การศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจากการใช้อุปกรณ์สอดช่องคลอดเพื่อควบคุมการเป็นสัดในกระบือปลัก

Plasma progesterone profile after synchronization of estrus with intravaginal device in swamp buffal

ณัฐวุฒิ อภิชัย[1], ณรงค์พัชร น้ำใจสุข[1], จตุพงษ์ ปัทมะ[1], เพทาย พงษ์เพียจันทร์[2] และ วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์[1*]

Nuttawut Apichai[1], Narongpatchara Numjaisuk[1], Jatupong Pattama[1], Petai Pongpiachan[2] and Wiwat Pattanavong[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของกระบือปลัก จากการใช้อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดที่ผลิตขึ้นเปรียบเทียบกับอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดทางการค้า โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ใช้อุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดทางการค้า (Control : n=3) กลุ่มที่ 2 ใช้อุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดที่ผลิตขึ้น (MJID1 : n=3) และกลุ่มที่ 3 ใช้อุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดที่ผลิตขึ้น (MJID2 : n=3) โดยกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่มจะทำการสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดเข้าช่องคลอดพร้อมกับฉีด 100 mg/ml P_4 + 2 mg/ml E_2 ในวันที่ 0 และวันที่ 6 ทำการฉีดฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ วันที่ 7 ถอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำเป็นสัด วันที่ 8 ทำการฉีดฮอร์โมน Estradiol Benzoate 1mg/ml เฝ้าสังเกตการเป็นสัดในช่วง 24-36 ชั่วโมง โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดกระบือปลักเป็นเวลา 10 วันนับตั้งแต่วันที่เริ่มสอดอุปกรณ์ เพื่อทำการวัดปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดด้วยเทคนิค ELISA ผลการทดลองพบว่ากระบือปลักในกลุ่ม MJID2 มีปริมาณโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงกว่ากลุ่มทางการค้า (Control) และกลุ่ม MJID1 ($P<0.05$)
คำสำคัญ: กระบือปลัก, การเหนี่ยวนำการเป็นสัด, อุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอด

ABSTRACT: The experiment is a study on plasma progesterone profile after synchronization of estrus with intravaginal device in swamp buffalo. The estrus synchronization device of commercial vagina inserting type was used for comparing with that of the invented one. The experiment consisted of 3 groups : 1) using of commercial device (Control : n=3). 2) using of the invented vagina inserting device (MJID1 : n=3). 3) using of the invented vagina inserting device (MJID2 : n=3). All of the experimented groups was used on the first day of being estrus (Day 0) 100 mg/mlP4+2mg/mlE$_2$ was injected. After that,PGF$_{2\alpha}$ was injected on Day6. The vaginal inserting device was removed from the vagina on Day7 and Estradiol Benzoate 1 mg/ml was injected on Day8 and Estrus detected for 24-36 hours. The swamp buffalo blood sample was collected for 10 days after the first day of inserting the device. This was aimed measure the amount of progesterone hormone in blood circulation by using ELISA technique. Results, the researcher device (MJID2) gave a higher plasma progesterone concentration than that of the commercial and MJID1 device ($P<0.05$)
Keyword: swamp buffalo, estrus synchronization, intravaginal device for estrus synchronization

---

[1] คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai 50290

[2] ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200
Department of Animal and Aquatic Science , Faculty of Agriculture, Chiang Mai University 50200

* Corresponding author: Wiwat-p@mju.ac.th

บทนำ

อุปสรรคประการหนึ่งของการผสมเทียมกระบือปลักคือ การตรวจการเป็นสัด (estrus) เนื่องจากกระบือปลักมีวงรอบการเป็นสัด ระยะเวลาการเป็นสัดที่ผันแปรและเห็นได้ไม่ชัดเจน ซึ่งระยะเป็นสัดเป็นระยะที่แสดงออกถึงการยอมรับการผสมจากกระบือปลักเพศผู้ แต่กระบือปลักจะมีความแตกต่างจากโคโดยกระบือปลักจะไม่แสดงอาการเป็นสัดต่างๆ ให้เห็นเด่นชัด มักเป็นสัดเงียบ Rensis et al. (1997) รายงานว่าระยะการเป็นสัดของกระบือปลักจะอยู่ประมาณ 19-42 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่รายงานว่าอยู่ในช่วง 24-36 ชั่วโมงและมีการตกไข่ 6-21 ชั่วโมงหลังสิ้นสุดการเป็นสัด การเหนี่ยวนำการเป็นสัดจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ซึ่งจะช่วยเหนี่ยวนำให้กระบือปลักมีวงรอบการเป็นสัดที่พร้อมกันและสามารถกำหนดเวลาการผสมเทียมได้ ช่วยลดปัญหาการตรวจสัดและการจับสัดยากได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการพัฒนาอุปกรณ์ควบคุมหรือเหนี่ยวนำการเป็นสัดขึ้นเองเพื่อใช้ในประเทศจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและพัฒนาความสามารถทางระบบสืบพันธุ์ของกระบือปลัก เพื่อเป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กระบือปลักต่อไป

วิธีการทดลอง

ใช้กระบือปลักสาวที่เป็นสัดครั้งแรก ซึ่งไม่เคยได้รับการผสมจำนวน 9 ตัว จากฟาร์มโคนม-โคเนื้อมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการสุ่มกระบือปลักทั้งหมดโดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกทำการสอดอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดทางการค้า (Control) จำนวน 3 ตัว กลุ่มที่ 2 ใช้อุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดที่ผลิตขึ้นมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 1.5 กรัม (MJID1) จำนวน 3 ตัว และกลุ่มที่ 3 ใช้อุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดที่ผลิตขึ้นมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 2 กรัม (MJID2) จำนวน 3 ตัว โดยแบ่งกระบือปลักทั้งหมดอยู่ในคอกๆ ละ 1 ตัว จากนั้นทำการสอดอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดกลุ่ม Control , MJID1 และ MJID2 ร่วมกับการใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่ด้วยฮอร์โมน โดยในวันที่เริ่มสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด (วันที่ 0) จะทำการฉีดฮอร์โมน Estradiol 17β 1mg/ml และฉีด Progesterone 1mg/ml จากนั้นในวันที่ 6 จะทำการฉีด $PGF_{2\alpha}$ 2ml เพื่อสลายคอร์ปัสลูเทียม มีผลให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงและในวันที่ 7 จึงทำการถอดอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอด และในวันที่ 8 จะทำการฉีด Estradiol Benzoate 1mg/ml ปริมาณ 1 ml สังเกตการเป็นสัดในช่วง 24-36 ชั่วโมง โดยทำการตรวจการเป็นสัดวันละ 2 ครั้งๆ ละ 2 ชั่วโมง และวันที่ 10 (D_{10}) ทำการผสมพันธุ์เมื่อพบว่ากระบือปลักแสดงอาการเป็นสัด ดังแสดงใน Figure 1 โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดโคเป็นเวลา 10 วันนับตั้งแต่วันที่เริ่มสอดอุปกรณ์

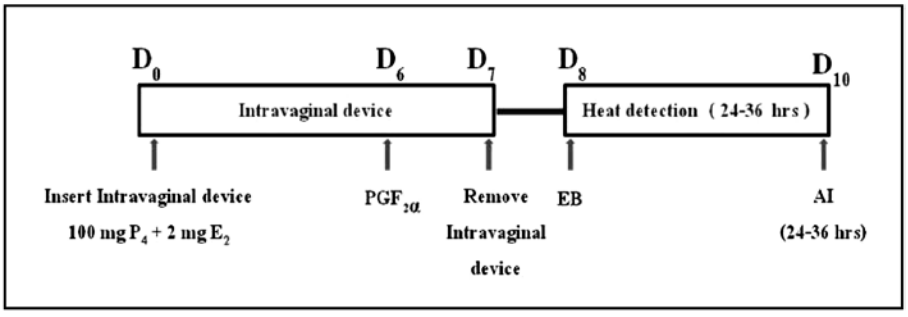

Figure 1 Estrous synchronization protocols using the intravaginal device for swamp buffalo. Sangsritavong et al. (2002)

การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกระบือปลักตั้งแต่วันที่เริ่มสอดอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอด (วันที่ 0) ไปจนถึงวันที่ 10 โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดกระบือปลักจากเส้นเลือดดำบริเวณหาง ปริมาณ 10 ml.โดยเก็บในหลอดทดลองขนาด 15 ml .ที่มีการเติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบเป็นเวลา 20 นาที ทำการเก็บส่วนที่เป็นพลาสมาใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.9 มิลลิลิตรและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างโดยวิธี Competitive ELISA

เคลือบเพลท 96 หลุม ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อโปรเจสเตอโรนความเข้มข้น 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง ล้างด้วยเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างจากนั้นเติมสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 1% ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ระหว่างนั้นทำการเติมโพลีโคลนอลที่จำเพาะต่อโปรเสเตอโรน (PAb-P4) ที่มีความเข้มข้น 1:5,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรรวมกับตัวอย่างพลาสมาที่จะทำการวิเคราะห์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรบ่มรวมกันในไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ทำการล้างเพลท หลังจากนั้นทำการเติมตัวอย่างที่บ่มรวมกับ PAb-P4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทแล้วเติมสารละลายที่ทำให้เกิดสีปริมาตรา 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย $4NH_2SO_4$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสังคมศาสตร์ รุ่น 18.0 สำหรับวินโดว์. (Statistics Package for the Social Science: SPSS 18.0 For Windows) ลิขสิทธิ์สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

วันที่ 13 สิงหาคม พ.ศ. 2553 ถึง วันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ. 2554

ผลการทดลอง

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของกระบือปลักทั้ง 3 กลุ่มพบว่า มีระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงขึ้นเรื่อยๆ จากวันที่ทำการสอดอุปกรณ์ และจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากได้รับการฉีด $PGF_{2\alpha}$ ในวันที่ 6 หนึ่งวัน จากนั้นในวันที่ 8 จะทำการฉีด Estradiol Benzoate เหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ มีผลให้ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มระดับสูงขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 8-10 แสดงใน **Figure 2** และเมื่อนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า กระบือปลักในกลุ่ม MJID2 มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

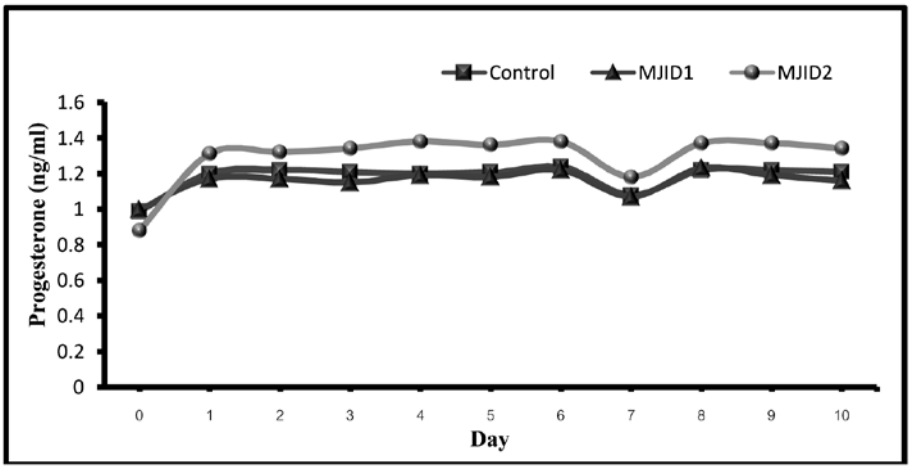

Figure 2 Plasma progesterone profile 10 days after insertion intravaginal device in swamp buffalo.

Table 1 The plasma progesterone profile of swamp buffalo in 3 groups (Control, MJID1 and MJID2) measured on a daily basis.

Day	Progesterone concentrations ng/ml (Mean ± SE (Min-Max, n))		
	Control (n=3)	MJID1 (n=3)	MJID2 (n=3)
0	0.99±0.10[a]	1.00±0.10[a]	0.88±0.10[a]
1	1.20±0.09[a]	1.17±0.09[a]	1.31±0.09[a]
2	1.22±0.07[a]	1.17±0.07[a]	1.32±0.07[a]
3	1.21±0.06[ab]	1.15±0.06[a]	1.34±0.06[b]
4	1.20±0.08[a]	1.19±0.08[a]	1.38±0.08[a]
5	1.21±0.08[a]	1.18±0.08[a]	1.36±0.08[a]
6	1.24±0.08[a]	1.22±0.08[a]	1.38±0.08[a]
7	1.08±0.02[a]	1.07±0.02[a]	1.18±0.02[b]
8	1.22±0.08[a]	1.23±0.08[a]	1.37±0.08[a]
9	1.22±0.07[a]	1.19±0.07[a]	1.37±0.07[a]
10	1.21±0.08[a]	1.16±0.08[a]	1.34±0.08[a]

[a,b] described the significantly different value in row at $P<0.05$

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสอดอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดทางการค้าร่วมกับการฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสัดและตกไข่ในกระบือปลักได้ (Neglia et al. 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chaikhun et al. (2010) คือการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยอุปกรณ์ทางการค้าร่วมกับการฉีดฮอร์โมน ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้อัตราการผสมติดและอัตราการตั้งท้องในกระบือปลักเพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สูงขึ้นก่อนการฉีด $PGF_{2\alpha}$ ในวันที่ 6 เกิดจากการที่ยังมีคอร์ปัสลูเทียมคงอยู่และยังไม่มีการถอดอุปกรณ์ออกจากช่องคลอด ส่วนในวันที่ 8-10 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มสูงขึ้นอีกเล็กน้อย เนื่องจากมีการตกไข่และคอร์ปัสลูเทียมเริ่มมีการพัฒนาขึ้นใหม่ สำหรับการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดที่ผลิตขึ้น (MJID1,MJID2) มีความสามารถในการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเข้าสู่กระแสเลือดของกระบือปลักได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับอุปกรณ์การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดทางการค้า ซึ่งเป็นเทคโนโลยีของต่างประเทศซึ่งต้องนำเข้ามาในราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการคิดค้นอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อใช้ทดแทนอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้า จะช่วยลดมูลค่าการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศได้ และให้เกษตรกรได้มีโอกาสเข้าถึงเทคนิคการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในการเพิ่มจำนวนกระบือปลักที่ตั้งท้องด้วยวิธีการควบคุมนี้มากขึ้น รวมถึงจะช่วยให้ทำการผสมพันธุ์ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากกระบือปลักจะเป็นสัดในเวลาเดียวกัน ทำให้ง่ายต่อการจัดการ ช่วยให้การผสมพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถพัฒนาอุปกรณ์สำหรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดสำหรับนำไปประยุกต์ใช้กับการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์โคเนื้อ, โคนม และสัตว์อื่นๆ ต่อไป

สรุป

อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดสามารถนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในกระบือปลักได้จริง รวมถึงใช้ทดแทนและลดมูลค่าการนำเข้าอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดทางการค้าที่เป็นเทคโนโลยีนำเข้าจากต่างประเทศได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chaikhun T., T. Tharasanit, J. Rattanatep, F. De Rensisd, M. Techakumphu. 2010. Fertility of swamp buffalo following the synchronization of ovulation by the sequential administration of GnRH and PGF2alpha combined with fixed-timed artificial insemination. Theriogenology. 74:1371-1376.

Neglia G, A. Natale, G. Esposito, F. Salzillo, L. Adinolfi, G. Campanile, M. Francillo, L.Zicarelli. 2008.Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. In: Proc I Congresso Nazionale sull'allevamento del buffalo. 953-960.

Rensis F. De and F. Lo´pez-Gatius. 2007.Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. Theriogenology. 67:209-216.

Sangsritavong,S., D.K. Combs, R. Satori, L.E. Armentano and M.C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17β in dairy cattle. J. Dairy Sci. 85: 2831-2842.