การตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จากตัวอย่างอุจจาระ ของแรดขาว ด้วยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนเอสเซ เพื่อนำไปใช้ในการประเมินสภาวะการทำงานของรังไข่ ณ. สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี

Assessment of Progesterone metabolites levels in Captive White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*) by Enzyme immunoassay technique and its application for assessment of ovarian activity diagnosis at Khao Kheow Open Zoo, Chonburi province.

โดย :ฝ่ายอนุรักษ์และวิจัย งานวิจัย สวนสัตว์เปิดเขาเขียว

น.ส.อุพาริกา กองพรหม, นายชัยณรงค์ ปั้นคง, น.ส.สุทธิลักษณ์ มีวีระสม, น.ส.ปิ่นอนงค์ ทองนพคุณ และน.ส.นิตยา เพชรสุกร

บทคัดย่อ

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระของแรดขาวเพศเมียที่เลี้ยงในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวน 2 ตัว (ชื่อสมศรี และขนุน) ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) ระหว่างช่วงเดือน ธันวาคม 2551 ถึงเดือนมีนาคม 2552 พบว่าแรดขาวเพศเมียชื่อสมศรี และขนุน มีค่าเฉลี่ยระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระ(Mean ± SE)เท่ากับ 0.27±0.19 µg/g of dry feces และ 0.20±0.15 µg/g of dry feces ตามลำดับ ซึ่งสมศรี(ที่ไม่ได้จับคู่ผสมพันธุ์)มีปริมาณฮอร์โมนนี้มากกว่าขนุน(ที่ได้รับการผสมจากเพศผู้) เล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [$P > 0.05$, $n = 93$ (ANOVA $F=3.454$, $P=0.066$)] ทั้งนี้พบว่าปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.04 ถึง 1.05 µg/g of dry feces โดยเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของฮอร์โมนนี้ในแต่ละช่วงเดือนพบว่า แรดขาวเพศเมียทั้งสองตัวมีปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เข้มข้นสูงที่สุดในช่วงเดือนธันวาคม 2551 ซึ่งแตกต่างจากช่วงเดือนอื่นๆ ที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P < 0.05$) นอกจากนี้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ตรวจวัดได้ แสดงถึงแนวโน้มที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นวงรอบ (non cyclic) และมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ อีกทั้งแสดงถึงภาวะที่ไม่ได้มีการตั้งท้อง หรือเป็นสัด ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว.

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สืบเนื่องจากองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ได้ดำเนินความพยายามที่จะเพาะขยายพันธุ์สัตว์ป่าหายากหลากหลายชนิด เพื่อเป็นการอนุรักษ์สัตว์ป่าในกรงเลี้ยง โดยมีความมุ่งหมายที่จะคงความหลากหลายทางชีวภาพและเพิ่มโอกาสของการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติในอนาคต แรดเป็นสัตว์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อองค์การสวนสัตว์ เนื่องด้วยแรดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่บนบกที่มีขนาดใหญ่สุดรองลงมาจากช้าง ปัจจุบันมีแรดเหลืออยู่ในโลกเพียง 5 ชนิด ทุกชนิดจัดอยู่วงศ์ ไรโนเซอโรทิดี(Family Rhinocerotidae) ที่รวบรวมสัตว์จำพวกแรดเข้าไว้ด้วยกัน ซึ่งเป็น 1ใน 3 วงศ์ของกลุ่มสัตว์กีบคี่ (Odd-toed ungulates) จากจำนวนที่มีอยู่ 5 ชนิดทั่วโลก 3 ชนิดมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย คือ แรดอินเดีย แรดชวาและแรดสุมาตราหรือกระซู่ ที่เหลืออีก 2 ชนิด มีถิ่นกำเนิดและอาศัยอยู่ในทวีปแอฟริกา คือแรดดำ และแรดขาว ซึ่งมี 2 นอ เช่นกัน โดยแรดขาวนั้นเมื่อโตเต็มที่จะมีน้ำหนักประมาณ 3,500 กิโลกรัม เป็นแรดที่ใหญ่ที่สุดของสัตว์กลุ่มนี้ ปกติมีนิสัยเชื่องไม่ค่อยดุร้าย ปัจจุบันมีถิ่นที่อยู่อาศัยแพร่กระจายทางใต้ของทวีปอัฟริกาความยาวลำตัว 360-420 เซ็นติเมตร ความสูงช่วงไหล่ 150-185 เซ็นติเมตร แรดขาวมีริมฝีปากบนเรียบเป็นเส้นตรงลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสต่างจากแรดดำตรงที่แรดดำริมฝีปาก

บนเป็นจงอยสามารถม้วนจับใบไม้ได้ โดยทั่วไปแล้วถ้ามองเผินๆ ผิวหนังของแรดขาวจะเรียบและผิวนวล แรดเป้นสัตว์ที่จมูกดีมาก แต่ตาและหูไม่ดี แรดขาวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 7-10 ปี ตั้งท้องนาน 18 เดือน (547 วัน) ปกติออกลูกตัวเดียว ซึ่งพออายุ 1 วันก็เดินตามแม่ได้แล้ว พออายุ 1 สัปดาห์เริ่มกินหญ้า ลูกจะอยู่กับแม่จนอายุ 1 ปี ลูกจะมีน้ำหนักประมาณ 400 กิโลกรัม ในเวลา 18 เดือน และมีอายุยืน 30-40 ปี แรดขาวและแรดชนิดอื่นๆ เป็นสัตว์ที่มีจำนวนเหลืออยู่ในธรรมชาติไม่มากนักอีกทั้งอยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์เนื่องจากถูกล่าอย่างหนัก แรดในธรรมชาติจึงอยู่ในภาวะอันตราย แต่การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยงนั้นเป็นเรื่องที่ทำให้ประสบความสำเร็จได้ยาก เนื่องจากขาดข้อมูลที่สำคัญหลายประการ ทั้งนี้สวนสัตว์เปิดเขาเขียวที่มีแรดขาวอยู่ในความดูแลรับผิดชอบจำนวนหนึ่งนั้นจึงให้ความสำคัญกับการขยายพันธุ์สัตว์หายากเหล่านี้เพื่อเป็นการอนุรักษ์สัตว์ป่าในกรงเลี้ยงจึงได้ริเริ่มดำเนินการศึกษาปัญหาที่เกี่ยวข้องกับขยายพันธุ์บางประการ ประกอบกับก่อนหน้านี้ได้รับรายงานจากพนักงานที่ดูแลให้ข้อมูลว่าแรดขาวเพศเมียบางตัว (ชื่อ ขนุน)ได้รับการผสมพันธุ์จากแรดขาวเพศผู้ที่เป็นคู่กันก่อนที่เพศผู้จะตายลงในช่วงต้นปี 2551 และมีการตั้งสมมุติฐานถึงความเป็นไปได้ในการตั้งท้องของแรดขาวเพศเมีย ทางฝ่ายอนุรักษ์และวิจัยจึงได้ดำเนินการศึกษาเพื่อทดสอบสมมุติฐานดังกล่าว เพื่อประโยชน์ในการดูแล และปรับปรุงการจัดการกรงเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้มีการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้

โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการศึกษาแบบไม่ต้องทำการจับบังคับหรือรบกวนตัวสัตว์ (Noninvasive methods) โดยการตรวจวัดปริมาณของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระสัตว์ อันเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเหมาะสมสำหรับสัตว์ที่อยู่ในสภาพของกรงเลี้ยง (Rupert *et al*., 2005)ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบและอาการบาดเจ็บที่อาจจะเกิดขึ้นกับสัตว์ในภายหลัง โดยอาศัยหลักการที่ว่า “ฮอร์โมน” ถูกสร้างจากระบบต่อมไร้ท่อต่างๆ และถูกส่งเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อผ่านไปยังอวัยวะเป้าหมาย จากนั้นจะถูกหมุนเวียนผ่านเข้าไปภายในตับซึ่งจะถูก metabolized เปลี่ยนแปลงสภาพเป็นอนุพันธ์ต่างๆ จากนั้นจะถูกส่งต่อเข้าลำไส้ในรูปของน้ำดีซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการเผาผลาญอาหารของร่างกาย (metabolites) และถูกขับถ่ายออกโดยปนมากับอุจจาระ ที่จะมีการเรียกรวมๆ สเตียรอยด์ทั้งหมดที่อยู่ในอุจจาระว่า “Fecal steroids” (Erich *et al*., 2005)

การตรวจสเตียรอยด์ในอุจจาระจึงสามารถดำเนินการเพื่อเป็นการประเมินสภาวะสภาพของระบบต่อมไร้ท่อได้ ซึ่งแนวคิดนี้ถูกริเริ่มขึ้นมาในช่วงปลายคริสต์ศักราช 1970 ศึกษาในนก และช่วงต้นคริสต์ศักราช 1980 ศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Rupert, 2005) และได้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อพิสูจน์ทราบความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนกับพฤติกรรม พอๆ กันกับการนำมาใช้ในการตอบปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ (Reproduction), สวัสดิภาพสัตว์ (animals welfare), การอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพ(Conservation) โดยทำให้ทราบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากตัวอย่างอุจจาระ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการด้านการจับคู่ผสมพันธุ์แรดภายในสวนสัตว์ฯ เพื่อนำมาใช้แก้ไขปัญหาการขยายพันธุ์และการจัดการสัตว์ป่าในสภาพกรงเลี้ยงได้ ที่สามารถพัฒนาให้การเพาะขยายพันธุ์ประสบความสำเร็จได้มากขึ้น ซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนต่อไป.

จุดมุ่งหมายในการศึกษา

1. เพื่อติดตามการทำงานของระบบสืบพันธุ์และใช้เป็นฐานข้อมูลเปรียบเทียบการเจริญพันธุ์ของประชากรแรดในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว
2. ศึกษาการตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในแรดขาวโดยวิธีการสกัดจากอุจจาระ
3. เพื่อให้ทราบข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะขยายพันธุ์แรดในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว
4. เพื่อศึกษาถึงสภาพทางสรีรวิทยาภายในตัวสัตว์และประเมินสภาพของการจัดการกรงเลี้ยง

วิธีดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์ (Materials Essential Component of the EIA)

- Solid Phase : polystyrene microtiter plate(Nunc Immuno plate)
- Polyclonal Antibody : Antibody Progesterone R 4866
- Coating buffer : Carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6
- Wash solution : Nacl and Tween 20 solution
- Enzyme conjugate (tracer) : ProgesteroneHorseradish peroxidase (HRP)
- Assay buffer : Phosphate or Tris buffers pH 7.0
- Standards or unlabeled antigen : Standards Progesterone(Sigma Diagnostics)
- Substate: Chromagen(ABTS และ TMB) and catalyst (Hydrogen peroxide) Substrate
- Reading : Spectrophotometer or Plate reader

ตัวอย่างสัตว์ (Animals sample)

- แรดขาวเพศเมีย จำนวน 2 ตัว

วิธีการ (Methods)

ทำการศึกษาในแรดขาวเพศเมีย จำนวน 2 ตัวที่อยู่ในความรับผิดชอบของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว โดยมีการเก็บตัวอย่างอุจจาระ อย่างต่อเนื่อง (ยกเว้น ช่วงวันหยุดและเหตุสุดวิสัย) ระหว่างช่วงเดือนธันวาคม 2551 – มีนาคม 2552 ใส่ในกล่องเก็บตัวอย่างและนำไปเก็บรักษา เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนการตั้งท้องคือ ฮฮร์โมนโปรเจสเตอโรนจากทางห้องปฏิบัติการ และจะไม่ทำการรบกวนสัตว์ไม่ว่ากรณีใดๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย โดยมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้คือ

เก็บตัวอย่างอุจจาระแรดขาว (Collection feces):

เลือกเก็บ/เลือกใช้แต่ตัวอย่างอุจจาระ อุจจาระที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้ได้สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีการกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอในตัวอย่าง โดยเลือกเก็บเฉพาะอุจจาระที่มีลักษณะสดใหม่ ไม่แห้ง นอกจากนี้ตัวอย่างอุจจาระที่สัตว์ขับถ่ายออกมาในบางครั้งหากพบว่าอาหารยังถูกย่อยไม่ดีโดยยังคงรูปของชิ้นอาหารหรือสีของอาหารที่กินเข้าไปอยู่ก็จะต้องคัดแยกออกไม่ทำการเก็บ โดยหลักแล้วต้องเลือกเก็บเฉพาะตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอุจจาระ และไม่มีเศษวัสดุอื่นปนอยู่ในตัวอย่าง

การเก็บรักษาตัวอย่างหรือทำให้แห้ง (Preservation with Freezing or Drying immediately):

กรณีที่ยังไม่สามารถทำตัวอย่างให้แห้งได้ทัน สามารถทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในกล่องทึบแสงที่มีฝาบิดเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างสัมผัสกับความชื้นหรือแสง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาสภาพของอุจจาระจากแบคทีเรีย และเป็นการป้องกันไม่ให้สเตียรอยด์มีการเปลี่ยนแปลงสภาพไป

นำตัวอย่างที่แช่แข็งเก็บรักษาสภาพมาทำให้แห้งด้วยการไล่ความชื้นออกจากตัวอย่างด้วยการโดยการใช้เครื่อง lyophilizer หรือนำเข้าตู้อบ (hot air oven) เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงอีก จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างด้วยการใส่หีบห่อทึบแสง ใส่สารดูดความชื้นลงไปเพื่อป้องกันความชื้น seal ปิดฝาให้สนิทนำไปเก็บไว้ภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่เย็นและมืด ป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสเตียรอยด์ (Erich *et al*., 2005;Tony *et al*., 2005) เพื่อรอนำไปสกัดฮอร์โมนต่อไป

การสกัดสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากอุจจาระ (Fecal Extraction):

ทำการสกัดด้วยวิธีการต้ม(Dry and Wet Weight Fecal Extraction–Boiling Method) ใช้ตัวอย่างอุจจาระแรดขาว 0.2 g สกัดด้วย Ethyl alcohol 90 % แล้วเก็บสารละลายที่ได้ไว้ใน dilution buffer แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน (Assay Protocols):

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ตามกระบวนการของ Dr. Janine Brown และคณะ (2004)

ซึ่งเทคนิคการตรวจแบบ ELISA. มีหลักการโดยสรุปคือ การเคลือบพื้นผิวของแผ่นเพลท (polystyrene microtiter plate) ด้วย " แอนติบอดี้(antibody)" ที่จำเพาะต่อ " แอนติเจน(antigen) " ที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกเติมลงไปพร้อมกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วย "เอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate)" โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดี้ที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับจำนวนฮอร์โมน เช่น ถ้าตัวอย่างมีฮอร์โมนมากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดีได้มากกว่า และเมื่อเติม substrate ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของ แอนติเจน และ คอนจูเกต ซึ่งสามารถทำการตรวจวัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง .

ผลการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาและตรวจวิเคราะห์ ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone metabolites) ในตัวอย่างอุจจาระ (feces) ของแรดขาว เพศเมีย ตั้งแต่ปีเดือนธันวาคม – เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551-2552 ที่อยู่ในสภาพกรงเลี้ยงและจัดแสดง ด้วยวิธี EIA หรือ เอนไซม์อิมมูโนเอสเซ (Enzyme immunoassay) โดยแบ่งตามลักษณะของการจัดการกรงเลี้ยงคือ

1. แรดขาว เพศเมียที่เคยจับคู่ (ได้รับการผสมพันธุ์ จากเพศผู้) ชื่อ ขนุน อายุ 16 ปี
2. แรดขาว เพศเมียที่ไม่เคยจับคู่ ชื่อ สมศรี อายุ 17 ปี

จากการศึกษาได้ผลการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนดังนี้

- แรดขาวเพศเมียที่ไม่ได้จับคู่ (สมศรี)

จากการศึกษาการตรวจวัดระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone metabolites) เบื้องต้น ในตัวอย่างอุจจาระของแรดขาวเพศเมียที่ไม่ได้จับคู่ (สมศรี) ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2551 – มีนาคม 2552 รวมจำนวนทั้งสิ้น 4 เดือนนั้นพบว่า ฮอร์โมนที่ถูกขับออกมาในตัวอย่างอุจจาระของแต่ละช่วงเดือนนั้นมีปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกันออกไป (ตาราง ที่1) โดยมีปริมาณเฉลี่ยของโปรเจสเตอโรนที่พบตั้งแต่ 0.11 µg/g ถึง 1.05 µg/g of dry feces ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ที่ถูก metabolites ออกมาของแรดขาวเพศเมียที่ไม่ได้จับคูในแต่ละช่วงเดือน (ตั้งแต่ธันวาคม 2551 – มีนาคม 2552) จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, $n = 50$ (ANOVA $F=9.455$, $P=0.000$)) โดยในช่วงเดือนธันวาคม 51 จะมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.48 ± 0.29 µg/g ซึ่งมากกว่าช่วงเดือนอื่นๆ ที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาเป็นช่วงเดือนมกราคม 52 โดยมีแนวโน้มลดลงอีกในช่วงเดือนที่เหลือ ทั้งนี้โดยเฉลี่ยทั้งหมดแล้วแรดขาวเพศเมียตัวนี้มีปริมาณโปรเจสเตอโรน (Progesterone metabolites) ในตัวอย่างอุจจาระเท่ากับ 0.27 ± 0.19 µg/g of dry feces

- แรดขาวเพศเมียที่(เคย)จับคู่

จากการศึกษาในแรดขาวเพศเมีย ชื่อ ขนุน (ที่เคยจับคู่แล้ว) จำนวน 1 ตัว พบว่า มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone metabolites)ที่พบตั้งแต่ 0.04 ถึง 0.74 µg/g โดยในช่วงเดือนธันวาคม

2551 มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เฉลี่ยสูงกว่าช่วงเดือนอื่นๆ ที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, n = 43 (ANOVA F=5.997 , $P = 0.002$) เช่นเดียวกัน รองลงมาคือช่วงเดือนมกราคม กุมภาพันธ์ และมีนาคม 2551 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ตามลำดับและเมื่อพิจารณาจากปริมาณฮอร์โมนจากแรดขาวเพศเมียตัวนี้ตลอดทั้ง 4 เดือน พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 0.20 ± 0.15 µg/g of dry feces

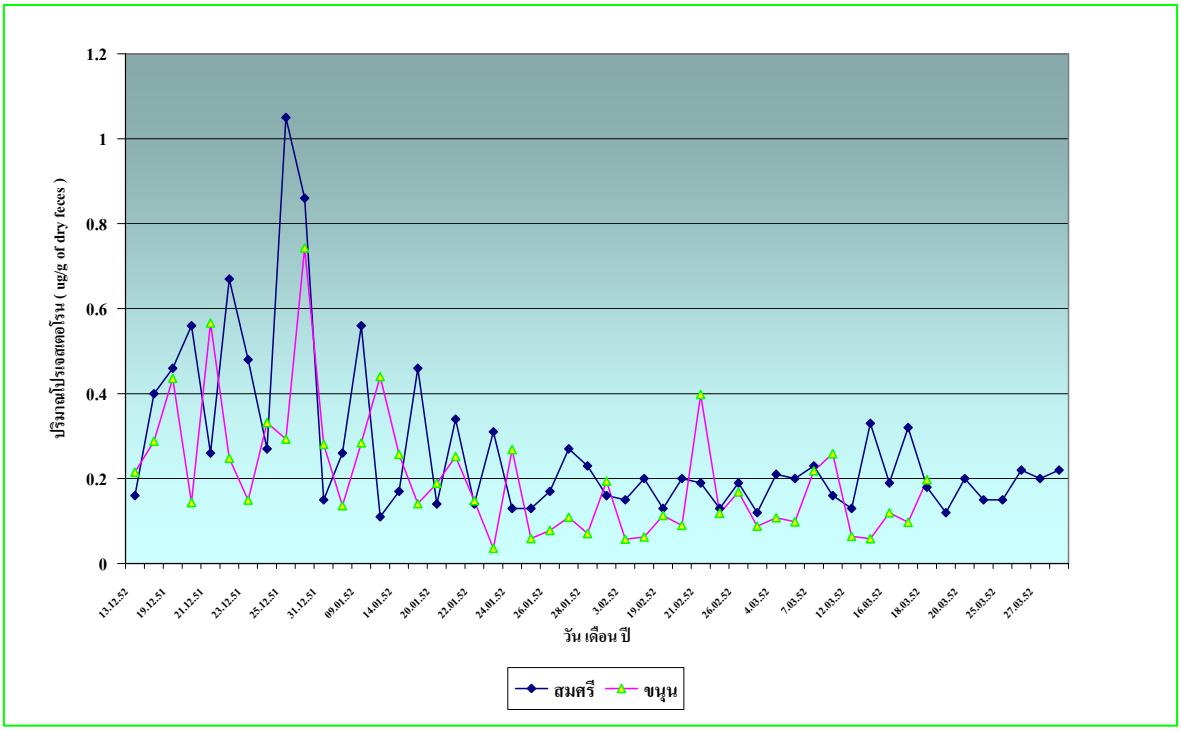
ทั้งนี้พบว่าแรดขาวเพศเมีย ทั้งสองตัว คือสมศรีที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์ และ ขนุนที่เคยได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้ (ก่อนเสียชีวิต) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรเจสเตอโรน เฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยแรดขาวที่ชื่อสมศรี จะมีปริมาณฮอร์โมนนี้สูงกว่าในแรดขาวที่ชื่อขนุน เล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, n = 93 (ANOVA F=3.454 , $P = 0.066$) รายละเอียดผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณโปรเจสเตอโรน ในตัวอย่างอุจจาระของแรดขาว (Means for groups in homogeneous subsets are displayed.)

ชนิดนก (Common name)	ช่วงเดือน (Month)	ปริมาณ Progesterone metabolites	
		จำนวน (N)	Mean ± SD (µg/g of feces)
แรดขาว เพศเมีย (สมศรี)	ธันวาคม (ปี 51)	11	0.48 ± 0.29 [b]
	มกราคม (ปี 52)	14	0.24 ± 0.13 [a]
	กุมภาพันธ์ (ปี 52)	9	0.16 ± 0.03 [a]
	มีนาคม (ปี 52)	16	0.20 ± 0.06 [a]
	Total / mean	50	0.27±0.19
แรดขาว เพศเมีย (ขนุน*)	ธันวาคม (ปี 51)	11	0.34 ± 0.18 [b]
	มกราคม (ปี 52)	13	0.18 ± 0.11 [a]
	กุมภาพันธ์ (ปี 52)	8	0.14 ± 0.11 [a]
	มีนาคม (ปี 52)	11	0.13 ± 0.07 [a]
	Total / mean	43	0.20±0.15
Total / mean		**93**	**0.24±0.17**

หมายเหตุ a และ b แสดงความเหมือนหรือความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างคู่ของหน่วยการทดลองโดยวิธี LSD และ Duncan's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

(*) เคยอยู่กับเพศผู้



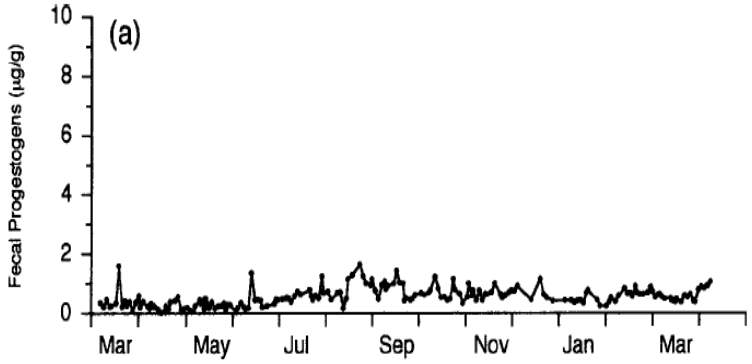
ภาพที่ 1 กราฟแสดงแนวโน้มความเคลื่อนไหวของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone metabolites)ในตัวอย่างอุจจาระของแรดขาวเพศเมีย ในแต่ละช่วงเดือน

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

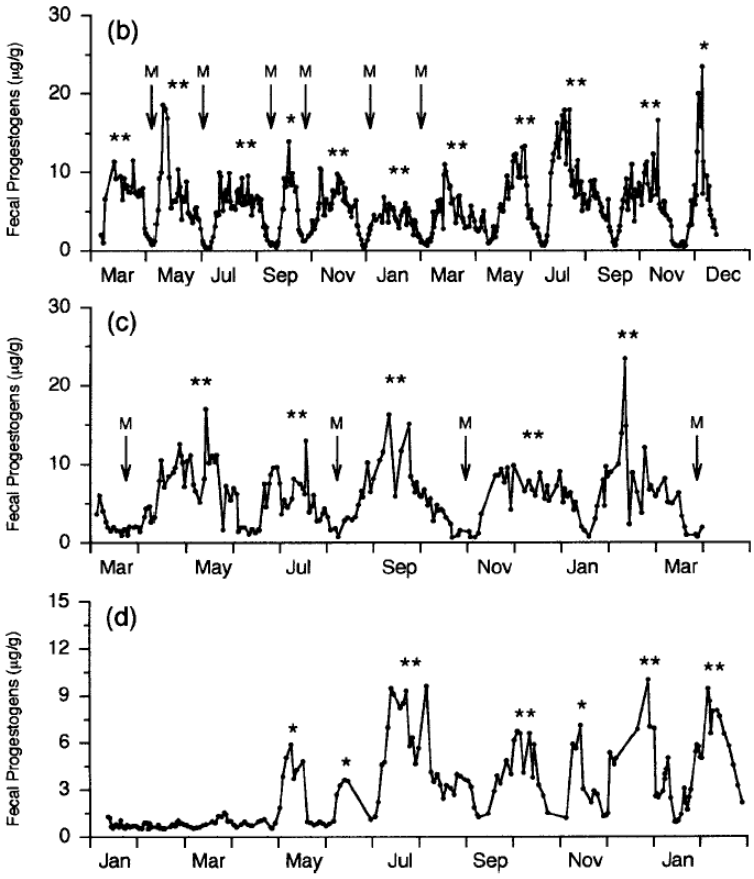
จากการศึกษาปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระของแรดขาว ที่สามารถตรวจวัดได้ ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2551 ถึงเดือนมีนาคม 2552 พบว่าแรดขาวจะมีความเข้มข้นของฮอร์โมนแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงเดือนโดยมีรายละเอียดการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ถูก metabolites ออกมา โดยสรุปคือ

แรดขาวเพศเมีย ทั้งสองตัว คือสมศรี และ ขนุน มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยเฉลี่ยรวม(Mean ± SD) เท่ากับ 0.24 ± 0.17 µg/g (n = 93) ซึ่งในช่วงเดือนธันวาคม 51 จะมีความเข้มข้นของฮอร์โมนนี้สูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากช่วงเดือนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าแรดขาวเพศเมียที่อยู่ในสภาพกรงเลี้ยงและส่วนแสดงดังกล่าวจะมีปริมาณโปรเจสเตอโรนที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (ช่วงเดือนธันวาคม 51 – มีนาคม 2552) อยู่ในช่วง 0.04 ถึง 1.05 µg/g of dry feces โดยปริมาณของโปรเจสเตอโรนที่วัดได้ไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นวงรอบที่ชัดเจน หรืออีกนัยหนึ่งคือไม่แสดงถึงความเปลี่ยนแปลงในการทำงานของรังไข่ที่ชัดเจน ประกอบกับเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแรดขาวทั้งสองตัวคือ แรดขาว ที่ชื่อขนุน ที่คาดว่าได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้กับสมศรีที่ไม่ได้รับการผสม พบว่าปริมาณฮอร์โมนมีค่าใกล้เคียงกันมาก (ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ทั้งนี้จากรายงานของ Dr. Janine และคณะ (2001) ที่รายงานไว้ถึงแรดขาวเพศเมียในสหรัฐอเมริกา จากทั้งหมด 13 ตัว พบว่ามีแรดขาวประมาณครึ่งหนึ่ง (6 ตัว) ที่ไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ที่ชัดเจน โดยแสดงถึงความเคลื่อนไหวของปริมาณโปรเจสเตอโรน ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นวงรอบ(แสดงดังกราฟที่ 2) คล้ายคลึงกันกับปริมาณของโปรเจสเตอโรนที่ตรวจวัดได้ในแรดขาวของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวคือ มีความเข้มข้นโดยเฉลี่ยต่ำ ค่าที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ในส่วนของแรดขาวที่มีการจับคู่ผสมพันธุ์และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นวงรอบของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและมีค่าเฉลี่ยของปริมาณฮอร์โมนนี้ค่อนข้างสูงโดยอยู่ในช่วงที่ตรวจวัดได้ตั้งแต่ 3-24 µg/g of dry feces โดยพบว่ามีช่วงระยะเวลาการตกไข่ (follicular phase) ที่มีความแปรผันแตกต่างกันไปโดย อยู่ในช่วง ตั้งแต่ 2-21 วัน ดังกราฟ ที่ 3-5



กราฟที่ 2 แสดงความเคลื่อนไหวของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแรดขาวเพศเมีย (เฉลี่ย 6 ตัว ระยะเวลาการตรวจวัดนาน 13-14 เดือน) (Janine *et al*,2001)



กราฟที่ 3-5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแรดขาว ในช่วงเวลาต่างๆ ในรอบปี (Janine *et al*,2001)

โดยกราฟ b และ c แสดง ถึงการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะเป็นวงรอบ ขึ้นและลง ส่วนสัญลักษณ์ M เป็นช่วงที่พบว่าสัตว์มีการจับคู่ (Mating)

โดยรวมแล้วจากปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของแรดขาวที่ตรวจวัดได้เทียบกับการแสดงออกทางพฤติกรรมอาจสามารถสรุปได้ว่าแรดขาวทั้งสองตัวไม่เกิดการตั้งท้อง และไม่เกิดการเป็นสัตว์ ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว (ธันวาคม 51 – มีนาคม 52)ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นเพียงการตรวจวัดปริมาณโปรเจสเตอโรน ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น อีกทั้งข้อมูลที่ได้ยังมีปริมาณน้อย ฉะนั้นจึงจำเป็นจะต้องดำเนินการศึกษาเก็บข้อมูลอย่าง

ต่อเนื่องต่อไป ประกอบกับจะต้องดำเนินการศึกษาตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ประกอบด้วย เช่นฮอร์โมน Estrogen หรือ Estradiol เพื่อพิจารณาดูความสมบูรณ์พันธุ์ของแรดขาว รวมถึงฮอร์โมนความเครียดเพื่อดูถึงความเหมาะสมในการจัดการสภาพกรงเลี้ยง รวมถึงการศึกษาเพิ่มเติมในแรดขาวเพศผู้ ทั้งนี้เพื่อจะได้เป็นประโยชน์ในการดำเนินการปรับปรุงการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์สัตว์ชนิดดังกล่าว ต่อไป.

ข้อเสนอแนะ

1. เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนจากตัวอย่างอุจจาระ เป็นเทคนิคที่ช่วยให้ทราบถึงข้อมูลของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ได้โดยไม่จำเป็นต้องจับบังคับสัตว์ โดยสามารถทำนายวงรอบได้เช่นเดียวกันกับการตรวจเลือด ดังนั้น สำหรับสัตว์หลายชนิดที่อยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์และยังขาดข้อมูลทางด้านการสืบพันธุ์ เทคนิคนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ชนิดดังกล่าว เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลทางด้านระบบสืบพันธุ์ที่จะเป็นประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงขยายพันธ์สัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ต่อไป

2. เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการเก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ ซึ่งต้องมีข้อควรระวังหลายประการ จึงจะได้ตัวอย่างที่ดี ไม่ทำให้ค่าของฮอร์โมนเปลี่ยนแปลงไปก่อนการวิเคราะห์ จึงควรมีการทำความเข้าใจให้ความรู้กับเจ้าหน้าที่ประจำจุดก่อนการเริ่มเก็บตัวอย่าง

3. เนื่องจากผลการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ได้ พบว่ามีระดับความเข้มข้นต่ำ ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น เกิดจากสภาวะทางสรีรวิทยาภายในตัวสัตว์เอง หรือเกิดจากการจัดการกรงเลี้ยง เช่น ปัญหาภาวะโภชนาการ (ได้รับค่าโภชนะไม่สมดุล หรือไม่เหมาะสมกับสัตว์ป่าชนิดนั้นๆ) และภาวะความเครียดจากสภาพกรงเลี้ยง และอื่นๆ เป็นต้นซึ่งควรที่จะมีการดำเนินการศึกษาพฤติกรรมควบคู่กันอย่างต่อเนื่อง ต่อไป.

เอกสารอ้างอิง

Erich Mostl, Sophi Rettenbacher, And Rupert Palme. 2005. Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds' Droppings: An Analytical Approach. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1046: 17–34.

Janine L. Brown, and Other. 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.

Janine L. Brown, Steinman,K. 2004.Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species, 2nd edition, USA : Smithsonian institution.

R. Plame, S. Rettenbacher, C. Touma, S. M.El-Bahr, and E. Mostl. 2005. Stress Hormones in mammals and birds Comparative Aspects Regarding Metabolism , Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1040: 162–171.

Rupert Palme. 2005. Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1046: 75–80

Rupert Palme. 2005. Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application, Academy of science, New York.

Toni E. Ziegler, and Daniel J. Wittwer. 2005. Fecal Steroid Research in the Field and Laboratory Improved Methods for Storage, Transport, Processing, and Analysis. University of Wisconsin. American Journal of Primatology , 67 : 159-174.

Tusanee Apichartsrungkoon. 2002. Effect of stress on Progesterone and Luteinizing Hormone in Female Reproductive System. Journal of Agriculture , 18 (3) : 261 – 269.