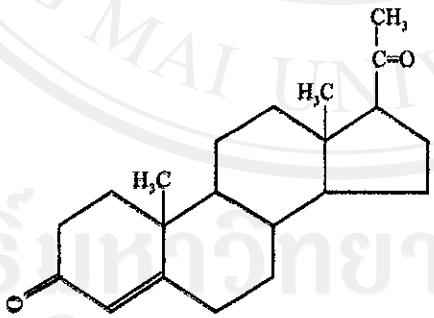
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

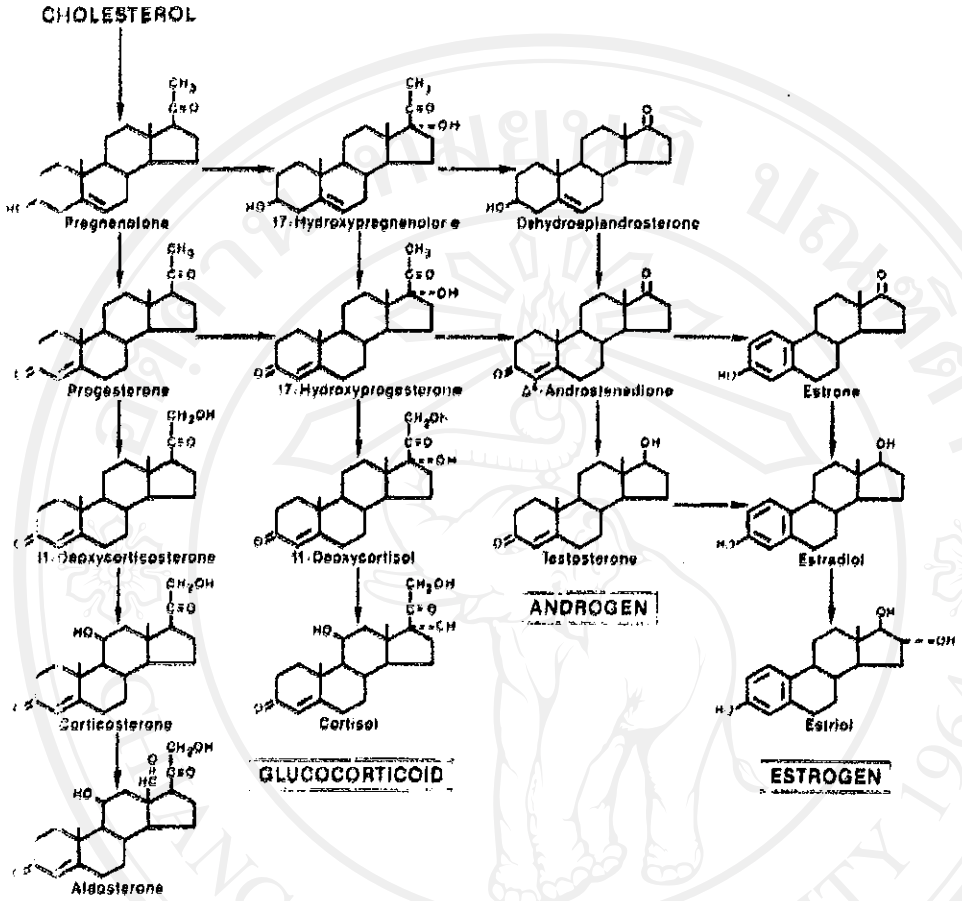
2.1. ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone, P_4) จัดเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมน (ภาพที่ 2-1) มีโคเลสเตอรอลในพลาสมาเป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 2-2) มีน้ำหนักโมเลกุล 314.15 มีจุดหลอมเหลวที่ 121 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ละลายได้ดีในไขมันและแอลกอฮอล์, อะซิโตน และไดออกแซน สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ฮอร์โมนนี้ส่วนมากถูกสร้างมาจากคอร์ปัสลูเทียมในรังไข่, รก ในช่วงตั้งท้องและต่อมหมวกไตส่วนนอกบ้างเล็กน้อย โดยมีลูทิไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing hormone, LH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าเป็นตัวกระตุ้นคอร์ปัสลูเทียม ควบคุมผ่าน Secondary messenger ที่ชื่อ cyclic AMP (cAMP) ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จะสูงในช่วงการตั้งท้อง ทำให้ส่วน endometrium หนาตัวขึ้น และมี uterine glands เจริญมากขึ้น เพื่อเตรียมไว้สำหรับการฝังตัวของไข่ที่ปฏิสนธิแล้ว อีกทั้งยังยับยั้งการหดตัวของมดลูกในระหว่างระยะของการตั้งท้อง และรกจะมีบทบาทในการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน หลังจากช่วงหนึ่งในสาม และครึ่งหนึ่งของการตั้งท้อง



ภาพที่ 2-1. แสดงโครงสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Ball and Peters, 2004).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-2. แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Ball and Peters, 2004).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2. ลักษณะทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในโคนม

2.2.1. ระบบต่อมไร้ท่อควบคุมการทำงานของรังไข่

2.2.1.1. ช่วงเป็นสัดจนถึงตั้งท้อง

วงจรการเป็นสัดถูกควบคุมด้วยโดยฮอร์โมนลูทิไนซ์ซิ่งฮอร์โมน LH และฟอลลิเคิล สติมิวเลติง ฮอร์โมน (follicle stimulating hormone, FSH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดยได้รับการกระตุ้นจาก gonadotropin releasing hormone (GnRH) ซึ่งสร้างมาจากไฮโปธาลามัส (hypothalamus) โดยฟอลลิเคิลจะตอบสนองต่อฮอร์โมนดังกล่าว ด้วยการเจริญเติบโต มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนต่างๆ ออกมาที่สำคัญได้แก่ อีสตราไดออล (estradiol, E_2) โดย theca interna จะเปลี่ยน choresterol ให้ไปเป็น andostenedione และ testosterone ด้วยอิทธิพลของ LH และหลังจากนั้น andostenedione และ testosterone จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอีสตราไดออลที่ granulosa cell ด้วยอิทธิพลของ FSH เมื่อระดับความเข้มข้นของอีสตราไดออลมากขึ้นเรื่อยๆ ก็จะมีผลไปยังต่อมใต้สมองและระบบสืบพันธุ์ ทำให้โคแสดงอาการเป็นสัด มีการชักนำให้เกิดการตกไข่ หลังจากตกไข่แล้วฟอลลิเคิลจะเปลี่ยนรูปร่างและหน้าที่ โดยอิทธิพลของ LH เป็นสำคัญ granulosa cell และ theca interna จะถูกกระตุ้นและเปลี่ยนหน้าที่ให้สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดย granulosa cell จะถูกเปลี่ยนแปลงให้เป็น small luteal cell ใน corpus luteum ส่วน theca interna จะกลายเป็น large luteal cell ใน corpus luteum ทั้ง small และ large luteal cell นี้ ต่างก็ทำหน้าที่ผลิตและหลั่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เมื่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงขึ้น จะมีผลไปกด (negative feedback) การสร้างและหลั่งฮอร์โมน FSH และ LH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland)

ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระบบหมุนเวียนเลือดส่วนปลาย (circulatory system) ในช่วงการเป็นสัด (estrus) จะมีค่าน้อยกว่า 1.0 ng/ml และจะไม่สูงขึ้นจนกระทั่งวันที่ 5 ของรอบการเป็นสัด ต่อจากนั้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นสม่ำเสมอจนกระทั่งวันที่ 16 ถึง 19 จะมีค่าเฉลี่ยประมาณ 5.4 - 10 ng/ml ในช่วง luteal phase ของรอบ และช่วงปลายของ luteal phase จะมีค่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระบบหมุนเวียนเลือดส่วนปลายประมาณ 6 – 7 ng/ml ที่เวลานี้ corpus luteum จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร หรือมากกว่า และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วระหว่างวันที่ 16 ถึง 19 ช่วงระยะเวลาระหว่างการลดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเช่นนี้และช่วงการเป็นสัดจะแปรผันจาก 1 - 5 วัน ถ้าโคนมที่ได้รับการผสมและตั้งท้องจะมีกลไกที่มีผลยับยั้งการสร้างและดูดซึมพรอสตา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แกลนดิน (Prostaglandin, PG) ที่มดลูก ทำให้ corpus luteum มีการคงอยู่และหลั่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกมาเรื่อยๆ อันมีความสำคัญต่อการตั้งท้อง

ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมจะแปรผันโดยตรงกับเลือดแต่ลักษณะที่ใกล้เคียงนี้ใช้ไม่ได้ในโคสาวที่ยังไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์ (maiden heifer) อย่างไรก็ตาม ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในน้ำนมมีประโยชน์อย่างมากสำหรับเกษตรกรในการหลีกเลี่ยงที่จะต้องเจาะเลือด แต่ทั้งนี้ปัญหาและประสิทธิภาพในการเก็บรักษาตัวอย่างมีอิทธิพลต่อการวัดความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น วิธีการที่ใช้จึงจำเป็นต้องมีมาตรฐาน ไม่ว่า fore milk หรือ whole milk ที่เก็บ (5 ml จากแต่ละเต้า) ใส่ในขวดแก้วที่มี preservative ที่เหมาะสม เช่น potassium dichromate ชนิดเม็ด 30 mg และเก็บไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการ และพบว่าถ้าเก็บตัวอย่าง fore-milk ที่ไม่ได้ทำการแช่เย็น ต้องบีบนมทิ้งก่อนเพื่อทำความสะอาด teat sinus ในอีกนัยหนึ่ง whole milk ที่เก็บจากการรีดนมช่วงบ่ายจะใช้ในการทดสอบได้กว้างกว่า เพราะน้ำนมในช่วงบ่ายจะมีความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากกว่าในช่วงเช้า และความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมจะมีมากกว่าในพลาสมา (สุวิชัย, 2538) และเพื่อให้แน่ใจว่าสัตว์ได้มีการตั้งท้องจริง จึงมีหลักเกณฑ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นหลักในการพิจารณาดังนี้ คือ

2.2.1.1.1. การไม่มีการเป็นสัด (absence of estrus)

ถ้าได้มีการจดบันทึกระยะการเป็นสัด และวันที่ผสมพันธุ์ไว้หลังการผสมพันธุ์ ก็จะทำให้ทราบเกี่ยวกับการตั้งท้องในระยะแรก ๆ ได้ โดยสังเกตจากการไม่เป็นสัดหลังการผสมนั้นในครั้งต่อไป อย่างไรก็ตามการไม่เป็นสัดนั้นไม่ได้เป็นสิ่งที่พิสูจน์ได้อย่างสมบูรณ์ว่าสัตว์ตั้งท้อง สัตว์ที่ไม่ตั้งท้องอาจไม่แสดงการเป็นสัดหลังการผสมพันธุ์ก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก corpus luteum ยังคงมีอยู่ในรังไข่ หรือเนื่องมาจากการติดเชื้อที่มดลูก หรือความผิดปกติอย่างอื่น ๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ นอกจากนั้นยังมีเหตุผลอื่น ๆ สำหรับสัตว์ที่ขาดหายไปจากการเป็นสัดหนึ่งหรือสองระยะการเป็นสัด หลังการผสมก็คือ มีการแท้งในระยะแรกเกิดขึ้นตามมาหลังการผสมก็ได้

2.2.1.1.2. การเปลี่ยนแปลงของส่วนนูนของผนังท้อง

ส่วนท้องของสัตว์ตัวเมียมาถึงระยะท้าย ๆ จะถูกดึงให้ย้อยลงมาเห็นชัดเจน ซึ่งเป็นการที่ท้องมีขนาดโตขึ้น การเพิ่มในขนาดของท้องเกิดขึ้นเนื่องจากมีการเพิ่มในขนาดของ fetus รวมทั้งมีการเพิ่มของ fetal fluidและการขยายออกของมดลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.1.3. การคลำผ่านทาง rectum และผ่านทางผนังท้อง

สัตวแพทย์ที่มีความชำนาญสามารถตรวจสอบการตั้งท้องได้ผลอย่างแน่นอนมากทีเดียว โดยการคลำผ่านทาง rectum ในโคและม้า การตรวจการตั้งท้องและการประมาณถึงระยะการตั้งท้องนั้น อาศัยความรู้พื้นฐานของการเจริญของ fetus และการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ และร่วมกับโครงสร้างของแม่สัตว์ สิ่งที่ใช้ในการบอกว่าแม่โคนั้นตั้งท้องจากการคลำก็คือ

2.2.1.1.3.1 คลำพบ corpus luteum ที่รังไข่

2.2.1.1.3.2 มีการขยายใหญ่ออกของ uterine horn ข้างใดข้างหนึ่งเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอีกข้างหนึ่ง

2.2.1.1.3.3 ถ้าตั้งท้องได้ 3 เดือน สามารถคลำรู้สึกถึง fetal membranes และ caruncles ขนาดเล็กที่ผนังมดลูก

2.2.1.1.3.4 Middle uterine artery ข้างที่ตั้งท้องจะใหญ่กว่าข้างที่ไม่ตั้งท้องเล็กน้อย และรู้สึกว่ามีลักษณะกระเพื่อมของเลือดในเส้นเลือด

2.2.1.1.3.5 ถ้าตั้งท้องได้ 4 เดือน สามารถคลำรู้สึกว่าเป็น fetus และ caruncles ได้ชัดเจน

2.2.1.1.3.6 การตั้งท้องได้ 5-7 เดือน คลำรู้สึกได้ว่า มดลูกจะตกลงมาอยู่เหนือขอบของเชิงกรานและทำให้คอมดลูกยืด รังไข่และ fetus คลำรู้สึกได้ยาก แต่ caruncles บนมดลูกคลำรู้สึกได้และมีขนาดใหญ่

2.2.1.1.3.7 มีลักษณะนูนออกทางสวาปข้างขวาในการตั้งท้องมากกว่า 7 เดือน

2.2.1.1.3.8 การตั้งท้องอายุ 8-9 เดือน สามารถคลำดูได้ผ่านทาง rectum (วิโรจน์, 2546)

2.2.1.2. ช่วงเวลาหลังคลอดจนถึงการตกไข่ครั้งแรก

การทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอดเป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของไฮโปธาลามัสและต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดยพบว่าจะมีการหลั่ง FSH ในช่วง 9-15 วันหลังคลอด ซึ่งมีผลทำให้ไข่เริ่มมีการเจริญเติบโต และมีการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนมากขึ้น อันมีผลต่อเนื่องทำให้มีการตอบสนองต่างๆ เกิดขึ้น จนกระทั่งทำให้รังไข่มีไข่ที่เจริญเติบโต และสามารถเกิดการตกไข่ในช่วง 2-3 สัปดาห์ภายหลังคลอด แต่ในความเป็นจริงแล้วโคนมมักจะไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เห็นในการตกไข่ครั้งแรก และมักจะแสดงอาการเป็นสัดเมื่อมีการตกไข่ในรอบต่อมา เพราะว่าโคต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ก่อนแล้วตามด้วยฮอร์โมนอีสตราไดออล โคจึงจะแสดงอาการเป็นสัดได้อย่างชัดเจน ช่วงวงรอบการเป็นสัดของการตกไข่ครั้งแรกกับการตกไข่ครั้งที่สอง จะสั้นประมาณ 17-18 วัน โดยโคจะแสดงอาการเป็นสัดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการตกไข่ครั้งแรก และประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการตกไข่ครั้งที่สองและมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการตกไข่ครั้งที่สาม

จากวิธีการตรวจท้องดังกล่าวนี้จะสังเกตได้ว่าผู้ทำการตรวจท้องจะต้องมีความชำนาญอย่างมาก เพราะถ้าผิดพลาดแล้วย่อมหมายถึงการสูญเสีย ดังนั้นจึงมีวิธีการหนึ่งเกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นการวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยการใช้เทคนิคที่คิดค้นโดย Yallow and Berson (1959) ที่เรียกว่า เรดิโออิมมูนโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA) ซึ่งวิธีการนี้จะใช้วัดการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมที่ได้ผลดี (มณีวรรณ และคณะ, 2531) แต่มีข้อจำกัดหลายอย่าง คือต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์อย่างน้อย 3 วันจึงจะสามารถบอกผลได้ และจำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำที่ฟาร์ม อีกทั้งเครื่องมือราคาแพงโดยเฉพาะที่ใช้วัดฮอร์โมนที่ติดฉลาก (label) ด้วยตริเตรียม (Tritium) และที่สำคัญที่สุด คือ มีปัญหาในการขจัดขยะรังสี จึงได้มีการพัฒนาโดยการนำเอาเทคนิค ELISA เข้ามาใช้ซึ่งจะแตกต่างจาก RIA เพราะจะไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี (มนตรี และคณะ, 2542) เทคนิคนี้มีหลักการคือ เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน แอนติบอดีที่มีความไว และความจำเพาะเจาะจงสูง โดยนำเอาแอนติเจนหรือแอนติเจนติดฉลาก เนื่องจากเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) เกิดผลผลิตที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และเมื่อต้องการบันทึกผลการทดสอบโดยละเอียดก็สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือสำหรับวัดความเข้มของสี (นภาธร, 2536) และเทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าวิธี RIA นอกจากนั้นยังสามารถนำไปใช้ในฟาร์มได้ และแสดงผลได้ภายในเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

Monro and Stabenfelst (1984) ได้พัฒนาให้มีการใช้ microtitre plate ELISA ในการตรวจวัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยใช้วิธี ELISA แบบ competitive พบว่าให้ผลใกล้เคียงกับวิธี RIA โดยความไวต่อปฏิกิริยาต่ำสุดที่วัดได้ที่ 0.25 พิโคกรัมต่อหลุม ต่อมามีการใช้ Microplate หรือ Strip ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (IgG) ต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ผลิตจากหนูตัวเล็กเคลือบเพลท ผลจากวิธีการนี้พบว่ารวดเร็วและความไวสูง Wimpy *et al.* (1986) ได้พยายามทำให้การวิเคราะห์ง่ายขึ้นโดยใช้ Solid-phase เป็นกระดาษ โดยทำการวิเคราะห์ในหลอดแก้ว (test tube) แล้วเคลือบแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Paper-Ab) ทำการเปรียบเทียบด้วยการดู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

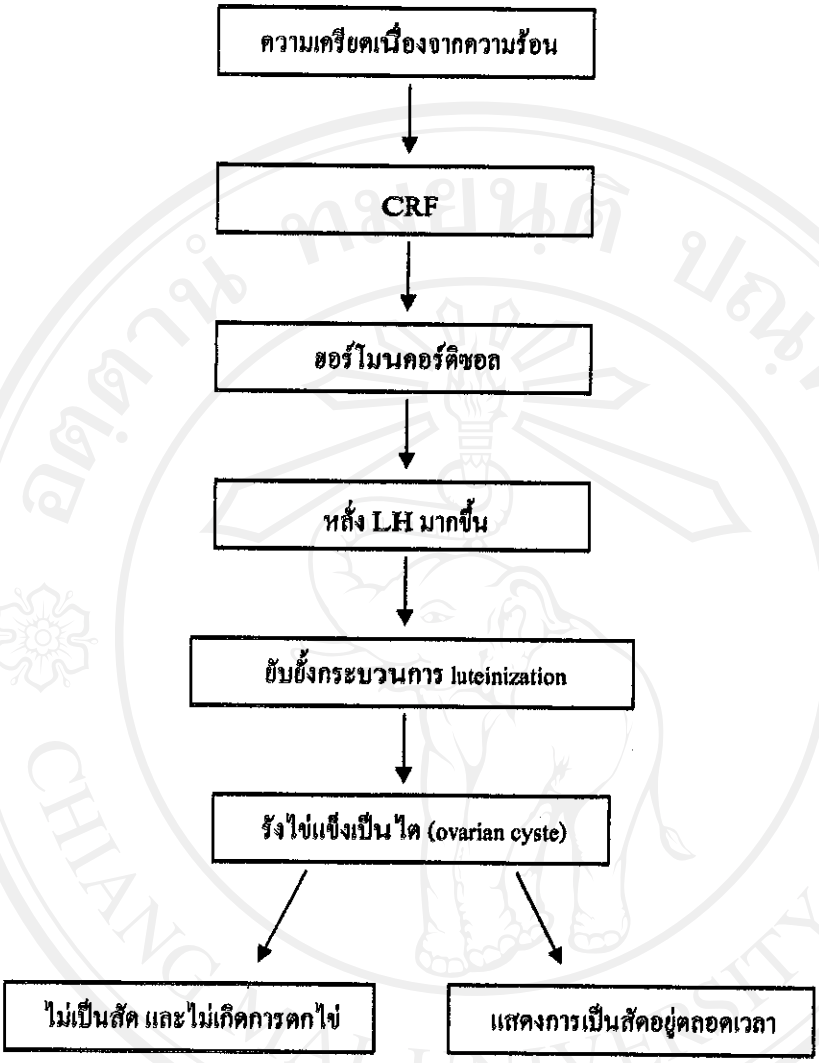
ความเข้มสีด้วยตาเปล่า ระหว่างหลอดที่ทราบความเข้มข้นกับหลอดที่ไม่ทราบ พบว่าการดูด้วยตาเปล่าเปรียบเทียบกับการใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)ให้ค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนใกล้เคียงกัน

2.3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์

2.3.1. ฤดูกาล

ปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งคือ ฤดูกาล ซึ่งในประเทศไทยพบว่า อัตราการกลับสัดหลังคลอด การแสดงอาการเป็นสัด รอบการเป็นสัด อัตราการผสมติด และอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ จะเป็นปกติมากที่สุดในช่วงฤดูหนาว และมีค่าตกต่ำในช่วงฤดูร้อน ซึ่งเรียกสภาพเช่นนี้ว่า ภาวะเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน (heat stress, HS) ก่อให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล ซึ่งเป็นฮอร์โมนสำคัญในกระบวนการปรับตัวต่อความเครียด โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของคอร์ติซอลที่อยู่บริเวณโดยรอบถุงไข่เพิ่มขึ้นก่อนมีการตกไข่ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา และมีการลดระดับ LH ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากมีการ luteinization ของถุงไข่ที่โตเต็มที่มีเพียงพอ ถุงไข่จะแข็งตัวเป็นไต (Cystic Follicle) อาจจะทำให้รังไข่หยุดการสร้างไข่อ่อน ซึ่งในกรณีเช่นนี้ส่งผลกระทบให้สมรรถภาพของระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 2-3) เช่น การเป็นสัดเงียบ หรือแสดงอาการเป็นสัดตลอดเวลา เปอร์เซ็นต์การผสมติดต่ำ เป็นต้น ซึ่งที่แสดงออกนี้ล้วนเป็นผลสืบเนื่องมาจากระบบการทำงานของฮอร์โมนที่ผิดปกติ จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ให้ทราบว่าฤดูร้อนชื้นจะไม่เป็นผลดีต่อระบบสืบพันธุ์ อันอาจจะเป็นไปได้ว่าฤดูร้อนชื้นมีผลต่อตัวโคในหลายๆด้าน และมีผลต่อความสมบูรณ์ของพืชอาหารสัตว์อันเป็นผลทางอ้อมไปสู่ความสมบูรณ์ของโคอันมีผลทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของโคลดลงในช่วงฤดูร้อนและร้อนชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

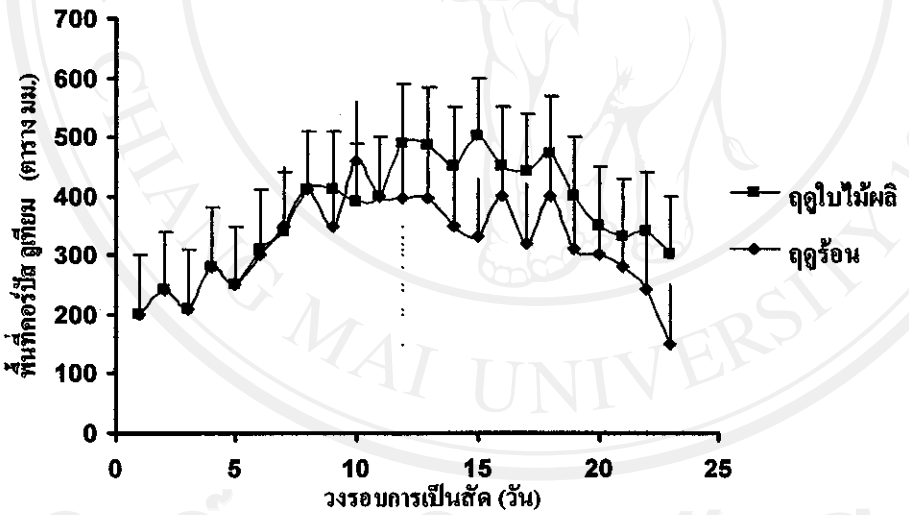


ภาพที่ 2-3. แสดงผลของความเครียดอันเกิดจากความร้อนที่มีต่อการทำงานของรังไข่ ดัดแปลงจากสุวิชัย (2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

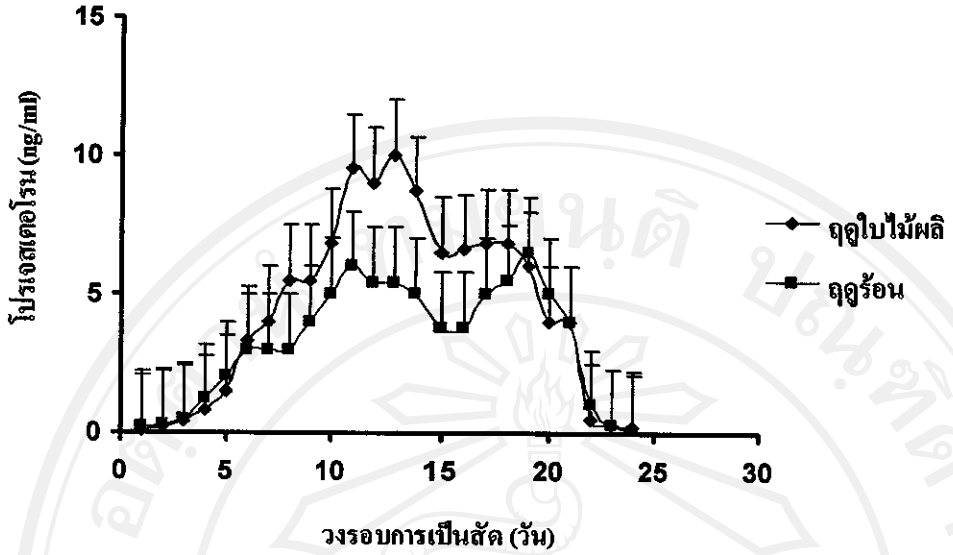
Wolfenson *et al.* (2000) กล่าวว่าการลดลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เป็นผลเนื่องมาจากการได้รับความร้อนมากเกินไป โดยเฉพาะในกลุ่มความเครียดเนื่องจากความร้อนแบบเรื้อรัง และจะเพิ่มขึ้นในกลุ่มโคที่ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อนแบบเฉียบพลัน การที่โคได้รับ ความเครียดเนื่องจากความร้อน ในช่วงฤดูร้อนเป็นเวลานานมีผลต่อการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ส่งผลให้การพัฒนาของฟอลลิเคิลผิดปกติทำให้เกิดความผิดปกติของรังไข่และเกิดการตายของตัวอ่อนได้

จากการศึกษาของ Howell *et al.* (1993) ในโคนมพันธุ์แท้โฮสไตน์ฟรีเชี่ยน พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะลดต่ำลงในช่วงที่โคนมมีความเครียดอันเกิดจากความร้อนจากฤดูร้อนที่อุณหภูมิ 31.1 ± 0.3 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับฤดูใบไม้ผลิที่อุณหภูมิ 21.2 ± 0.9 ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดคอร์ปัสลูเทียมที่ลดลง (ภาพที่ 2-4) ส่งผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ และอัตราผสมติดประสบผลสำเร็จไม่ดีเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังพบว่าฤดูร้อนมีแนวโน้มของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่ำกว่าฤดูใบไม้ผลิ 4.8 ± 0.9 และ 7.4 ± 0.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2-5) และปริมาณแอมพริจูด (amplitude) ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะต่ำเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2-1)



ภาพที่ 2-4. แสดงขนาดของคอร์ปัส ลูเทียมเปรียบเทียบระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน ดัดแปลงจาก Howell *et al.* (1993).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-5. แสดงระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะลูเทียลระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน ดัดแปลงจาก Howell *et al.* (1993).

ตารางที่ 2-1. แสดงระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะลูเทียลระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน ดัดแปลงจาก Howell *et al.* (1993)

	ฤดูใบไม้ผลิ	ฤดูร้อน	SEM
ความยาวของระยะลูทียล (วัน)	16.3[a]	16.6[a]	0.7
โปรเจสเตอโรนทั้งหมดในระยะลูเทียล (ng/ml) / วัน	101.0[a]	70.1[a]	12.1
แอมพริจูดของโปรเจสเตอโรน (ng/ml)	13.3[a]	9.6[b]	1.8

[a, b] อักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $P < 0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2. อุณหภูมิ

เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น และต้องประสบปัญหาจากสภาพภูมิอากาศที่ค่อนข้างร้อน ซึ่งเรียกสภาพเช่นนี้ว่า ความเครียดที่เกิดจากความร้อน (heat stress, HS) เป็นสภาวะที่สัตว์ไม่สามารถทนกับสภาพที่มีอุณหภูมิสูงได้ ส่งผลให้สมรรถภาพในการผลิตของสัตว์เปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ เช่น การเป็นสัดเงียบ เปอร์เซ็นต์การผสมติดต่ำ เป็นต้น ซึ่งที่แสดงออกนี้ล้วนเป็นผลสืบเนื่องมาจากระบบการทำงานของฮอร์โมนที่ผิดปกติ

จากการศึกษาของ Wolfenson *et al.* (2002) พบว่า ประสิทธิภาพของกระบวนการสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยการกระตุ้นให้โคนมเกิดการตกไข่ จากนั้นนำไข่ที่ได้เลี้ยงในอาหาร (media) ควบคุมอุณหภูมิที่ 31.4 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดย granulosa cell (GC) และ theca cell (TC) เท่ากับ 31.1 ± 6.1 ng/ml ใน follicular fluid และมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมา 3.5 ± 0.6 ng/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการนำไข่ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 18.6 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดย GC และ TC เท่ากับ 15.3 ±6.8 ng/ml ของ follicular fluid และมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมา 3.2 ±0.6 ng/ml ซึ่งมีระดับฮอร์โมนที่ต่ำกว่าการควบคุมอุณหภูมิที่ 31.4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2-2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Guzeloglu *et al.* (2001) ที่พบว่าปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีค่าเท่ากับ 44.7 ± 5.0 ng/ml และมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมา 5.43 ± 0.5 ng/ml เมื่อควบคุมอุณหภูมิที่ 31.4 องศาเซลเซียส และฮอร์โมนจะมีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 18.6 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2-2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-2. แสดงความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายใน follicular fluid และภายในพลาสมาที่ภายใต้อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ

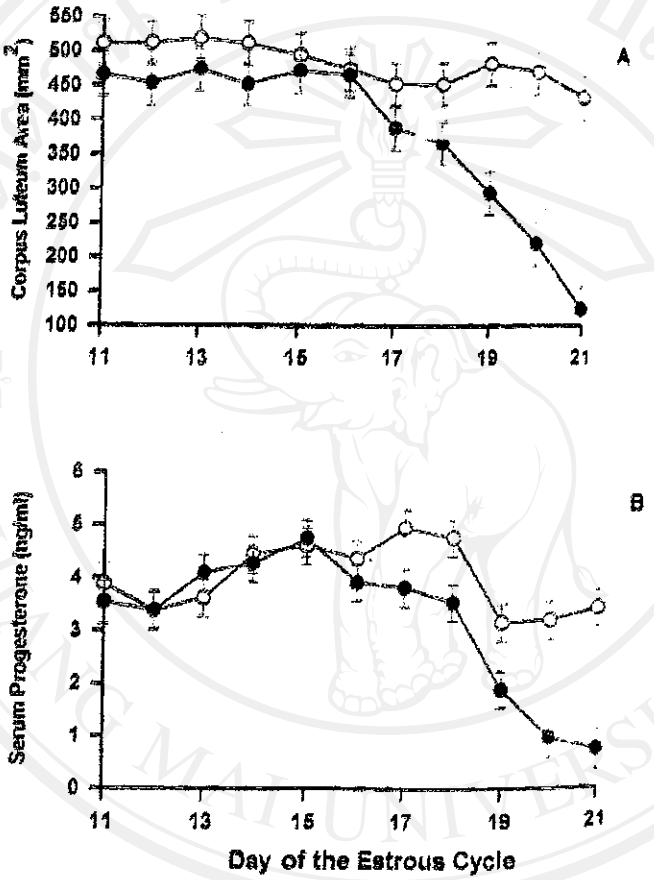
	อุณหภูมิสูง (mean ± SE)		อุณหภูมิต่ำ (mean ± SE)	
	Guzeloglu *et al.* (2001) (32°C)	Wolfenson *et al.* (2002) (31.4 °C)	Guzeloglu *et al.* (2001) (18.6°C)	Wolfenson *et al.* (2002) (18.6°C)
โปรเจสเตอโรนภายใน follicular fluid (ng/ml)	54.1 ± 5.1 (n=8)	31.1 ± 6.1 (n=9)	44.7 ± 5.0 (n=8)	15.3 ± 6.8 (n=8)
โปรเจสเตอโรนภายในพลาสมา (ng/ml)	5.21 ± 0.5 (n=8)	3.5 ± 0.6 (n=9)	5.43 ± 0.5 (n=8)	3.2 ± 0.6 (n=8)

ดัดแปลงจาก Wolfenson *et al.* (2002) และ Guzeloglu *et al.* (2001).

ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Wilson *et al.* (1998) ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองผลของอุณหภูมิต่ำที่มีผลต่อการทำงานของรังไข่ในโคให้นม โดยให้อยู่ภายใต้อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส พบว่า ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จะมีระดับเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 15 และจะลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 21 ของวงรอบการเป็นสัดซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีความปกติตามรูปแบบทั่วไป (ภาพที่ 2-6B) แต่เมื่อทดลองผลของความเครียดอันเกิดจากความร้อนที่มีผลต่อการทำงานของรังไข่ในโคให้นม โดยให้อยู่ภายใต้อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส พบว่า ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จะมีระดับคงที่จนกระทั่งถึงวันที่ 16 และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งถึงวันที่ 18 สุดท้ายจะลดลงในวันที่ 19 และคงที่จนถึงในวัน 21 ของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่คงที่ (ภาพที่ 2-6B) อาจมีสาเหตุเกิดจากอิทธิพลของอุณหภูมิที่สูงนี้ มีผลต่อกระบวนการสลายตัวของ corpus luteum ที่พบว่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนั้นยังคงอยู่ ซึ่งสัมพันธ์กับพื้นที่หรือขนาดของ corpus luteum ที่ยังคงอยู่เช่นเดียวกันดังภาพที่ 2-6A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อมีการศึกษาถึงอุณหภูมิที่สูงต่อช่วงระยะเวลาของลูเทียล โดย Howell *et al.* (1994) พบว่ามีค่าเท่ากับ 16.6 วัน และมีระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมา 9.6 ng/ml อีกทั้งยังพบว่า rectal temperature จะมีค่าสูงเช่นเดียวกันและมักจะสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดต่ำด้วย และ Younas *et al.* (1993) พบว่าการหลั่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในช่วง luteal phase จะเพิ่มขึ้นถ้ามีพัดลมช่วยระบายความร้อนในช่วงฤดูร้อน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jonsson *et al.* (1997)



ภาพที่ 2-6. **A** แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อขนาดหรือพื้นที่ของ corpus luteum
B แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อ ความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในซีรัม
● thermoneutral ○ heat stress (Wilson *et al.*, 1998).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.3. ความชื้นสัมพัทธ์

จากการศึกษาถึงความชื้นสัมพัทธ์ที่มีต่อวันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอดในโคนมของ Wolfenson *et al.* (1998) โดยพบว่าเมื่อสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงนั้น วันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอดจะเท่ากับ 43.7 ± 5.1 (mean ± SE) วัน ซึ่งสอดคล้องกับการที่อุณหภูมิมีระดับสูงด้วยเช่นกัน อีกทั้งยังพบว่าอัตราการผสมติดและอัตราการตั้งท้องยังลดลงอีกด้วย (ตารางที่ 2-3)

ตารางที่ 2-3. แสดงถึงความชื้นสัมพัทธ์ที่มีต่อวันแรกของการเป็นสัด (Day to first estrus), ช่วงเวลาของรอบการเป็นสัด (Duration of first estrus) และช่วงเวลาของรอบการเป็นสัดจนกระทั่งผสมเทียม (Duration of estrus on AI) (n=38)

ความชื้นสัมพัทธ์ (mean ± SE)	อุณหภูมิ (mean ± SE)	Day to first estrus (mean ± SE)	Duration of first estrus(h) (mean ± SE)	Duration of estrus on AI (h) (mean ± SE)
สูง, 71 ± 0.6	30.6 ± 0.2	43.7 ± 5.1	13.0 ± 1.2	13.6 ± 1.0
ต่ำ, 53 ± 0.5	19.2 ± 0.2	43.2 ± 4.8	9.9 ± 1.2	12.6 ± 1.2

ดัดแปลงจาก Wolfenson *et al.* (1998).

จากการศึกษาถึงความชื้นสัมพัทธ์ที่มีต่อวันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอดในโคนมของ Wolfenson *et al.* (1998) โดยพบว่าเมื่อสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์ที่ต่ำนั้น วันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอดจะเท่ากับ 43.2 ± 4.8 (mean ± SE) วัน ซึ่งสอดคล้องกับการที่อุณหภูมิมีระดับต่ำด้วยเช่นกัน อีกทั้งอัตราการผสมติดและอัตราการตั้งท้องยังมีระดับสูงกว่าความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงอีกด้วย (ตารางที่ 2-4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-4. แสดงถึงความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลต่ออัตราการผสมติด (conception rate) และอัตราการตั้งท้อง (pregnancy rate)

ความชื้นสัมพัทธ์ (mean ± SE)	Conception rate (%)		Pregnancy rate (%)		
	First insemination	All insemination	At 90 d	At 120 d	At 150 d
สูง, 71 ± 0.6	17 (n=6/35)	20 (n=14/70)	14 (n=5/35)	31 (n=11/35)	31 (n=11/35)
ต่ำ, 53 ± 0.5	59 (n=20/34)	57 (n=32/56)	44 (n=15/34)	59 (n=20/34)	73 (n=25/34)

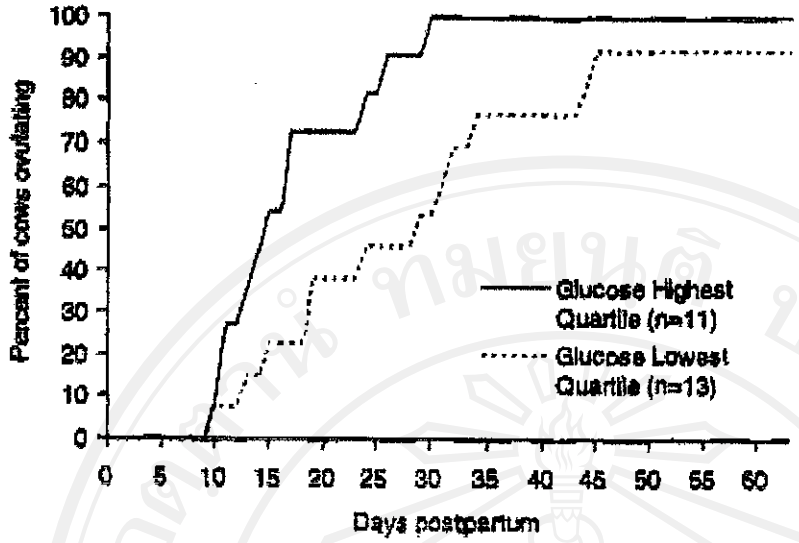
ดัดแปลงจาก Wolfenson *et al.* (1998).

2.3.4. ดัชนีอุณหภูมิและความชื้น (Temperature Humidity Index , THI)

จากการศึกษาถึง THI ในช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อนโดย Jonsson *et al.* (1997) พบว่าในฤดูร้อน THI โดยเฉลี่ย 78 ± 0.14 สูงกว่าฤดูหนาวที่มีค่าเฉลี่ย 69 ± 0.27 และระยะเวลาจากการตกไข่ครั้งแรกหลังคลอดในช่วงฤดูร้อนจะมีระยะเวลายาวนานกว่าฤดูหนาว 22.8 และ 17.6 วันตามลำดับ ($P<0.05$) และTHI จะมีผลทางอ้อมต่อความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาทำให้ระยะเวลาของการตกไข่นั้นเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นกันคือ โคนมที่มีระดับความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาต่ำจะใช้ระยะเวลาในการตกไข่ครั้งแรกยาวนานกว่าโคนมที่มีระดับความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาสูงประมาณ 25-45 วัน ดังภาพที่ 2-7 และมีสูตรดังนี้

Time to first ovulation = 80.0 – 17.9 x plasma glucose concentration (mmol/l)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-7. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของโคนมที่ตกไข่และวันหลังคลอดที่แปรผันตามความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาที่สูงและต่ำ (Jonsson *et al.*, 1997).

จากภาพแสดงให้เห็นว่า THI ที่สูงนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการลดระดับของกลูโคสในพลาสมา เนื่องจากโคนมที่อยู่ภายใต้สภาวะที่ร้อนเช่นนี้จะลดอัตราการกินได้ ลดประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหาร และเปลี่ยนแปลงการหลั่งฮอร์โมนด้วย ทำให้ระยะการตกไข่ครั้งแรกล่าช้าออกไป ดังตารางที่ 2-5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-5. แสดงดัชนีอุณหภูมิและความชื้น (Temperature Humidity Index, THI) ที่มีต่อกลูโคสในพลาสมา (Plasma glucose) และการสูญเสียน้ำหนัก (Total bodyweight loss)

Variable	Winter (n=23)		Summer(n=21)	
	Mean	SE	Mean	SE
THI	69	0.27	78	0.14
Plasma glucose (mmol)	3.46	0.07	3.22	0.10
Total bodyweight loss (kg)	42	4.2	63	7.0
DMI (kg DM day)	16.4	0.53	16.1	0.81

DMI, Dry matter intake

ดัดแปลงจาก Jonsson *et al.* (1997).

กัลยา และคณะ (2539) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและความชื้นต่อการให้นมและความสมบูรณ์ของแม่โคนม โดยแบ่งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ น้อยกว่า 27, 27-30 และมากกว่า 30 องศาเซลเซียส) และแบ่งความชื้นเป็น 5 ระดับ น้อยกว่า 60, 60-69.9, 70-79.9, 80-89.9 และ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) พบว่าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ มีผลต่ออัตราการผสมติด ผู้วิจัยจึงแนะนำให้จัดการโรงเรือนให้มีอุณหภูมิต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์

Ronchi *et al.* (2001) รายงานถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเครียดเนื่องจากความร้อนคือ มีผลต่อระดับฮอร์โมนที่สำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ เช่นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน, LH หรือ FSH เป็นต้น นอกจานั้นยังมีผลต่อความสามารถในการหลั่งฮอร์โมนของเซลล์ theca และ granulosa อัตราการผสมติดต่ำลง การตรวจสัดหรือรอบการเป็นสัดล่าช้า จำนวนครั้งผสมต่อการผสมติดเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อทราบว่าช่วงอุณหภูมิ ความชื้น หรือดัชนีอุณหภูมิกับความชื้นสัมพัทธ์ใดเป็นช่วงวิกฤติก็ควรมีการปรับปรุงสภาพแวดล้อม เช่นการระบายอากาศภายในโรงเรือน หรือลดความชื้น และอุณหภูมิภายในโรงเรือน เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.5. ปัจจัยเนื่องจากสายพันธุ์

จากการศึกษาของ Pongpiachan *et al.* (2000) ถึงประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ระหว่างโคนมพันธุ์แท้โฮสไตน์ฟรีเชียนและโคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง-โฮสไตน์ฟรีเชียนภายใต้อากาศร้อน พบว่าโคนมพันธุ์แท้โฮสไตน์ฟรีเชียน จะมีประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ต่ำกว่ากลุ่มโคนมลูกผสม เช่น โคนมพันธุ์แท้จะใช้เวลาในจากหลังคลอดจนถึงวันที่ผสมเทียมครั้งแรกยาวนานกว่า หรือจำนวนครั้งของการผสมเทียมมากกว่าโคนมลูกผสม เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ของโคนมมีส่วนเกี่ยวข้องกันระหว่างความสามารถปรับร่างกายให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมและในทำนองเดียวกันย่อมจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองกับ Pongpiachan *et al.* (2003) ที่ศึกษาถึงอิทธิพลของฤดูกาลที่มีต่อการสังเกตการเป็นสัดในโคนมพันธุ์แท้โฮสไตน์ฟรีเชียนและโคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง-โฮสไตน์ฟรีเชียน พบว่าแนวโน้มของการเป็นสัดจะสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน) และลดลงในฤดูกาลที่ร้อนตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายน

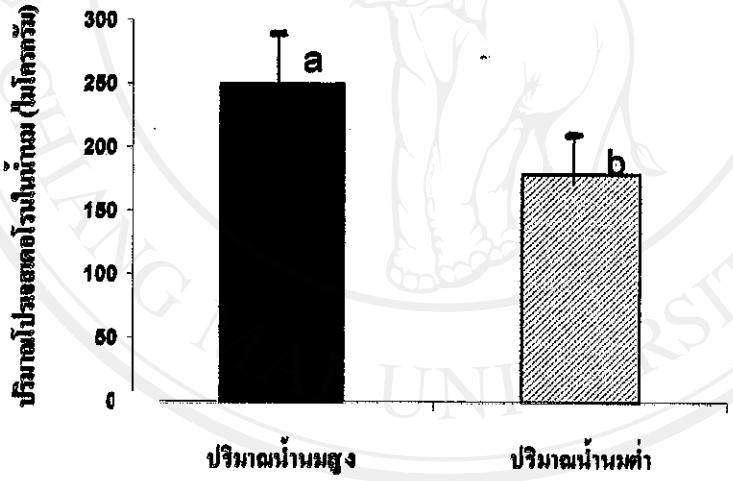
2.3.6. ปัจจัยเนื่องจากปริมาณน้ำนม

ในกลุ่มโคนมที่ให้ผลผลิตสูงมักจะประสบปัญหาเนื่องจากความผิดปกติของสมดุลพลังงาน (negative energy balance) หลังคลอด เนื่องจากต้องการพลังงานทั้งในการผลิตน้ำนมและเพื่อดำรงชีพ จึงต้องการใช้พลังงานมาก ฮอร์โมนและเมตาบอไลท์ต่าง ๆ ต้องการสารอาหารมาใช้ในขบวนการเปลี่ยนแปลงสัญญาณต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบสืบพันธุ์โดยผ่านการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (hypothalamo pituitary axis) การศึกษาของ Reist *et al.* (2003) ทำการศึกษากลุ่มโคนมที่ให้ผลผลิตสูงพบว่า ความสมดุลของพลังงานมีผลต่อโอกาสการผสมติด โดยในกลุ่มที่มี high energy balance ในการผสมครั้งแรกจะมีโอกาสผสมติดมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ

โคนมจะมีการสูญเสียน้ำหนักภายหลังคลอดอันเนื่องมาจากการสร้างน้ำนม และการสูญเสียน้ำหนักที่เกิดจากพลังงานที่เก็บสะสมไว้ในรูปต่างๆ ถูกนำมาใช้ และยังมีการเกิดสารบางอย่างที่มีผลเสียต่อร่างกายในรูปแบบต่างๆ เช่น สารพวกคีโตน (ketone) มีการสำรวจพบว่า กลุ่มโคนมที่ให้น้ำนมมาก จะสูญเสียน้ำหนักมาก จะมีสารพวกคีโตนอยู่มากในกระแสโลหิต และโค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พวกนี้จะมีสภาวะการไม่เป็นสัดภายหลังคลอดนานกว่าปกติอีกด้วย และโคที่มีการหลั่งน้ำนมมากๆ จะมีระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลและโปรแลคตินสูงกว่าโคที่ให้น้ำนมน้อย และผลของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ทำให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมน gonadotrophin releasing hormone และ LH ลดลง ทำให้มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลและการทำงานของรังไข่เช่นกัน (Nebel and McGilliard, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lean *et al.* (1989) และ Hooijer *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าโคในกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูงจะมีโอกาสเสี่ยงการเกิด cystic ovarian มากกว่ากลุ่มที่ให้ผลผลิตต่ำกว่า ซึ่งในกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูงจะมีปัญหาเกี่ยวกับ negative energy balance แต่ในการศึกษาของ Rabiee *et al.* (2002) ถึงผลของปริมาณน้ำนมในแต่ละวันต่อระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม โดยแบ่งกลุ่มโคนมที่ให้ผลผลิตสูง (27-29 kg/day) และผลผลิตต่ำ (17-22 kg/day) โดยการยับยั้งการไหลเวียนฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เกิดขึ้นภายในร่างกายด้วย GnRH-agonist และเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย controlled intravagina device release (CIDR) จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการให้น้ำนมต่างกัน มีผลต่อระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม โดยโคนมที่ให้ผลผลิตสูงจะมีการขับออกของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงกว่าโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมน้อยกว่า (ภาพที่ 2-8)



ภาพที่ 2-8. แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.) ของระดับโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคนมที่มีปริมาณน้ำนมสูง (n = 6) และปริมาณน้ำนมต่ำ (n = 6) ดัดแปลงจาก Rabiee *et al.* (2002)

[a, b] อักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $P < 0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Laben *et al.* (1982) และ Stevenson *et al.* (1983) มีความเห็นที่สอดคล้องกันว่าโคนมที่ให้ผลผลิตสูงนั้นจะมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ โดยมีผลทำให้อัตราการผสมติดต่ำ วันท้องว่าง (days open) มีระยะเวลานาน สุดท้ายจะทำให้เกิดการคัดทิ้ง

ปริมาณการผลิตน้ำนมจะมากหรือน้อยนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมแล้ว มักจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยรอบ โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงจะทำให้ได้ปริมาณน้ำนมลดต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเป็นกลุ่มโคที่มีพันธุกรรมที่ให้ผลผลิตสูงจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด (Kadzere *et al.*, 2002) นอกจากนี้ความเครียดจากความร้อนยังมีผลต่อความเป็นอยู่ด้านอื่นๆ ในโคนม เช่น ปริมาณการกินได้ลดลง ซึ่งส่งผลทางอ้อมต่อผลผลิตน้ำนม

จากการศึกษาของ Sangsritavong *et al.* (2002) ถึงเมตาบอลิซึมของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากการไหลเวียนฮอร์โมนเข้าสู่ตับ จากกลุ่มโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนม (lactating cow) และกลุ่มโคนมที่ไม่ให้ผลผลิตน้ำนม (nonlactating cow) พบว่ากลุ่มโคนมที่ไม่ให้ผลผลิตน้ำนมจะมีระดับโปรเจสเตอโรนในซีรัมสูงกว่าโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนม ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มโคนมที่ให้ผลผลิตจะมีอัตราการกินได้สูง เกิดการไหลเวียนของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเข้าสู่ตับมากกว่า จึงทำให้มีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มที่ยังไม่ให้ผลผลิตน้ำนม ดังตารางที่ 2-6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-6. Serum progesterone concentrations in lactating and nonlactating cows during continuous infusion of progesterone at 3 to 5 after feeding (Sangsritavong *et al.*, 2002)

Serum progesterone concentrations (ng/ml)					
Lactating cows					
Cow No.	Day 1	Day 2	Day 3	Average	CV[2]
3989	2.98	2.60	2.77	2.78	0.06
4075	2.18	2.40	2.53	2.37	0.07
4180	2.43	2.39	2.39	2.40	0.01
4202	1.97	2.15	2.32	2.15	0.08
CV[1]	0.20	0.08	0.08		
				LSM ± SEM 2.43 ± 0.17	
Nonlactating cows					
Cow No.					
4431	3.18	3.17	2.96	3.10	0.04
4223	3.59	3.87	3.30	3.59	0.07
4146	4.22	3.96	3.69	3.96	0.06
CV[1]	0.14	0.12	0.11		
				LSM ± SEM *3.53 ± 0.20	

[1]CV between animals within day.

[2]CV within the animal between days.

*progesterone concentrations in nonlactating cows were greater ($P = 0.009$) than in lactating cows .

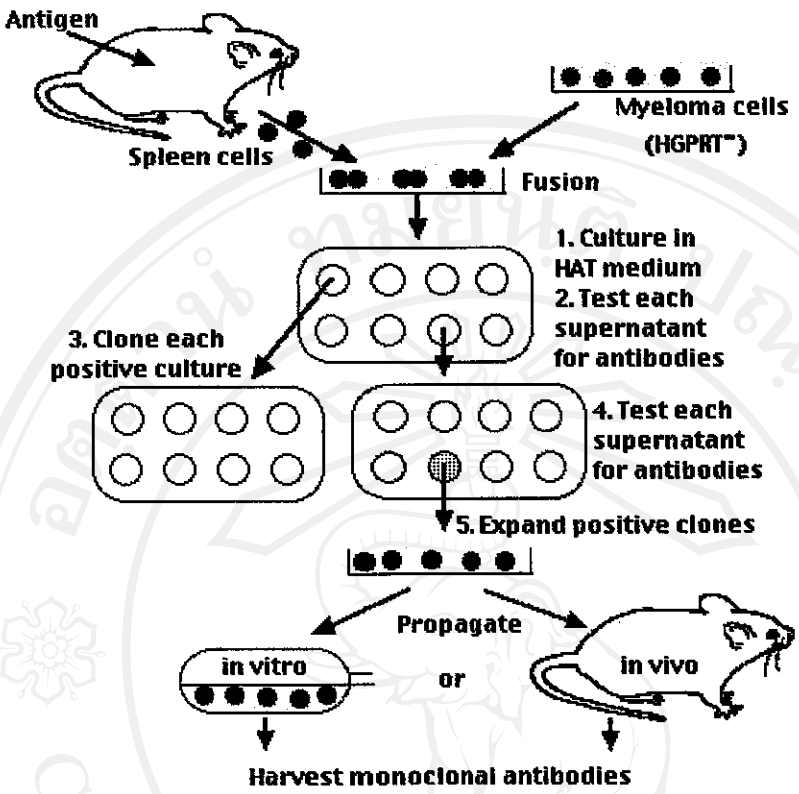
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติเจนที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งกำเนิดมาจาก B lymphocyte เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจน และชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น

ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดรวมกันซึ่งรวมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) แต่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวเมื่อเป็นโรคมะเร็งของ B lymphocyte หรือเซลล์พลาสมา โดยที่เซลล์พลาสมาปกติเซลล์หนึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เหล่านี้อย่างไม่หยุดยั้ง และสร้างแอนติบอดีชนิดเดียวกันจำนวนมากออกมาให้สามารถตรวจพบได้ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการและที่นำมาใช้ในการรักษาโรคในปัจจุบันเป็นชนิดที่ผลิตขึ้นในห้องทดลองโดยวิธีต่าง ๆ กัน แต่มีวิธีที่เป็นที่นิยมกันมากคือ วิธีที่เรียกว่า Somatic hybridization ซึ่งเป็นการเชื่อมเซลล์สองเซลล์เข้าด้วยกัน โดยเซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ อีกเซลล์หนึ่งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง วิธีการนี้ทำให้ได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า Hybridoma ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีและมีชีวิตยืนยาว และสามารถเพิ่มจำนวนได้โดยไม่มีสิ้นสุด (ภาพที่ 2-9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-9. แสดงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (www.users.rcn).

2.5. เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA)

หลักการของ ELISA คล้ายกับวิธีของ RIA เพียงแต่ใช้เอนไซม์แทนสารกัมมันตภาพรังสีเชื่อมต่อกับแอนติบอดี เอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (chromogenic substrate) เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ใน ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase, horseradish peroxidase เป็นต้น ซึ่งความไวของ ELISA นั้นอาจใกล้เคียงกับ RIA และมีข้อได้เปรียบที่ความปลอดภัยและประหยัดกว่า RIA มาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพัฒนา ELISA รูปแบบต่าง ๆ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่าง

Direct ELISA

วิธี direct ELISA สามารถใช้ตรวจสอบหรือตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ลงในหลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนในถาดหลุม 96 หลุมทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน และล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนออก เติมสับสเตรท ปริมาณสีที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถวัดโดย microplate reader ที่ออกแบบสำหรับอ่านถาดหลุม 96 หลุม ซึ่งสามารถทราบผลค่าการดูดกลืนแสงจากทั้ง 96 หลุมภายในเวลาไม่นาน

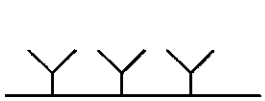
Indirect ELISA

วิธี indirect ELISA คล้ายกับ direct ELISA แต่ใช้ซีรัมหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ไม่ติดฉลาก จากนั้นตรวจสอบแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมกับเอนไซม์ โดยแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อชนิดแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีอิสระออก เติมสับสเตทเช่นเดียวกับ direct ELISA

Competitive ELISA

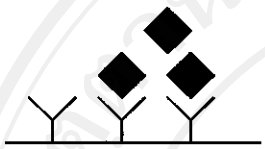
เป็นวิธีการวัดปริมาณแอนติเจนคล้ายกับ RIA โดยวิธีเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ผสมกับตัวอย่างแอนติเจนมาตรฐานหรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจ จากนั้นเติมลงในถาดหลุม 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติบอดี ซึ่งถ้าเติมตัวอย่างมาก แอนติเจนที่จะจับกับแอนติบอดีก้นหลุมมีมากเช่นเดียวกัน แต่แอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีก้นหลุมน้อย ดังนั้นผลที่ได้จะแปรผันกัน เช่นถ้าตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนอยู่มากจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ (สีจางลง) กว่าหลุมที่มีแอนติเจนความเข้มข้นต่ำ ดังแผนภาพที่ 2-9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

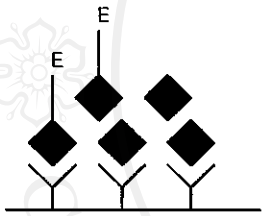


1. เคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดี

ล้าง

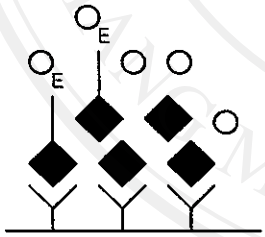


2. เติม sample หรือแอนติเจน



3. เติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์

ล้าง



4. เติม substrate

5. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ภาพที่ 2-10. แสดงวิธี Competitive ELISA (นภาธร, 2536)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved