 난자채취를 위해서 난소의 크기도 발정기의 난소가 비발정기의 난소보다 훨씬 컸었다.

개의 미성숙난자의 발달율은 110 μm 이상의

Table 1. Effect of estrus status on the collection rate of oocytes and ovary size

Status of estrus	No. of ovary	No. of oocytes (%)			No. of oocytes/ovary (%)		
		> 110 μm	< 110 μm	Total	> 110 μm	< 110 μm	Total
Estrus	14	313 (63.6) ^a	179 (36.4)	492 (100)	22.6 (63.8) ^a	12.8 (36.2)	35.4 ^a (100)
Anestrus	31	253 (51.5) ^b	238 (48.5)	491 (100)	8.2 (51.6) ^b	7.7 (48.4)	15.9 ^b (100)

* Experiment was replicated three times

Table 2. Effect of estrus status and oocyte size on the nuclear development in preantral dog oocytes

Estrus cycle	Size of oocytes	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to				No. (%) of unidentifiable oocytes
			GVBD	M I	AT	M II	
Estrus	>110 μm	111(100)	43(38.7)	27(24.3) ^a	8(7.2) ^a	2(1.8)	31(28.0)
	<110 μm	79(100)	42(53.2)	2(2.5) ^b	0.0 ^b	0	35(44.3)
An-estrus	>110 μm	89(100)	40(44.9)	6(6.8) ^b	1(1.1) ^b	1(1.1)	41(46.1)
	<110 μm	31(100)	19(61.3)	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0	12(38.7)

* GVBD: germinal vesicle breakdown, M I: metaphase, AT: anaphase I to telophase I, M II: metaphase II.

* Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

난자가 유의적으로 MI~MII까지의 발달율이 높기 때문에 100 μm 이상의 난자회수율이 매우 중요한 요인이 될 것이다. 년중 발정주기가 계속되는 가축의 난소에서는 미성숙 난포란의 발달이 계속되고 있으나, 개 난소에서는 발정발현 때 이외에는 전혀 변화가 없다가 발정발현시 난포의 발달 및 배란이 일어난다. 따라서 몇 연구자들은 개 난소로부터 미성숙난자의 회수율을 높이기 위하여 본 연구에서와 같이 난소를 세절한 후 미성숙난자를 얻는 방법을 이용하고 있다 (Nickon 등, 1993; Hewitt와 England, 1999b). 난소로부터 회수된 난자 중에서 약 20~80%의 퇴화된 난자가 회수된다고 보고하였다 (Metcalf, 1999; Thesis, 1997). Farstad 등 (1993)은 68%의 형태학적으로 체외성숙에 사용할 수 없는 oocyte를 얻었다고 보고하였고, Thesis (1997)은 oocyte quality 기준으로 2층 이하의 과립막세포, 불충분한 세포질, 세포질내 액포 및 투명대의 파열 등으로 판단하였다.

2. 발정주기 및 난자의 크기가 핵 발달율에 미치는 영향

미성숙난자의 체외성숙을 유도하기 위하여 발정주기에 따른 난소로부터 회수된 난자를 110 μm 이상과 이하의 크기로 분류하여 체외성숙에 유도한 결과는 Table 2에서와 같다. 이때 체외성숙 후 핵 발달과정의 조사는 TCM199에 10% FCS와 hormones을 첨가하여 72시간 동안 체외성숙을 유도한 후 과립막세포를 제거하고 48시간동안 고정 후 1% Orcein으로 염색하여 조사하였다. 발정주기의 110 μm 이상의 난자에서 MI 및 AT까지 핵 발달율 (24.3, 7.2%)은 110 μm 이하의 핵 발달율 (2.5, 0.0%)보다 유의적으로 높은 발달율을 얻었다 ($P < 0.05$). 또한 비발정기의 핵 발달율은 110 μm 이상 (6.8, 1.1 및 1.1%)과 이하 (0.0, 0.0 및 0.0%)에서는 차이가 없었다.

72~96시간 동안 체외성숙 후 M II까지 발달하는 성공율은 0% (Robertson 등, 1992; Hewitt과

England, 1999a) 및 32~42% (Nickson 등, 1993; Yamada 등, 1993)에 이르기까지(평균 20% 전후) 연구자마다 각각 크게 차이가 난다. 다른 포유류의 경우 follicle size (Motlik와 Fulka, 1986; Lonergan 등, 1994; Martino 등, 1994)와 oocyte size (Fair 등, 1995; Otoi 등, 1997)가 미성숙난자의 성숙과 수정에 영향을 미친다고 보고하였는데, 개 난자의 크기는 70~130 μm (평균 112 μm)로 다양하며 112 μm 이상의 oocyte에서 MI, A-TI 및 MII까지 발달 능력이 100 μm 이하의 oocyte보다 유의적으로 높았다는 보고 (Hewitt와 England, 1997a)와 같이 oocyte의 크기가 체외성숙 시 핵 발달능력에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 따라서 oocyte의 크기가 체외성숙 시 핵 발달능력에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단되지만, 정확히 어느 정도의 oocyte 크기가 성숙과 수정에 영향을 미친다는 보고는 많지 않은 상태이다. 발정주기에 관계없이 난소적출에 의한 난포란의 체외성숙율에는 영향을 미치지 못하는 것으로 보고되었으나 (Hewitt와 England, 1997ab; Metcalfe, 1999; Nickson 등, 1993; Robertson 등, 1992), 본 연구에서는 난소적출 시 개의 발정주기, 즉 발정기와 비발정기에 따라 유의적으로 영향을 미치는 것으로 판단된다.

3. 체외성숙배양액의 종류에 따른 핵 발달율

체외성숙배양액에 따른 미성숙난자의 체외발달율을 조사한 결과는 Table 3에와 같다. 체외성숙시 TCM 199을 기본배양액으로 이용하였을 때 GVBD, MI, AT 및 MII까지의 발달율(40.0, 21.8, 7.3 및 0.9%)이 α -MEM(44.5, 10.0, 1.1 및 1.1%)

보다 MI과 AT까지의 발달율에서 유의적으로 높은 결과를 얻었다 ($P < 0.05$).

FSH는 소를 포함한 많은 동물의 체내에서 미성숙난자의 정상적인 발달과 성장, 체외에서 과립막세포의 증식과 분화 및 생존성 등에 관련 있다고 보고되었다 (Wandji 등, 1996). EGF첨가 또한 미성숙난자에 영향을 미치는데 pig (Morbeck 등, 1993), hamster (Roy, 1993), cow (Wandji 등, 1996)에서 과립막세포의 증식에 관여한다고 보고하였다. 따라서 FSH와 EGF의 첨가는 미성숙난자의 생존율과 성장에 중요하다고 할 수 있다. Insulin-Transferine-Selenium (ITS)를 사용함으로써 insulin은 단독으로는 정상적인 난포유지는 힘들지만 난포환경에서 과립막세포의 유지의 효과 및 난포culture에 필수적이며 insulin부족 시 난포의 퇴화가 일어난다. 또한 selenium은 배양조건을 향상시키는 것으로 보고되고 있다 (Roy와 Treacy, 1993). 따라서 FSH, ITS, glutamine 및 sodium pyruvate의 첨가는 난포발달을 향상시켜 이것은 난포의 생존 시간 및 성장이 2배나 높게 나타난 것으로 보고되었다 (Katska와 Rynska, 1998). 또한 각종 hormones의 첨가에 의한 배양체계에서는 체외성숙에 영향을 미치지 못한다는 정반대의 보고 (Hewitt와 England, 1999a)에서 체외성숙 media에 hormone의 첨가는 중요하지 않다고 보고하였지만, Yamada 등 (1993)은 gonadotrophin 유기한 발정개와 무발정개의 oocyte의 체외성숙시 대조구보다 gonadotrophin hormone 처리구에서 유의적으로 높은 체내성숙율을 보고함으로써 정확한 결론을 내릴 수 없다. 한편 Kim (2000)은 mouse의 미성숙난자를

Table 3. Effect of culture media on the nuclear development in preantral oocytes

Culture media	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to				No. (%) of unidentifiable oocytes
		GVBD	MI	AT	MII	
TCM 199	110(100)	44(40.0)	24(21.8) ^a	8(7.3) ^a	1(0.9)	33(30.0)
α -MEM	90(100)	40(44.5)	9(10.0) ^b	1(1.1) ^b	1(1.1)	39(43.3)

* Oocytes were collected from estrus dog's ovaries and selected over 110 μm diameter for this experiment.

* Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

α -MEM에 배양 시 다른 배양액 (Waymouth 및 TCM 199)보다 유의하게 높은 생존율과 성숙율을 나타냈으며, 특히 10 mIU/ LH와 100 mIU/ml FSH의 병용은 미성숙난자의 성장과 steroid hormone의 생산을 더욱 증가시켜 미성숙난자 배양을 위하여 보다 효과적 이었다고 보고하였다. 그러나 체외성장된 난자의 발생 능력에서는 FSH 단독처리군이 FSH와 LH를 병용처리한 군들보다 다소 높은 발생율을 나타냈다고 하였다.

이와 같이 미성숙난자의 발달에 주요한 장애원인으로서의 난자의 quality, hormone환경과 첨가 여부, 체외성숙을 위한 난자의 과립막세포의 유의성, 혈청과 단백질의 첨가 영향, 난포의 크기와 발달단계 및 난소를 채취한 개의 발정주기와 연령, 즉 성성숙 여부에 따라 체외성숙에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

IV. 요약

본 연구는 개 난자의 체외성숙을 유도하기 위하여 발정기 및 비발정기의 개로부터 난소를 채취하여 난자의 채취율과 채취된 난자의 크기와 배양액의 종류에 따른 핵 발달율을 조사하기 위하여 수행되었다. 본 연구를 위하여 난소의 채취는 순천축산에서 난소적출술로 회수하여 30°C saline에 담아 실험실로 2시간 이내에 수송하였다. 모든 난소는 항생제가 첨가된 saline으로 3-4회 세척 후 100 mm dish에서 blade로 세절하여 미성숙난자를 회수하였다. 회수된 난자는 발정기와 비발정기 및 110 μ m 이상과 이하로 구분하여 회수율을 조사하였다. 미성숙난자의 핵 발달을 유도하기 위하여 체외성숙 배양액은 TCM199과 α -MEM에 10% FCS, 0.1 mg/ml sodium pyruvate, 100 ng/ml FSH, 100 ng/ml EGF, 1% ITS, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 등을 첨가하여 38.5°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양하였다. 핵발달율은 45% acetic acid 용액으로 48시간 고정 후 1% Orcein으로 염색하여 조사하였다. 발정기의 난소로부터 110 μ m 이상의 난자의 회수율 (63.6%)은 비발정기(51.5%)의 것보다 유의적으로 높았다 (P

< 0.05). 발정기의 난소에서 110 μ m 이상의 난소당 난자회수율 (22.6개/63.8%)은 비발정기의 것보다 유의적으로 높았다 (P < 0.05). 발정기의 난소에서 110 μ m 이상의 난자의 MI까지의 핵발달율 (24.3%)은 110 μ m이하의 것 또는 비발정기의 110 μ m 이상 및 이하의 난자의 것보다 유의적으로 높았다 (2.5, 6.8 및 0.0%; P < 0.05). 발정기의 110 μ m 이상 난자의 AT 또는 MII까지의 핵발달율은 다른 처리군보다 높게 발달하였다. TCM199에서 MI까지의 핵발달율 (21.8%)은 α -MEM (10.0%)보다 유의적으로 높았다 (P < 0.05). 그러나 AT까지의 핵 발달율은 TCM199 (7.3%)과 (-MEM (1.1%) 간에는 유의적 차이가 있었으나 (P < 0.05), MII까지는 TCM199 (0.9%)과 (-MEM (1.1%)에는 유의차가 없었다.

본 연구결과는 110 μ m 이상의 난자는 발정기의 난소로부터 더 많은 난자를 회수할 수 있었고, 110 μ m 이상의 난자들이 MI, AT까지의 핵발달 능력이 높았다. 또한 체외성숙배양액 시 TCM199이 α -MEM보다 Mi과 AI까지 높은 발달율을 보였다.

V. 인용문헌

1. Fair, T., Hyttel, P. and Greve, T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol. Reprod. Dev., 42:437-442.
2. Farstad, W., Krogenaes, A., Nagyova, E., Hafine, A. L. and Hyttel, P. 1993. *In vitro* techniques in fox reproduction. Livestock Prod. Sci., 36:23-27.
3. Farstad, W., Mondain-Monval, M., Hyttel, P., Smith, A. J. and Markeng, D. 1989. Periovarian endocrinology and oocytes maturation in unmatched, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). Acta. Vet. Scand., 30:313-319.
4. Hewitt, D. A. and England, G. C. W. 1997a. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. J.

- Reprod. Fert., 51:83-91.
5. Hewitt, D. A. and England, G. C. W. 1997b. The canine oocytes penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoa performance *in vitro*. Anim. Reprod. Sci., 50:123-139.
 6. Hewitt, D. A. and England, G. C. W. 1999a. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. Vet. Rec., 144:237-239.
 7. Hewitt, D. A. and England, G. C. W. 1999b. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. Ani. Reprod. Sci., 55:63-75.
 8. Hewitt, D. A., Watson, P. F. and England, G. C. W. 1998. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology, 49: 1083-1101.
 9. Katska, L. and Rynska, B. 1998. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. Theriogenology, 50:213-222.
 10. Kim, D. H. 2000. Studies on *in vitro* growth and development of mouse preantral follicles. Ph.D. Thesis in Konkuk University. Korea.
 11. Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P. and Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 37:48-53.
 12. Mahi, C. A. and Yanagimachi, R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool., 196:189-196.
 13. Martino, A., Mogas, T., Palomo, M. J. and Paramio, M. T. 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. Theriogenology, 41: 969-980.
 14. Metcalfe, S. S. 1999. Assisted reproduction in the bitch. Thesis for the degree of Master of Science, Monash University, Victoria, Australia. p. 160.
 15. Morbeck, D. E., Flowers, W. L. and Britt, J. H. 1993. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles of FSH, 8-bromo-cAMP and EGF *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 99:577-584.
 16. Motlik, J. and Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. Theriogenology, 25:87-96.
 17. Nickson, D. A., Boyd, J. S., Eckersall, P. D., Fergusson, J. M., Harvey, M. J. A. and Renton, J. P. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. J. Reprod. Fert.(Supp.), 231-240.
 18. Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. and Suzuki, T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. Theriogenology, 48:769-774.
 19. Renton, J. P., Boyd, J. S., Eckersall, P. D., Ferguson, J. M., Harvey, M. J. A., Mullaney, J. and Perry, B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). J. Reprod. Fert., 93:221-231.
 20. Robertson, J. B., Srsen, V. and King, W. A. 1992. Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction. The Hague. The Netherlands, 4:1808-1810.
 21. Roy, S. K. 1993. TGF- β potentiation of FSH-induced DNA synthesis in hamster preantral follicles is mediated by a latent induction of EGF. Biol. Reprod., 48:558-563.
 22. Roy, S. K. and Treacy, B. J. 1993. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. Fertil. Steril., 59:783-790.
 23. Thesis, T. 1997. Investigations on the collec-

- tion, *in vitro* maturation and fertilization of dog oocytes. Thesis. Tierarzliche Fakultat der Ludwig-Maximillian Universtat Munich.
24. Toyoda, Y. and Chang, M. C. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.*, 36:9-22.
25. Tsutsui, T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 39:629-275.
26. Wandji, S. A., Eppig, J. J. and Fortune, J. E. 1996. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 45:817-832.
27. Yamada, S., Shimazu, Y., Kawano, Y., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. 1993. *In Vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 47:227-229.
- (접수일자: 2001. 3. 15. / 채택일자: 2001. 4. 2.)