

## 개 미성숙난자의 체내이식 배양이 핵성숙에 미치는 영향

이효상 · 이영호 · 윤희준 · 공일근<sup>†</sup>  
순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

### Effect of Meiotic Maturation of Canine Oocytes Cultured in Reproductive Tract

H. S. Lee, Y. H. Lee, X. J. Yin and I. K. Kong<sup>†</sup>

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences,  
Sunchon National University

#### SUMMARY

This study were carried out to evaluate the possibility of nuclear progression of canine immature oocytes, of which was cultured in a reproductive tract, such as oviduct, ovarian bursa and uterus of estrus bitch for 4, 5 and 6 days following immediately collection. Cumulus intact oocytes(COC) were collected from domestic dog following ovariohysterectomy at local veterinary clinics. In Exp. 1, COCs of >110  $\mu\text{m}$  diameter were selected and cultured *in vitro* at 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere. The nuclear progression of canine oocytes checked at 24, 48 or 72 h after *in vitro* maturation. There was not increased the nuclear progression to the M II stage depending on culture periods at 24, 48 and 72h (1.3%, 3.7% and 4.7%).

In Exp. 2, to evaluate of nuclear progression of immature oocytes, collected or *in vitro* cultured oocytes were transfer into a canine reproductive tract (oviduct, ovarian bursa and uterus). The recovery rates of canine oocytes from a reproductive tract after 4 days (33.7%) *in vivo* culture were significantly higher than those 5 (17.7%) or 6 day (3.4%) ( $P<0.05$ ). The survival rates of collected oocytes after 4 days (60.0%) were also significantly higher than those of 5 days (30.2%) and 6 days (38.9%) ( $P<0.05$ ). The meiotic resumption rates of canine oocytes were not significantly difference among the culture periods at 4 days (5.9%), 5 days (0.0%) and 6 days (0.0%).

These results show that the nuclear progression of canine immature oocytes from in *in vivo* culture was not affect the nuclear resumption of oocytes.

(Key words : canine, oocyte, oocyte transfer, *in vivo* maturation)

#### 서 론

현재까지 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 이용된 배양액은 Synthetic Oviductal Fluid (SOF) (Bolamba 등, 2002; Hewitt와 England, 1999), TCM-

199 (de Avila Rodrigues와 Rodrigues, 2003; Luvoni 등, 2001), NCSU-23 (Lee 등, 2003), DMEM (Lee 등, 2003) 등을 이용하여 체외성숙을 유도하였으며, 첨가 단백질로는 Bovine serum albumin (BSA) (Rodrigues와 Rodrigues, 2003), Fetal bovine serum

\* 본 연구는 농림부 농업기술개발과제(과제번호 2003: 203121-03-1-SB010)의 지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : ikong@sunchon.ac.kr

(FBS) (Lee 등, 2003), Estrus bitch serum (EBS) (Otoi 등, 1999)등을 첨가하여 많은 연구자들이 다양한 방법을 통해 미성숙난자의 체외성숙을 유도하고 있으나, 현재까지 개의 체외성숙에 관한 보고에서 핵의 완전한 성숙은 불과 20% 내외로서 (Farstad, 2000) 타동물에 비해 미진한 실정이다.

대부분의 포유류 (소, 돼지, 염소 등)는 일정한 발정주기를 가지며 배란시 제 2성숙 분열중기 (Metaphase-II)기에 배란되어 난관에서 수정이 일어나지만, 개는 가을에 계절번식을 하는 Besenji종을 제외하고는 일반적으로 뚜렷한 발정주기가 없다. 발정이 진행되어 난자가 배란되는 시점까지도 많은 시간이 소요되며, 난자의 배란생리도 타포유류와 같이 MII 단계의 배란을 하지 않고 미성숙 단계인 germinal vesicle (GV) 단계에 배란을 하여 (Tsutsui, 1989; Yamada 등, 1993) 난관에서 약 2~5일간 성숙되어 MII에 이른다 (Tsutsui, 1989). 이는 GV 단계에서 배란된 난자가 난관에서 난관의 운동성, 난관액내의 호르몬 등 체내 인자에 의하여 성숙에 이르는 것으로 추정된다. 하지만, 현재까지 개의 GV 단계의 미성숙 난자를 난관내에 이식하여 난자의 성숙을 유기하는 연구는 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 개의 미성숙 GV 단계 난자를 발정건의 난관 혹은 난소낭 및 자궁에 이식하여 체내에서 4일 이상 배양 후 채란하여 난자의 채란율과 핵 성숙율을 조사하여 번식기관내 환경이 미성숙난자의 핵 성숙에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

본 연구에 사용된 암개는 임상적으로 건강하고, 자견 생산경험이 있는 2년생 이상의 발정이 개시된 잡종견 3두를 구입하여 공시하였다.

### 2. 난소 및 난자의 회수

난소는 발정주기에 관계의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 38℃의

0.9% 생리식염수가 들어있는 보온병에 넣어 2시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin 및 0.3% BSA (A-9647, Sigma) 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 Otoi 등 (2001)의 난자 분류기준에 따라 난구세포가 2~4층으로 둘러싸여 있고 세포질의 직경이 110 µm 이상이면서 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

### 3. 미성숙난자의 체외성숙

체외성숙 배양액으로 TCM-199 (M-7528, Sigma)에 10% FBS (26140-079, Gibco), 1 mg/ml cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma), 20 ng/ml E<sub>2</sub> (E-8875, Sigma)를 첨가하였다. 배양액은 4-well dish (Nunc, Denmark)에 500 µl 씩 분주한 후 20~30개의 난자를 주입하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24, 48 및 72시간 동안 배양 후 난자의 핵성숙을 조사하였다.

### 4. 미성숙난자의 발정건 생식기내의 이식 및 회수

미성숙난자의 핵성숙을 유도하기 위하여 자연 발정이 진행된 개의 생식기관에 이식하였다. 난자 이식은 개의 발정 진행 상태를 확인하여 배란 적기를 판단하고 외과적 수술방법으로 이식하였다. 배란 적기의 판단기준은 Feldman과 Nelson (1996)의 방법에 준하여 질 상피세포의 각질화 상태를 조사하여 실시하였다. 질 상피세포의 채취는 멸균된 면봉을 질내에 삽입 후 질 상피세포를 채취하였고, 슬라이드에 도말한 후 Gimsa 염색액을 이용하여 염색 후 질 상피세포의 각질화 변화를 관찰하여 배란 적기를 판단하였다. 미성숙 난자의 생식기관내 이식은 Table 1과 같이 설계하여 이식하였다. 배란적기인 암개를 200 µg/kg의 Sedaject (삼우메디안; 한국)에 15분간 진정시킨 후 20 mg/kg의 Ketamine (유한양행; 한국)을 이용하여 15분간 마취하였다. 마취 후 복강의 정중선을 절개하여 난소와 생식기관 (난관, 난소낭, 자궁)에 미성숙난자를 이식하였다. 이식 4, 5 및 6일 후 위와 동일한 방법으로 마취 후 복강을 절개하였으며, 난소를 포함한 자궁 절제 시술을 통해 생식기관을 회수 후 연구

Table 1. Oocyte transfer (OT) schedules for estrus bitch

Bitch No	OT sites	OT organs	Recovery days after OT
1	Right	FT	4
	Left	FT	
2	Right	OB	5
3	Right	OB	6
	Left	FT	
		Uterus	

FT : Fallopian tube, OB: Ovarian bursa.

실에서 난관, 난소낭, 자궁을 관류하여 난자를 회수하였다. 관류액은 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin 및 0.3% BSA (A-9647; Sigma)가 첨가된 D-PBS를 사용하였다. 회수된 난자는 회수율, 생존율, 사멸율 및 제1극체 유무 등을 조사한 후, 생존된 난자만을 이용하여 난자의 핵 성숙율을 조사하였다. 채취된 난자의 생사 유무는 세포질이 깨지거나, 투명대만 존재하는 것을 사멸된 난자로 판단하였고, 난자의 세포질과 세포질의 외막이 온전한 것을 생존난자로 판단하였다.

### 5. 난자의 핵 분열상 평가

체외성숙 및 체내배양 후 회수된 난자의 핵상 관찰은 0.2% hyaluronidase 용액에 난자를 침지하여 glass pipette으로 난구세포를 제거한 후 생존한 난자만 고정하여 핵 분열상을 평가하였다. 고정은 10 µg/ml의 Hoechst 33342 염색액이 첨가된 2.5%의 paraformaldehyde에 30분간 고정 후 slide에 정치시켜 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV, 염색체가 적도판에 배열하고 극체가 확인되지 않은 난자를 MI, 극체가 확인된 난자를 MII라 판단하였다. 또한, 핵상을 정확히 구분하기 어려운 상태를 Unclear로 구분하여 관찰하였다.

### 6. 통계학적 분석

본 연구에서 얻어진 자료는 GraphPad InStat

(version 3.05 for Windows 95/NT, GraphPad Software, San Diego, CA) software를 이용하였고, chi-square test를 적용하여 각 실험군 간의 유의성을  $P<0.05$ 의 경우만을 처리구간의 통계학적 차이를 인정하였다.

## 결 과

### 1. 미성숙난자의 체외성숙

개의 미성숙난자를 배양시간에 따라 체외성숙을 확인한 결과는 Table 2와 같다. 미성숙난자를 체외배양 24, 48 및 72시간 동안 체외성숙을 유도하여 각각 83.8, 74.0 및 73.0% 난자가 GV 상태에 존재하는 것으로 조사되었다. 또한, 체외성숙시간이 길어질수록 핵상을 판별하기 어려운 Unclear (11.3, 14.8 및 21.7%) 상태의 난자가 많아졌으며, 미성숙 난자를 24, 48 및 72시간 동안 체외성숙을 유도하였을 때 각각 1.3, 3.7 및 4.7%의 MII 난자가 조사되어 성숙시간에 따른 체외성숙율에는 유의적 차이는 인정되지 않았다.

### 2. 미성숙난자의 체내 이식 후 회수율

미성숙난자를 개의 생식기관에 이식 후 4, 5 및 6일 후 회수한 결과는 Table 3과 같다. 난관 이식 후 4일째 (Bitch No. 1) 좌·우 난관 관류를 통해 회수한 난자의 회수율은 30.8% (48/156)와 42.3% (22/52)로 유의적 차이는 없었다. 회수된 난자의 생존율 56.3% (27/48)와 68.2% (15/22) 및 사멸 난자의 회수율은 43.8 (21/48)와 31.8% (7/22)로 조사되었고, 오른쪽 난관에서 회수한 난자 중 1 (4.6%)

Table 2. Effect of *in vitro* culture time on the nuclear maturation in canine oocytes

Culture time	No. of cultured oocyte	No. (%) of oocytes			
		GV	MI	MI I	Unclear
24	80	67(83.8) <sup>a</sup>	2(2.5)	1(1.3) <sup>a</sup>	10(11.3)
48	54	40(74.0) <sup>a</sup>	4(7.4)	2(3.7) <sup>a</sup>	8(14.8)
72	63	46(73.0) <sup>a</sup>	5(7.2)	3(4.7) <sup>a</sup>	9(21.7)

<sup>a</sup> Values with same superscript within the same column were not significantly different ( $p<0.05$ ).

개만이 제1극체가 확인되었다. 난자를 난소낭에 되었고, 오른쪽 난관에서 회수한 난자 중 1 (4.6%) (Bitch No. 2) 이식한 후 5일째 오른쪽 난소낭에서 이식한 난자를 회수하였을 때 17.7% (53/300)의 난자가 회수되었으며, 회수된 난자중 생존해 있는 난자는 30.2% (16/53)로 조사되었으며, 사멸된 난자는 69.9% (37/53)로 조사되었다. 회수된 난자중 제1극체가 조사된 난자는 없었다. 개의 미성숙난자를 오른쪽 난소낭 및 왼쪽 난관과 자궁에 이식한 후 (Bitch No. 3) 6일째 회수한 난자의 회수율은 난소낭 5.7% (10/175), 난관 4.6% (8/175) 및 자궁 0% (0/180)로 조사되었고, 회수된 난자의 생존율은 난소낭 40.0% (4/10), 난관 37.5% (3/8) 및 자궁 0.0% (0/0)로 조사되었으며, 사멸된 난자의 회수율은 난소낭 60.0% (6/10), 난관 62.5% (5/8) 및 자궁 0.0% (0/0)로 조사되었다. 또한, 체외 채취 난자를 체내 배양하였을 때 배양시간이 길어질수록 난자의 회수율은 유의적으로 떨어졌다 ( $P<0.05$ ).

### 3. 체내이식 후 회수된 난자의 핵 성숙을

체내 배양기간별로 회수된 난자의 핵 성숙율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 배양기간별로 회수된 난자는 4일째 58.8% (20/34), 5일째 40.0% (6/15), 6일째 57.1% (4/7)가 GV 상태로 존재하며, 성숙된 난자는 체내배양 4일째 5.9% (2/34)가 조사되었다. 염색 후 핵상을 정확히 구별하기 어려운 난자가 체내 배양기간이 길어질수록 증가하였다 (35.3, 60.0 및 42.9%).

Table 4. Meiotic maturation of canine oocytes cultured for 4, 5 and 6days in reproductive tract

Culture period (days)	No. of oocytes	No. (%) of oocytes			
		GV	M I	M II	Unclear
4	34	20(58.8)	0(0.0)	2(5.9)	12(35.3)
5	15	6(40.0)	0(0.0)	0(0.0)	9(60.0)
6	7	4(57.1)	0(0.0)	0(0.0)	3(42.9)

## 고 찰

대다수의 포유류는 배란시 혈중 progesterone 농도가 최하 수준이 되고 estradiol이 최고 수준에 도달했을 때 배란전 LH peak가 일어나는 것과는 다르게 개와 여우는 progesterone 농도가 높은 수준에 도달하였을 때 배란전 LH peak가 일어나고 (Concannon 등, 2001), LH peak 후 1~2일 사이에 배란이 일어나며 배란된 난자는 특이하게 GV 단계인 미성숙 난자가 배란되어 난관에서 성숙이 일어난다 (Renton 등, 1991; Mahi와 Yanagimachi, 1976; Yamada 등, 1993).

본 연구에서 개의 미성숙 난자를 24, 48 및 72시간 동안 체외성숙을 유도하였을 때 핵 성숙율에는 유의적 차이는 인정되지 않았다 (Table 2). 이러한 결과는 Saint-Dizier 등 (2004)이 개 난자를 24 (2/169), 48 (6/391) 및 72 (6/91)시간 동안 체외성숙을 시킨 결과와 비슷하였으며, Yamada 등

Table 3. The recovery rate of transferred canine oocytes

Bitch No	OT site	OT organs	No. of oocyte transferred	No.(%)of collected oocyte	No. (%) of survival	No. (%) of Deg.	1 <sup>st</sup> polar body
1	Right	FT	52	22(42.3) <sup>a</sup>	15(68.2) <sup>a</sup>	7(31.8) <sup>a</sup>	1(4.6)
	Left	FT	156	48(30.8) <sup>a</sup>	27(56.3) <sup>a</sup>	21(43.8) <sup>a</sup>	0(0.0)
2	Right	OB	300	53(17.7) <sup>b</sup>	16(30.2) <sup>b</sup>	37(69.9) <sup>b</sup>	0(0.0)
	Right	OB	175	10( 5.7) <sup>c</sup>	4(40.0) <sup>a,b</sup>	6(60.0) <sup>a</sup>	0(0.0)
3	Left	FT	175	8( 4.6) <sup>c</sup>	3(37.5) <sup>a,b</sup>	5(62.5) <sup>a</sup>	0(0.0)
		Utrus	180	0( 0.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	0(0.0)

<sup>a,b,c</sup> Values with different superscripts within the same column are significantly different ( $P<0.05$ ).

(1993)이 비 발정기의 난자를 이용하여 체외성숙시킨 결과와 비슷하였으나, 발정기의 난자를 이용하여 24 (4/9), 48 (6/22) 및 72 (58/179)시간 체외성숙시킨 결과와는 차이가 있었다. Concannon 등 (2001)은 개는 발정이 진행되면 혈중 progesterone의 농도가 상승한다고 하였으며, Kim 등 (2005)과 Willingham-Rocky 등 (2003)은 체외성숙 배양액에 progesterone을 첨가하였을 때 발정기 난소에서 채취한 난자의 핵성숙이 개선되었다고 하였다. 이러한 맥락에서 볼 때 개 난자의 체외성숙은 개의 내분비적인 요소를 참조하여 체외성숙 배양액의 개선이 필요하다고 생각되며, 본 연구의 낮은 핵성숙의 결과는 체외성숙 배양액 및 첨가물질이 개 미성숙난자의 체외성숙에 적합하지 않아 낮은 핵성숙율을 보이는 것으로 판단된다.

본 연구에서 개 미성숙 난자의 낮은 핵성숙을 개선하기 위하여 자연 발정기 개의 생식기관(난관, 난소낭, 자궁)에 이식하여 체내 배양을 통해 난자의 성숙을 유도하였다 (Table 3). 이식된 난자의 회수율은 체내 배양 기간이 길어질수록 저조하였으며 사멸된 난자의 비율이 높아졌다. 이런 결과는 Hinrichs 등 (2002)은 말의 난자를 체외배양 24시간 후 난관에 이식하여 40~44시간째 난관 관류를 통해 회수한 난자의 회수율 74% (87/118)와 생존율 64.4% (56/87)로 보고하여, 난자의 생존율은 본 연구의 난관에 4일 배양한 처리구와 비슷한 결과를 보였고, 회수율에 있어서는 많은 차이를 보였다. 이러한 회수율의 차이는 체내 배양기간의 차이인 것으로 생각된다. 또한, Fukui 등 (1989)은 소 난자를 체외수정 24시간째 토끼와 면양의 난관에 이식하고 6일 후 회수하였을 때 각각 68.1%와 35.3%의 회수율을 보여 수정란의 회수율에 있어 토끼와 면양에서 차이가 있었다. 또한, Sirard 등 (1985)은 분할된 수정란 (2~8 cell)과 미분할 수정란 (1-cell)을 토끼의 난관에 이식하여 회수하였을 때 분할된 수정란의 회수율이 미분할 수정란보다 높은 것은 수정란과 난관 사이의 생리적인 신호 (physiological signal)에 의해 발정기의 난관은 미분할 수정란보다 분할된 수정란을 효과적으로 보호한다고 추정하였다. 본 연구에서 총 이식한 난자 중 86.4%의 난자를 회수하지 못하였고, 회수된 난

자의 53.9%가 사멸된 난자로 조사되었다. 또한, 난자 회수시 자연 배란된 난자는 Bitch No.1에서 3개가 회수되었고, 회수된 난자는 모두 GV 단계인 것으로 조사되었다. 본 연구에서 이식된 난자의 회수율이 낮은 원인은 아마도 배란시점을 정확히 추정하지 못하여 미성숙 난자를 발정기 개에 이식한 것으로 생식기관과 미성숙난자 사이의 생리적인 신호가 적합하지 못하여 이식난자의 대부분이 lysis 되었거나, 죽은 난자 또한 다수가 회수된 것으로 판단된다.

본 연구에서 체내 배양 후 회수한 난자의 핵 상태를 조사한 결과 체내 배양 4일째 5.9% (2/34)의 핵성숙을 보였으며, 체내 배양기간이 길어질수록 판단이 힘들거나, 핵이 없는 상태의 난자가 증가하였다 (Table 4). 이는 난자를 체외배양시 배양시간을 7일 이상 (미발표 결과) 실시하여도 핵성숙에 차이를 보이지 않는 결과와 대조를 이루며, 이는 개의 난자내 핵성숙 관련인자와 관련있다고 사료된다. Wirtu 등(2004)은 MI 단계에서 배란하여 난관내에서 핵성숙이 완성되는 말의 난자를 양의 난관에 이식하여 인공수정을 완료하고, 7일 후 난관 관류를 통해 수정란을 회수한 결과 44.4%의 난할율을 보여, 말은 미성숙 난자를 난관에 이식하여도 성숙이 되는 것을 의미하여 본 연구와는 차이가 있었다.

## 적 요

본 연구는 개의 미성숙난자의 낮은 성숙율을 개선하기 위하여 자연발정은 개의 생식기관에 미성숙 난자를 이식하여 체내 배양 난자를 회수하여 회수된 난자의 핵 성숙율을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 미성숙난자를 24, 48 및 72시간 동안 체외성숙을 유도하였을 때 성숙시간에 따른 체외성숙율에는 유의적 차이는 인정되지 않았다.
2. 체내 배양 기간에 따른 난자의 회수율은 배양기간이 길어질수록 유의적으로 낮은 회수율을 보였으며, 배양기간이 증가할수록 난자의 생존율은 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 저하되었고 사멸된 난자의 비율도 또한 증가하였다.

3. 회수된 난자는 4, 5, 6일간의 체내 배양기간에 관계없이 대부분 GV 상태로 (20/34; 6/15; 4/7) 존재하였으며, 성숙된 난자는 체내 배양 4일째 회수된 난자에서 5.8%(2/34)의 난자가 MII까지 발달한 것으로 조사되어 개의 미성숙난자의 체내 배양은 개 난자의 핵성숙을 개선하지 못하였다.

이상의 결과에서와 같이 개의 미성숙난자의 체내 배양은 MII 단계까지의 발달에 기여하지 못한 것으로 판단되며, 이는 개 미성숙난자의 핵발달은 난포에서의 자극과 활성화가 요구되는 것으로 판단된다.

### 참고문헌

- Bolamba D, Russ KD, Olson MA, Sandler JL and Durrant BS. 2002. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, 58(9):1689-1703.
- Concannon P, Tsutsui T and Shille V. 2001. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:169-179.
- de Avila Rodrigues B and Rodrigues JL. 2003. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, 60(1): 59-66.
- Farstad W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1):175-186.
- Feldman E and Nelson R. 1996. Ovarian cycle and vaginal cytology. In canine and feline endocrinology and reproduction. 2nd ed., WB Saunders Company, pp. 526-546.
- Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C, Chikamatsu N and Ono H. 1989. Development to the late morula or blastocyst stage following *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 18:139-148.
- Hewitt DA and England GC. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 55(1):63-75.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH and Varner DD. 2002. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biol. Reprod.*, 67(1):256-262.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2005. Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 63(5):1342-1353.
- Lee HS, Yin XJ, Lee YH, Kang TY and Kong IK. 2003. Effect of IVM medium and protein source on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Korean J. Emb. Trans.*, 18(1):75-80.
- Luvoni GC, Luciano AM, Modina S and Gandolfi F. 2001. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:141-146.
- Mahi CA and Yanagimachi R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 196(2):189-196.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A and Suzuki T. 1999. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11(7-8):387-390.
- Otoi T, Ooka A, Murakami M, Karja NW and Suzuki T. 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 13(2-3):151-155.
- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J and Perry B. 1991.

- Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). J. Reprod. Fertil., 93(1):221-231.
- Rodrigues BA and Rodrigues JL. 2003. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. Reprod. Domest. Anim., 38(1):58-62.
- Saint-Dizier M, Reynaud K and Chastant-Maillard S. 2004. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. Mol. Reprod. Dev., 68(2):205-212.
- Sirard MA, Lambert RD, Menard DP and Bedoya M. 1985. Pregnancies after *in-vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. J. Reprod. Fertil., 75(2):551-556.
- Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. J. Reprod. Fertil. Suppl., 39:269-275.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME and Kraemer DC. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. Reproduction, 126(4):501-508.
- Wirtu G, Bailey TL, Chauhan MS, Parker NA, Dascanio JJ, Gwazdauskas FC and Ley WB. 2004. Xenogenous fertilization of equine oocytes following recovery from slaughterhouse ovaries and *in vitro* maturation. Theriogenology, 61:381-391.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K and Tyoda Y. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:227-229.
- 
- (접수일: 2005. 2. 6 / 채택일: 2005. 4. 3)