

การศึกษาวงรอบการสืบพันธุ์และการทดลองผสมเทียมช้างไทยในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

Reproductive Cycle Studies and Trials Artificial Insemination of Asian Elephants

in Khao Kheow Zoo, Thailand.

ชัยณรงค์ ปั่นคง¹, สุปราณี จันทร์เมืองไทย¹, ยลดา แต่งภูเขียว¹, อัมภา ห่อไธสง¹, อัมพิกา ทองภักดี², สกนธ์ น้อยมูล¹,

5 เจษฎา แถวเนิน¹, อุมภาพร ใหม่แก้ว¹, นิกอร์ ทองทิพย์³ และ อุพาริกา กองพรหม¹

Chainarong Punkong¹, Supranee Chanmueangthai¹, Yollada Taengphukhieo¹, Ampa Hothisong¹,

Ampika Thongpakdee², Sakol Noimuul¹, Jessada Thaeonoen¹, Umaporn Maikaew¹, Nikorn Thongtip³

and Uraikha Kongprom¹

E-mail: agist_c@hotmail.com โทร. 081-6851547

10

¹ ฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยและสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว 235 หมู่ 7 ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20110.

² สำนักอนุรักษ์ และวิจัย องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ แขวงคูสิต เขตคูสิต กรุงเทพมหานคร.

³ คณะสัตวแพทย์ คลินิกสัตว์ใหญ่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

15 **คำสำคัญ:** วงรอบการสืบพันธุ์ ผสมเทียม ลูทีไนซิงฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน คอร์ติซอล

Keywords: Reproductive cycle, Artificial insemination, Luteinizing, Progesterone, Cortisol

1. บทนำ (Introduction)

จากข้อจำกัดของปัญหาทางการสืบพันธุ์ การขยายพันธุ์ยาก และการแบ่งแยกกลุ่มประชากรช้างเลี้ยงของ
20 องค์การสวนสัตว์ ทำให้ปัจจุบันมีแนวโน้มว่าอัตราการเกิดของช้างมีน้อยกว่าหรือเท่ากับอัตราการตาย (ISIS
data, 2015) ซึ่งช้างเพศเมียที่อยู่ในสภาพการเพาะเลี้ยงมักประสบปัญหาเรื่องของวงรอบการสืบพันธุ์ (มีวงรอบ
การเป็นสัดที่ไม่แน่นอน) และมีความผิดปกติของระบบการสืบพันธุ์ที่นำไปสู่การสูญเสียประชากรจำนวนมาก
ในช่วงไม่กี่ทศวรรษที่ผ่านมา (Wiese, 2000; Hutchins and Keele, 2006) โดยอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของ
ต่อมไร้ท่อ โภชนาการและความเครียด (Brown *et al.*, 2004; Kimberley, 2009) การศึกษาวงรอบการสืบพันธุ์
25 และการทดลองผสมเทียมช้างไทย ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียวครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่าปริมาณฮอร์โมน
วงรอบการสืบพันธุ์ รวมถึงประเมินสถานภาพทางการสืบพันธุ์และศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์เพิ่ม
จำนวนลูกช้างด้วยการผสมเทียมเพื่อเป็นต้นแบบสู่การขยายพันธุ์ช้างไทยในองค์การสวนสัตว์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

30 **2.1 การเก็บชีรัมช้างเพื่อการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนวงรอบการสืบพันธุ์และการตกไข่ของช้างเอเชีย**

ศึกษาในกลุ่มประชากรช้างเอเชียเพศเมียของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสวนสัตว์อื่นในองค์การ
สวนสัตว์ จำนวน 8 เชือก มีช่วงอายุระหว่าง 20-45 ปี เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใบหู (ear vein) ทุกๆ
สัปดาห์ (หรือทุกวันกรณีหาช่วงของการตกไข่) ปั่นแยกเก็บชีรัมสำหรับตรวจวัดระดับฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน

35 (Progesterone; P4) และลูทิไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing hormone; LH) ด้วยวิธี Enzyme immunoassay (EIA) แบบ Double-antibody EIA และ Single-antibody EIA ตามวิธีของ Brown และคณะ (2000; 2004) และ Arborn Assay Inc.. (เอกสารไม่ถูกเผยแพร่)

2.2 การเก็บน้ำเชื้อจากช้างเอเชียเพศผู้

เก็บน้ำเชื้อจากช้างเอเชียเพศผู้ อายุระหว่าง 25-45 ปี ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวน 3 เชือก ทั้งที่เป็นช้างงาและช้างสีกอ ด้วยวิธีการใช้มือวนกระดูกชั้นที่บริเวณ ampulla gland และ seminal vesicle

40 2.3 การผสมเทียมช้าง

ทำการผสมเทียมช้างด้วยน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่แข็งในช้างเมื่อพบช่วงเวลาที่เหมาะสม ด้วยวิธีการใช้กล้องส่องตรวจภายในนำทางท่อผสมเทียม (endoscopic AI) ในแต่ละครั้งทำการผสมเทียมติดต่อกัน 3 วัน คือช่วง 1 วันก่อนการตกไข่ ช่วงวันที่ตกไข่ และ 1 วันหลังการตกไข่ ตามลำดับ

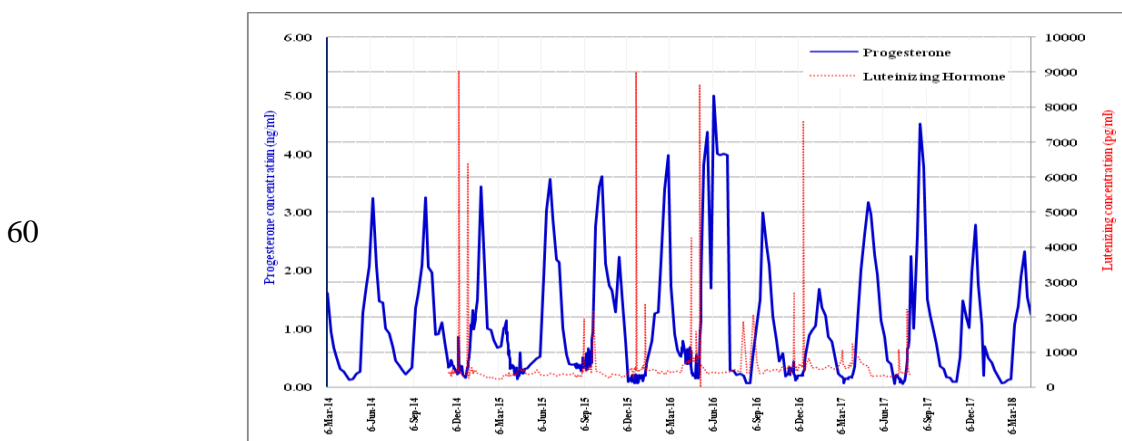
45 2.4 การตรวจติดตามการตั้งท้อง

ใช้การตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดติดต่อกันทุกสัปดาห์เป็นเวลาอย่างน้อย 12 สัปดาห์ ตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol) ที่แสดงถึงความเครียดและฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ที่ใช้ในการระบุเพศของลูกช้างในครรภ์ตลอดระยะเวลาของการตั้งท้อง

3. ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล (Results and Discussion)

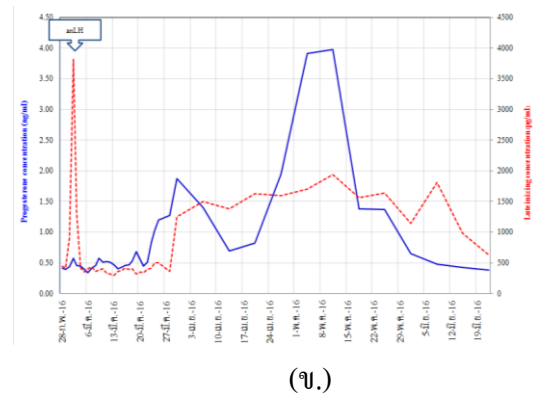
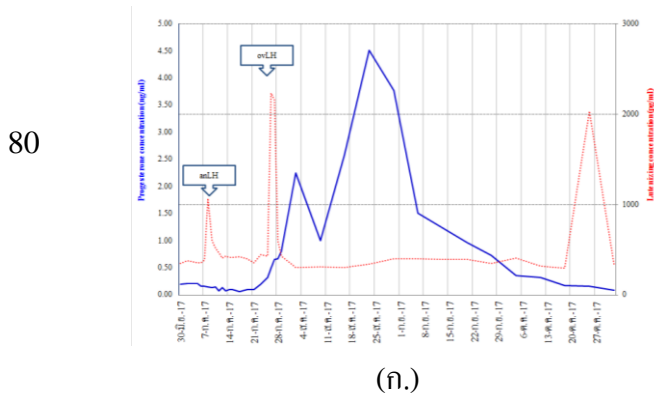
50 3.1 การศึกษาวงรอบการสืบพันธุ์และช่วงเวลาการตกไข่ของช้างเอเชีย

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนที่แสดงถึงวงรอบการสืบพันธุ์และการตรวจลูทิไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing hormone; LH) ที่แสดงถึงช่วงเวลาการตกไข่ในซีรัมช้างเพศเมีย 8 เชือกจากสวนสัตว์ต่างๆ ในองค์การสวนสัตว์พบว่าช้างเพศเมียทั้ง 8 เชือก แสดงถึงการเกิดวงรอบการสืบพันธุ์โดยมีแบบแผนการเกิดวงรอบการสืบพันธุ์คือพบการเพิ่มระดับขึ้นและลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อเนื่องกันซ้ำๆ แบบเป็นช่วงคลื่น (ภาพที่ 1)



65 ภาพที่ 1 . แสดงวงรอบการสืบพันธุ์และช่วงเวลาการตกไข่ของช้าง “พังจันทร์เพ็ญ” (ตลอดระยะเวลา 4 ปี)

เมื่อพิจารณาจำนวนวันหรือสัปดาห์จากการพบการเพิ่มขึ้นครั้งแรกของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ไปจนถึงการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนอีกช่วงหนึ่งที่เป็นวงรอบต่อเนื่องกัน พบว่าช้างเอเชียเพศเมียมีวงรอบการสืบพันธุ์นาน 14-17 สัปดาห์ (n = 47 วงรอบ) ในหนึ่งวงรอบสามารถจำแนกออกเป็นระยะลูเตียลหรือระยะหลังการตกไข่ (luteal phase) นาน 8-11 สัปดาห์ ที่ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนคงอยู่ในระดับสูง (0.6 - 3.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/ml)) และระยะที่ไม่ใช่ลูเตียลเฟส (nonluteal phase) นาน 4-6 สัปดาห์ ซึ่งระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอยู่ในระดับต่ำ (< 0.5 ng/ml) ซึ่งในขณะที่อยู่ในระยะที่ไม่ใช่ลูเตียลเฟสนั้นจะมีการเพิ่มความถี่ในการเจาะเลือดช้างเพื่อแยกเอาซีรัมมาทำการตรวจวิเคราะห์หาช่วงเวลาการตกไข่ โดยสามารถพบการเพิ่มระดับขึ้นสูงและลงของลูทีไนซิงฮอร์โมน (มีค่าระหว่าง 0.2-9.0 ng/ml) เป็นจำนวน 2 ช่วงคลื่น (surge) การเพิ่มระดับขึ้นครั้งที่หนึ่ง ถูกเรียกว่าเป็น “anovulatory surge” (anLH) ซึ่งตามรายงานของ Kapustin และคณะ (1996) คือพบการเพิ่มระดับขึ้นของลูทีไนซิงฮอร์โมนแต่ไม่ใช้ระยะการตกไข่ จากนั้นจะลดระดับลงสู่ค่าต่ำที่เป็นพื้นฐานในช่วงระยะหนึ่งและเพิ่มระดับขึ้นอีกเป็นครั้งที่สองภายใน 18-21 วันต่อมา โดยเรียกว่าเป็น “Ovulatory surge” (ovLH) ที่ถูกกำหนดให้เป็นช่วงการตกไข่ตามรายงานของ Kapustin และคณะ (1996) (ดังภาพที่ 2 ก.)



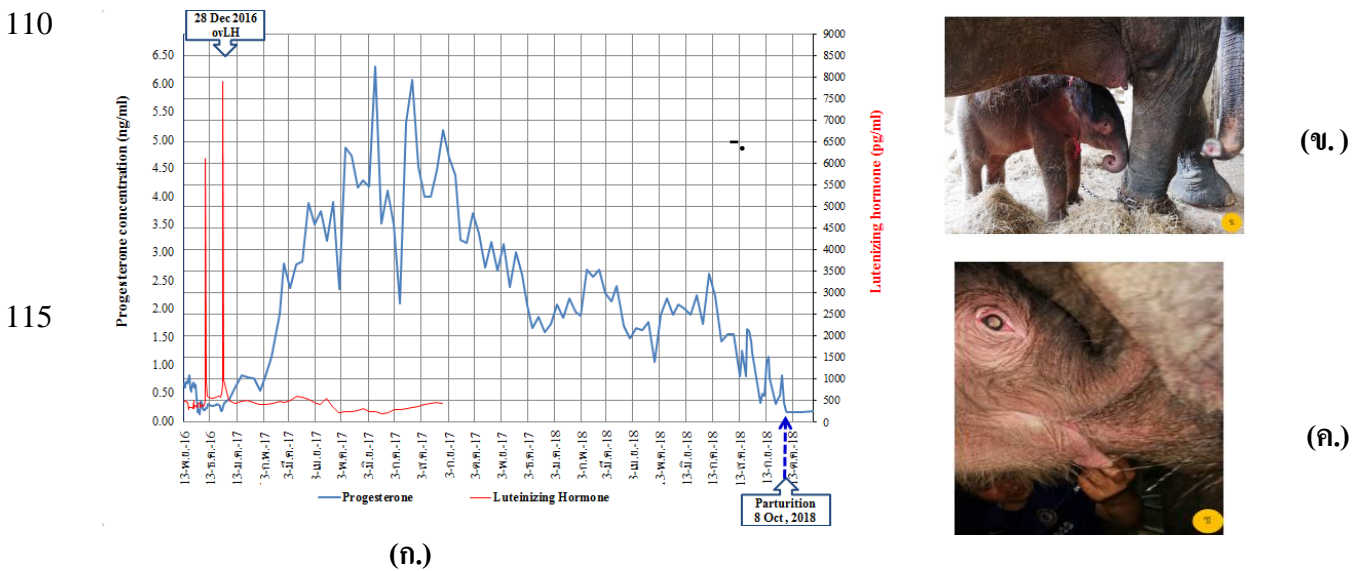
85 ภาพที่ 2. แสดงตัวอย่างค่าปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (—) และลูทีไนซิงฮอร์โมน (---) ในวงรอบการสืบพันธุ์ของ “พังงันทร์เพ็ญ” ที่เป็นแบบปกติ (ก.) และ ของ “พังกรอบทอง” ที่ไม่เป็นไปตามปกติ (ข.)

ทั้งนี้ช่วงระยะเวลาห่างของการเกิด “anLH” และ “ovLH” อาจมีความแตกต่างกันในช้างแต่ละเชือกหรือแต่ละวงรอบที่ทำการศึกษา สอดคล้องกันกับรายงานของ Kapustin และคณะ(1996) ที่ระบุ 19-22 วัน และ 18-23 วัน ตามรายงานของ Brown และคณะ (1999) นอกจากนี้ในรายงานของ Brown และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษาต่อเนื่องเป็นเวลา 3 ปี ในช้างเพศเมีย 9 เชือก ได้วงรอบที่สมบูรณ์ 10 วงรอบพบวงรอบการสืบพันธุ์ (Estrous cycle) ของช้างนานประมาณ 16 สัปดาห์ มีระยะลูเตียล (luteal phase) นานประมาณ 11 สัปดาห์

ในจำนวนของช้างทั้ง 8 เชือกที่ทำการศึกษา พบว่าช้างเพศเมียบางเชือกมีแนวโน้มของการหลังลูทีไนซิงฮอร์โมน (LH) ที่ไม่เป็นไปตามปกติ เช่น ในช้าง “พังกรอบทอง” ที่พบว่ามี LH คงระดับสูงต่อเนื่องนานหลายวันไม่สามารถจำแนกช่วงคลื่นที่ชัดเจนได้ (ภาพที่ 2. ข) ซึ่งอาจพบได้ในช้างที่มีอายุมาก (> 40-50 ปี) ที่มักจะมียอดคอร์ปัสลูเทียมหลายอันในรังไข่ อย่างไรก็ตามกว่า 70 เปอร์เซ็นต์จะพบค่า LH สูงเหนือค่าเฉลี่ยพื้นฐานมากเพียง 1 วัน เมื่อมีการพบการคงระดับสูงติดกัน 2 วัน จะมีอันใดอันหนึ่งอยู่ต่ำกว่า (Brown et al, 2004)

3.2 การทดลองผสมเทียมและการติดตามผลการตั้งท้องภายหลังการผสมเทียมในช้างเอเชีย

จากการทดลองผสมเทียมเป็นจำนวนทั้งสิ้น 7 ครั้ง ในช้างเพศเมีย 4 เชือก ตั้งแต่เดือนเมษายน 2558 ถึง ธันวาคม 2559 โดยใช้ไข่แช่สดและน้ำเชื้อแช่แข็ง พบการตั้งท้องในช้างเพศเมียจำนวน 1 เชือกที่ทำการผสมเทียมระหว่างวันที่ 26-28 ธันวาคม 2559 โดยหลังการผสมเทียมพบการเพิ่มระดับขึ้นของโปรเจสเทอโรนมีค่าอยู่ในช่วง 0.56-6.31 ng/ml และลดระดับลงสู่ค่าเฉลี่ยพื้นฐาน (baseline) ที่ระดับ 0.18 ± 0.05 ng/ml ก่อนพบการคลอด 1 วัน จากการตรวจวิเคราะห์แบบแผนการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ในตัวอย่างซีรัมของช้างที่ตั้งท้องสามารถระบุเพศของลูกช้างในครรภ์ได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยกว่า 15 เดือนลงไป ผลการคลอดได้ลูกช้างเพศเมียจำนวน 1 เชือก (ระดับของเทสโทสเตอโรนในซีรัมระหว่างการตั้งท้องคงอยู่ในระดับต่ำ น้อยกว่า 0.1 ng/ml) มีระยะการตั้งท้องนาน 650 วัน (ภาพที่ 3.) นอกจากนี้ในช้างเอเชียที่ตั้งท้องยังพบการมีน้ำไหลที่ขมับ (temporal gland drainage) คล้ายการตกมันเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวในช่วงสั้นๆ (2-11 วัน) ตลอดระยะของการตั้งท้อง ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวสามารถพบการลดระดับลงของโปรเจสเทอโรนขณะที่ฮอร์โมนคอร์ติซอลหรือฮอร์โมนความเครียดมีการเพิ่มระดับสูงขึ้น



ภาพที่ 3. ก. แสดงแบบแผนการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (----) และลูทิไนซิงฮอร์โมน (- - -) ในช้างเพศเมียที่ตั้งท้องจากการผสมเทียมของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว
ภาพที่ 3. ข. - ค. แสดงภาพลูกช้างเพศเมียที่เกิดจากการศึกษาการสืบพันธุ์และการทดลองผสมเทียม

4. สรุปผล (Conclusion)

การตรวจวัดระดับฮอร์โมนจากเลือดของช้างเพศเมีย สามารถใช้อธิบายถึงสถานภาพการสืบพันธุ์ การจัดลำดับช่วงการสืบพันธุ์และช่วงเวลาการตกไข่ที่จำเป็นต่อการนำมาใช้บริหารจัดการกรงเลี้ยงและต่อยอดคู่กระบวนการผสมเทียมได้ ซึ่งสามารถช่วยยกระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมและแก้ไขพฤติกรรมการขยายพันธุ์ยากของประชากรช้างเลี้ยงที่ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีการตามธรรมชาติให้คงอยู่ได้ต่อไป

130 **5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)**

ขอขอบคุณ Dr.Janine L. Brown และ Mt. Steve Paris จากสถาบันสมิธโซเนียน (SCBI) สหรัฐอเมริกา และอาจารย์ฉัตรโชติ ทิตาราม ที่ปรึกษาโครงการวิจัยฯ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาตลอดการศึกษา ขอขอบคุณศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ. ลำปาง ที่สนับสนุนการดำเนินงานและเอื้อเพื่ออุปกรณ์กล้องเอนโดสโคปที่ใช้ในการผสมเทียม ขอขอบคุณ โครงการคชอาณาจักร จ.สุรินทร์ ที่สนับสนุนการริเริ่มโครงการ
135 ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน) ที่ช่วยทำการผสมเทียม

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- Brown JL., Schmitt D.L., Bellem A., Graham L.H. and Lehnhardt J. 1999. Hormone Secretion in the Asian Elephant (*Elephas maximus*): Characterization of Ovulatory and Anovulatory Luteinizing Hormone
140 Surges. *Biology of Reproduction* 61, 1294–1299.
- Brown, J. L, Goritz, F., Pratt-Hawkes, N., Hermes, R., Galloway, M., Graham, L. H, Gray, C., Walker, S. L, Gomez, A., Moreland, S., Murray, S., Schmitt, D. L, Howard, J., Lehnhardt, J., Beck, B., Bellem, A., Montali, R. and Hildebrandt, T. B. 2004. Successful artificial insemination of an Asian elephant at the National Zoological Park. *Zoo Biology*. 23 [1]. 45-63.
- 145 Carden M, Schmitt D, Tomasi T, Bradford J, Moll D, Brown J. 1998. Utility of serum progesterone and prolactin analysis for assessing reproductive status in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Anim Reprod Sci*; 53:133–142.
- Hermes, R, Goritz, F, Streich, WJ and Hildebrandt,TB. 2007. Assisted Reproduction in Female Rhinoceros and Elephants – Current Status and Future Perspective. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 33-44.
- 150 Hutchins, M and Keele, M. 2006. Elephant Importation From Range Countries: Ethical and Practical Considerations for Accredited Zoos. *Zoo Biology*, 25, 219-223.
- Kapustin N, Critser JK, Olson D, Malven PV. 1996. Nonluteal estrous cycles of 3-week duration are initiated by anovulatory luteinizing hormone peaks in African elephants. *Biol Reprod*; 55:1147–1154.
- Kimberley N. 2009. Captive Elephant Infertility: Consequences for Conservation. The University
155 Nottingham ; School of Biosciences.
- Olsen JH, Chen CL, Boules MM, Morris LS, Coville BR. 1994. Determination of reproductive cyclicity and pregnancy in Asian elephants (*Elephas maximus*) by rapid radioimmunoassay of serum progesterone. *J Zoo Wildl Med*; 25:349–354.
- Thitaram, C., J. L. Brown, et al. 2008. Seasonal effects on the endocrine pattern of semi-captive female Asian
160 elephants (*Elephas maximus*): timing of the anovulatory luteinizing hormone surge determines the length of the estrous cycle. *Theriogenology*. 69 (2): 237-44.

- 165 Thongtip N, Saikhun J, Damyang M, Mahasawangkul S, Suthunmapinata P, Yindee M, Kongsila A, Angkawanish T, Jansittiwate S, Wongkalasin W, Wajjwalkul W, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, Pinyopummin A. 2004. Evaluation of post-thaw Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa using flow cytometry: the effects of extender and cryoprotectant. *Theriogenology*. 62 (3-4): 748-60.
- Wingfield, J.C. and Sapolsky, R.W. 2003. Reproduction and Resistant to stress: When and how. *Journal of Neuroendocrinology* vol 15, 711-724.
- Wiese, R.J. 2000. Asian Elephants Are Not Self Sustaining In North America. *Zoo Biology*, **19**, 299-309