



HORMONÁLNA A AKUPUNKTÚRNA SYNCHRONIZÁCIA RUJE ANESTRICKÝCH BAHNÍC

Hormonal and acupuncture synchronisation in anestrus ewes

J. HALAGAN, I. MARAČEK, A. STANÍKOVÁ

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT

The simple acupuncture needles have been used for the purpose of activating the ovary in anoestrous ewes. The experimental population comprised of 15 of the three year-old ewes after regular weaning of lambs (in middle part of May). The animals were allocated into three groups. In first group (control group – K) comprised of untreated animals. In the second group (group H) the ewes were treated with 20 mg chlorsuperlutine vaginal sponges. The third group (group A) was provided with the acupuncture treatment. Acupuncture treatment procedure consisted of needling of two pairs of active points of Bladder Meridian (BL 21 and BL 22), and single Governing Vessel point (GV 20b). Each treatment lasted for 15 to 20 minutes. Stimulation by inserting the needle has been carried out by contra dial rotation of insertion needle. The needling procedure has been repeated three-times in 48 h intervals. The stimulatory effect of the treatment was evaluated according to morphological changes of the ovary found out by laparotomy (ovulation rate, number of tertiary follicles) and according to peripheral blood plasma concentrations of 17 beta estradiol and progesterone on the 5th day after the last acupuncture procedure or withdrawal of sponges. A significant increase in the ovarian follicular activity after acupuncture stimulation has been observed in anoestrous ewes in comparison to the untreated ewes (40% follicle ovulation effect and 43% follicle growing effect, respectively), but not in the same range as was found in case of hormonally synchronized ewes (60% follicle ovulation effect and 67% of follicle growing effect, respectively). Similar increase in the levels of plasma estradiol and progesterone has been recorded in the acupuncture stimulated group in comparison to untreated ewes (7.8 : 21.0 pg.ml⁻¹ with respect to 0.65 : 1.04 ng.ml⁻¹). Preliminary results support the idea of involving the traditional Chinese medicine treatment in sheep reproduction if treatments are to be performed and evaluated individually on a case by case basis. Two theoretical approaches (Chinese and Western) to explain the needling acupuncture effects were discussed.

Key words: acupuncture, synchronization, oestrus, ovulation, ovary, estradiol, progesterone

ÚVOD

U dospelých bahníc je fyziologicky normálna pohlavná aktivita pravidelne jedenkrát v roku vystriedaná obdobím pohlavného pokoja – anestrom. V našich klimatických podmienkach sa obdobie anestru začína v marci a končí v auguste. Základnými ukazovateľmi subminimálnej aktivity vaječníkov bahníc počas anestruckej periódy je absencia sexuálnej aktivity, preovulačných antrálnych folikulov, rozvíjajúceho sa alebo aktívneho žltého telieska na vaječníkoch a

minimálne hladiny periférnych ovariálnych hormónov. Kľúčom prechodu estrickej do anestruckej sezónnej periódy je epifýza, ktorá cez svetelný signál a vegetatívnu nervovú sústavu brzdí alebo aktivuje hypotalamus. Z doposiaľ publikovaných prameňov vyplýva, že efektívna manipulácia so sezónnosťou bahníc je možná použitím jednej alebo kombináciou nasledovných metód:

- úprava výživy,
- svetelný režim,
- použitie hormónov (melatonín, gestagény, gonadotropíny, gonadoliberíny a prostaglandín).

Correspondence: E-mail: halagan@uvm.sk

V ostatných desaťročiach sa začali objavovať správy o pokusoch využitia priamej alebo nepriamej intervencie funkcií vaječníkov bahnic a prasníc cez vegetatívnu nervovú sústavu (Goodman a kol., 1996; Jana a kol., 2005; Jaroszewski a Kotwica, 1992). Otázky biológie, fyziológie a najmä patológie reprodukčných procesov samíc hospodárskych zvierat (najmä kobýl a kráv) sú celé storočia centrom záujmu aj čínskej tradičnej medicíny aj vo veterinárnej praxi.

Cieľom predloženej práce bolo predbežne preskúmať, overiť a v experimentálnych podmienkach potvrdiť alebo vyvrátiť:

- možnosť dosiahnutia pozitívnej funkčnej a morfolologickej odpovede vaječníkov bahnic cez akupunktúrne body povrchu tela, ktoré podľa literárnych údajov ovplyvňujú pohlavný trakt,
- indukovať estrus u acyklických bahnic v anestre pomocou jednoduchého akupunktúrneho ošetrenia,
- overiť možnosť použitia jednoduchej akupunktúry na ovulačnú aktivitu vaječníkov bez hormonálnej stimulácie pre účel synchronizácie ruje.

MATERIÁL A METÓDA

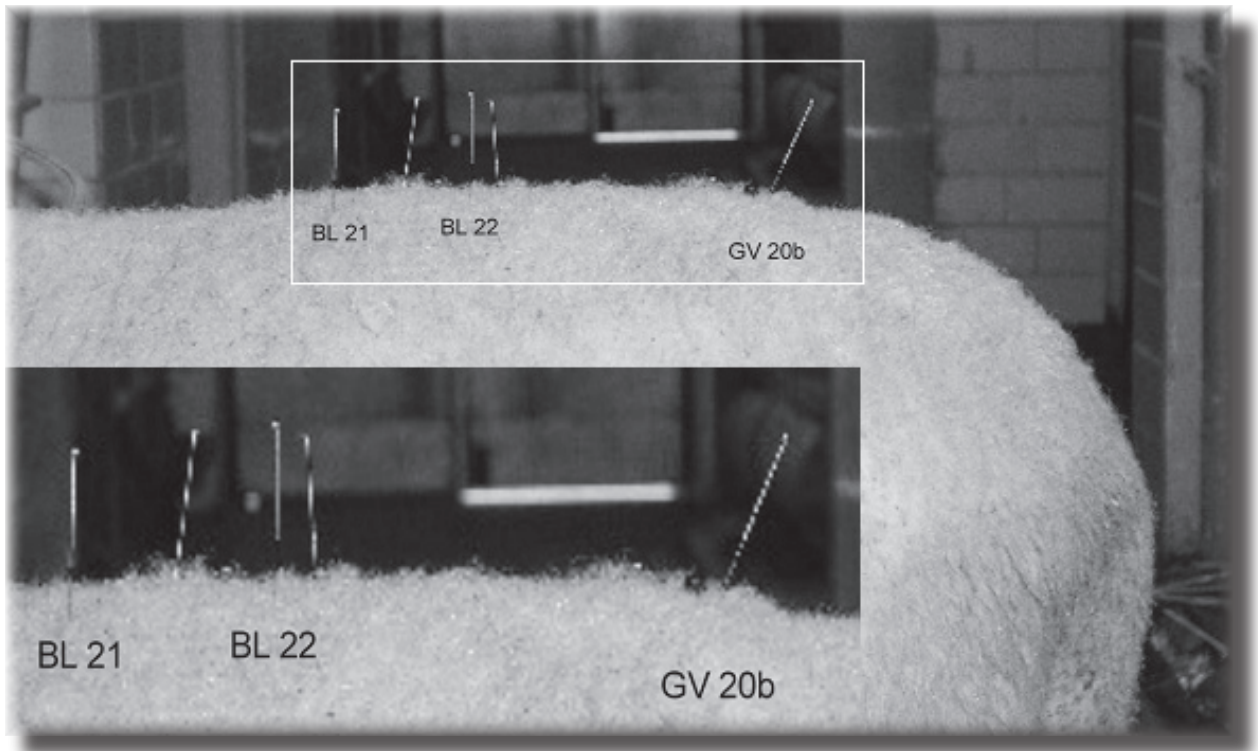
Pokus sme uskutočnili na pätnástich trojročných bahniciach plemena slovenské merino. Vybraté a klinicky otestované bahnice sme rozdelili do troch skupín (v každej po päť zvierat) nasledovne:

K - neošetrené bahnice(kontrolná skupina) .

H - skupina synchronizovaná 12 dní pošvovými hubkami obsahujúcimi 20 mg chlórsuperlutínu (chlormadinon acetát).

A - skupina podrobená trom akupunktúrnym procedúram špeciálnymi akupunktúrnymi ihlami. Tieto sa zaviedli do podkožia a svalstva v akupunktúrnych bodoch BL 21 a BL 22, ktoré predstavujú meridián močového mechúra a do bodu Bai Hui GV 20b (obr.1). Pri zavádzaní ihiel sme sa topograficky riadili podľa údajov atlasu akupunktúrnych bodov pre prežúvavce (Kothbauer a Vanengelenburg, 1994).

Ihlovú akupunktúrnú procedúru (needling) sme pri každej ovci robili stimuláciou piatich bodov naraz. Dĺžka stimulácie (točenie ihiel v smere hodinových ručičiek



Obr. 1: Topografická lokalizácia akupunktúrnych bodov BL 21, BL 22 (paravertebrálne medzi prvým a druhým resp. druhým a tretím bedrovým stavcom) a bodu GV 20b (tzv. Bai Hui mediálna línia medzi posledným bedrovým stavcom a krížnou kosťou)

Fig. 1: The topographic localization of acupuncture points BL 21, BL 22 (paravertebrally between the 1st and the second and/or between the 2nd and the 3rd lumbar vertebra) and of point GV 20b (so called Bai Hui, in medial line between the last lumbar vertebra and sacrum)

prstami holej ruky) trvala pri prvej procedúre 15 minút, pri ďalších dvoch procedúrach po 20 minút. Celý postup sme opakovali 3-krát s jednodennými pauzami.

Výskyt ruje sme pri všetkých bahniciach testovali trikrát denne vazektomovaným baranom. Na piaty deň po ukončení akupunktúrnych procedúr, alebo vybratí vaginálnych hubiek sme od pokusných oviec excidovali vaječníky. Po laparotómii sme makroskopicky hodnotili ich veľkosť vaječníkov, počet prominujúcich, veľkých a rastúcich preovulačných folikulov a aj počet čerstvých žltých teliesok, resp. počet ovulačných bodov. Po histologickom spracovaní a zafarbení vaječníkov sme mikroskopickou analýzou hodnotili aj atretické zmeny folikulárneho aparátu.

Zmeny koncentrácií estradiolu a progesterónu v krvnej plazme sme hodnotili rádioimunologicky pomocou súprav RIA estradiol a RIA progesterón (firma Immunotech Sa, Beckman Coulter Company, Marseille Cedex, France). Koncentrácie progesterónu sme určovali priamo z plazmy, koncentrácie estradiolu z 1 ml plazmatických extraktov éterom. Všetky získané údaje a parametre sme štatisticky hodnotili Studentovým t- testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Sumárne výsledky uvádzame v tabuľkách. Príznačky ruje sme počas celého sledovaného obdobia zaznamenali iba v druhej, hormonálne synchronizovanej

Tabuľka 1: Aktivita vaječníkov bahnic po hormonálnej a akupunktúrnej stimulácii na 5. deň po vybratí hubiek alebo akupunktúrnej stimulácii

Table 1: Ovarian activity of ewes after hormonal or acupuncture stimulation on the 5th day after withdrawal of sponges or last acupuncture procedure

¹ Ukazovateľ	¹⁴ Skupina bahnic									xP H:A
	K (n=5)			H (n=5)			A (n=5)			
	px	x	%	px	x	%	px	x	%	
² príznačky ruje	-	-	-	2	-	40	-	-	-	
³ počet ovulácií	-	-	-	3	-	60	2	-	40	
⁴ váha vaječníka		720			840			811		
⁵ objem vaječníka		790			885			862		
⁶ počet pre. fol.		5			50			31		**
⁸ prom.	-	-	-	8	0,8	16	3	0,3	10	**
⁹ terc.v.	-	-	-	24	2,4	48	13	1,3	41	*
⁷ preov. fol.										
¹⁰ terc. rast.	4	0,4	90	12	1,2	24	7	0,7	23	*
¹¹ terc. atret.	-	-	-	4	0,4	8	3	0,3	10	
¹² terc. atret. rast.	1	0,1	10	2	0,2	4	5	0,5	16	
¹³ plaz. k. (lap.d.)	E2	7,80 ± 0,60		21,00 ± 4,60		11,20 ± 6,20				*
	P4	0,65 ± 0,02		1,75 ± 0,03		1,04 ± 0,03				*

n – počet bahnic

px – počet folikulov resp. zvierat

x – priemerný počet folikulov na vaječník

% - percentuálne zastúpenie jednotlivých skupín folikulov k počtu preovulačných folikulov

xP – rozdiel v priemernom počte preovulačných folikulov medzi skupinami H:A preukazných na hladine * P<0,05; ** P<0,01

preov. fol. – preovulačné folikuly

prom. – prominujúce veľké folikuly

terc.v. – terciárne veľké folikuly => 5 mm

terc. rast. – terciárne rastúce folikuly < 5 mm

terc. atret. – terciárne veľké atretické folikuly

terc. atret. rast. – terciárne atretické rastúce folikuly

plaz. k. lap. d. – plazmatická koncentrácia v deň laparotómie

E2 – estradiol (pg.ml⁻¹)

P4 – progesterón (ng.ml⁻¹)

¹parameter, ²oestrus demonstration, ³number of ovulation, ⁴mean ovary weight (mg), ⁵mean ovary volume (ml), ⁶number of prominated follicles,

⁷total number of preovulatory follicles, ⁸prominated follicles, ⁹tertiary follicles > 5 mm, ¹⁰growing follicles < 5 mm, ¹¹tertiary atretic follicles > 5

mm, ¹²tertiary atretic follicles < 5 mm, ¹³mean plasma concentration of oestradiol (E2, pg.ml⁻¹) and progesterone (P4, ng.ml⁻¹) on laparotomy day,

¹⁴the group of ewes, K – untreated animals, H – hormonally treated animals, A – acupuncture treated animals, n – the number of animals

skupine, v ktorej plnohodnotnú ruju vykázali dve z piatich bahnic (40%-ný synchronizačný efekt). V prvej a tretej skupine sme nezistili žiadne príznaky ruje.

Vaječníky kontrolných bahnic vykazovali všetky príznaky hlbokého anestrú teda boli malé s hladkým povrchom bez prominujúcich folikulov alebo žltého telieska a nejavili príznaky ovulácie. Vo vaječníkoch hormonálne synchronizovaných bahnic sme zistili priemerne 4,8 preovulačných folikulov s 0,3 ovulačným indexom na vaječník. Ovulácie folikulov boli sprevádzané histologicky potvrdenou luteinizáciou v plnom rozsahu charakteristickým pre rozvinuté a funkčne žlté telieska. Podobne ako u hormonálne stimulovanej skupine bahnic aj pri akupunktúrne ošetrených bahniciach sme na vaječníkoch zistili prominujúce neovulované folikuly a čerstvé ovulácie. Avšak hodnoty obidvoch uvedených ukazovateľov boli výrazne nižšie (3,2 resp. 0,2 na vaječník). Histologickou analýzou ovulovaných folikulov pri tejto skupine sme zistili plne rozvinutú luteinizáciu iba u dvoch zo štyroch prominujúcich preovulačných folikulov. Okrem toho, prevažná časť neovulovaných

folikulov nejavila známky zreteľného intenzívneho prekrvenia folikulárnych štruktúr.

Zmeny koncentrácií estradiolu a progesterónu v krvnej plazme bahnic pred a počas experimentu uvádzame v tabuľke 2. Zatiaľ, čo hladiny oboch hormónov vaječníkov v skupine intaktných bahnic zostali počas celej doby sledovania nemenné, bahnice hormonálne a akupunktúrne ošetrené vykázali štatisticky významný nárast koncentrácií estradiolu a progesterónu ku koncu sledovaného obdobia (17. deň – deň laparotómie), čo potvrdzuje stimulačný účinok ako hormónu, tak i akupunktúry, na folikulárny aparát vaječníkov. Priemerné hladiny progesterónu u akupunktúrne ošetrených bahnic sú však signifikantne nižšie ako u bahnic stimulovaných hormonálne.

Nakoľko v dostupnej odbornej literatúre nie sú zatiaľ publikované výsledky o použití akupunktúrnej techniky na synchronizáciu ruje u oviec, nemôžeme naše výsledky priamo konfrontovať s inými autormi. Podľa Kothbauera a Van Engelenburga (1994) však stimuláciou aktívnych bodov močového mechúra možno ovplyvniť

Tabuľka 2: Zmeny koncentrácia estradiolu a progesterónu v krvnej plazme bahnic počas experimentu
Table 2: Changes in concentrations of oestradiol and progesterone in peripheral blood plasma in the ewes during the course of experimental investigation

¹ Hormón	² Skupina	³ Deň experimentu							
		0	2	4	6	8	12	17+	
⁴ E2 (pg.ml ⁻¹) plazmy	K	\bar{x}	6,9	7,3	7,1	7,4	7,6	7,5	7,8
		SD	1,30	0,58	1,03	0,83	0,40	0,56	0,60
	H	\bar{x}	7,2	7,9	7,4	8,6	8,9	9,1	21,0
		SD	1,10	2,10	1,80	1,60	1,90	3,20	4,60
	A	\bar{x}	7,6	6,7	5,7	6,2	7,7	7,8	11,2
		SD	0,66	1,55	1,01	0,63	1,07	1,95	6,50
	⁶ P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	K:H *	K:H**
	⁵ P4 (ng.ml ⁻¹) plazmy	K	\bar{x}	0,54	0,48	0,50	0,50	0,54	0,60
SD			0,14	0,10	0,15	0,11	0,11	0,08	0,09
H		\bar{x}	0,58	0,61	0,60	0,49	0,52	0,64	2,45
		SD	0,11	0,12	0,13	0,09	0,10	0,12	0,31
A		\bar{x}	0,66	0,70	0,72	0,74	0,77	0,78	1,04
		SD	0,09	0,11	0,08	0,09	0,10	0,07	0,45
P			>0,05	K:A *	>0,05	K:A*	>0,05	>0,05	K:H** K:A*

E2 – estradiol

P4 – progesterón

(+) – deň laparotómie

\bar{x} – priemerné hodnoty - mean value

SD – smerodajná odchýlka - standard deviation

P – hladina štatistickej preukaznosti zmien, * P<0,05, ** P<0,01

¹hormone, ²the group, ³day of experiment, ⁴oestradiol (pg.ml⁻¹), ⁵progesterone (ng.ml⁻¹), ⁶level of the statistically significant difference, 17+ - day of laparotomy

ovulačný cyklus kráv. Títo autori získali pozitívne výsledky u kráv po stimulácii aktívnych bodov BL 22 až 24, GV 26 pri nepravidelných estrálnych cykloch a pozitívny účinok Yan Chi a BL 30 pri superovulačných pokusoch. U bahnic sa zdá byť efektívna kombinácia bodov meridiánu močového mechúra (BL) a tzv. zadnej centrálnej dráhy (GV), Lin a kol. (1998). Po porovnaní prezentovaných výsledkov stimulácie vaječníkov (vyjadrenej ovulačným indexom) po akupunktúrnym ošetrení s výsledkami synchronizácie a ovariálnej stimulácie syntetickým gestagénom konštatujeme potvrdenie vyrovnania biologického efektu akupunktúry a použitia gestagénu alebo GnRH zaznamenaných v podobných podmienkach Linom a kol. (1998).

Nami dosiahnutý pozitívny účinok akupunktúry na aktivitu vaječníkov môže byť hodnotený z dvoch základných aspektov. Z pohľadu princípov a učenia tradičnej čínskej medicíny, stimuláciou akupunktúrnych bodov na povrchu tela aktivujeme alebo prerušíme prúdenie energie „Qi“ v jednotlivých meridiánoch (Limehouse a Taylor, 1994). Účinok akupunktúrnej stimulácie sa však dá interpretovať a čiastočne vysvetliť aj možným nepriamym účinkom akupunktúrneho zásahu na vaječníky cez ovplyvnenie systémového endomorfného neuroendokrinného systému v hypotalamo-hypofyzárnych štruktúrach (Chen, 1997; Lin a kol., 1998; Marossy a Arendarčík, 1974). Inou možnou cestou účinku by mohli byť aktivovanie centrálného a periférneho epinefrického a cholinergického autonómneho systému, lokálnej sympatikovej a parasympatikovej inervácie vaječníkov a centrálného katechol-estrogénneho systému (Lara a kol., 1993; Stener-Victorin a kol., 20000).

V modernom ponímaní a takzvanej „západnej“ interpretácii akupunktúry by sme naše výsledky mohli interpretovať kombináciou princípu „jin-jan“ ako synergických regulačných tendencií funkčného krvného zásobovania a podpory vaječníkov a maternice. Z uvedeného hľadiska adrenergický systém predstavuje aktivačné regulačné mechanizmy „jin“ a cholinergný systém „jan“ zasa deaktivované mechanizmy. Krava, ovca, mačka a morča patria do skupiny samíc s bohatou adrenergickou inerváciou vaječníkov (jin).

Problematickou a doteraz nevysvetlenou otázkou zostáva frekvencovaný počet výskytu tzv. neplnohodnotných ovulácií bez typických príznakov ruje s nedostatočne rozvinutým procesom postovulačnej luteinizácie buniek zrnitej vrstvy folikulu po akupunktúrnej procedúre. Absencia príznakov ruje u bahnic s pozitívnou ovulačnou odozvou a typickým zvýšením koncentrácie estradiolu odporuje klasickej fyziologickej predstave o endokrinných mechanizmoch regulujúcich pohlavné správanie malých prežúvavcov. Z tohto pohľadu samotné akupunktúrne ošetrenie sa zdá byť účinnou ale z hľadiska reprodukčnej fyziológie neplnohodnotnou technikou synchronizácie ruje u bahnic.

Pre relatívne malý počet použitých jedincov môžeme získané výsledky považovať za predbežné. Riešenie uvedenej problematiky si žiada hlbšie a širšie štúdium.

ZÁVER

Zo získaných výsledkov vyplýva, že v individuálnych prípadoch (pri zabezpečení optimálnej výživy a starostlivosti o bahnice plemena merino) je možné na ovplyvnenie funkcie vaječníkov bahnic použiť techniku akupunktúry cez stimuláciu akupunktúrnych bodov BL 21, BL 22 a GV 20 b. Dĺžka stimulácie (15-20) minút pri troch opakovaní procedúr (s jednoduchými prestávkami) je pri prevedení lege artis postačujúca na pozitívne ovplyvnenie funkcií zdravých, fyziologicky normálne funkčných vaječníkov bahnic v anestrickom období.

Napriek pozitívnej ovulačnej odozve považujeme akupunktúrnú stimuláciu vaječníkov kvôli chýbaniu príznakov plnohodnotnej ruje a neúplnej postovulačnej luteinizácii za fyziologicky neplnohodnotnú.

LITERATÚRA

- CHEN, B. I. 1997. Acupuncture normalizes dysfunction of hypothalamic pituitary ovarian axis. In: *Acupuncture Electrother. Res.*, Vol. 22; 1997, No.2, p. 97-107.
- GOODMAN, R. L. – HAVERN, R. L. – WHISNANT, C. S. 1996. Alpha - adrenergic neurons inhibit luteinizing hormone pulse amplitude in breeding season ewes. In: *Biol. of Reprod.*, Vol. 54, 1996, p. 380-386.
- JANA, B. – DZIENIS, A. – PANCZYSSZYN, J. – ROGOZINSKA, A. – WOJTKIEWICZ, J. – SKOBOWIAT, C. – MAJEWSKI, M. 2005. Denervation of the porcine ovaries performed during early luteal phase in influenced morphology and function of the gonad. In: *Reprod. Biol.*, Vol. 5, 2005, No. 1 p. 69-82.
- JAROSZEWSKI, J. – KOTWICA, J. 1992. Influence of adrenergic innervation of the ovary on its secretory function. In: *Med. Weter*, Vol. 48, 1992, p. 134-138.
- KOTHBAUER, O. – VANENGELENBURG, G. D. 1994. Acupuncture in cattle. In: Scheon: *Veterinary acupuncture*. Mosby: New York, USA, 1994, p. 635-655. ISBN 0-39674-51-3.
- LARA, H. H. – FERRUZ, J. L. – LUZA, S. – BUSTAMANTE, BORGES, Y. – OJEDA, S. R. 1993. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. In: *Endocrinology*, Vol. 133, 1993, p. 2690-2695.
- LIMEHOUSE, J. B. – TAYLOR, P. A. 1994. Oriental concepts of acupuncture. In: Scheon: *Veterinary Acupuncture*, Mosby: New York, USA, 1994, p. 55-74, ISBN 0-939674-51-3.
- LIN, J. H. – LIU, S. H. – CHAN, W. W. – WU, L. S. – PI, W. P. 1988. Effects of electroacupuncture and gonadotropin-releasing hormone treatments on hormonal changes in

- anoestrous sows. In: *Amer. J. Chin. Med.*, Vol. 16, 1988, p. 117-126.
- MAROSSY, A. – ARENDARČÍK, J. 1974. Vplyv LH-RH, L-DOPA a hypofyzárneho extraktu ošípaných deleného na Sephadex G-25 na hladinu FSH a LH v krvnom sére anestrálnych oviec. In: *Čsl. Fysiol.*, roč. 23, 1974, s. 266-267.
- STENER-VICTORIN, E. – LUNDEBERG, T. – WALDESTROM, U. – MANNINI, L. – ALOE, L. – GUNNARSSON, S. – ANSON, P. O. 2000. Effects of electroacupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. In: *Biol. Reprod.*, Vol. 63, No. 5, 2000, p. 1497-1503.

Adresa autorov: Doc. MVDr. Juraj Halagan, PhD., Prof. MVDr. Imrich Maraček, DrSc., Doc. RNDr. Angela Staniková, PhD, Ústav fyziológie Katedry normálnej anatómie, histológie a fyziológie, UVL, Komenského 73, 041 81 Košice.