วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.
KKU Veterinary Journal
ISSN 0858-2297

RESEARCH ARTICLE

Pattern of fecal estradiol and progesterone concentrations throughout estrous cycle in fishing cats (*Prionailurus viverrinus*) in Chiang Mai Night Safari

Narathip Vorawattanatham[1], Anuchai Pinyopummin[2], Ratchaneewan Punyathong[3], Kanit Chukanhom[4*]

[1]*Veterinary, Conservation and Research Section, Animal Management Division, Chiang Mai Night Safari, Chiang Mai 50230, Thailand*
[2]*Department of Large Animal and Wildlife Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 10900, Thailand*
[3]*Conservation Research and Animal Health Department, Chiang Mai Zoo, Chiang Mai 50200, Thailand*
[4]*Division of Livestock Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*
[*]***Corresponding author** E-mail: kanchu@kku.ac.th*

Received 22 April 2019, **Accepted** 17 June 2019, **Published** 30 June 2019

Abstract

Objective: To study patterns of fecal estradiol and progesterone concentrations throughout estrous cycle in adult captive female fishing cats (*Prionailurus viverrinus*) using non-invasive fecal steroid analysis method.

Materials and Methods: Seven adult captive female fishing cats (4-9 years old) were used to studied patterns of fecal estradiol and progesterone concentrations throughout estrous cycle. The cats were individual housed as a singleton in enclosures off public which display in the same facility and the cats were exposed to natural lighting. Fresh cat fecal samples were collected three times a week 1,344 samples since January 2013 - April 2014. Fecal samples were extracted steroid hormones using ethanol, then measured estradiol and progesterone concentrations by using an estradiol and progesterone enzyme immunosorbent assay (EIA).

Results: All cats showed at least one estrous cycle throughout the year. The mean peak estrogen concentrations in follicular phase was 562.49 ± 95.13 ng/g feces (means ± SEM), increasing nearly 4.7 times above baseline (117.50 ± 10.54 ng/g feces). Estrogen cycle was18.27 ± 1.25 days in average, while, and mean progesterone concentrations in luteal phase was 32.68 ± 2.54 µg/g feces, increasing nearly 8.86 times above baseline (3.69 ± 0.86µg/g feces).

Conclusion: Fishing cats had at least one estrous cycle throughout the year and estrous cycle was18.27 ± 1.25 days. Concentrations of estrogen and progesterone were not influenced by season. The data of present study is useful tool for breeding management and planning for the development of assisted reproductive techniques such as artificial insemination.

Keywords: Fishing cat, estrous cycle, fecal steroids hormone, estrogen, progesterone

บทความวิจัย

รูปแบบของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในอุจจาระตลอดวงรอบการเป็นสัดของเสือปลาที่เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี

นราธิป วรวัฒนธรรม[1], อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์[2], รัชนีวรรณ ปัญญาทอง[3], คณิต ชูคันหอม[4*]

[1]กลุ่มงานสัตวแพทย์ อนุรักษ์และวิจัย ฝ่ายบริหารจัดการสัตว์ สำนักงานเชียงใหม่ไนท์ซาฟารี จังหวัดเชียงใหม่5230 ประเทศไทย

2ภาควิชาสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 10900 ประเทศไทย

[3]ฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยและสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200 ประเทศไทย

[4]กลุ่มวิชาอายุรศาสตร์ปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น40002 ประเทศไทย

[*]ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมล์: kanchu@kku.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษารูปแบบของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนจากอุจจาระเสือปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ในกรงเลี้ยงตลอดวงรอบการเป็นสัด โดยใช้วิธีไม่รบกวนตัวสัตว์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ศึกษารูปแบบของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนตลอดวงรอบของการเป็นสัดในเสือปลาเพศเมียจำนวน 7 ตัว (อายุ 4-9 ปี)เก็บตัวอย่างอุจจาระจากคอกกักเสือปลาอาทิตย์ละสามวันในตอนเช้าวันจันทร์ พุธ และศุกร์ อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 15 เดือนนำตัวอย่างอุจจาระไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนอุจจาระแห้งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธี Dry weight fecal extraction–boiling นำไปสกัดฮอร์โมนด้วยเอทานอลและหาระดับความเข้มข้นของเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ด้วยวิธีอีไอเอ(enzyme immunosorbent assay: EIA)

ผลการศึกษา พบว่าเสือปลาทุกตัวมีวงรอบการเป็นสัดอย่างน้อยหนึ่งครั้งในรอบปี โดยในระยะ follicular phase มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นสูงสุดของเอสโตรเจนเท่ากับ 562.49 ± 95.13 ng/g (means ± SEM) ซึ่งสูงกว่าค่าความเข้มข้นพื้นฐาน (117.50 ± 10.54 ng/g) 4.7เท่า และมีระยะวงรอบของการเป็นสัดเฉลี่ย 18.27 ± 1.25 วัน ขณะที่ในระยะ luteal phase มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 32.68 ± 2.54 µg/g ซึ่งสูงกว่าค่าความเข้มข้นพื้นฐานของ โปรเจสเตอโรน (3.69 ± 0.86 µg/g feces) 8.86 เท่า

ข้อสรุป เสือปลามีวงรอบการเป็นสัดอย่างน้อยหนึ่งครั้งในรอบปี มีระยะวงรอบของการเป็นสัดเฉลี่ย 18.27 ± 1.25 วัน ฤดูกาลไม่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนและข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการจัดการการผสมพันธุ์และแผนการพัฒนาเทคนิคทางด้านวิทยาการช่วยสืบพันธุ์ เช่น การผสมเทียมในเสือปลาต่อไป

คำสำคัญ: เสือปลา วงรอบการเป็นสัด สเตียรอยด์ฮอร์โมนในอุจจาระ เอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน

บทนำ

เสือปลา(Fishing cat, *Prionailurus viverrinus*) เป็นหนึ่งในสัตว์วงศ์เสือและแมว (*Family felidae)* (Brown, 2011) เสือปลายังเป็น 1 ใน 9 ชนิดของสัตว์ในวงศ์เสือและแมวของประเทศไทย (Lekagul and McNeely, 1988) ประเทศไทยจัดให้เสือปลาเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2546 (ศุภากร ปทุมรัตนาธาร, 2558) และในปี ค.ศ. 2008 องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (IUCN) จัดให้เสือปลาอยู่ในกลุ่มของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered) อีกทั้งอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (CITES) จัดเสือปลาไว้ในบัญชีชนิดพันธุ์หมายเลข 2 (Appendix II) (Mukherjee *et al*., 2010) เสือปลาอาศัยอยู่ตามป่าชายเลน พื้นที่ชุ่มน้ำ แม่น้ำและหนองน้ำ (Nowell and Jackson, 1996) มักแยกตัวอยู่แบบโดดเดี่ยว การแพร่กระจายพันธุ์ของเสือปลาพบได้ตั้งแต่ทางตะวันตกเนปาลตอนใต้ของอินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย และยังพบเสือปลาได้ที่เกาะสุมาตราและเกาะชวาของอินโดนีเซีย(Lekagul and McNeely, 1988) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานว่าพบเสือปลาที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวจังหวัดชัยภูมิและอุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอดจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ศุภากร ปทุมรัตนาธาร, 2558) เสือปลาเป็นสัตว์ที่มีรูปร่างสั้นป้อมมีขาสั้น มีขนสีเขียวมะกอกมีจุดสีดำเรียงต่อกันเป็นแถวบางครั้งเรียงกันเป็นเส้นขนานไปตามความยาวลำตัว บริเวณหัวของเสือปลามีเส้นสีดำจำนวน 6-8 เส้นพาดผ่านตั้งแต่บริเวณเหนือตาระหว่างหูทั้งสองข้างยาวต่อไปถึงบริเวณคอซึ่งเส้นจะแตกออกเป็นเส้นสั้นๆ หรือจุดที่ตำแหน่งบริเวณหัวไหล่ ขนใต้ท้องของเสือปลาจะมีจุดเช่นเดียวกับขนบริเวณลำตัวแต่มีความยาวมากกว่าขนหางจะมีลักษณะเป็นวงแหวนสีดำโดยหางของเสือปลานั้นมีความยาวเพียงหนึ่งส่วนสามของความยาวลำตัว เสือปลาเพศเมียมักมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ ปลอกหุ้มเล็บของเสือปลาสั้นกว่าเล็บทำให้ไม่สามารถเก็บเล็บได้ทั้งหมดเวลาหดเล็บ (Nowell and Jackson, 1996) เสือปลาสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็วในน้ำ เหยื่อโดยส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์น้ำจำพวกปลามากกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมขนาดเล็ก (Mukherjee *et al*., 2010) อาหารของเสือปลาได้แก่ ปลา ปู หนู นก หอยเปลือกแข็ง และสัตว์ต่างๆ ที่มันสามารถจับได้ (Lekagul and McNeely, 1988) โดยเสือปลาจะมีลักษณะเด่นที่เท้าที่เป็นพังผืดและไม่สามารถหดเล็บเข้าไปในถุงหุ้มปลอกได้ทั้งหมดซึ่งช่วยในการว่ายน้ำเพื่อจับเหยื่อ (Kitchener, 1991) ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมของเสือปลาในธรรมชาติมีน้อยส่วนมากจะพบว่าเสือปลาออกหากินในเวลากลางคืนมากกว่ากลางวันและมักจะหากินใกล้แหล่งน้ำโดยเสือปลาจะใช้พื้นที่หากินเฉลี่ยประมาณ 0.6 ตารางกิโลเมตร (ศุภากร ปทุมรัตนาธาร, 2558)

ปัจจุบันประชากรเสือปลามีจำนวนลดลงมาก ปัจจัยที่ทำให้เสือปลาลดจำนวนลงคือการถูกคุกคามหรือการทำลายพื้นที่ชุ่มน้ำที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยเช่นการเข้ามาตั้งที่อยู่อาศัยของมนุษย์การทำการเกษตรการทำการประมงและการถูกล่า(Nowell and Jackson, 1996) เสือปลาในประเทศไทยเป็นหนึ่งในชนิดของสัตว์ผู้ล่าขนาดเล็กที่จัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่จำเป็นต้องได้รับการอนุรักษ์อย่างเร่งด่วน (นฤมล ตันติพิษณุ และคณะ, 2553) เสือปลาในธรรมชาติจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 8-10 เดือน (Hamlin, 2004) โดยเมื่อโตเต็มที่แล้วเพศผู้จะมีน้ำหนัก 12-14 กิโลกรัม และเพศเมียจะมีน้ำหนัก 8-9 กิโลกรัม (ศุภากร ปทุมรัตนาธาร, 2558) เสือปลาจะผสมพันธุ์กันปีละครั้งในช่วงของเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ (Nowell and Jackson, 1996) โดยจะตั้งท้องนาน 63-70 วัน จำนวนลูกต่อคอก 1-4 ตัว (เฉลี่ย 2 ตัวต่อคอก) น้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ยอยู่ที่ 170 กรัม หย่านมเมื่ออายุ 4-6 เดือน และมีอายุขัยเฉลี่ย 12 ปี (Hamlin, 2004) การอนุรักษ์และศึกษาข้อมูลทางด้านระบบสืบพันธุ์ในเสือปลาจึงมีความสำคัญในการคงไว้และแพร่ขยายประชากรเสือปลาในอนาคต ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษารูปแบบของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระเสือปลาเพศเมียตลอดวงรอบการเป็นสัดโดยวิธีไม่รบกวนสัตว์ (Non-invasive method) เพื่อเป็นแนวทางในการนำข้อมูลได้มาใช้ในการวางแผนการผสมพันธุ์และนำไปประยุกต์ใช้ในงานเทคโนโลยีช่วยสืบพันธุ์ในสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ เพื่อการจัดการวางแผนทางพันธุกรรม โดยการผสมเทียมหรือการย้ายฝากตัวอ่อนในอนาคตต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

เสือปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์เลี้ยงไว้ในส่วนแสดงมีอายุเฉลี่ย 6.89 ± 2.25 ปี (ช่วงอายุระหว่าง 4 ปี 4 เดือน – 9 ปี เดือน 5 เดือน) จำนวน 7 ตัว (น้ำหนักตัวระหว่าง 8.25 - 11.00 กิโลกรัม) เลี้ยงแยกกรงรายตัวเพื่อป้องกันไม่ให้อุจจาระปะปนกันและง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง กรงมีขนาด 2 x 3 x 2.5 เมตร (5 ตัว) หรือ 2 x 1.5 x 2.5 เมตร (2 ตัว) ให้อาหารกินจำพวกโครงไก่ น่องไก่ เนื้อหมู หรือปลาทูวันละครั้งในตอนเย็น มีน้ำให้กินตลอดเวลาในถาดน้ำได้รับแสงธรรมชาติ

การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

เก็บตัวอย่างอุจจาระจากคอกกักเสือปลาในตอนเช้าเวลาประมาณ 08.30-09.30น. เก็บทุกวันจันทร์ พุธ และศุกร์ อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 15 เดือน (ระหว่างเดือนมกราคม 2556

ถึงเดือนเมษายน 2557) เลือกเก็บเฉพาะอุจจาระสดใหม่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันไม่มีเศษอาหารที่ยังไม่ย่อยหรือเศษวัสดุอื่นปนทำการเก็บอุจจาระครั้งละประมาณ 30 กรัมต่อตัว นำตัวอย่างอุจจาระใส่ถุงซิปพร้อมทั้งระบุหมายเลขของตัวสัตว์ หมายเลขกรงและวันที่เก็บตัวอย่าง นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดฮอร์โมนต่อไป

การสกัดฮอร์โมนจากตัวอย่างอุจจาระ

นำตัวอย่างอุจจาระแช่แข็งไปอบด้วยตู้อบลมร้อน (hot-air-oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนอุจจาระแห้งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธี dry weight fecal extraction–boiling method ตามวิธีการของ Brown *et al*., 2004; Khonmee *et al*., 2016) มีขั้นตอนดังนี้เติม90%เอทานอล 5 มิลลิลิตรลงไปในหลอดที่มีอุจจาระแห้ง 0.2 กรัม นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex นาน 30 วินาที อุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวด้านบน (supernatant) เก็บไว้ และสกัดฮอร์โมนจากอุจาระอีกรอบแต่ปั่นเหวี่ยงเพียง15 นาทีนำของเหลวด้านบนที่ได้ในการสกัดรอบสองไปผสมกับของเหลวด้านบนที่ได้ครั้งที่หนึ่งจากนั้นนำไประเหยให้แห้งอีกครั้ง เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตรลงละลายสารสกัดที่แห้งแล้ว นำไปเขย่าให้เข้ากันดีเพื่อไม่ให้มีสารสกัดติดหลอด และเจือจางด้วยสารละลาย buffer ก่อนนำไปวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมน

ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนจากอุจจาระของเสือปลาโดยประยุกต์ตามวิธีการของ Brown (2008) ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) โดยมีรายละเอียดดังนี้ เคลือบไมโครเพลท 96 หลุม ด้วย Polyclonal anti-E2 (Sigma #R4972) ที่ความเข้มข้น 1:17,000 หรือ monoclonal anti-progesterone (Sigma #CL425) ที่ความเข้มข้น 1:5,000 ใน coating buffer 0.015M Na_2CO_3 (Sigma #S2127) 0.035M $NaHCO_3$ (Sigma #S8875; pH 9.6) หลุมละ 50 µl (ยกเว้นหลุม1A และ 1B) แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืนทำการล้างไมโครเพลทด้วย wash solution (1.5M NaCl Sigma #S6925, 0.05% Tween 20 Sigma #P1379) 5 ครั้ง ในการตรวจฮอร์โมนเอสโตรเจนจะเติม assay buffer (0.1 M $NaPO_4$, 0.149M NaCl, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.0) หลุมละ 50 µl จากนั้นปิดเพลทด้วย plate sealer แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง(แต่การตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่ต้องทำการเติม assay buffer) จากนั้นเติมสารมาตรฐานสำหรับตรวจเอสโตรเจน ได้แก่ เอสโตรเจน 17β-estradiol (ความเข้มข้น 1.95-500 pg/หลุม Steraloids #E8875) สารควบคุม (สารควบคุมที่เหมาะสมได้จากการทำ parallelism มีค่าการเกิดพันธะใกล้เคียง 30% และ 70% มากที่สุด) และตัวอย่างสารสกัดจากอุจจาระระดับการเจือจาง 1:100-1:50 ใส่ชนิดละ 20µl ส่วนสารมาตรฐานสำหรับตรวจโปรเจสเตอโรนได้แก่ progesterone standard (Steraloids #P0130) (ความเข้มข้น 0.78-200 pg/หลุม) สารควบคุมและตัวอย่างสารสกัดสำหรับตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเจือจาง 1:5,000-1:200 ใส่ชนิดละ 50µl ใส่ตามหลุม (plate map) ที่ได้กำหนดไว้โดยทำซ้ำ 2หลุม ในสารแต่ละชนิด แล้วเติม estradiol-17β -horse radish peroxidase (UC Davis University, USA) หรือ progesterone-3CMO-horseradish peroxidase (UC Davis University, USA) เจือจางที่เหมาะสมที่ได้จากการทำ checkerboard titration ชนิดละ 50 µl/หลุม ทิ้งให้ทำปฏิกิริยานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างไมโครเพลทด้วย wash solution 5 ครั้ง เพื่อล้างสารที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมสารละลาย ABTS (0.001M ABTS, Sigma #1888) 100 µl/หลุม รอให้เกิดสี 40 – 50 นาที แล้วนำมาอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (TECAN Sunrise™ microplate reader)

การแปรค่าข้อมูล

หาค่าความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline) ของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในอุจจาระจากค่าเฉลี่ยของทุกข้อมูลบวกกับ 1.5 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานตามวิธีของ Brownและคณะ(1994) และ Graham และคณะ (2000) จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดที่เหลือมาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งค่าที่ได้จะถูกเรียกว่าเป็นค่าความเข้มข้นพื้นฐานและค่าที่สูงกว่าความเข้มข้นพื้นฐานบวกกับ 1.5เท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจะถือเป็นค่าที่เพิ่มขึ้น (Herrick *et al*., 2010; Moreira *et al*., 2001; Pelican *et al*., 2005)

ระยะห่างของแต่ละวงรอบการเป็นสัด (estrous cycle) ประมาณจากค่าสูงสุด (peak) ของฮอร์โมนเอสโตรเจนจนถึงค่าสูงสุดของฮอร์โมนเอสโตรเจนในวงรอบการเป็นสัดถัดไปของสัตว์ตัวเดียวกัน

ระยะเวลาการเกิด follicular phase คือจำนวนวันต่อเนื่องกันโดยที่ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงกว่าผลรวมของค่าเฉลี่ยบวก 1.5 เท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การสิ้นสุดของ follicular phase คือการที่ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงกลับสู่ระดับความเข้มข้นพื้นฐานอย่างน้อย 5 วันติดต่อกัน(Brown *et al*., 1994; Graham *et al*., 2000)

วงรอบการเป็นสัดโดยไม่มีการตกไข่ (anovulatory estrous cycle) คือระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งไม่มีการเพิ่มสูงขึ้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนตามมา การระบุแยกวงรอบการเป็นสัดประมาณจากค่าสูงสุดทั้งสองต้องมีระยะห่างกันไม่ต่ำกว่า 6 วันที่มีความเข้มข้นฮอร์โมนเอสโตรเจนอยู่ในระดับความเข้มข้นพื้นฐาน (Brown *et al*., 1994; Graham *et al*., 2000)

ช่วงระยะเวลาที่ไม่เป็นสัด (anestrus) จะต้องไม่น้อยกว่า50 วัน (Santymire *et al*., 2011)

ระยะ luteal phaseประมาณจากค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระสูงกว่าความเข้มข้นพื้นฐานบวกกับ 1.5 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคงอยู่สูงกว่าอย่างน้อย 14 วันติดต่อกันแต่เมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดลงกลับสู่ระดับ baseline อย่างน้อย 6 วันถือว่าสิ้นสุดระยะ luteal phase (Brown *et al*., 1994; Graham *et al*., 2000)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใช้นำมาวิเคราะห์ข้อมูลแบบ repeated measure ANOVA โดยมีตัวแปรอิสระที่สำคัญอยู่ 2 ตัวแปร คือฤดูกาล และระดับความแตกต่างของฮอร์โมนในเสือปลาแต่ละตัว โดยค่าที่ได้จะถูกแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) และระดับนัยสำคัญทางสถิติกำหนดที่ $P<0.05$ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมด ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 17.0

ผลการศึกษา

ตลอดระยะเวลา 15 เดือน เก็บตัวอย่างอุจจาระจากเสือปลาได้จำนวนทั้งสิ้น1,344 ตัวอย่าง เมื่อนำอุจจาระไปสกัดฮอร์โมนและวิเคราะห์ข้อมูลแล้ว พบว่าสามารถจำแนกวงรอบการเป็นสัดออกเป็นระยะ follicular phase และระยะ luteal phase โดยพบว่าระยะ follicular phase มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.01 ± 0.71 วัน โดยมีระยะเวลาของ estrous cycle 18.27 ± 1.25 วัน ในระยะนี้พบว่ามีค่าความเข้มข้นพื้นฐานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (baseline estrogen) เท่ากับ 117.50 ± 10.54 ng/g feces ค่าเฉลี่ยของเอสโตรเจน/follicular phase เท่ากับ 404.53 ± 56.58 ng/g feces และค่า peak estrogen/follicular phase เท่ากับ 562.49 ± 95.13 ng/g feces จากผลการศึกษานี้พบความเข้มข้นสูงสุดของฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงกว่าความเข้มข้นพื้นฐาน 4.7 เท่า

ข้อมูลทางระบบสืบพันธุ์ในเสือปลาเพศเมียรายตัวในระยะ follicular phase (Table 1) ส่วนในระยะ luteal phase (Table 2) พบจำนวนครั้งของ estrogen surge เท่ากับ 6.00 ± 1.13 ครั้ง ระยะเวลาของ luteal phase เท่ากับ 45.76 ± 2.34 วัน ค่าความเข้มข้นพื้นฐานของโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 3.69 ± 0.86 µg/g ค่าเฉลี่ยของโปรเจสเตอโรน/ luteal phase เท่ากับ 32.68 ± 2.54 µg/g ค่า peak progesterone/luteal phase เท่ากับ 72.70 ± 6.59 µg/g ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระในช่วง luteal phase มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นพื้นฐาน 8.86 เท่า เสือปลาทั้ง 7 ตัวมีจำนวนครั้งที่พบ luteal phase ดัง Table 3

จากผลการศึกษาเมื่อนำค่าความเข้มข้นของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนรวมทั้งค่ามาตรฐานของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์และนำมาแสดงรูปแบบกราฟ พบว่ารูปแบบของกราฟที่ได้ ทำให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน รวมทั้งสามารถเปรียบเทียบค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (Figure 1)

การแบ่งฤดูกาลยึดตามกรมอุตอนิยมวิทยาได้ดังนี้ ฤดูหนาว(ระหว่างกลางเดือนตุลาคมถึงกลางเดือนกุมภาพันธ์) ฤดูร้อน(ระหว่างกลางเดือนกุมภาพันธ์ถึงกลางเดือนพฤษภาคม)และฤดูฝน (ระหว่างกลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนตุลาคม) การจำแนกระดับฮอร์โมนตามฤดูกาล เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน พบว่าค่า mean fecal estrogen (p-value = 0.938) ค่า mean elevated fecal estrogen (p-value = 0.945) ค่า mean fecal estrogen peak (p-value = 0.715) ค่า mean fecal progesterone (p-value = 0.451) และค่า mean fecal progesterone peak (p-value = 0.159) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

วิจารณ์

การศึกษาฮอร์โมนเพศด้วยวิธีการตรวจจากอุจจาระในครั้งนี้ ได้เก็บตัวอย่างจากเสือปลาเพศเมีย วัยเจริญพันธุ์จำนวน 7 ตัว ที่เลี้ยงขังแยกกรงในเชียงใหม่ไนท์ซาฟารี เป็นระยะเวลา 15 เดือน ซึ่งคลอบคลุมทุกฤดูกาลของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างต่อเนื่อง สัปดาห์ละ 3 วัน คือ ทุกวันจันทร์ พุธ และศุกร์ โดยรูปแบบการวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาในสัตว์ตระกูลแมว (Palm *et al*., 1996; Brown *et al*., 2004) แต่ยังมีความแตกต่างจากการศึกษาของ Santrymireและคณะ (2011) ที่ศึกษาฮอร์โมนเพศของเสือปลาเพศเมียในสวนสัตว์ 7 แห่งในอเมริกาเหนือ โดยเก็บตัวอย่างจากอุจจาระสัปดาห์ละ 5-7 วัน

จากการศึกษารูปแบบของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปร

Table 1. Follicular phase reproductive data of seven female fishing cats at the Chiang Mai Night Safari.

Cat No.	Duration of follicular phase (d)	Estrous cycle length(d)	Baseline estrogen (ng/g feces)	Mean estrogen/ follicular phase (ng/g feces)	Peak estrogen/ follicular phase (ng/g feces)
F1	7.00 ± 0.7 (n*=22)	14.54 ± 1.12 (n=26)	132.15 ± 3.62 (n=193)	344.25 ± 14.87 (n=87)	455.62 ± 32.59 (n=27)
F2	10.52 ± 1.11 (n=21)	17.76 ± 2.00 (n=21)	89.41 ± 2.37 (n=193)	272.62 ± 11.18 (n=99)	363.55 ± 31.51 (n=23)
F3	10.67 ± 1.85 (n=21)	19.82 ± 1.87 (n=22)	139.63 ± 3.29 (n=194)	368.90 ± 17.76 (n=101)	430.15 ± 52.20 (n=23)
F4	8.22 ± 3.51 (n=18)	17.35 ± 1.36 (n=23)	134.73 ± 3.15 (n=191)	334.10 ± 21.75 (n=75)	422.91 ± 60.74 (n=24)
F5	12.11 ± 1.17 (n=18)	23.56 ± 2.51 (n=18)	102.47 ± 2.51 (n=193)	324.18 ± 17.42 (n=94)	464.36 ± 54.14 (n=19)
F6	11.88 ± 1.70 (n=17)	20.50 ± 1.49 (n=14)	148.02 ± 3.61 (n=190)	714.38 ± 9.38 (n=88)	1,064.84 ± 276.86 (n=18)
F7	9.69 ± 0.96 (n=29)	14.33 ± 1.39 (n=30)	76.10 ± 1.84 (n=190)	473.29 ± 31.29 (n=135)	735.99 ± 96.60 (n=30)
Mean ± SEM**	10.01 ± 0.71	18.27 ± 1.25	117.50 ± 10.54	404.53 ± 56.58	562.49 ± 95.13
Range	7 - 2	14 – 23	76 - 148	272 - 714	363 – 1,064

* n = number of samples

** Values are Mean ± SEM in samples collected over 15 months (total sample = 1344)

Table 2. Luteal phase reproductive data of seven female fishing cats at the Chiang Mai Night Safari.

Cat No.	Estrogen surge during luteal phase (times)	Luteal phase length (d)	Baseline Progesterone (µg/g feces)	Mean Progesterone/ luteal phase (µg/g feces)	Peak Progesterone/ luteal phase (µg/g feces)
F1	6	45.00 ± 5.00 (n*=2)	2.56 ± 0.04 (n=193)	29.47 ± 3.19 (n=38)	65.07 ± 11.14 (n=2)
F2	6	53.00 ± 5.55 (n=3)	3.16 ± 0.06 (n=192)	27.16 ± 2.25 (n=63)	62.18 ± 3.97 (n=3)
F3	10	53.50 ± 6.89 (n=4)	3.21 ± 0.04 (n=193)	32.77 ± 2.56 (n=87)	76.55 ± 8.42 (n=4)
F4	6	43.00 ± 2.89 (n=3)	6.59 ± 0.15 (n=191)	40.04 ± 3.07 (n=47)	86.80 ± 5.50 (n=3)
F5	1	36.00 ± 0.00 (n=1)	1.54 ± 0.03 (n=193)	22.71 ± 3.19 (n=15)	43.17 ± 0.00 (n=1)
F6	4	47.50 ± 4.56 (n=4)	7.13 ± 0.52 (n=190)	35.84 ±2.6 (n=72)	79.57 ± 8.14 (n=4)
F7	9	42.33 ± 4.10 (n=3)	1.64 ± 0.02 (n=188)	40.78± 5.20 (n=46)	95.59 ± 36.81 (n=3)
Mean ± SEM**	6.00 ± 1.13	45.76 ± 2.34	3.69 ± 0.86	32.68 ± 2.54	72.70 ± 6.59
Range	1 - 10	36 – 53	1.54 – 6.59	27.16 – 40.78	43.17 – 95.59

* n = number of samples

** Values are Mean ± SEM in samples collected over 15 months (total sample = 1344)

Table 3. Occurrence of luteal phase in seven female fishing cats across season at the Chiang Mai Night Safari.

Cat No.	Winter	Summer	Rainy season	Total
F1	0	0	2	2
F2	1	0	2	3
F3	1	1	2	4
F4	1	1	1	3
F5	1	0	0	1
F6	1	1	2	4
F7	0	1	2	3
Mean	0.71	0.57	1.57	2.86

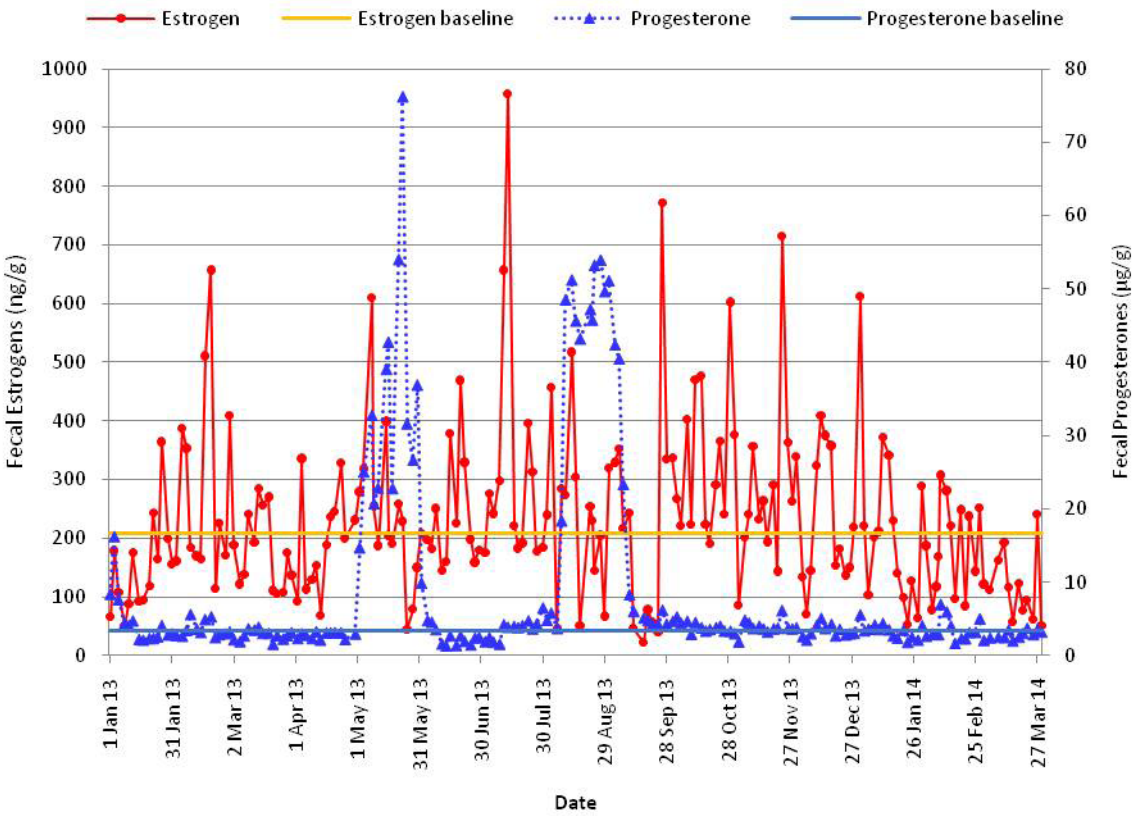

Figure 1. showed estrogen and progesterone levels in fishing cat No.1 during the study period.

เจสเตอโรนในเสือปลาเพศเมียในเชียงใหม่ไนท์ซารี ประเทศไทย พบว่ามีระยะเวลาของวงรอบการเป็นสัด 18.27 วันซึ่งต่ำกว่าการศึกษาของ Santrymire และคณะ (2011) (20 วัน) ซึ่งความแตกต่างกันไม่มากนั้นอาจเกิดจากจำนวนสัตว์ และ/หรือความถี่ในการเก็บตัวอย่างที่ต่างกัน วงรอบการเป็นสัดในเสือปลามีระยะเวลาใกล้เคียงกับสิงโต พูม่า เสือโคร่ง เสือดาว เสือดาวหิมะ และเสือลายเมฆ ซึ่งมีระยะของวงรอบการเป็นสัดอยู่ที่ประมาณ 20-30 วัน แต่จะยาวนานกว่าใน เสือชีตาร์ แมวตีนดำ (Black-footed cat) แมวทราย (Sand cat) แมวป่าโอซีล็อต (Ocelot) Tigrina และ แมวมาร์เกย์ (Margay) (Santymire *et al.*, 2011) ในส่วน

ของระยะเวลาของ luteal phase ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ประมาณ 46 วัน พบว่ามีระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับแมวบ้าน (Graham *et al*., 2000) และแมวพัลลัส (Pallas' cat) (Brown, 2011)

ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สูงที่สุดในช่วงของ follicular phase จากการศึกษาครั้งนี้คือประมาณ 562 ng/g feces ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานอยู่ที่ 4.7 เท่า มีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Santymire และคณะ (2011) ที่พบว่าค่าระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สูงที่สุดเท่ากับ 460 ng/g feces ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐาน 5 เท่า แสดงให้เห็นว่า พารามิเตอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนจากการศึกษาครั้งนี้ มีค่าที่ใกล้เคียงกับการศึกษาในเสือปลาเพศเมียที่เลี้ยงในพื้นที่ต่างกัน นอกจากนี้ เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ มาเปรียบเทียบในแต่ละฤดูกาลพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า อิทธิพลของฤดูกาลไม่มีผลต่อรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในเสือปลาเมีย ที่เลี้ยงภายในพื้นที่จำกัดของเชียงใหม่ไนท์ซาฟารี และผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Santymire และคณะ (2011) และ Brown (2006)

สรุป

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าเสือปลาเพศเมียมีระยะเวลาของวงรอบการเป็นสัด ประมาณ 18 วันมีระยะเวลาของ luteal phase ประมาณ 46 วัน และพบว่ามีการเกิด luteal phase1-4 ครั้งต่อปี (เฉลี่ย 2.9 ครั้งต่อปี) ระยะเวลาของ follicular phase ประมาณ 11 วัน ค่าเฉลี่ยของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สูงที่สุดในช่วงของ follicular phase อยู่ที่ประมาณ 562 ng/g feces และสูงกว่าค่ามาตรฐานประมาณ 4.7 เท่า และฤดูกาลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ข้อมูลรูปแบบของฮอร์โมนเพศที่ได้จากการศึกษานี้น่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนเพื่อการสืบพันธุ์ในเสือปลาต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ ที่ช่วยสนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณฝ่ายบริหารจัดการสัตว์ สำนักงานเชียงใหม่ไนท์ซาฟารีที่อำนวยความสะดวกและให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างและขอขอบคุณฝ่ายอนุรักษ์วิจัยและสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เชียงใหม่ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการเก็บตัวอย่าง การสกัดตัวอย่าง และการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างฮอร์โมน

ขอขอบคุณ ดร. Janine L. Brown (Head, Endocrinology Laboratory Elephant SSP Reproductive Advisor) จากสถาบัน Smithsonian Institution National Zoological Park แห่งประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความรู้ในการคำนวณหาวงรอบการเป็นสัดในเสือปลา และให้คำแนะนำในการเขียนบทความทางวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

Brown, J.L. 2006. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. Theriogenology 66, 25–36.

Brown, J.L. 2011. Female reproductive cycles of wild female felids. Animal Reproduction 124: 155–162.

Brown, J.L. 2008. Wildlife endocrinology manual. Front Royal VA: Conservation and Research Center Endocrine Research Laboratory.

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

Brown, J.L, Wasser, S.K., Wildt, D.E., Graham, L.H. 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces.

Biology of Reproduction 51, 776-786.

Graham, L.H., Swanson, W.F., Brown, J.L. 2000. Chorionic gonadotropins administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. Theriogenology 54, 1117-1131.

Hamlin, M. *Prionailurus viverrinus* [online] 2004 [cited 2013 Aug 10]. Available from http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Prionailurus_viverrinus/

Herrick, J.R., Bond, J.B., Campbell, M., Levens, G., Moore, T., Benson, K., et al. 2010. Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*). Gen Comp Endocrinology 165, 204–214.

Khonmee, J., Vorawattanatham, N., Pinyopummin, A., Thitaram, C., Somgird, C., Punyapornwithaya ,V., Brown, J.L . 2016. Assessment of faecal glucocorticoid metabolite excretion in captive female fishing cats (*Prionailurus viverinus*) in Thailand. Conservation Physiology 4(1): cow021. doi:10.1093/ conphys/cow021.

Kitchener, A.C. 1991. The natural history of the wild cats. Christopher Helm: London.

Lekagul, B., McNeely, J.A. 1988. Mammals of Thailand. 2nd ed. Bangkok: Association for the Conservation of Wildlife.

Moreira, N., Monteiro-Filho, E.L., Moraes, W., Swanson, W.F., Graham, L.H., Pasquali, O.L., et al. 2001. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the Leopardus Genus. Zoo Biology 20(2), 103-116.

Mukherjee, S., Sanderson, J., Duckworth, W., Melisch, R., Khan, J., Wilting, A., et al. *Prionailurus viverrinu* [online] 2010 [cited 30 Aug 2013] Available from: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T18150A7673993.en

Nowell, K., Jackson, P. 1996. Wild Cats Status Survey and Conservation Action Plan. Cambridge UK: The Burlington Press.

Palm, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Iswmall, M.N. 1996. Excretion of infuse 14C-steroid hormone via faeces and urine in domestic livestock. Animal Reproduction 43, 43-63.

Patumrattanathan, S. 2015. Ecology of fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) by community participation on its conservation in Kui Buri district, Prachuap Khiri Khan province, Thailand. Doctor of Philosophy (Sustainable Land Use and Natural Resources Management), Major Field: Sustainable Land Use and Natural Resources Management, Interdisciplinary Graduate Program. Graduate School, Kasetsart University. 162 p.

Pelican, K.M., Brown, J.L., Wildt, D.E., Ottinger, M.A., Howard, J.G. 2005. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. General and Comparative Endocrinology 144(2), 110-121.

Santymire, R.M., Brown, J.L., Stewart, R.A., Santymire, R.C., Wildt, D.E., Howard, J. 2011, Reproductive gonadalsteroidogenic activity in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses. Animal Reproduction 128, 60-72.

Tantipisanuh, N., Chutipong, W., Ngoprasert, D., Lynam, A.J., Sukmasuang, R., Jenks, K.J.G., et al. 2010. Status and distribution of small carnivores in Thailand. Abstracts in Thailand Wildlife Seminar 31st. 50 years To Celebrate the Golden Jubilee of Thai Wildlife Conservation. Faculty of Forestry, Kasetsart University.16-17 December 2010. 20-22.