

말 인공수정에서 발정동기화와 배란유도 방법이 호르몬 농도와 임신율에 미치는 효과

Effects of Estrus Synchronization and Ovulation Induction Methods on Hormone Concentrations and Pregnancy Rate in Artificial Insemination of Riding Horses

권수현¹

Su heon Gwon
경상대학교
축산과학부

박용수^{2*}

Yong Soo Park
한국농수산대학교
축산학부

¹ Animal material engineering, Division Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

² Department of Livestock, Korea National University of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Korea

ABSTRACT

Reproductive research such as artificial insemination and embryo transfer is necessary to produce high-quality riding horses. In this study, we investigated the effects of estrus synchronization and ovulation induction methods, which can be considered the basis of artificial insemination in horses, on the hormone concentration and artificial insemination pregnancy rate of mares.

For the purpose of synchronization of estrus in horses, Cidr-plus insertion method, Regumate feeding method, and 150mg progesterone + 10mg estradiol mixed administration method were used. In the Cidr-plus insertion method and the Regumate feeding method, the progesterone concentration reached the appropriate level for ovulation induction on the 8th day of administration. The mixed administration method of 150mg progesterone + 10mg estradiol maintained the progesterone concentration at an appropriate level immediately after administration. With the administration of PGF2a and hCG, progesterone concentration decreased rapidly, making ovulation induction possible. As a result of comparing the pregnancy rate between natural estrus and estrus synchronization, the pregnancy rate was found to be higher in estrus synchronization and ovulation induction. From the results of this study, it is insufficient to judge the effect of the pregnancy rate due to the small number of tests, but in terms of usability, estrus synchronization and ovulation induction were useful. Therefore, it is expected to contribute to improving the efficiency of future roadster production.

Key Words : Riding horse, Estrous synchronization, Hormone, Artificial insemination

Received Dec. 06. 2023
Revised Dec. 22. 2023
Accept Dec. 22. 2023

*Correspondence
Yong Soo Park
dvmpys@korea.kr



서론

가축 정자의 채취, 동결 및 수정 기술의 발달로 인공수정과 수정란이식을 비롯한 생명공학 기술이 다양한 가축에서 번식에 활용하고 있다. 말에서 정자의 이용 기술은 냉장 및 동결 체계에 관한 여러 연구를 통하여 최근에는 이용이 증가하고 있으며 결과 또한 안정적으로 보고 되고 있다 (Backman 등, 2004; Loomis와 Graham, 2008). 미국에서는 번식기의 암말 40만 4,000여 두 가운데 88%인 35만 5,000두가 인공수정을 이용하여 번식하였다(Loomis와 Graham, 2008). 그러나 국내에서 사육되고 있는 대부분 말이 경주용(터러브렛 종)으로 이들의 번식은 자연종배에 의존하고 있어, 인공번식에 필요한 정액채취, 정자 냉장과 동결 및 인공수정에 관한 기본 자료가 부족한 실정이다. 하지만 최근 레저 산업의 성장과 함께 승용마에 대한 요구가 증가하고 있어, 국외의 우수한 승용마의 도입이 요구되고 있으나, 비용 과다와 도입과정의 손상 등으로 어려움이 있다. 하지만 인공수정 또는 수정란이식 기술을 활용하면 우수한 유전능력을 가진 승용마를 단기간에 대량으로 생산하는 장점이 있다. 말 인공수정의 임신율은 약 85~90% 정도이나 다음 해 태어나는 망아지는 임신한 씨암말 대비 65~79% 정도에 불과한 것으로 알려져 있다.

말의 인공수정 및 수정란 이식의 효율성 향상을 위해서는 발정 동기화 기술의 개발과 안정화가 반드시 필요하다. 특히 말은 발정주기가 4~7일로서 배란 시기의 예측이 무엇보다 중요하다. 배란 유도 시점의 난포 크기는 4cm 이상, 인공수정 시점의 난포 크기는 5cm 이상이어야 임신이 가능하다(Park과 Cho, 2011). 특히 배란과 인공수정 시간이 매우 중요하며, 정자의 생존 시간을 고려하여 냉장 정액은 배란 전 48시간 이내, 동결정액은 배란 전후 6 또는 12시간에 인공수정을 권장하고 있다(Sieme 등, 2003; Bedford-Guaus, 2007). 배란 유도는 동결정액을 이용한 말의 인공수정에 반드시 필요한 방법으로, 발정기 암말은 난포의 성장주기에 따라서 hCG 또는 deslorelin으로 배란 유도가 가능하며 투여 후 36~42시간에 배란되는 비율이 94%이다 (Samper, 2008).

국내 말의 생산 체계와 관련하여 우량 승용마 생산을 위해서는 국외의 우수한 자원의 동결정액 또는 수정란을 도입하여 국내 실정에 맞게 개량, 증식하는 연구가 필요하며, 국산 기술개발을 위한 말 정액 동결 기술, 암말의 발정 및 배란 동기화 기술, 인공수정 임신율 향상 연구 및 망아지 육성체

계 개발에 대한 기초 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 말 인공수정의 기초라고 할 수 있는 발정/배란 동기화법이 호르몬 농도에 미치는 효과와 이후 임신율을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

씨수말

정액채취에 이용된 씨수말은 한국마사회 장수목장에서 사육 중인 승용 씨수말(웁블러드 종) 1두를 이용하였다. 씨수말은 2019년도 인공수정 사업에 공시된 씨수말 중에서 수태율이 양호하다고 판단되는 개체이다. 씨수말의 관리는 한국마사회 장수목장의 씨수말 일반관리 방법에 준하여 실시하였다.

정액채취

씨수말의 정액 채취는 발정 상태의 씨암말을 채취장 내의 격리 공간에 위치하여 씨수말의 성적흥분을 유도하였고, 충분히 생식기가 팽창되면 온수로 충분히 세척하여 이물질을 제거하였다. 씨수말을 의빈대에 승가를 허용하였고, 인공질에 생식기를 유도하여 채취하였다. 정액은 CSU type artificial vagina(ARS, Chino, CA, USA)에 필터가 장착된 채취병을 부착하여 채취하였다. 인공질(ARS, USA)에 48℃ 온수를 넣고, 내부에는 Non-spermicidal gel(Continental, USA)을 도포하여 보온을 유지하면서 준비하였다. 채취한 정액은 즉시 실험목적에 따라 EZ-mixin(ARS, USA) 또는 INRA96(INRA, French) 희석액으로 상온에서 정액과 1:1(v:v)로 희석하였고, 정자농도를 측정하였다. 최종 냉장 정액의 정장 함유 비율과 보존 방법은 실험 목적에 따라 최종 정자 농도는 100×10⁶/ml로 조정하였다.

발정 동기화 및 배란 동기화

발정 동기화에 이용된 방법은 Cidr-plus[®](1.9 g progesterone), Regumate[®] (oral progesterone), 150mg Progesterone+10mg Estrogen 혼합 주사이고, 배란 동기화에는 PGF2 α (Lutalyse[®]) 및 hCG(Daesung hCG[®])를 각각 제조사의 지시에 따라 사용하였다. Cidr-plus 을 암말의 질내에 삽입(Day 0)한 후 7~10일 후에 제

거하였다. 삽입 7일째부터 난소를 검사하여 황체가 형성되고 활성화된 난포의 존재가 확인되면 배란 동기화를 유도하였다. Regumate는 0.044mg/kg progesterone 용량으로 매일 사료에 혼합하여 9일간 급여하였다. 배란 동기화는 Cidr-plus[®]를 이용하여 발정 동기화를 시행하였고, 8일째에 제거하면서 각각 PGF2 α 또는 hCG를 주사하였다.

프로제스테론 농도 분석

채혈은 발정 동기화 0, 2, 4, 6, 8일에 각각 번식 말의 경정맥에서 헤파린이 처리되지 않은 진공관(Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 10mL씩 채취하여 상온에서 약 2시간 방치하여 혈액을 응고시킨 후에 3,000rpm으로 15분간 원심분리하여 순수 혈청만을 분리해서 분석 시까지 -80 $^{\circ}$ C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 프로제스테론과 에스트로젠 농도는 전문기관(서울의과학연구소, 대한민국)에 의뢰하여 분석하였다.

인공수정 및 임신진단

인공수정에 사용된 암말은 한국마사회 장수목장에서 사육 및 관리 중인 것으로 16두를 선정하여 자연발정과 발정 유도군으로 구분하여 인공수정 하였다. 발정 동기화는 cidr-plus[®]를 이용하였다. 인공수정은 발정 징후를 나타내는 씨

암말을 12시간 간격으로 난소의 크기를 측정하여 발정을 예측하였고, 정액은 냉장 정액을 이용하였다. 발정증상 확인 또는 발정유도 후 난포가 ≥ 3.5 cm에 도달하였을 때 24시간 간격으로 2회 인공수정을 하였다. 임신진단은 초음파(Honda, Japan)를 이용하여 수정 후 15일, 및 40일에 확인하였다.

통계처리

호르몬 농도는 Mean \pm SD로 나타냈으며 각각의 평균에 대한 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 분산 분석 후 Duncan's 다중검정을, 임신율은 χ^2 -test를 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

결 과

Cidr-plus[®]

Cidr-plus[®] 삽입 후의 프로제스테론 농도를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. cidr-plus[®] 삽입 직전에는 1.2 \pm 0.2ng/ml, 2일 3.6 \pm 1.3ng/ml, 4일 4.4 \pm 1.1ng/ml, 6일 8.0 \pm 2.3ng/ml 및 8일 8.9 \pm 2.1ng/ml로서 지속적으로 증가하는 경향이였다.

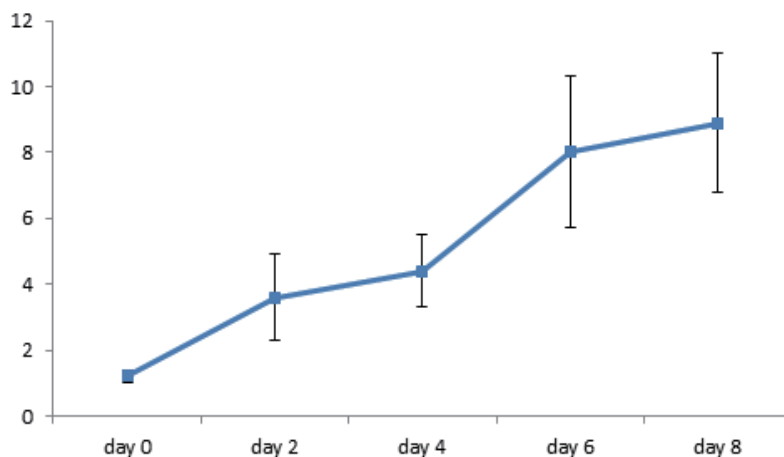


Fig. 1. Concentration of serum progesterone during Cidr-plus implant in mare

Regumate[®]

Regumate[®]는 투여 전, 투여 후 2일, 4일, 6일 및 8일에 각각 평균 0.04 \pm 0.01ng/ml, 0.03 \pm 0.01ng/ml, 1.59 \pm

0.7ng/ml, 8.84 \pm 1.8ng/ml 및 9.3 \pm 3.1ng/ml이었다 (Fig. 2).

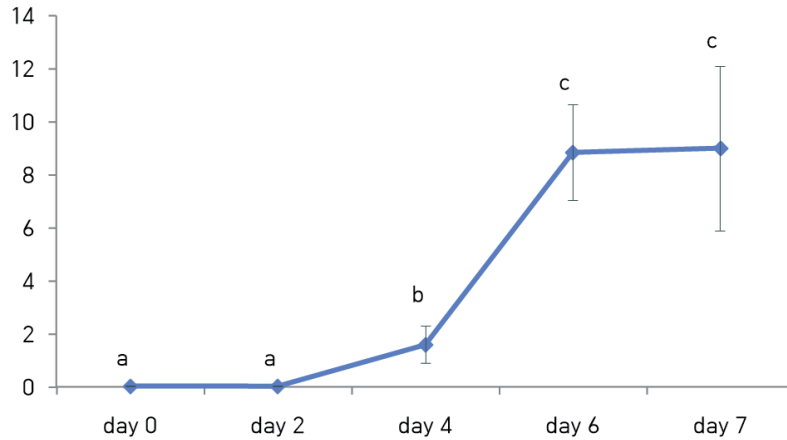


Fig. 2. Concentration of serum progesterone during supplementation of Regumate.^{a,b,c} Values in the same row with different superscripts are significantly different(p<0.05)

Progesterone과 Estrogen 공동 투여

150mg 프로제스테론+10mg 에스트라디올 혼합 주사를 이용하여 발정 동기화를 유도한 결과는 Fig. 3과 같다. 프로제스테론 농도가 직전부터 8일까지 각각 11.59±3.44ng/ml, 10.21±3.01ng/ml, 8.26±2.57ng/ml, 8.54±

1.98ng/ml, 8.84±1.52ng/ml였다. 프로제스테론과 에스트라디올 혼합제는 시판 중인 두 가지 호르몬을 오일에 용해하여 사용하는 것으로 사용 시 오일이 포함되므로 주사 후 근육 부위의 부종이 장기간 지속되는 단점이 발생되었다.

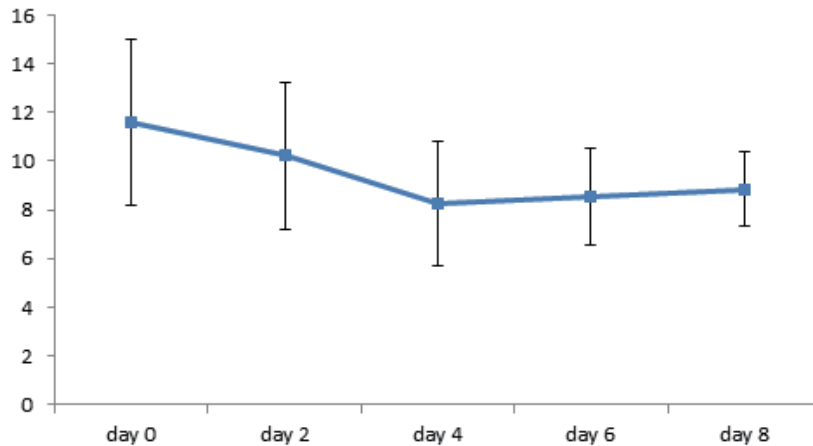


Fig. 3. Concentration of serum progesterone changes following co-administration of 150mg-progesterone and 10-mg estrogen

PGF_{2α} 투여

발정주기를 일치시킨 이후 PGF_{2α}를 이용하여 발정유도에 따른 혈중 프로제스테론 농도를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 투여 전, 1일~4일까지 각각 9.3±2.4ng/ml, 0.5±

0.3ng/ml, 0.3±0.1ng/ml, 0.2±0.1ng/ml, 0.3±0.1ng/ml였다. 혈중 프로제스테론 농도는 투여 시작부터 투여 후 1일에 급격히 감소한 후 낮은 농도를 나타냈다.

hCG 투여

발정주기를 일치시킨 이후 hCG를 이용하여 발정유도에 따른 혈중 프로제스테론 농도를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 투여 전, 1일~4일까지 각각 $7.2 \pm 1.9 \text{ng/ml}$, $1.15 \pm$

0.2ng/ml , $0.23 \pm 0.01 \text{ng/ml}$, $0.18 \pm 0.01 \text{ng/ml}$, $0.15 \pm 0.01 \text{ng/ml}$ 였다. 혈중 프로제스테론 농도는 투여 시작부터 투여 후 1일에 급격히 감소한 후 낮은 농도를 나타냈다. HCG 투여 후부터 48시간까지 초음파를 이용하여 난포 크기를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다.

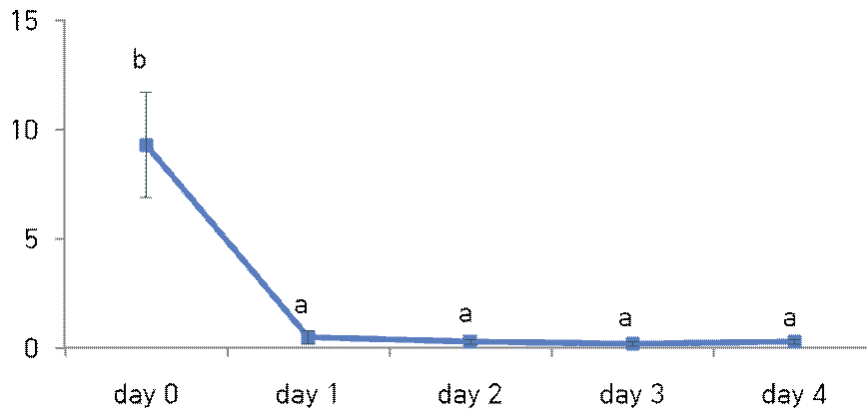


Fig. 4. Concentration of serum progesterone after PGF2α injection.

^{a,b} Values in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

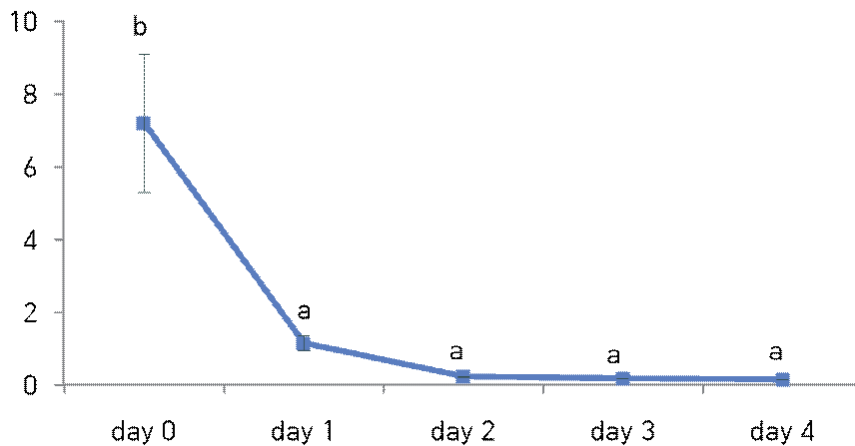


Fig. 5. Concentration of serum progesterone after hCG injection.

^{a,b} Values in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

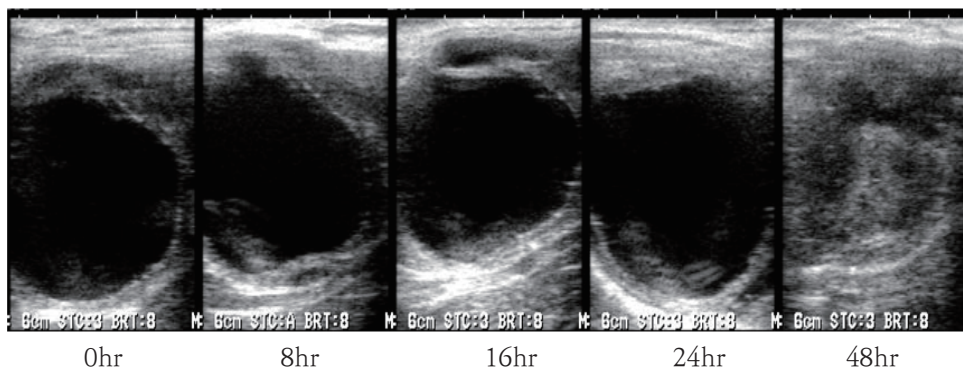


Fig. 6. Picture of follicles during ovulation synchronization using hCG. Ovulation is expected to occur between 24 and 48 hours.

임신율

배란 유도 처리가 암말의 임신율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 자연발정의 임신율이 25%였으나, 배란 유도로 임신율이 50%로 상승하는 경향이었으나, 유의차는 없었다. 추후 보다 많은 두수에 대한 추가 조사 필요할 것으로 생각된다.

고 찰

암말의 발정증상은 흥분하고 사료를 거부하며, 수말에 대하여 관심을 보이며 따라다니지만, 교배 허용 이전에는 수말의 접근을 허용하지 않는다. 시간이 경과함에 따라 수말에게 접근하여 승가를 유도하기도 하며, 꼬리를 들어 올리고 배노 자세를 취하며 오줌을 빈번하게 본다. 동시에 외음부가 개폐하면서 윙킹(winking)을 2~3초 주기로 반복하다가 수말의 승가를 허용하게 된다. 발정 지속시간은 개체, 계절, 영양 등 여러 조건에 따라 차이가 크다. 대부분 말은 발정기간이 4~8일이고 배란은 발정 종료 전 24~48시간 전에 일어난다. 정상적인 발정주기 상에는 다양한 크기의 난포가 존재하다가, 발정기가 다가오면서 1~2개의 우세난포가 발달하게 되고 그중 1개가 배란하게 된다. 말의 인공수정 및 수정란이식의 효율성 향상을 위해서는 발정 동기화 기술의 개발과 안정화가 반드시 필요하다. 특히 말은 발정주기가 4~7일로서 배란 시기의 예측이 무엇보다 중요하다. 본 연구에서 Cidr-plus 삽입법, Regumate 급여법 및 150mg 프로제스테론+10mg 에스트라디올 혼합 투여법을 이용한 발정 동기화 처리는 일정 수준 이상의 프로제스테론 농도를 유지하므로 배란 유도와 동시에 사용한다면, 말의 발정주기 조절에 효과적이었다(Fig 1, 2, 3). 하지만, 질내에 삽입하는 Cidr-plus는 인력과 사용이 간편하였으나 장기간 이물질의 삽입에 따른 질의 염증과 오염 원인이 되었고, 경구용 프로제스테론은 매일 일정한 시간에 일정량을 급여해야 하는 문제점이 있었고, 프로제스테론과 에스트라디올 혼합제는 주사 후 근육 부위의 부종이 장기간 지속되는 단점이 발생하였다. 이러한 장단점을 고려하여 농장별로 효과적인 발정 동기화법을 선정한다면 말의 번식에 효과적으로 이용 가능할 것이다.

임신율에 영향을 미치는 요인 중에서 배란과 인공수정 시간이 매우 중요하다. 정자의 생존 시간을 고려하여 냉장 정액은 배란 전 48시간 이내, 동결정액은 배란 전후 6 또는

Table 1. Effect of oral progesterone supplementation on pregnancy rates after artificial insemination

Ovulation	Heads	Pregnancy	%
Natural	8	2	25
Induced	8	4	50

12시간에 인공수정을 권장하고 있다(Sieme 등, 2003; Bedford-Guaus, 2007). 정확한 인공수정 시점을 판단하기 위하여 6-12시간 간격으로 직장검사 또는 초음파검사를 하여 난포의 크기를 측정하므로 배란 시기를 예측하여야 하지만, 노동력과 시간이 많이 소요되어 수행하기가 어려운 실정이므로, 호르몬에 의한 배란 시기 예측의 활용이 증가되고 있다(Sieme 등, 2003). 배란 유도는 동결정액을 이용한 말의 인공수정에 반드시 필요한 방법으로, 발정기 암말은 난포의 성장주기에 따라서 hCG 또는 PGF_{2α} 주사로 배란 유도가 가능하며 투여 후 36~42시간에 배란되는 비율이 94%이다(Samper, 2008). 호르몬에 의한 배란 유도를 동결정액 인공수정에 활용한 결과 사용한 정자수, 수정 회수 및 시간에 따른 차이는 있으나, 32시간째 1회 수정 임신율이 67%(Morris 등 2003), 24 및 40시간째 2회 수정 임신율이 46%(Barbacini 등, 2005), 배란 직후 임신율 45~47%(Barbacini 등, 2005; Metcalf, 2005; Hemberg 등, 2006)로 보고하였다. 배란 유도가 말의 인공수정 임신율에 효과가 있음이 보고되고 있다. 본 연구에서도 배란 동기화 처리로 프로제스테론 농도의 유의한 감소가 확인되었고(p<0.05)(Fig. 4, 5), 난포 검사에서도 난포의 성장과 파열이 관찰되어(Fig. 6) 배란이 유도되는 것으로 확인되었다.

국외 보고에서 인공수정 임신율은 자연종부는 80%~90%이고, 사용하는 정액의 상태에 따라 신선 정액(Fresh-diluted) 70%~80%, 냉장 운반(cooled-transported) 60%~70% 그리고 동결정액은 발정 주기당 32%~73% 및 번식 계절당 56%~89%로 보고하였다(Loomis, 2001; Vidament, 2005; Nielsen 등, 2008). 국내에서도 Park과 Cho(2011)가 인공수정 기초 조사에서 신선-희석(Cooled-diluted) 60%, 냉장운반 정액 50% 및 동결정액 37.5%의 임신율을 보고하였다. 말의 자연종부 시 1회 사정량이 30ml~150ml이지만, 냉장-운반 정액의 주입량은 20ml, 동결-용해 정액의 주입량은 2ml 정도로 자연종부에 비하여 인공수정에는 소량의 정액이 주입된다. 인공수정 시 주입하

는 정자수는 총 $200 \times 10^6 \sim 400 \times 10^6$ 개 정도면 임신율이 안정적으로 유지되며, 300×10^6 개 정도를 2회 인공수정에서도 임신율이 증가하였다(Vidament 등, 1997). 인공수정 임신율에 악영향을 미치는 요인으로는 1회 이상의 자궁내막 검사, 프로스타그란딘을 이용한 발정유도, 불완전한 발정증상, 정액 스트로우 수량, 수정전 액체의 저류이고, 인공수정 후 액체의 저류, 계절 및 월, 자궁 세척, 쌍자 임신 및 자궁 낭종은 임신에 영향이 없었다(Nielsen 등, 2008). 또한 씨수말과 암말의 상태도 영향을 끼치고, 씨수말의 25%만이 자연종부 및 냉장 정액과 비슷한 수준의 임신율을 나타내고, 암말의 나이, 사양관리와 발정상태에 따라 임신율에 차이가 있었다(Samper, 1995; Vidament 등, 1997; Nielsen 등, 2008). 하지만 인공수정 계절, 월, 자궁 세척 및 낭종은 임신에 영향이 없다고 하였다(Nielsen 등, 2008). 본 연구에서는 인공수정 시 활용 가치가 높은 발정유도를 통하여 50%의 임신율을 기록하여 앞으로 말의 인공수정에 활용도가 높을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Backman T, Bruemmer JE, Graham JK and Squires EL. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18hours and then frozen. *J. Anim. Sci.* 82:690-694.
2. Barbacini, S.; Loomis, P.; Squires, E.L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozenthawed spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 89, 203-235.
3. Bedford-Guaus SJ. 2007. Transported stallion semen and breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. *Clin. Tech. Equine Pract.* 6:239-248.
4. Hemberg, E.; Lundeheim, N.; Einarsson, S. Successful timing of ovulation using deslorelin (Ovuplant) is labour-saving in mares aimed for single AI with frozen semen. *Reprod. Domest. Anim.* 2006, 41, 535-537.
5. Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68:191-200.
6. Loomis PR and Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105:119-128.
7. Metcalf, E.S. Optimizing pregnancy rates using frozenthawed equine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 89, 209-212.
8. Morris, L.H.; Tiplady, C.; Allen, W.R. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozenthawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine. Vet. J.* 2003, 35, 197-201.
9. Nielsen JM, Kofoed Bock TS and Ersbøll AK. 2008. Factors associated with fertility in horse in a Danish equine practice after artificial insemination with frozen-thawed semen. *Anim. Reprod. Sci. Suppl.* 107:336-337.
10. Park yong-soo and Cho gil-jae. 2011. Factors affecting on the motility of semen and the pregnancy rate of artificial insemination in equine. *J. Emb. Trans.* 26:15-19.
11. Samper JC. 1995. Stallion semen cryopreservation: factors affecting pregnancy rates. *Proc. Soc. Theriogenology* 160-165.
12. Samper JC. 2008. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology* 70:445-447.
13. Sieme H, Schafer T, Stout TA, Klug E and Waberski D. 2003. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* 60:1153-1164.
14. Vidament M. 2005. French field results(1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 89:115-136.
15. Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P and Palmer E. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility results. *Theriogenology* 48:907-917.