

การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนในอุจจาระเพื่อประเมินแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของ ฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนในกลุ่มละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่าเพศเมีย

Use of Fecal hormones assays for evaluating progesterone patterns in Females *Cervus eldi siamensis* and *Cervus eldi thamin*.

ชัยณรงค์ ปั่นคง สุทธิลักษณ์ มีวีระสม และ นิตยา เพชรสุกร

Chainarong Punkong, Sutttiluck Meeveerasom and Nittaya Petsukorn

งานวิจัย ฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยและสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนในอุจจาระเพื่อประเมินแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน (*Progesterone*) ในกลุ่มละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่าเพศเมีย พบการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนที่แสดงถึงวงจรการทำงานของรังไข่ (*ovarian cyclicity*) โดยในละมั่งพันธุ์ไทย มีระยะวงรอบการเป็นสัด (*estrous cycle*) นานเฉลี่ย 21.64 ± 1.83 วัน (\pm SEM, พิสัย 12-32 วัน; $n=11$ cycles) มีค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (*baseline concentration*) ของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน เฉลี่ยเท่ากับ 298.91 ± 11.99 ng/g of dry feces ทั้งนี้ค่าปริมาณฮอร์โมนที่แสดงถึงระยะ luteal phase มีค่าอยู่ระหว่าง 448 ถึงกว่า 3,000 ng/g สูงสุดที่ 3,112 ng/g of dry feces และช่วงระยะเวลาที่เป็น follicular phase นาน 5-9 วัน มีระยะเป็นสัดนาน 1-2 วัน

ในละมั่งพันธุ์พม่า พบว่า มีวงรอบการเป็นสัดนานเฉลี่ย 20.75 ± 1.13 วัน (\pm SEM, พิสัย 14-30 วัน; $n=20$ cycles) ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐานในตัวที่ไม่ตั้งท้อง เฉลี่ยเท่ากับ 172.0 ± 28.09 ng/g of dry feces และความเข้มข้นของฮอร์โมนในระยะ luteal phase มีค่าอยู่ระหว่าง 258.96 ถึง 1,840 ng/g of dry feces และจากการศึกษาละมั่งพันธุ์พม่ามีการตั้งท้องจำนวน 3 ตัว ในจำนวนนี้เป็นละมั่งที่ตั้งท้องสมบูรณ์ได้ลูกตามปกติ 1 ตัวและตั้งท้องไม่สมบูรณ์ 2 ตัว มีระยะเวลาดังตั้งท้องปกติ 34 สัปดาห์ โดยในช่วงสัปดาห์แรกๆ จะมีปริมาณฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนอยู่ที่ระดับประมาณ 400-1,000 ng/g และสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างเห็นได้ชัด (โดยเฉพาะในช่วง 23 สัปดาห์สุดท้ายก่อนคลอด) ทั้งนี้พบว่าในช่วงสัปดาห์ท้ายๆ ปริมาณฮอร์โมนที่พบในละมั่งพันธุ์พม่าที่ตั้งท้องจะสูงได้ถึง 14,720 ng/g of dry feces และจะลดต่ำลงในช่วงสุดท้ายของการตั้งท้อง ซึ่งจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนในช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ดังกล่าว มีเป้าประสงค์ที่สำคัญต่อการนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงสำหรับการวางแผนบริหารจัดการการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ (*breeding management plan*) ด้วยการประยุกต์ใช้เทคนิคต่างๆ ได้อย่างเหมาะสมมากยิ่งขึ้นในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: ละมั่งพันธุ์ไทย ละมั่งพันธุ์พม่า ค่าความเข้มข้นพื้นฐาน ฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน ระยะการตั้งท้องของละมั่ง

Abstract

The fecal hormones assays for evaluating progesterone patterns in females *Cervus eldi siamensis* and *Cervus eldi thamin* were found that all of studying females have an evidence of ovarian cyclicity. The average estrous cycle length for all *Cervus eldi siamensis* was 21.64 ± 1.83 days (\pm SEM, range 12-32 days; $n=11$ cycles). Overall baseline concentrations of fecal progesterone averaged 298.91 ± 11.99 ng/g. In the luteal phase, concentrations ranging from approximately 448 to 3,000 ng/g with peak concentrations reaching as high as 3,112 ng/g. The follicular phases (i.e., when progesterone concentrations were at baseline) generally lasted 5-9 days, behavioral estrus were approximately 24-48 h duration.

The average estrous cycle length for all *Cervus eldi thamin* was 20.75±1.13 days (±SEM, range 14-30 days; n=20 cycles). Overall baseline concentrations of fecal progesterone averaged 172.0±28.09 ng/g. In the luteal phase, concentrations ranging from approximately 258.96 to 1,840 ng/g. One complete and two partial pregnancies were monitored during the study. This Gestation duration was 34 wk with fecal progesterone concentrations remained at 400-1,000 ng/g for the first several weeks, then increased markedly during pregnancy (especially the last 23 wk) with peak concentrations reaching as high as 14,720 ng/g before an abrupt decline coincided with parturition. Finally, from study of fecal progesterone variation in breeding season by determination reproductive status (ovarian activity, estrous cycle, baseline concentrations and pregnancy diagnosis) has contained an important purpose for data base requirement to breeding management plan by assisted reproductive technologies to be appropriate.

Keywords: *Cervus eldi siamensis*, *Cervus eldi thamin*, baseline concentrations, progesterone, Gestation duration of Eld's deer.

1. บทนำ

ละมั่งจัดเป็นสัตว์ป่าสงวน 1 ใน 15 ชนิดตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และมีสถานะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่าจึงเป็นสัตว์อีกกลุ่มหนึ่งที่จัดว่ามีความสำคัญต่อองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ที่ดำเนินงานทางด้านการศึกษาเพื่ออนุรักษ์และคงความหลากหลายทางชีวภาพ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประชากรของละมั่งในธรรมชาติลดน้อยลงจนใกล้สูญพันธุ์นั้นมาจากการถูกล่า และผืนป่าอันเป็นที่อยู่อาศัยถูกทำลายไป ด้วยเหตุเหล่านี้ทำให้ประชากรละมั่งในป่าธรรมชาติลดน้อยลง กระจุกกระจายอยู่เป็นกลุ่มเล็กๆ จนไม่สามารถแพร่ขยายพันธุ์ให้เป็นปรกติตามธรรมชาติได้ ปัจจุบันจึงมีการนำละมั่งมาเพาะขยายพันธุ์ภายในสวนสัตว์และหน่วยงานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าของกรมป่าไม้ ซึ่งโดยทั่วไปในการบริหารจัดการสัตว์ในสวนสัตว์นั้น มักพบปัญหาว่าสัตว์ในกรงเลี้ยงบางชนิดไม่สามารถตั้งท้องและให้ลูกได้ หรือบางชนิด บางกลุ่มประชากรก็อาจพบว่ามีกรตั้งท้องและตกลูกได้ง่ายจนเกิดภาวะประชากรมากเกินไป (over population) ทั้งนี้เนื่องจากการที่ไม่สามารถดำเนินการทางด้านโปรแกรมการเพาะขยายพันธุ์ (breeding program) ได้อย่างเหมาะสมเพียงพอเนื่องจากขาดข้อมูลสนับสนุนที่เกี่ยวกับสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์นั้นๆ โดยเฉพาะในเรื่องของวงจรการสืบพันธุ์ อาทิวงจรการเป็นสัด (estrous cycle) ความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมนต่างๆ และระยะการตั้งท้อง ซึ่งการดำเนินการทางด้านฮอร์โมนนั้นคือการทำความเข้าใจเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ในสัตว์ เพราะฮอร์โมนคือปัจจัยในการขับเคลื่อนสู่กระบวนการสืบพันธุ์และรูปแบบของการหลังฮอร์โมนต่างๆ สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะสุขภาพของการสืบพันธุ์ได้ (Brown *et al.*, 2001) ทั้งนี้การประเมินสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เพศเมียในกรงเลี้ยงด้วยการติดตามการทำงานของรังไข่ (ovarian status) นั้นสามารถกระทำได้ด้วยการใช้วิธีการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนอย่างเช่น โปรเจสเตอโรนจากอุจจาระ (Schwarzenberger *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาแบบไม่ใช้การจับบังคับตัวสัตว์ หรือที่เรียกว่า “non-invasive hormone monitoring” โดยอาศัยการเก็บตัวอย่างอุจจาระ (fecal samples) มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน (Plame, 2005)

ในกรณีที่คาดว่าสัตว์เพศเมียนั้นมีการตั้งท้อง เราสามารถทำการยืนยันผลและประมาณกำหนดระยะเวลาการคลอดได้จากกรตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน ซึ่งการตรวจวินิจฉัยการตั้งท้องด้วยการทำอัลตราซาวด์ (ultrasound) นั้นถือว่าเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามไม่ใช่สัตว์ทุกชนิดหรือทุกตัวที่สามารถจับมาทำการพิสูจน์ทราบด้วยวิธีดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงเกิดการประยุกต์ใช้การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนทั้งในปัสสาวะและอุจจาระที่สามารถนำมายืนยันผลการตั้งท้องได้ โดยช่วงเวลาของการคลอดหรือตกลูกอาจสามารถทำการประมาณได้ถ้าทราบระยะเวลาการตั้งท้องที่แน่นอนของสัตว์ชนิดนั้นๆ และมีการสังเกตพบช่วงของการเริ่มต้นผสมพันธุ์ร่วมกันกับข้อมูลการตรวจติดตามปริมาณฮอร์โมนที่ครอบคลุมถึงในช่วงระยะเวลาดังกล่าว ทั้งนี้ในการวางแผนให้มีการจัดแสดงร่วมกันระหว่างเพศเมียกับเพศผู้ นั้นสามารถกระทำเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดด้วยการวางแผนการเก็บตัวอย่างอุจจาระที่ดี เพื่อพิสูจน์ทราบค่าพื้นฐานปริมาณฮอร์โมน (baseline hormone) ของเพศเมียแต่ละชนิดหรือแต่ละตัว ซึ่งการเก็บตัวอย่างหรือดำเนินการศึกษาอย่างต่อเนื่องจะทำให้มั่นใจได้ว่าการทำงานของรังไข่ (ovarian activity) ในช่วงนั้นๆ มีความ

พร้อมต่อการผสมพันธุ์ด้วยการใช้กระบวนการจัดการรังเลี้ยงจับคู่ให้อยู่กับเพศผู้ได้อย่างถูกช่วงเวลา (Morrow, 2007) หรือขยายพันธุ์สัตว์ด้วยการใช้เทคนิคต่างๆ อาทิการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อ การย้ายฝากตัวอ่อนในแม่รับ รวมถึงเทคนิคอื่นๆ เป็นต้น

2. วิธีการศึกษา

2.1 ตัวอย่างสัตว์และการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ (Animals and Fecal Sample Collection)

รวมจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีจำนวนทั้งสิ้น 10 ตัว เป็นเพศเมียทั้งหมด จากสวนสัตว์ และหน่วยงานภาครัฐ รวม 3 แห่ง (ตามตารางที่ 1) โดยเป็นละมั่งพันธุ์พม่า จำนวน 8 ตัว และละมั่งพันธุ์ไทย จำนวน 2 ตัว ซึ่งถูกใช้เพื่อการพัฒนาเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์แบบการผสมเทียม หรือ artificial insemination (AI) และการย้ายฝากตัวอ่อน หรือ embryo transfer (ET)

ทำการเก็บตัวอย่างมูลของละมั่งแต่ละตัว (individual fecal sample) 10-50 g สัปดาห์ละ 1-3 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6-10 เดือน (ระหว่างช่วงเดือน เมษายน 2553-มกราคม 2554) ซึ่งหลังจากการเก็บตัวอย่างได้จะนำไปเก็บรักษาสภาพที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์

2.2 การสกัดสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากมูลสัตว์ (Fecal Steroid Extraction)

นำตัวอย่างมูลสัตว์ที่แช่แข็งไว้มาทำให้แห้งด้วยการนำเข้าสู่อบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทบให้แตกเป็นผง เก็บเข้าตู้แช่แข็งรักษาสภาพที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการสกัด ทำการสกัดโดยชั่งน้ำหนักมูลสัตว์ที่แห้งเป็นผง 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เดิม 90 % เอทิลแอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร (ml) แล้วนำไปต้มเป็นเวลานาน 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 g เป็นเวลานาน 20 นาที รินเก็บเฉพาะสารละลายใสๆ ด้านบน จากนั้นนำตะกอนที่เหลือไปทำละลายใหม่อีกครั้ง ในเอทานอล 90 % 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เป็น extractans ไป vortex ราว 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 g เป็นเวลานาน 15 นาที รินสารละลายใสๆ ด้านบนที่เป็น supernatants รวมกันกับตอนแรก นำไปทำ dry แล้วทำละลายอีกรอบ (redissolv) โดยการละลายในเอทานอล หรือ dilution buffer (อย่างใดอย่างหนึ่ง) 1 มิลลิลิตร นำ extractans ไป vortex ราว 1 นาที เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการตรวจวิเคราะห์ (assay) ซึ่งกระบวนการสกัดด้วยวิธีการต้ม แบบใกล้เคียงกันนี้มีประสิทธิภาพในการสกัดเอาสเตียรอยด์ฮอร์โมนได้มากกว่า 85% ขึ้นไป (Extraction recovery efficiency was >85% for all steroids.) (Brown *et al.*, 2004)

2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) โดยใช้หลักการแย่งกันจับกับ Monoclonal Antibody: Pregnane CL-425 (Provided by Quidel Corporation) ระหว่างแอนติเจน (antigen) หรือฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เมตะบอไลต์ (progesterone metabolites) ในตัวอย่างนั้นๆ กับ enzyme conjugate: Pregnane Horseradish Peroxidase (HRP) แล้วทำให้เกิดสีด้วยการใช้สารละลาย substrate (ABTS and catalyst: Hydrogen peroxide) ทำปฏิกิริยากับ HRP-labeled hormone วัดค่าความเข้มแสงที่เกิดขึ้นและคำนวณปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (nm.) (Brown *et al.*, 2004)

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อหน่วยงานหรือสถาบันเพาะเลี้ยงละมั่งที่นำมาใช้ในการศึกษานี้

Institutions	ละมั่งพันธุ์ไทย (<i>Cervus eldi siamensis</i>)		ละมั่งพันธุ์พม่า (<i>Cervus eldi thamin</i>)	
	N (M/F)	Age (yr)*	N (M/F)	Age (yr)*
สวนสัตว์เปิดเขาเขียว	-	-	0/3	-/-
สวนสัตว์ดุสิต	0/2	-/-	-	-
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน **)	-	-	0/5	-/-

*: ข้อมูลถึงปี 2553

** ได้รับละมั่งจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในที่นี้นำเสนอในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM) ซึ่งนิยามของคำว่า “Estrous cycle” อยู่บนพื้นฐานของแบบแผนหรือโครงร่าง (profiles) ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากอุจจาระ (fecal progesterone) ทั้งนี้ในกรณีของสัตว์ที่ไม่ได้ตั้งท้อง (non pregnant) ค่าระดับความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ตรวจวัดได้สามารถคำนวณได้จากการนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างสองครั้งมาหาค่าเฉลี่ยของมูลแต่ละตัวอย่าง แล้วนำค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยซ้ำอีก (recalculated) คัดเอาค่าที่เกินจากค่าเฉลี่ยบวกด้วย 1.5 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (1.5 SD) ออกไป และทำการคำนวณใหม่ซ้ำๆ แบบนี้อีกหลายครั้งจนกระทั่งไม่มีค่าใดที่สูงเกินกว่าค่าเฉลี่ยบวกด้วย 1.5 เท่าของค่า SD (Brown *et al.*, 1994)

ในการกำหนดระยะที่เป็น luteal phase นั้น จะเริ่มจากจุดเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนสูงขึ้นไปจากระดับ baseline ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์และลงระดับที่สูงต่อเนื่อง โดยจุดสิ้นสุดของ luteal phase จะนับจากจุดที่ค่าระดับความเข้มข้นลดลงมาอยู่ในระดับความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline) อีกครั้ง ส่วนวงรอบการเป็นสัด (estrous cycle) จะมีความยาวนานเท่าไรนั้นสามารถคำนวณได้จากจุดเริ่มของการเป็น luteal phase อันหนึ่งไปจนถึงจุดเริ่มต้นอีกอันหนึ่งที่ต่อเนื่องกัน (Brown *et al.*, 1994) ส่วนภาวะที่เป็น anestrus หรือภาวะที่วงรอบทางเพศมีการหยุดวงจรลงชั่วคราว (sexual cycle rest) จะกำหนดให้อยู่ระหว่างระยะของการเป็น luteal phase ที่พักตัวยาวนานกว่า 2 เท่าของช่วงเวลาปกติของระยะที่เป็น follicular phase

ทั้งนี้ในการศึกษานี้จะกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงที่เป็นวงรอบแบบ estrous cycle หรือ cyclic changes ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) โดยวงรอบการเป็นสัดในละมั่งทั่วไปจะอยู่ที่ประมาณ 21 วัน หรืออาจยาวนานได้ถึง 30 วัน ส่วนระยะเวลาการตั้งท้องในละมั่งเฉลี่ย 33.5 สัปดาห์ (Monfort *et al.*, 1990)

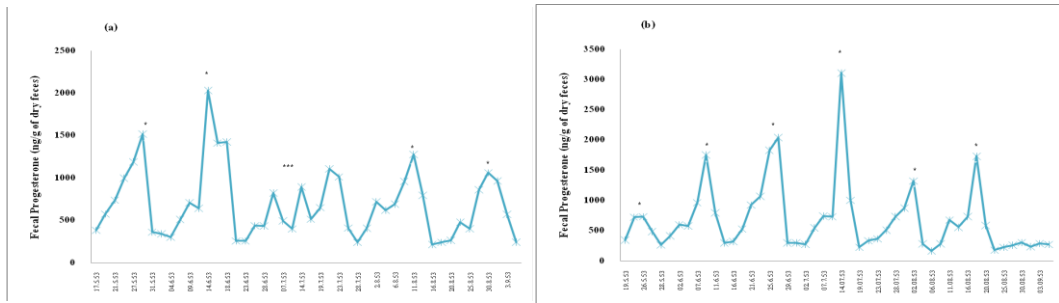
3. ผลการศึกษา

จากการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนในอุจจาระเพื่อประเมินแบบแผนที่เป็นวงรอบ และการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกลุ่มละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่าพหุเมย (ที่รวมถึงกลุ่มที่มีย้ายฝากตัวอ่อนและผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง) ด้วยวิธีการสกัดแบบ boiling method และทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี Enzyme immunoassay สามารถจำแนกผลการศึกษาได้ดังต่อไปนี้

3.1 ละมั่งพันธุ์ไทย (*Cervus eldi siamensis*)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระ (fecal progesterone) ของละมั่งพันธุ์ไทยพหุเมยจำนวน 2 ตัว พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสามารถแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ที่เป็นวงรอบได้อย่างชัดเจน (ovarian cyclicity) โดยมีช่วงระยะความยาวนานของวงรอบการเป็นสัด (estrous cycle) เฉลี่ย 21.64 ± 1.83 วัน (\pm SEM, n = 11 cycles) โดยช่วงระยะของการเปลี่ยนแปลงที่เป็นวงรอบมีความแปรปรวนและอาจล่าช้าออกไป ซึ่งอยู่ในช่วง (พิสัย) 12-32 วัน

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentrations) ของ fecal progesterone ในละมั่งพันธุ์ไทยพหุเมยมีค่าเฉลี่ย (Mean±SEM) เท่ากับ 298.91 ± 11.99 ng/g โดยมีปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แสดงถึงระยะที่เป็น luteal phase อยู่ระหว่าง 448 ถึงมากกว่า 3,000 ng/g ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นสูงสุด (peak concentration) สูงถึง 3,112 ng/g of dry feces (ภาพที่ 1. a, b) ซึ่งช่วงระยะที่เป็น follicular phase (เมื่อปริมาณ progesterone ลงมาอยู่ในระดับของ baseline) นานประมาณ 5-9 วัน นอกจากนี้พฤติกรรมที่แสดงถึงภาวะของการเป็นสัด (behavioral estrus) มีระยะเวลาสั้นราว 1-2 วัน โดยตลอดช่วงระยะที่มีการศึกษาปริมาณฮอร์โมน (พฤษภาคม-กันยายน 2553) ไม่พบว่าละมั่งพันธุ์ไทยทั้งสองตัวแสดงถึงภาวะที่เป็น anestrus แต่อย่างใด และไม่พบการตั้งท้องของละมั่งพันธุ์ไทยทั้งสองตัว



ภาพที่ 1 Individual profiles of fecal progesterone concentrations in two representative Eld's Deer females (*Cervus eldi siamensis*). Reproductive cycles are designated by an asterisk. (single asterisk represent normal cycle and double asterisk a long cycle; *normal, **long cycles)

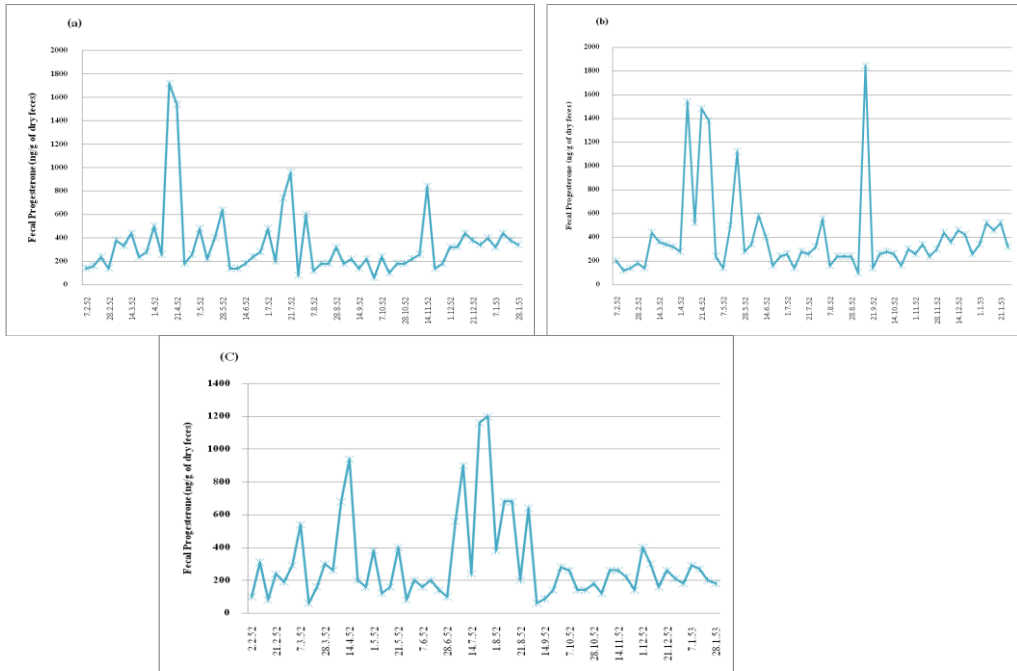
3.2 ละมั่งพันธุ์พม่า (*Cervus eldi thamin*)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระ (fecal progesterone) ของละมั่งพันธุ์พม่าเพศเมียพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของรังไข่เป็นวงรอบ (ovarian cyclicity) เช่นกัน โดยมีช่วงระยะเวลาความยาวนานของการเป็นสัด (estrous cycle) เฉลี่ย 20.75 ± 1.13 วัน (\pm SEM, ฝัด 14-30 วัน; $n=20$ cycles)

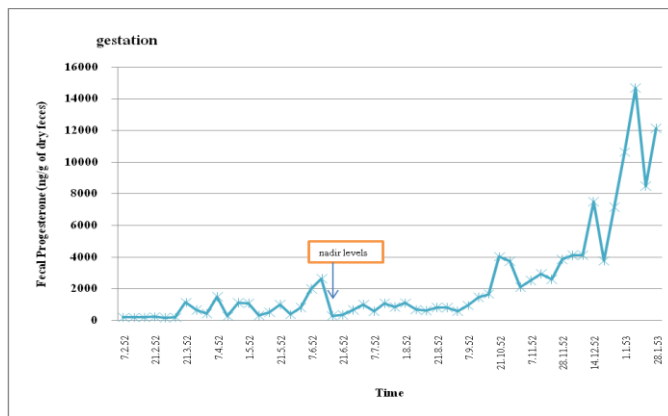
สำหรับค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentrations) ของ fecal progesterone มีค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) เท่ากับ 172 ± 28.09 ng/g โดยมีปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ที่แสดงถึงระยะ luteal phase อยู่ระหว่าง 258.96 ถึงกว่า 1,800 ng/g of dry feces ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นสูงสุด (peak concentration) สูงถึง 1,840 ng/g of dry feces (ภาพที่ 2. a, b and c) โดยตลอดช่วงระยะที่มีการศึกษาปริมาณฮอร์โมนดังกล่าวพบว่าละมั่งพันธุ์พม่า 3 ตัวจาก 8 ตัว แสดงถึงการตั้งท้อง โดยเป็นการตั้งท้องจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งตามการปฏิบัติงานของทีมนักสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 1 ตัว อีก 2 ตัว เป็นละมั่งที่ผสมเทียมในหลอดแก้วแล้วย้ายฝากตัวอ่อนตามการปฏิบัติงานของคณะเจ้าหน้าที่องค์การสวนสัตว์ฯ นำโดยสำนักอนุรักษ์ วิจัย และการศึกษา ทั้งนี้สามารถจำแนกผลการศึกษาปริมาณฮอร์โมน progesterone ได้ดังต่อไปนี้

3.2.1 ละมั่งพันธุ์พม่าที่ผสมเทียมด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน progesterone ในช่วงวันที่ละมั่งพันธุ์พม่าดังกล่าวได้รับการผสมเทียมโดยการสอดน้ำเชื้อแช่แข็ง จะมีปริมาณฮอร์โมน progesterone อยู่ในระดับต่ำๆ (nadir levels) โดยคาดว่าจะในช่วงที่สัตว์อยู่ในระยะของการเป็นสัดหรือมีไขตกพร้อมต่อการถูกผสมด้วยการฉีดน้ำเชื้อ (มีปริมาณฮอร์โมน progesterone ≤ 300 ng/g of dry feces) ซึ่งในช่วงช่วงที่มีการตั้งท้องนั้นพบว่าปริมาณฮอร์โมน progesterone จะคงอยู่ในระดับสูง กล่าวคือในช่วงระยะเริ่มต้นของการตั้งท้องระดับฮอร์โมนจะคงอยู่ในระดับประมาณ 400-1,000 ng/g (ช่วง 1-11 สัปดาห์แรก) และสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างเห็นได้ชัด ($p > 1,500$ ng ขึ้นไป) โดยเฉพาะในช่วง 23 สัปดาห์สุดท้ายก่อนคลอด ทั้งนี้พบว่าในช่วงสัปดาห์ท้ายๆ ปริมาณฮอร์โมน Progesterone ที่พบในละมั่งพันธุ์พม่าที่ตั้งท้องด้วยการผสมเทียมจะสูงได้ถึง 14,720 ng/g of dry feces และจะลดลงจนถึงระดับต่ำสุดในช่วงสัปดาห์สุดท้ายของการตั้งท้องซึ่งโดยสรุปแล้วพบว่าละมั่งพันธุ์พม่าที่ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งดังกล่าวมีระยะการตั้งท้องนานประมาณ 34 สัปดาห์ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 Individual profiles of fecal progesterone concentrations in three representative Eld's Deer females (*Cervus eldi thamin*).

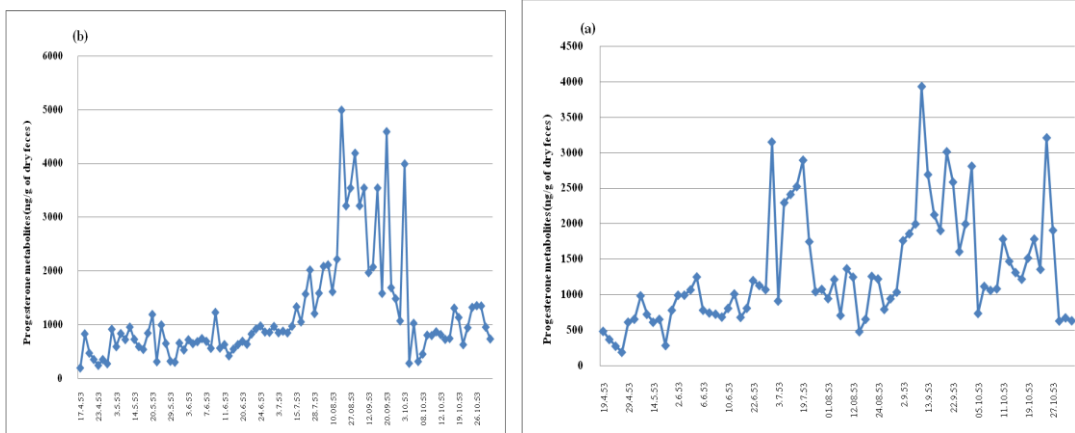


ภาพที่ 3 Fecal progesterone concentrations in an individual Eld's Deer female (*Cervus eldi thamin*) throughout gestation.

3.2.2 ละมั่งพันธุ์พม่าที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อน

จากการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ในละมั่งพันธุ์พม่าที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อน ภายหลังจากย้ายฝาก (ทำการย้ายฝากช่วงวันที่ 30 มีนาคม 2553) พบว่าละมั่งพันธุ์พม่าทั้งสองตัวที่ตั้งท้องจะมีปริมาณฮอร์โมนอยู่ในช่วง 200-5,000 ng/g of dry feces โดยในช่วงประมาณ 11-15 สัปดาห์แรกของการตั้งท้องจะมีปริมาณฮอร์โมน progesterone เฉลี่ยอยู่ในช่วง 200-1,000 ng/g of dry feces หลังจากนั้นปริมาณฮอร์โมน progesterone จะเพิ่มสูงขึ้น เฉลี่ยมากกว่า 1,000 ng/g of dry feces และในช่วงสัปดาห์ที่ 21-23 ปริมาณฮอร์โมน progesterone จะเพิ่มถึงระดับประมาณ 3,000-5,000 ng/g of dry feces และ

ลดระดับความเข้มข้นในช่วง 1-2 สัปดาห์สุดท้ายก่อนคลอด ทั้งนี้พบว่าละมั่งย้ายฝากตัวอ่อนดังกล่าวมีระยะเวลาการตั้งท้องนานเฉลี่ย 31 สัปดาห์ โดยลูกละมั่งเกิดใหม่ตายขณะคลอดทั้งสองตัว (ภาพที่ 4 a and b)



ภาพที่ 4 Fecal progesterone concentrations in two Eld's Deer females (*Cervus eldi thamin*) throughout gestation from ET techniques.

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปอภิปรายผล

จากผลการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน ในอุจจาระ (fecal progesterone) เพื่อประเมินแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน (progesterone) ในกลุ่มละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่าเทศเมียว พบว่าในละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่ามีการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ที่เป็นวงรอบ โดยมีช่วงระยะเวลาความยาวนานของการเป็นสัด (estrous cycle) เฉลี่ย (Mean±SEM) เท่ากับ 21.64±1.83 วัน (พิสัย = 12-32 วัน) และ 20.75±1.13 วัน (พิสัย 14-30 วัน) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentrations) ของ fecal progesterone ในละมั่งนั้น พบว่าในละมั่งพันธุ์ไทยและพันธุ์พม่าเทศเมียวจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กล่าวคือในละมั่งพันธุ์ไทยจะมีค่าเฉลี่ย (Mean±SEM) ของ fecal progesterone ที่เป็น baseline เท่ากับ 298.91±11.99 ng/g ซึ่งมากกว่าที่พบในละมั่งพันธุ์พม่าที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 172.0±28.09 ng/g ทั้งนี้พบว่าในละมั่งพันธุ์พม่าที่มีการตั้งท้องและได้ลูกที่มีลักษณะปกติ (จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อ) จะมีระยะเวลาการตั้งท้องนานประมาณ 34 สัปดาห์ โดยตลอดระยะเวลาของการตั้งท้องมีปริมาณฮอร์โมน progesterone อยู่ในช่วง 400 ถึงประมาณ 14,000 ng/g of dry feces ซึ่งในช่วงระยะเริ่มต้นของการตั้งท้องระดับฮอร์โมนจะคงอยู่ในระดับต่ำ และจะสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในช่วง 23 สัปดาห์สุดท้ายก่อนคลอด และจะลดลงจนถึงระดับต่ำสุดในช่วงสัปดาห์สุดท้ายของการตั้งท้อง ในกรณีของละมั่งที่ตั้งท้องด้วยวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนในการศึกษาดังกล่าวนี้พบว่ามีระยะตั้งท้องที่สั้นกว่าละมั่งที่ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง กล่าวคือมีระยะเวลาการตั้งท้องนานเฉลี่ยเพียง 31 สัปดาห์และเมื่อทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมน progesterone พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยละมั่งที่มีการย้ายฝากตัวอ่อนในการศึกษาดังกล่าวมีระดับของฮอร์โมนการตั้งท้องที่ค่อนข้างต่ำ เพียง 200-5,000 ng/g of dry feces ซึ่งคิดเป็นประมาณ 1/2 ของละมั่งที่มีการตั้งท้องด้วยการผสมเทียม ทั้งนี้พบว่าลูกละมั่งเกิดใหม่ด้วยวิธีการดังกล่าวมีลักษณะที่ยังไม่เป็นไปตามปกติและตายขณะคลอดสอดคล้องกับรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนที่เป็นไปในรูปแบบที่ค่อนข้างมีความแปรปรวนสูงซึ่งสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนที่ผิดปกติดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนความเครียด (cortisol) ที่เบื้องต้นพบว่าการเพิ่มขึ้นผิดปกติระหว่างช่วงที่มีการตั้งท้องในละมั่งย้ายฝากตัวอ่อนทั้ง 2 ตัว ทั้งนี้สาเหตุของการมีปริมาณฮอร์โมนความเครียดในระดับสูงอาจมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ที่จะต้องทำการแก้ไขปรับปรุงในการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้เมื่อทำการพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาระดับของฮอร์โมน progesterone ในการศึกษาดังกล่าวนี้ เทียบกับการศึกษาทั้งในและต่างประเทศ พบว่าการศึกษการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน progesterone ในละมั่งพันธุ์ไทย (*Cervus eldi siamensis*) ดังรูปแบบดังกล่าวเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรก ซึ่งรายงานการศึกษาส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นการศึกษาในกลุ่มละมั่งพันธุ์พม่า (*Cervus eldi thamin*) ทั้งนี้เมื่อทำการพิจารณาความยาวนานของการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนที่เป็น estrous cycle ของกลุ่มละมั่งพันธุ์ไทยและพันธุ์พม่าพบว่าโดยเฉลี่ยจะมีความยาวนานประมาณ 21 วัน นอกจากนี้จากการศึกษา ยังพบว่ารอบอาจยาวนานได้ถึง 30-32 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Monfort *et al.* (1990) ที่ระบุถึงวงจรที่เป็น estrous ในละมั่งทั่วไปจะอยู่ที่ประมาณ 21 วัน และยาวนานได้ถึง 30 วัน และเมื่อทำการพิจารณารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน progesterone ในละมั่งที่มีการตั้งท้องและได้ลูกที่มีลักษณะปกตินั้นพบว่าระยะการตั้งท้อง (34 สัปดาห์) และช่วงสัปดาห์ที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนที่เห็น ได้ชัด (ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 23 ขึ้นไป) มีค่าใกล้เคียงกัน

โดยสรุปแล้วทั้งละมั่งพันธุ์ไทยและละมั่งพันธุ์พม่า นั้นจัดเป็นสัตว์ที่มีช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ที่ยาวนาน ทั้งนี้ในหนึ่งฤดูกาลสืบพันธุ์ (breeding or reproductive season) สามารถมีวงจรการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ได้หลายครั้ง (polyestrous) ทั้งนี้มีแนวโน้มว่าละมั่งพันธุ์พม่าบางตัวในการศึกษาดังกล่าว แสดงถึงช่วงพักหรือช่วงที่เป็น anestrus ในระหว่างช่วงเดือนตุลาคมถึงมกราคม (ภาพที่ 2 b and c) และเดือนมกราคมถึงมีนาคม (ภาพที่ 3) ใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาของ Monfort *et al.* (1990) ที่ระบุว่าฤดูกาลที่มีการเปลี่ยนแปลงของรังไข่จะเริ่มในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม และสิ้นสุดในช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม นอกจากนี้ Hosack *et al.* (1997) ได้รายงานว่าละมั่งพันธุ์พม่าเพศเมียในกรงเลี้ยงของอเมริกาเหนือ จะมีฤดูกาลสืบพันธุ์ (reproductive season) นานเฉลี่ย 277.9±9.7 วัน และมีวงจรการเปลี่ยนแปลงของรังไข่เฉลี่ย 13.8±0.5 วงรอบต่อฤดูกาล โดยอาจคิดเป็นความยาวนานของวงจรประมาณ 19-21 วัน ซึ่งใกล้เคียงกันกับการศึกษาที่ได้กล่าวถึงข้างต้นและการศึกษาในครั้งนี้

ทั้งนี้ในการศึกษาดังกล่าวด้วยการประเมินแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน progesterone ในตัวอย่างมูลสัตว์เพื่อพิสูจน์ทราบวงจรการเป็นสัด (estrous cycle) ค่าเฉลี่ยฐานปริมาณฮอร์โมน (baseline) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน progesterone ในช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์และระยะการตั้งท้อง จึงสามารถนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลที่สำคัญต่อการประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการจัดการละมั่งในกรงเพาะเลี้ยงและต่อขยายการถ่ายฝากตัวอ่อนและการผสมเทียมในละมั่งพันธุ์พม่าและพันธุ์ไทยในอนาคตได้ต่อไป ซึ่งในการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ที่คืนนั้นควรกระทำสัปดาห์ละประมาณ 3-6 ครั้ง (เป็นอย่างน้อย) มาทำการตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้สามารถกระทำควบคู่ไปกับการสังเกตพฤติกรรมจากพนักงานผู้ดูแลสัตว์ (keeper) และเจ้าหน้าที่อาสาสมัครต่างๆ (volunteer) ร่วมด้วยจะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญมาใช้ในการประเมินสถานภาพการสืบพันธุ์ของเพศเมียแต่ละตัวเพื่อการวางแผนบริหารจัดการการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ หรือ “breeding management plan” ได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น (Morrow, 2007)

4.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาดังกล่าว เป็นเพียงส่วนหนึ่งของการดำเนินงาน โดยความร่วมมือระหว่างองค์กรสวนสัตว์ฯ โดยสำนักอนุรักษ์ วิจัยและการศึกษา สวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสวนสัตว์ดุสิต ร่วมกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทั้งนี้พบว่าความถี่ จำนวนซ้ำ และความยาวนานของการเก็บข้อมูลหรือช่วงที่มีการเก็บตัวอย่างอุจจาระของละมั่งที่นำมาทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนนั้น มีผลต่อความแม่นยำ การแปรผลและวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งหากมีการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ในจำนวนซ้ำที่เหมาะสม มีความถี่ที่สม่ำเสมอและต่อเนื่องจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องเหมาะสมมากขึ้น อีกทั้งการแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของฮอร์โมน (แผนภูมิแสดงความเคลื่อนไหวของปริมาณฮอร์โมน) จะมีความต่อเนื่องและง่ายต่อการแปรผลข้อมูลซึ่งช่วยให้การศึกษามีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับฮอร์โมนในสัตว์ป่าของสวนสัตว์ฯ สามารถที่จะกระทำและนำไปใช้อ้างอิงหรือนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการกรงเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพได้ซึ่งควรที่จะมีการสนับสนุนการดำเนินงานดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง

นอกจากนี้ในการศึกษาดังกล่าวยังไม่ครอบคลุมตลอดช่วงฤดูกาลหรือความยาวนานของฤดูกาลเนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่างมูลสัตว์ที่ได้รับและระยะเวลาในการดำเนินงาน ซึ่งอาจสามารถนำมาพิจารณาในการวางแผนการศึกษาในอนาคตต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

- Brown, J.L., Wasser, S.K., Wildt, D.E. and Graham, L.H. 1994. **Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces.** Biol Reprod. (51): 776-786.
- Brown, J.L., Bellem, A.C., Michael, F., Wildt, D.E. and Roth, T.L. 2001. **Comparative Analysis of Gonadal and Adrenal Activity in The Black And White Rhinoceros in North America by Noninvasive Endocrine Monitoring.** Zoo Biology. (20): 483-486.
- Brown, J.L., Walker, S. and Steinman, K. 2004. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species, 2nd edition,** Smithsonian institution. USA.
- Hosack, D.A., Miller, K.V., Marchinton, R.L. and Monfort, S.L. 1997. **Ovarian Activity in Captive Eld's Deer (*Cervus eldi thamin*).** *Journal of Mammalogy.* 78(2): 669-674.
- Monfort. S.L., Wemmer, C.M., Brown, J.L. and Wildt, D.E. 1990. **Use of urinary hormone assays for evaluating endocrine patterns associated with the long-day breeding season in Eld's deer (*Cervus eldi thamin*).** J. Exp. Zoo Suppl.,(4):215-8.
- Morrow, C. 2007. **FAQ - Frequently Asked Questions.** [online]. Available from: <http://scimitarscientific.com>. [2011 March, 15].
- Palme, R. 2005. **Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application.** Academy of science, New York.
- Schwarzenberger, F., Walzer, C., Tomasova, K., Vahala, J., Meister, J., Goodrowe, K.L., Zima, J., Strauß, G. and Lynch, M. 1998. **Fecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).** Anim. Reprod. Sci, (53): 173-90.