

ผลของระยะเวลาในการใช้ จี เอ็น อาร์ เอช อะโกนิสต์ ชนิดฝังเข้าใต้ผิวหนัง
ต่อวงรอบการเป็นสัด ระดับโปรเจสเตอโรน
และการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและรังไข่ในสุนัขเพศเมีย

นางสาว กนกกาญจน์ สุภัครพงษ์กุล


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF IMPLANTED DURATION OF IMPLANTATION GnRH AGONIST ON
ESTRUS CYCLE, SERUM PROGESTERONE AND THE CHANGES OF UTERINE
AND OVARY IN FEMALE DOGS



Miss Kanokkarn Supakpongkul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science Program in Theriogenology

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของระยะเวลาในการใช้ จี เอ็น อาร์ เอช อะโกนิสต์ ชนิดฝังเข้าใต้ผิวหนัง ต่อวงรอบการเป็นสัด ระดับโปรเจสเตอโรน และการเปลี่ยนแปลงของมดลูก และรังไข่ในสุนัขเพศเมีย


โดย นางสาวกนกกาญจน์ สุภัครพงษ์กุล

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สุตสรร ศิริไวยพวงศ์

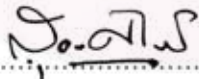
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ชัยณรงค์ โลกษิต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

 คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กุดต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. วิชัย ทันตศุภาวิรักษ์)

 อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สุตสรร ศิริไวยพวงศ์)

 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชัยณรงค์ โลกษิต)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. วรา พานิชเกรียงไกร)

กนกกาญจน์ สุภครพงษ์กุล : ผลของระยะเวลาในการใช้ จี เอ็น อาร์ เอช อะโกนิสต์ ชนิด
ฝังเข้าใต้ผิวหนังต่อวงจรการเป็นสัด ระดับโปรเจสเตอโรน และการเปลี่ยนแปลงของมดลูก
และรังไข่ในสุนัขเพศเมีย (Effect of implanted duration of implantation GnRH Agonist
on estrus cycle, serum progesterone and the changes of uterine and ovary in
female dogs) อ. ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร.สุทธรร ศิริไวยพงษ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม :
รศ.น.สพ.ดร.ชัยณรงค์ โลกษิต, Dr. Timothy Trigg, 37 หน้า

Deslorelin เป็น GnRH agonist ซึ่งมีคุณสมบัติออกฤทธิ์เพื่อกระตุ้นการตอบสนองของตัว GnRH เองในลักษณะ
down-regulation ทำให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าไม่มีการหลั่ง FSH และ LH ออกมา เพื่อวัตถุประสงค์ในการควบคุมประชากร
สุนัขโดยอาศัยการออกฤทธิ์ยับยั้งการเป็นสัด แต่จากการศึกษาครั้งก่อนๆ พบว่าการใช้ deslorelin จะกระตุ้นให้เกิดการเป็น
สัดขึ้น การศึกษานี้เพื่อยืนยันถึงคุณสมบัติในการควบคุมประชากรและยับยั้งการเป็นสัดในสุนัขเพศเมียหลังจากการ
ได้รับ deslorelin แล้ว โดยใช้สุนัขเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ทั้งหมด 12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่ม
การทดลองที่ 1 ศึกษาตรวจดูความเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของอวัยวะเพศ เซลล์เยื่อบุช่องคลอด และระดับ
progesterone ในกระแสเลือด ตรวจการตกไข่ เพื่อดูการเข้าสู่วงจรการเป็นสัดและดูความสมบูรณ์ของวงจรการเป็นสัด
ผลจากการศึกษาพบว่า สุนัขทุกตัว (100%) เข้าสู่วงจรการเป็นสัด ภายหลังจากฝัง deslorelin ขนาด 4.7 mg เข้าใต้
ผิวหนัง และถอดออกเมื่อตรวจพบว่าสุนัขเข้าสู่วงจรการเป็นสัด กลุ่มการทดลองที่ 2 ได้รับการฝัง deslorelin ในขนาดและ
ตำแหน่งเดียวกันแต่ไม่ได้รับการถอดออก ผลการศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสุนัขกลุ่มทดลองที่
1 และ 2 ต่อจำนวนสุนัขที่เข้าสู่วงจรการเป็นสัด แต่พบว่ามีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับ progesterone
ภายหลังจากที่สุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการถอด deslorelin ออกในช่วง 1-6 สัปดาห์หลังจากที่เข้าสู่วงจรการเป็นสัด ผล
จากการตรวจลักษณะทางพยาธิวิทยาไม่พบความเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของมดลูกในสุนัขทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง
แต่ตรวจพบ follicle และ corpus luteum ในรังไข่ของสุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 ออกในขณะที่สุนัขกลุ่มทดลองที่ 2 ไม่พบว่ามี
ร่องรอยการคงอยู่ของ follicle หรือ corpus luteum จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า deslorelin สามารถนำไปใช้เพื่อ
วัตถุประสงค์ในการคุมกำเนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนผลจากการเหนี่ยวนำเข้าสู่วงจรการเป็นสัดช่วงแรกอาจทำให้
สุนัขไม่สามารถรักษาการตั้งท้องไว้ได้ หากทำการฝัง deslorelin เป็นระยะเวลายาวนาน เนื่องจากการที่ระดับ
progesterone ในระยะ diestrus จะอยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ

สถาบันวิทยบริการ

ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวทวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4775501631 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEY WORD : GnRH AGONIST / FEMALE DOG / CONTRACEPTION / INDUCTION OF ESTRUS / FERTILITY

KANOKKARN SUPAKPONGKUL : EFFECT OF IMPLANTED DURATION OF IMPLANTATION GnRH AGONIST ON ESTRUS CYCLE, SERUM PROGESTERONE AND THE CHANGES OF UTERINE AND OVARY IN FEMALE DOG. THESIS ADVISOR : ASSOC PROF. DR. SUDSON SIRIVAIYAPONG, D.V.M.,Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC PROF. DR. CHAINARONG LOHACHIT, D.V.M.,Dr.Med.Vet., 38 pp.

Deslorelin is GnRH agonist that affect and stimulates the response of GnRH itself in the down- right regulation which results in the prohibition of FSH and LH flows of which the objective is to control the Canine population by prohibiting oestrus in the dogs. However, previous studies have revealed the initial oestrus signs following deslorelin implantation. Present study has an objective to confirm the quality of population control and the prohibition of oestrus in female dogs after receiving deslorelin by dividing 12 adolescent female dogs into 2 groups equally. The first experiment observed the changes of genital organ, cervical cell and serum progesterone level with the observation of ovulation to identify the oestrus cycle and the completion of such cycle. The result of the study revealed that all the dogs entered oestrus after implantation of deslorelin 4.7 mg and then removed when the dogs found entering oestrus cycle. The second experiment group received the same amount of deslorelin and at the same location without the removal. The result shows no significant difference between the number of dog entering oestrus cycle from group 1 and 2. However, there is a significant differences in the progesterone levels after the dogs in group1 had got the deslorelin remove within 1-6 week after entering oestrus cycle. The result of histopathology has found no abnormality of the uterus in both groups but has found follicle and corpus luteum in the ovary of the dogs in group 1 while the dogs in group 2 found no trace of follicle or corpus luteum. The result shows that deslorelin can be effectively applied for the purpose of birth controlling. Although the initial oestrous is induced, bitch may not be able to maintain pregnancy, when deslorelin is implanted for a long period, because of the low serum progesterone level and short period of progesterone profile were observed.

Department of Obstetrics
Gynaecology and Reproduction
Field of study Theriogenology
Academic year 2007

Student's signature.....*Kanokkarn Supakpongkul*
Advisor's signature.....*Sudson Sirivaiyapong*
Co-advisor's signature.....*Chainarong Lohachit*

กิตติกรรมประกาศ

ทางผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร.สุดสรร ศิริไวยพวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ และ รศ.น.สพ.ดร.ชัยณรงค์ ไลหะซิด อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ Dr. Timothy
Trigg ที่ได้สนับสนุนผลิตภัณฑ์ deslorelin เพื่อให้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ น.สพ.ธีรวัฒน์ สว่างจันทร์อุทัย สพ.ญ.สุกัญญา มณีอินทร์
น.สพ.นันทิ อ่าอินทร์ สพ.ญ. วรณี หมู่มิ่ง และ น.สพ.พิสุทธิ เพ็ญสิทธิพร ที่ได้กรุณาให้ความ
ช่วยเหลือด้านต่างๆ พร้อมทั้งให้คำแนะนำปรึกษาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่สาว และเพื่อนๆ พี่ๆ สัตวแพทย์
ผู้ร่วมงาน โรงพยาบาลสัตว์ของหล่อทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจให้

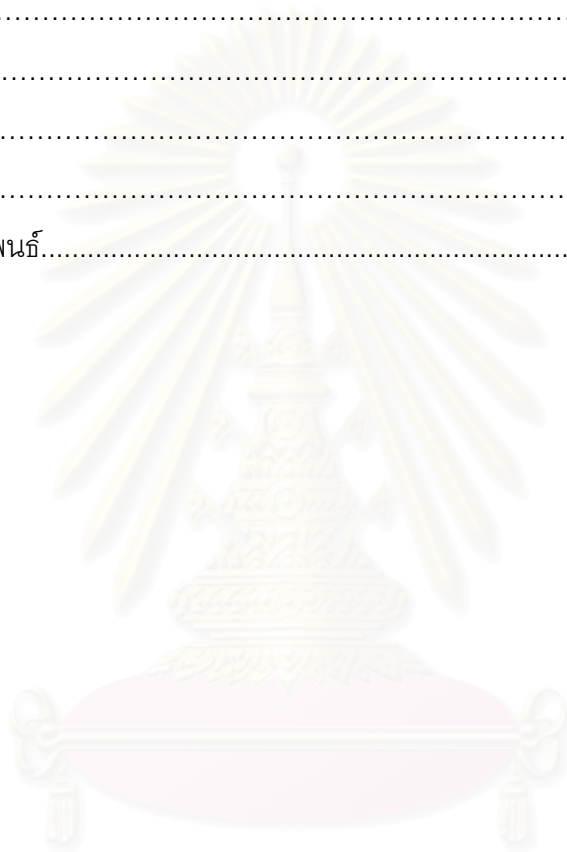


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปและแผนภูมิ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
วงรอบการเป็นสัด.....	4
การทำงานของ GnRH	6
กลไกการควบคุม Gonadotropin.....	6
โครงสร้างทางเคมีของ GnRH.....	6
การควบคุมการผลิตและการหลั่ง GnRH.....	6
การทำงานของตัวรับ GnRH.....	7
GnRH agonists.....	7
ประโยชน์เพื่อการนำไปใช้ในสัตว์.....	8
การใช้เพื่อประโยชน์ด้านอื่น.....	9
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
1. สัตว์ทดลอง.....	12
2. แผนการทดลอง.....	12
3. ผลิตภัณฑ์ที่ใช้.....	13
4. คุณสมบัติของระบบสืบพันธุ์.....	13
5. ลักษณะทางกายภาพที่แสดงถึงการเข้าสู่ระยะ estrus.....	14
6. การตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด.....	14
7. ระดับฮอร์โมน progesterone.....	14
8. คุณสมบัติของระบบสืบพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง.....	14

9. กรรมวิธีทางพยาธิวิทยา.....	15
10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	15
4. ผลการทดลอง.....	16
4.1 ตำแหน่งที่ทำการฝัง.....	16
4.2 การเข้าสู่วงรอบการเป็นสัตว์.....	16
5. อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	24
รายการอ้างอิง.....	29
ภาคผนวก.....	35
ภาคผนวกที่ 1	36
ภาคผนวกที่ 2	37
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	38



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การควบคุมจำนวนประชากรสุนัข ซึ่งมีการเพิ่มมากขึ้นทุกปี เป็นมาตรการสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย เนื่องจากการเพิ่มจำนวนขึ้นของประชากรสุนัข อาจส่งผลกระทบต่อหลายระบบ หากเป็นสุนัขจรจัดสุนัขเหล่านี้สามารถก่อปัญหาให้สังคมเป็นอันมากและประการสำคัญคือการทำร้ายคน การกระจายของโรคเช่นโรคพิษสุนัขบ้า การสร้างมลพิษจากปัสสาวะและอุจจาระ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้สุนัขยังเป็นอาหารสำหรับหนู เป็นที่ขยายพันธุ์ของหมัดหนู และมีการปนเปื้อนในอาหารของมนุษย์ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคติดต่อสู่คนได้ (Carter, 1990) รายงานของ Lloyd ที่กล่าวไว้ในปี 1988 ว่าสุนัขจรจัดอาจเป็นสาเหตุให้เกิดอุบัติเหตุบนท้องถนน และก่อความสูญเสียต่อสัตว์ที่เลี้ยงไว้เป็นอาหาร รวมถึงสัตว์เลี้ยงในบ้านด้วย การควบคุมจำนวนประชากรสุนัขจึงเป็นสิ่งที่ควรตระหนักถึง เพื่อป้องกันและลดปัญหาดังกล่าวที่จะเกิดตามมาจากการเพิ่มขึ้นของสุนัขจรจัด โดยที่สุนัขจรจัดเหล่านั้น ส่วนหนึ่งมาจากการที่เจ้าของสุนัขเลี้ยงไม่ได้ให้ความสำคัญต่อการคุมกำเนิด เมื่อสุนัขที่เลี้ยงคลอดลูกและเจ้าของไม่สามารถดูแลได้ทั่วถึง ทำให้สุนัขบางส่วนถูกนำไปปล่อยไว้ตามสถานที่ต่างๆ จนเกิดเป็นปัญหาสุนัขจรจัด ซึ่งผลจากการสำรวจครั้งล่าสุดปี 2549 จำนวนประชากรสุนัขในกรุงเทพมหานครมีประมาณ 823,504 ตัว และมีเพียง 753,478 ตัวเท่านั้นที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าแล้ว

การคุมกำเนิดในสุนัขเพศเมียด้วยวิธีการผ่าตัดเอามดลูกและรังไข่ออก เป็นวิธีการคุมกำเนิดที่ได้ผลแน่นอนและถาวร แต่การคุมกำเนิดด้วยวิธีนี้ สุนัขที่จะเข้ารับการผ่าตัด จะต้องได้รับการตรวจสุขภาพและเจาะเลือดเพื่อตรวจดูการทำงานของตับและไตก่อน เนื่องจากความผิดปกติของตับ ไต จำนวนเม็ดเลือดแดงและขาว อาจส่งผลให้สุนัขมีความเสี่ยงต่อการวางยาสลบมากกว่าสุนัขที่มีสุขภาพเป็นปกติ แม้กระนั้นสุนัขที่ร่างกายแข็งแรงก็ยังมีความเสี่ยงต่อการวางยาสลบ นอกจากนี้อาจเกิดความผิดปกติภายหลังการผ่าตัดตามมาได้เช่น แผลแตก ในกรณีที่เจ้าของสุนัขดูแลไม่ได้ทั่วถึง ทำให้แผลสกปรกและติดเชื้อแทรกซ้อนได้ รวมถึงการเกิด stump pyometra ในสุนัขเพศเมียบางตัวพบลักษณะการปัสสาวะกระปริดกระปรอยภายหลังจากการทำหมัน ซึ่งสาเหตุเกิดจากภาวะความไม่สมดุลของ estrogen นอกจากนี้การใช้วิธีผ่าตัดต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง อีกวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมคือ การคุมกำเนิดด้วยการบริหารยาแบบฉีด สามารถทำได้ง่ายกว่าในบางกรณี ซึ่งฮอร์โมนที่นิยมใช้เพื่อวัตถุประสงค์การคุมกำเนิดมีหลายชนิด แต่ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ medroxy - progesterone acetate โดยจะฉีดได้เฉพาะตอนที่

สุนัขไม่ได้อยู่ในช่วงที่เป็นสัดหรือ anoestrus เท่านั้น แต่ก็พบว่าฮอร์โมนชนิดนี้เป็นสาเหตุโน้มนำให้สุนัขเกิดภาวะมดลูกอักเสบชนิดเป็นเมือก (mucometra) และมดลูกอักเสบชนิดเป็นหนอง (pyometra) ได้

ในปัจจุบันมีผู้เลี้ยงสุนัขหลายคนที่ต้องการคุมกำเนิดสุนัขที่ตนเลี้ยงไว้เพียงชั่วคราว และต้องการให้สุนัขสามารถกลับมาเป็นสัดและผสมพันธุ์ให้ลูกได้อีก ด้วยเหตุผลหลายประการ บางคนก็ต้องการให้คุมกำเนิดด้วยวิธีที่ปลอดภัย หรือยอมให้สุนัขของตนมีความเสี่ยงน้อยที่สุด ซึ่งจากการศึกษาของ Trigg และคณะที่กล่าวถึงในปี 2006 รายงานว่า การฝัง GnRH agonist ใต้ผิวหนัง ไม่พบว่าก่อให้เกิดปฏิกิริยาของผิวหนัง หรือเกิดการติดเชื้อแต่อย่างใด (Ponglowhapan et al., 2002; Trigg et al., 2006) สุนัขไม่ต้องถูกวางยาสลบก่อนลงมือปฏิบัติ deslorelin (Suprelorin®) เป็น GnRH agonist สังเคราะห์ รูปแบบที่ใช้คือแบบฝังเข้าใต้ผิวหนัง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการคุมกำเนิด ที่ได้รับการรับรอง และมีการใช้เพื่อคุมกำเนิดในสุนัขเพศผู้ในประเทศออสเตรเลียแล้ว (Kutzler, 2005) แต่การใช้เพื่อวัตถุประสงค์การคุมกำเนิดในสุนัขเพศผู้ นั้น การออกฤทธิ์รวมทั้งกระบวนการที่เกิดขึ้น ไม่ซับซ้อนเท่ากับการใช้ในเพศเมียด้วย วัตถุประสงค์เดียวกัน เนื่องจากพบว่าภายหลังจากการฝัง GnRH agonist ในสุนัขเพศเมียในบางช่วงของวงจรการเป็นสัด จะเกิดการกระตุ้นให้สุนัขแสดงอาการเป็นสัดภายหลังจากการฝังไปแล้ว ในช่วงระยะเวลา 10-18 วัน แล้วหลังจากนั้นจึงเกิดการคุมกำเนิดจากการไปออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของ FSH และ LH (Trigg et al., 2001) โดยที่การฝังแล้วไม่ก่อให้เกิดการแสดงอาการเป็นสัดภายหลังจากการฝังนั้น ควรทำการฝังในช่วงระยะไดเอสตรัสช่วงต้นในสุนัขเพศเมียโตเต็มวัย และการฝังในช่วงอายุก่อนวัยเจริญพันธุ์ตอน 4 เดือน ก็จะไม่ก่อให้เกิดการเป็นสัดเช่นกัน แต่ในการศึกษาที่ทำการฝัง GnRH agonist ที่อายุ 7 เดือนพบว่าสุนัขถูกกระตุ้นให้เข้าสู่วงจรการเป็นสัดก่อน 1 ครั้งแล้วจึงยับยั้งตามมา (Trigg et al., 2006) จากการศึกษาดังกล่าวในข้างต้น นับเป็นข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม มีการบ่งชี้ถึงความล้มเหลวในการคงอยู่ของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดของสุนัขภายหลังจากการใช้ GnRH agonist แบบฝังไปแล้ว 40 วัน และพบว่าระยะไดเอสตรัสของสุนัขที่ถูกกระตุ้นการเป็นสัดสั้นลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Wright, 1989 และ Trigg et al., 2006) โดยที่ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงวงจรการเป็นสัดที่เกิดขึ้นครั้งแรกจากการฝัง GnRH agonist ชนิดฝังเข้าใต้ผิวหนัง การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรเจสเตอโรน และการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและรังไข่ในสุนัขเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ จึงเป็นที่น่าศึกษาโดยละเอียดถึงผลจากการกระตุ้นการเป็นสัดภายหลังจากการฝัง GnRH agonist ชนิดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ แบบระยะยาว (slow release long acting) ในแต่ละระยะของการเป็นสัด เพื่อศึกษาถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของสุนัขที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ และความเหมาะสมในประโยชน์ด้านการใช้เพื่อคุมกำเนิด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษามลของการใช้ จี เอ็น อาร์ เอช อะโกนิสท์ ผังใต้ผิวหนังสุนัขเพศเมียในวัยเจริญพันธุ์ ด้วยวิธีการบริหารยาให้ออกฤทธิ์ระยะสั้น และระยะยาว
2. เพื่อศึกษามลของการใช้ จี เอ็น อาร์ เอช อะโกนิสท์ ผังใต้ผิวหนังสุนัขเพศเมียในวัยเจริญพันธุ์ ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ภายใน โดยดูจากลักษณะทางกายวิภาคและจุลกายวิภาค ภายหลังจากการผังไปแล้ว 63 วัน
3. เพื่อศึกษาถึงความผิดปกติของการใช้ จี เอ็น อาร์ เอช อะโกนิสท์ชนิดผังเข้าใต้ผิวหนัง ณ ตำแหน่งที่ทำการผัง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วงรอบการเป็นสัดและลักษณะทางพยาธิวิทยาของมดลูกและรังไข่ในสุนัข

ระยะ Prooestrus

เป็นช่วงที่มีการเจริญของ follicle และการเรียงตัวของมดลูก การเจริญและพัฒนาของรังไข่รวมถึงการหลั่งของ estrogen จะถูกควบคุมโดยฮอร์โมน FSH LH และฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองหรือที่เรียกว่า pituitary gonadotropins ในทางกลับกัน estrogen ที่หลั่งจากรังไข่จะเป็นตัวไปกระตุ้นให้ LH จากรังไข่ขึ้นสูงสุด (LH surge) ซึ่งมักจะเป็นวันเดียวกันกับวันที่เข้าสู่ระยะ estrus และเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ FSH จะสูงที่สุด 1 วันก่อนเข้าสู่ระยะ estrus ส่งผลให้มีการเจริญของ follicle มากขึ้นแล้วจากนั้นจึงลดลง ส่วน LH จะสูงที่สุดในวันที่เข้าสู่ระยะ estrus เช่นเดียวกับ estrogen ในขณะที่ estrogen สูงขึ้นก่อนเข้าสู่ระยะถัดไป และจะสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่ระยะ estrous การเกิดคอร์ปัสลูเทียมและการหลั่ง progesterone เกิดจากการทำงานของ LH โดยไปจับกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ของ follicle ที่แตกออกแล้วซึ่งจะมีการเพิ่มจำนวนตัวรับมากขึ้น (LaPolit et al., 1990) ฟอลลิเคิลที่แตกและฝ่อไปแล้วจะถูกเรียกว่า คอร์ปัสลูเทียม ซึ่งประกอบไปด้วยลูเทียมเซลล์ เรียกว่า luteotropic effect (Wingard et al., 1991; Lincoln, 1992; Bearden and Fuquay, 1997) และเมื่อ LH ต่ำลงคอร์ปัสลูเทียมก็จะค่อยสลายไปพร้อมๆกัน ลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบว่ามีการหลั่งของเหลวจากฟอลลิเคิลมากขึ้นเนื่องจากเส้นเลือดฝอยบริเวณนั้นจะมีแรงดันสูงขึ้น ผนังฟอลลิเคิลบางลงจนสามารถมองเห็นได้ถึงของเหลวที่อยู่ภายใน เมื่อ LH กระตุ้นให้ prostaglandin ถูกหลั่งออกมา ฟอลลิเคิลจึงแตกออกและเกิดการตกไข่ การตกไข่ในสุนัขสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องมีสิ่งกระตุ้น ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบมีการบวมน้ำและมีการคั่งเลือดที่ชั้นกล้ามเนื้อมดลูก เซลล์เยื่อบุช่องคลอดตรวจพบเป็นชนิด intermediate cell >50% (Verstegen et al., 1999) ลักษณะภายนอกที่พบคือเริ่มมีการบวมขยายใหญ่และมีสิ่งคัดหลั่งปนเลือดจากอวัยวะเพศ (Kutzler, 2005) ในระยะนี้สุนัขจะมีระดับ progesterone > 1 ng/ml (Trigg et al., 2006)

ระยะ Oestrus

เป็นระยะที่ follicle มีการเจริญอย่างเต็มที่จนกระทั่งแตกออกซึ่งเป็นผลมาจากการหลั่งของฮอร์โมน LH ส่วน estrogen ที่สูงในช่วงต้นระยะนี้ก็ค่อยๆลดลงอย่างสม่ำเสมอ โดยที่ระยะนี้จะถูกเรียกว่าระยะที่สุนัขเป็นสัด คือสุนัขเพศเมียยอมให้เพศผู้ขึ้นผสม ลักษณะทางพยาธิวิทยาพบชั้น mucosa-epithelium หนาตัวขึ้นอย่างต่อเนื่องจากการที่เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear

cell แทรกเข้ามา ในระยะนี้เส้นเลือดจะมาเลี้ยงบริเวณ propria-submucosa มากที่สุด เซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่พบจะเป็น superficial หรือเรียกอีกอย่างว่า cornified cell > 90% ซึ่งระยะนี้จะมีการตกไข่เมื่อตรวจพบ progesterone > 5 ng/ml (Kutzler, 2005) ระยะเวลาของช่วงนี้จะนาน 5 ถึง 9 วัน

ระยะ Dioestrus

เป็นระยะที่ corpus luteum มีการพัฒนาและหลั่งฮอร์โมน progesterone ออกมา ในระยะนี้เองที่หากไข่ถูกผสม สุนัขจะตั้งท้อง จนถึงสิ้นสุดระยะนี้ ผนังมดลูกจะค่อยๆกลับเข้าสู่สภาพปกติ การคั่งของเส้นเลือดและลักษณะบวมต่างๆจะลดลง ลักษณะทางพยาธิวิทยา แสดงให้เห็นถึงเซลล์ชนิด Stratified squamous epithelium มีจำนวนเซลล์ลดลงและบางลงอย่างชัดเจน แต่เซลล์ชั้นนอกสุดจะยังไม่เปลี่ยนเป็นแบบ cornified cell เมื่อตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด จะพบเป็น intermediate cell และมีเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมาก แต่จะไม่พบเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งระยะนี้จะยาวนาน 56 ถึง 60 วัน ในระยะไดเอสตริส luteal cell จะทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมน progesterone เป็นหลัก ชั้นกล้ามเนื้อมดลูกจะประกอบไปด้วย ชั้น tunica muscularis ชั้นในสุดเป็นกล้ามเนื้อเรียบซึ่งหนากว่าเมื่อเทียบกับกล้ามเนื้อเรียบที่อยู่ชั้นนอก ต่อมต่างๆ จะแทรกตัวอยู่ที่กล้ามเนื้อชั้นในกล้ามเนื้อเรียบที่อยู่ชั้นนอกจะมีการวางตัวเป็นแนวยาว กล้ามเนื้อทั้งสองชั้นนี้ถูกจัดเป็นมัด แต่มัดจะถูกรวมเข้าด้วยกันโดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ประกอบไปด้วย fibrocyte histiocyte mass cell, collagen และ elastic fiber นอกจากนี้จะพบได้ว่าที่ชั้นกล้ามเนื้อมีการขยายขนาดของ mucosal epithelium จากการเพิ่มจำนวนขึ้นของเม็ดเลือดขาว ชนิดนิวโทรฟิล นอกจากเส้นเลือดที่มาเลี้ยงชั้น propria-submucosa จะมีจำนวนมากขึ้นแล้วยังเกิดการคั่งของเลือดมากขึ้นด้วย เมื่อตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอดจะพบว่า intermediate cell มีน้อยกว่า 40% (Verstegen et al., 1999)

ระยะ Anoestrus

เป็นระยะที่เกิดต่อจาก dioestrus และเป็นระยะที่ระบบสืบพันธุ์เพศเมียกลับมามีอยู่ในสภาพปกติที่ไม่มีการพัฒนาใดๆ ลักษณะทางพยาธิวิทยา พบชั้นของ mucosal epithelium และชั้น propria-submucosa บางลง เซลล์เปลี่ยนเป็นชนิด simple cuboidal ซึ่งหนาเพียง 2 ถึง 4 ชั้นเท่านั้น เยื่อบุช่องคลอดจะเป็นลักษณะของ parabasal cell ซึ่งอาจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ lymphocyte ได้บ้าง ระยะนี้จะยาวนานได้ถึงหลายเดือน เซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่ตรวจพบเป็น parabasal cell หรือมี superficial cell < 50% และมีระดับ progesterone ในกระแสเลือด < 0.2 ng/ml (Volkman et al., 2006)

การทำงานของ GnRH

ในสุนัขเพศเมียจะมี FSH เป็นฮอร์โมนกระตุ้นให้ follicle มีการเจริญและ granulose cell จะผลิต estrogen ออกมา ส่วนการทำงานของ FSH ที่มีผลต่อการเจริญของ follicle และการสร้างสารสเตียรอยด์นั้นเกิดจากการเข้าจับกับตัวรับที่อยู่บน granulosa cell ในส่วนของ LH จะทำให้เกิด luteotropic effect กล่าวคือ LH จะไปทำให้เกิดการตกไข่โดย follicle จะแตกออกและเปลี่ยนเป็น corpus luteum ซึ่งจะสร้าง progesterone ออกมา โดยที่ FSH และ LH ถูกควบคุมโดย GnRH (Wingard et al., 1991; Lincoln, 1992; Bearden and Fuquay, 1997). ในระยะนี้จะมี การเพิ่มขึ้นของตัวรับ LH (LaPolT et al., 1990)

กลไกการควบคุม Gonadotropin

GnRH (gonadotropin releasing hormone) ทำหน้าที่ควบคุม FSH และ LH ที่รู้จักกันในชื่อ lutenizing hormone releasing factor (LRF) GnRH นี้จะเป็นตัวกระตุ้นและควบคุมการสร้างและหลั่งของ gonadotropin จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า

โครงสร้างทางเคมีของ GnRH

GnRH เป็นฮอร์โมนที่ผลิตจาก hypothalamus ประกอบไปด้วยเปปไทด์ 10 ตัวต่อกันตามโครงสร้างดังนี้ (Matsuo et al, 1971)



GnRH ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิดสามารถออกฤทธิ์ต่อกันได้เพียงแต่การตอบสนองที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันออกไป ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นจะตอบสนองต่อ GnRH ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วยกันได้ดีกว่า (Millar and King, 1988 cited by Cain et al., 1989)

การควบคุมการผลิตและการหลั่ง GnRH

ปริมาณและความถี่ในการหลั่ง GnRH เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ FSH และ LH การควบคุมการสร้าง gonadotropin และการหลั่งเกิดจากหลายปัจจัยรวมกัน การควบคุมนี้ไปทำให้ GnRH นั้นมีการหลั่งออกมาแบบเป็นช่วงๆจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Miller., 1993)

การทำงานของตัวรับ GnRH

ตัวรับของ GnRH ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 328 ตัว พบอยู่ในสมองและต่อมใต้สมองส่วนหน้า จำนวนตัวรับที่บริเวณต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะมีจำนวนไม่คงที่ เนื่องจากตัวรับเหล่านี้จะหยุดการทำงานและทำลายตัวเองตลอดช่วงระยะเวลาที่มันทำงาน และบางครั้งก็จะกระตุ้นตัวเองหรือสร้างเพิ่มขึ้นมาใหม่ ในการเข้าจับกันของ GnRH กับตัวรับนั้นต้องมีการกระตุ้นการแสดงออกของ GnRH ยีนส์และมีการหลั่งของฮอร์โมนได้แก่ gonadotrophins LH และ FSH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ตัวรับ GnRH นี้จะถูกกำหนดรูปแบบการทำงานตามคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่าในระยะ estrous จำนวนตัวรับจะค่อยๆเพิ่มจำนวนขึ้น และจะมีมากที่สุดตอนก่อนที่จะ LH จะหลั่งมาสูงที่สุด จากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนลงซึ่งระหว่างตั้งท้องและให้นมลูกก็จะลดลงเช่นกัน (Clayton et al., 1980; Conn, 1994) พบว่า สารคล้ายฮอร์โมน GnRH LH FSH สเตียรอยด์และโปรตีน สามารถควบคุมการทำงานทั้งเพิ่มและลดจำนวนตัวรับ GnRH ได้เช่นกัน (Wise et al., 1984; Young et al., 1984; Greg and Nett, 1989; Wang et al., 1989).

Up regulation เกิดจากการกระตุ้นของฮอร์โมนไปเหนี่ยวนำให้โมเลกุลของตัวรับมีเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ และในขณะเดียวกันเนื้อเยื่อเป้าหมายจะมีการพัฒนาและจะไวต่อการกระตุ้นของฮอร์โมนมากยิ่งขึ้น (Guyton and Hall, 1996) ในทางกลับกันการลดลงของจำนวนตัวรับเป็นการลดความไวรับลง โดยแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือความไวรับลดลงอย่างชั่วคราวหรือเพียงช่วงระยะเวลาสั้นๆ และความไวรับลดลงเป็นระยะเวลานาน การที่ความไวรับลดลงเกิดจากการที่ mRNA นั้นถูกสร้างน้อยลง ซึ่ง mRNA จะมีส่วนสำคัญในการสร้างตัวรับ GnRH ปริมาณ mRNA ที่ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นมีมากขึ้น หรือการแตกออกของโปรตีนตัวรับมีมากขึ้น เหล่านี้ล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า Down regulation

GnRH agonists

รูปแบบการเตรียมและโครงสร้าง

GnRH agonist ได้ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้นเนื่องจากโดยทั่วไปแล้ว GnRH agonist ที่ใช้กันอยู่หรือในธรรมชาติเองจะมีค่าครึ่งชีวิตสั้นและความคงตัวต่ำ ดังนั้นจึงถูกพัฒนาให้มีความคงตัวมากขึ้น (Pace et al., 1991) ซึ่งจากการศึกษาเพื่อพัฒนานี้มีที่เป็นทั้งแบบออกฤทธิ์เหมือนและออกฤทธิ์ตรงกันข้ามกับ GnRH โดยสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง LH และ FSH ได้สูงกว่าการกระตุ้นตามธรรมชาติถึง 200 เท่า (Nester, 1984 อ้างถึงโดย Vickery et al., 1989) เพื่อเลียนแบบการหลั่งออกมาอย่างช้าและต่อเนื่องของ GnRH ในธรรมชาติ สมัยก่อนจึงมีการนำเครื่องควบคุมการฉีด GnRH เข้าสู่หลอดเลือดดำในร่างกายอย่างเป็นจังหวะแต่ค่าใช้จ่ายก็สูงตามมา จึงพัฒนารูปแบบใหม่ที่สามารถใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนังได้หลายวิธี

(Concannon, 1989; Vickery et al., 1989; Cain et al., 1990; Cinone et al., 1996; Concannon, 1998; Inaba et al., 1998)

ผลิตภัณฑ์

ในทางสัตวแพทย์ได้มีการใช้และศึกษา GnRH ในสัตว์เพศผู้และเพศเมียหลายชนิด ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ออกฤทธิ์เหมือน GnRH (GnRH agonist) เป็นจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่จะใช้เป็นรูปแบบฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุกวันจึงเกิดเป็นข้อจำกัดในการใช้เพื่อประโยชน์ในการควบคุมการสืบพันธุ์ ซึ่งปัจจุบันผลิตภัณฑ์แบบออกฤทธิ์ได้ยาวนานด้วยการฉีดเพียงครั้งเดียวมีอยู่ในรูปแบบของ Deslorelin เป็นผลิตภัณฑ์แรกที่ถูกพัฒนาขึ้น

ผลของสารออกฤทธิ์คล้าย GnRH เมื่อเทียบกับ GnRH ในธรรมชาติ

เป็นที่ทราบกันดีว่าความเข้มข้นของ Gonadotropin ในกระแสเลือดขึ้นอยู่กับความถี่ของการหลั่ง GnRH จากต่อมใต้สมอง ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกันโดยตรงกับจำนวน receptor บนผิวเนื้อเยื่อ เนื่องจากตัว GnRH เองจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ receptor ในลักษณะต่างๆ (Kaiser et al., 1995) พบว่าการไม่ตอบสนองของ receptor ต่อ GnRH ในลักษณะ up-regulation เกิดจากการที่จำนวน receptor ที่อยู่บนผิวเนื้อเยื่อมีจำนวนน้อยลง ในการใช้ GnRH agonist มาเป็นเวลานานช่วงแรกจะกระตุ้นให้ gonadotrophin เพิ่มขึ้นแล้วจึงตามด้วยการไม่ตอบสนองของ receptor ที่ต่อมใต้สมองในการถูกกระตุ้นครั้งต่อไป

ประโยชน์เพื่อนำไปใช้ในสัตว์

ฤทธิ์ในการควบคุมวงจรการเป็นสัดในสุนัขเพศเมียของ GnRH agonist

ครั้งแรกที่มีการศึกษาถึงผลจากการใช้ GnRH agonist ซึ่งมีผลลดการเป็นสัดในสุนัขเพศเมียพบว่าสามารถระงับการเป็นสัดได้ เป็นการศึกษาในสุนัขเพศเมื่อก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ หรือช่วงอายุ 10-11 เดือน โดย Vickery และคณะในปี 1987 มีการศึกษาในสุนัขเพศเมียพบว่า ภายหลังจากการฝัง GnRH agonist สุนัข 3 ตัวแสดงอาการเป็นสัดภายใน 6 วัน หลังการฝังและไม่พบการเป็นสัดอีกเลยตลอด 1 ปีที่ทำการศึกษา จนกระทั่งอีก 8 เดือนต่อมาสุนัขจึงกลับมาแสดงอาการเป็นสัดอีกครั้ง (Vickery et al., 1989) ถัดมาได้มีการศึกษาในสุนัขพันธุ์บีเกิ้ลเพศเมีย โดย McRae และคณะในปี 1985 โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ nafarelin ในขนาด 32 ไมโครกรัมต่อวันและพบว่าหากทำการฝังฮอร์โมนนี้ในสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 4 เดือน หรือในสุนัขที่อยู่ในระยะ dioestrous และสุนัขหลังคลอด 7 วัน สุนัขจะไม่แสดงอาการเป็นสัดหลังการฝัง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Vickery และคณะ ในปี 1989 แต่ถ้าหากสุนัขที่แสดงอาการเป็นสัดจากการถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมน

ชนิดนี้ได้รับการผสมพันธุ์ สุนัขก็จะไม่สามารถตั้งท้องได้หรือมีอัตราการผสมติดต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของฮอร์โมน progesterone ในกระแสเลือดไม่อยู่ในระดับที่สูงพอจะรักษาสภาพตั้งท้องของสุนัขเอาไว้ได้ (Olson et al., 1989; Onclin et al., 2000) ผลจากการกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดในสุนัขหลังการใช้ฮอร์โมนใน 5-28 วันเป็นผลอันไม่พึงประสงค์ของการใช้ฮอร์โมนเพื่อการควบคุมวงจรการเป็นสัด ดังนั้น Wright และคณะ ในปี 2001 จึงได้ทำการศึกษาอีกครั้งเพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการถูกกระตุ้นการเป็นสัดในสุนัขหลังได้รับ GnRH agonist นั้นสามารถยับยั้งได้โดยใช้ progestin ส่วน Trigg และคณะที่ทำการศึกษาในปี 2001 กล่าวไว้ว่าเมื่อฝังฮอร์โมนในสุนัขที่มีระดับ progesterone ในกระแสเลือด > 5 ng/ml สุนัขจะไม่แสดงการเป็นสัดจากการถูกกระตุ้นด้วย GnRH agonist อีก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gobello ในปี 2006

นอกจากนี้แล้วยังมี GnRH agonist อีกหลายอย่างที่ได้มีการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางด้านจัดการระบบสืบพันธุ์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 GnRH agonist ที่ได้รับการยอมรับและนำไปใช้ในทางสัตวแพทย์ในหลายขนาดและรูปแบบ

GnRH agonist	Trade name	Formulation
Buserelin	Receptal	0.1 mg/ml (injection)
Fertirelin	Ovalyse	50 microgram/ml (injection)
Gonadorelin	Fertagyl	0.1 mg/ml (injection)
Buserelin	Suprefact	1.0 mg/ml (injection)
Goserelin	Zoladex	3.6 mg(implant for 1 month)
	Zoladex LA	10.8 mg(implant for 3 month)
Nafarelin	Synarel	Nasal spray
Deslorelin	Ovuplant	2.1 mg (implant)

การใช้เพื่อประโยชน์ด้านอื่น

การเหนี่ยวนำการเป็นสัด

มีการใช้สารเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดในสุนัขเพศเมียหลายชนิดด้วยกันรวมถึง GnRH agonist ในปัจจุบันยังได้มีการคิดค้นพัฒนา GnRH agonist เพื่อประโยชน์ด้านนี้ เนื่องจากคุณสมบัติและรูปแบบการเตรียมสารมีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับการออกฤทธิ์ของ GnRH agonist ในร่างกายตามธรรมชาติที่มีการหลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า และส่งผลกระตุ้นให้เกิด

การหลัง FSH และ LH ทำให้สุนัขเข้าสู่ระยะ proestrus และระยะ oestrus (Cain et al., 1988; Concannon et al., 1997; Vanderlip et al., 1987) ในอีกการศึกษาหนึ่งโดย Kutzler และคณะ ในปี 2002 รายงานถึงการฝัง GnRH agonist ที่ชั้น mucosa ของช่องคลอดของสุนัขเพศเมีย 8 ตัว ทุกตัวเข้าสู่รอบการเป็นสัดและได้รับการผสม แต่มี 5 ตัวที่ตั้งท้อง

การใช้ในสุนัข

มีการใช้ deslorelin เพื่อประโยชน์ในการจัดการด้านระบบสืบพันธุ์ในสุนัขทั้งเพศผู้และเพศเมีย ทั้งนี้ยังสามารถใช้ควบคุมวงจรระบบสืบพันธุ์และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศในสัตว์ป่าจำพวกสัตว์กินเนื้อและกลุ่ม exotic (Bertschinger et al., 2001 ; Trigg et al., 2001 ; Wright et al., 2001) ผลการทดลองรอบการเป็นสัดนั้นสามารถส่งผลยาวนานถึง 12 เดือนจากการฝัง deslorelin เข้าใต้ผิวหนังแต่การตอบสนองนั้นขึ้นอยู่กับขนาดและปริมาณของ deslorelin ที่ใช้ (Vickery et al., 1989)

เพื่อบอกถึงการคงอยู่ของเนื้อเยื่อรังไข่

สุนัขเพศเมียที่ทำหมันแล้ว เมื่อฉีด GnRH agonist เข้าทางหลอดเลือดดำจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงใดๆของ estrogen และ LH ซึ่งเป็นประโยชน์ในกรณีที่ต้องการทราบว่าสุนัขผ่านการ ทำหมันแล้วหรือยัง (England, 1998)

เพื่อเร่งการตกไข่

จากการศึกษาของ England ในปี 1998 พบว่าหากทำการฉีด GnRH agonist เข้าทาง หลอดเลือดดำเพียงครั้งเดียว สามารถเร่งการตกไข่ได้

เพื่อประโยชน์จากการที่สุนัขถูกผสมโดยไม่พึงประสงค์

โดยคุณสมบัติ down-regulation ทำให้ corpus luteum ขาด Gonadotrophin มาช่วยให้ คงอยู่ได้(England, 1998)

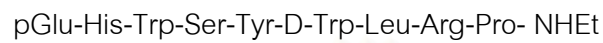
เพื่อใช้ในการรักษาเนื้องอกเต้านม

การใช้ GnRH agonist สามารถลดขนาดของก้อนเนื้องอกให้เล็กลงได้ในสุนัขที่ป่วยเป็น มะเร็งเต้านมชนิดที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน ซึ่งสามารถช่วยยืดอายุให้สุนัขออกไปได้อีก (Lombardi et al., 1999)

Deslorelin

โครงสร้าง

deslorelin เป็น nona-peptide ออกฤทธิ์ยาวนาน เป็นสารออกฤทธิ์คล้าย GnRH แต่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า GnRH ในธรรมชาติ 100-130 เท่า มีโครงสร้างเป็น



เมื่อฝังเข้าใต้ผิวหนังสุนัข พบว่า deslorelin จะถูกปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ในปริมาณมากกว่า 1 ไมโครกรัม/วัน ได้ยาวนานถึงมากกว่า 1 ปี (Peptech Animal Health, Sydney, personal communication)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกสัตว์และเก็บตัวอย่าง

สุนัขทดลองที่ใช้ในงานวิจัยเป็นสุนัขเพศเมียอายุ 8 เดือนขึ้นไปแต่ไม่เกิน 8 ปีอยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักอยู่ในช่วงระหว่าง 10-20 กิโลกรัม สุขภาพร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ เลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวมีน้ำให้ตลอดไม่จำกัด จากนั้นสุนัขทุกตัวจะได้รับการฉีดวัคซีนรวมเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อต่าง ๆ และวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ทั้งหมด 2 ครั้งตามโปรแกรมที่กำหนดโดยสมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบกรบำบัดโรคสัตว์ การป้องกันพยาธิหนอนหัวใจ เห็บ หมัด และพยาธิตัวกลมในลำไส้ทำโดยฉีด ivermectin ในขนาด 300 ไมโครกรัม/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม เข้าใต้ผิวหนังทุก 1 เดือน ทำการตรวจพิสูจน์ว่าไม่ได้อยู่ในระยะการเป็นสัด (oestrous stage) ใช้การตรวจโดยสังเกตพฤติกรรม การตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สุนัขทุกตัวต้องไม่เคยมีประวัติการได้รับสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ และยังไม่ได้รับการผ่าตัดนำรังไข่และมดลูกออก (ovariohysterectomy) อยู่ในระยะ anoestrus จำนวนทั้งหมด 12 ตัวต่างครอกกัน สุนัขทุกตัวมีประวัติการให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ครอก โดยสุนัขทุกตัวได้รับการบริจาคโดยตรงจากเจ้าของสุนัข ซึ่งประวัติการให้ลูกได้จากการสอบถามข้อมูลจากเจ้าของ

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

โดยทำการแบ่งกลุ่มสุนัขทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว

กลุ่มทดลองที่ 1

เจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมน progesterone ก่อนทำการฝัง GnRH agonist แล้วจึงฝัง GnRH agonist เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหูของสุนัขทุกตัว เมื่อสุนัขถูกกระตุ้นให้เข้าสู่รอบการเป็นสัดจนถึงระยะที่มีการเพิ่มขึ้นของ LH โดยสังเกตจากความเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดและอวัยวะเพศภายนอก แล้วจึงเจาะเลือดตรวจระดับ progesterone วันเว้นวันจนกว่า progesterone จะขึ้น >2 ng/ml แล้วจึงถอด GnRH agonist ของสุนัขทุกตัวในกลุ่มที่ 1 ออก

กลุ่มทดลองที่ 2

ทำการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมน progesterone โดยกำหนดให้ <2 ng/ml ทั้งหมด 3 ครั้งก่อนทำการฝัง GnRH agonist แล้วจึงฝัง GnRH agonist เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหูของสุนัขทุกตัว แต่เมื่อสุนัขถูกกระตุ้นให้เข้าสู่รอบการเป็นสัดจนถึงระยะที่มีการเพิ่มขึ้นของ LH โดยสังเกตจากความเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดและอวัยวะเพศภายนอก แล้วจึง

เจาะเลือดตรวจระดับ progesterone วันเว้นวัน จนกว่า progesterone จะขึ้น >2 ng/ml และจะไม่มีอาการของ GnRH agonist ออก

สุนัขทั้ง 2 กลุ่มทุกตัว จะได้รับการตรวจดูความเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของอวัยวะเพศ เก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อช่องคลอดและเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับฮอร์โมน progesterone 2 ครั้งเพื่อยืนยันระยะ anoestrus ก่อนทำการฝัง GnRH agonist โดยสุนัขที่อยู่ในระยะ anoestrus จะมีระดับของฮอร์โมน progesterone <1 ng/ml (Feldman and Nelson, 1996) จากนั้นจึงฝัง Deslorelin (Peptech Animal Health, Sydney Australia) ขนาด 4.7 mg/ชิ้น เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหูของสุนัขทุกตัวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำความสะอาดบริเวณที่ฝังด้วยการทาโพวิโดน ไอโอดีนและแอลกอฮอล์แล้วจึงฝัง deslorelin จากไซริงค์ที่ใช้เพียง 1 ครั้ง/ตัว สังเกตดูความเปลี่ยนแปลงบริเวณที่ฝังเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อตรวจดูลักษณะการอักเสบหรือปฏิกิริยาอื่นๆที่อาจเกิดขึ้น สุนัขทุกตัวจะได้รับการตรวจการเป็นสัดภายหลังการฝังฮอร์โมนทุกวัน โดยสังเกตจากความเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม อวัยวะเพศบวมแดง มีเลือดจากอวัยวะเพศดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 จึงเริ่มเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อช่องคลอดและเลือดวันเว้นวันจนถึงระยะตกไข่ หรือตรวจพบว่า มีระดับฮอร์โมน progesterone > 2 ng/ml (Wank et al., 1997) ต่อจากนั้นจะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับโปรเจสเตอโรนและเก็บเซลล์เยื่อช่องคลอดสัปดาห์ละ 1 ครั้งทุกสัปดาห์จนกว่าจะครบกำหนดผ่าตัด สุนัขทุกตัวเข้ารับการผ่าตัดทำหมันเพศเมียเมื่อ 8 สัปดาห์หลังตกไข่ สุนัขที่ได้รับการฝังฮอร์โมนแต่ไม่แสดงอาการเป็นสัดภายในระยะเวลา 28 วัน จะถูกคัดออกจากการทดลอง

3. ผลิตรภัณฑ์ที่ใช้

Deslorelin เป็น GnRH agonist ชนิดออกฤทธิ์ยาวนาน ลักษณะเป็นแท่งขนาดยาว 5 กว้าง 2.3 มม อยู่ในไซริงค์ซึ่งพัฒนาและผลิตขึ้นโดยบริษัท Peptech Animal Health Pty จำกัด รัฐ NSW ประเทศ Australia โดยที่ deslorelin แต่ละแท่งมีปริมาณสารออกฤทธิ์ 4.7 mg จำนวน 1 ชิ้น ใส่อยู่ในกระบอกฉีดที่ออกแบบให้มีคุณสมบัติคล้ายไซริงค์ บรรจุลงในซองและผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยระบบ e-beam irradiation แล้วจึงเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำไปใช้ เมื่อนำไปฝังเข้าใต้ผิวหนังจะออกฤทธิ์ > 1 μg /วัน นาน 1 ปี (Trigg et al., 2006)

4. ลักษณะของระบบสืบพันธุ์

สังเกตการเข้าสู่ระยะ oestrus จากความเปลี่ยนแปลงด้านกายภาพของอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น การบวม สิ่งคัดหลั่งจากอวัยวะเพศ เป็นต้น สังเกตจากการตรวจเซลล์เยื่อช่องคลอด และระดับฮอร์โมน progesterone ที่เพิ่มขึ้นวันเว้นวันหลังทำการฝังจนกระทั่งตกไข่ จากนั้นจึงทำการตรวจเซลล์และเจาะเลือดสัปดาห์ละครั้งจนสุนัขเข้ารับการผ่าตัดทำหมัน

5. ลักษณะทางกายภาพที่แสดงถึงการเข้าสู่ระยะ estrus

การตรวจดูอวัยวะเพศจากการสังเกตการบวมขยายใหญ่ และมีสิ่งคัดหลั่งจากอวัยวะเพศ

6. การตรวจเซลล์เยื่อช่องคลอด

เตรียมด้วยการใช้สำลีพันปลายไม้ (cotton swab technique) (Feldman and Nelson, 1996) นำไปทำให้ชุ่มด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9 % (saline solution) ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะเพศด้วยสารละลายน้ำเกลือเช่นกัน แล้วจึงใช้ cotton swab สอดเข้าไปที่อวัยวะเพศโดยใช้อีกมือหนึ่งจับที่อวัยวะเพศแล้วแยกออก จากนั้นดัน cotton swab เชียงขึ้นทำมุม 45 องศา ปลาย cotton swab จะผ่านส่วนท้ายของ vagina ลึกประมาณช่องเชิงกราน หมุน cotton swab เบาๆ แล้วถอนออก นำตัวอย่างเซลล์ที่ติดปลายไปแตะลงบนแผ่นสไลด์เปล่าโดยหมุน cotton swab เบาๆ ไปในทิศทางเดียวกันบนแผ่นสไลด์ ทำ 2-3 แถว นำสไลด์ไปตากให้แห้งแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสี Modified Wright-Giemsa (Dip Quick, Clinag Co., Ltd. Bangkok, Thailand) เซลล์ที่ได้เป็น parabasal หรือ intermediate หรือ superficial cell ตามข้อบ่งชี้ซึ่งแบ่งเป็นร้อยละเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย x 100 โดยจะนับที่ 200 เซลล์ (Concannon and Digregorio, 1986; Wright and Parry, 1989)

7. ระดับฮอร์โมน progesterone

เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือด 1 ครั้งต่อสัปดาห์จากเส้นเลือดดำ cephalic ปริมาณ 2 ml เก็บตัวอย่างลงในหลอดเก็บเลือดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำการ centrifuged เพื่อนำไปตรวจหาระดับของฮอร์โมน progesterone ในกระแสเลือดด้วยวิธี Electro-chemiluminescence immunoassay (Abbot laboratory, USA) หน่วยเป็น ng/ml การประเมินขอบเขตมีค่าตั้งแต่ 0.03-60 ng/ml ซึ่งในกรณีนี้ความแม่นยำอยู่ที่ 0.2 ng/ml

8. การจัดการระบบสืบพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

สุนัขทุกตัวได้รับการผ่าตัดทำหมันเพศเมียภายหลังเสร็จสิ้นการทดลองภายใต้การวางยาสลบ โดยใช้ atropine ขนาด 0.04 mg/kg และ xylazine (Rompun[®], Bayer, Germany) ขนาด 2 mg/kg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพื่อเตรียมสลบทั้งตัว จากนั้นจึงนำสลบด้วย thiopental sodium และรักษาภาวะสลบด้วย halothane และออกซิเจนผ่านทางท่อช่วยหายใจ ขณะทำการผ่าตัด สุนัขทุกตัวได้รับสารน้ำเข้าทางหลอดเลือดดำ การผ่าตัดเปิดเข้าช่องท้องในแนว ventral midline

incision แล้วเย็บปิดด้วย vicryl 2/0 เย็บปิดผิวหนังด้วยไหมเย็บชนิดไม่ละลาย (non absorbable multifilament)

9. กรรมวิธีทางจุลพยาธิวิทยา

ตัวอย่างมดลูกและรังไข่ถูกเก็บแช่ใน 10 % Para-formaldehyde จากนั้นนำไปตัดและย้อมด้วย haematoxylin and eosin.

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลของสัดส่วนของสุนัขที่มีการตกไข่ และสัดส่วนของสุนัขที่มีความผิดปกติบริเวณที่ทำการฝัง จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี student t-test

ข้อมูลความเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน progesterone ของสุนัขกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม วิเคราะห์โดยใช้ student t-test

11. การฝัง deslorelin

ทำการฝัง GnRH agonist ขนาด 4.7 มิลลิกรัมต่อสุนัข 1 ตัว โดยการฉีดเข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหู โดยก่อนขั้นตอนการฝังจะทำการโกนขนบริเวณที่จะฝังออกเป็นวงกลม จากนั้นจึงเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่โกนเสร็จแล้วด้วยโพวิโดน ไอโอดีน และเช็ดออกด้วยแอลกอฮอล์ 70% ตามเทคนิคปลอดเชื้อ หลังจากทำการฝังเสร็จเรียบร้อยแล้ว ใช้สำลีแอลกอฮอล์กดตรงตำแหน่งแทงเข็มนานประมาณ 2 นาที ตรวจดูสภาพผิวหนังบริเวณที่ทำการฝังนาน 7 วัน เพื่อสังเกตการบวม การเกิดถุงเลือด และการเกิดฝี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้ใช้สุนัขทั้งหมด 12 ตัว ต่างครอกกัน ทุกตัวมีประวัติการให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ครอกหรือมีประวัติการให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ครอก จากสุนัขทั้งหมดนี้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งจะทำการฝัง deslorelin แล้วถอดออก 6 ตัว และฝัง deslorelin แล้วไม่ถอดออกอีก 6 ตัว

ตำแหน่งที่ทำการฝัง

สุนัขทุกตัวได้รับการฝัง deslorelin ที่ใบหูด้านซ้าย เมื่อทำการสังเกตบริเวณที่ฝังเป็นเวลานาน 7 วัน ไม่พบว่ามีอาการอักเสบ ไม่มีการบวมหรือปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น และไม่พบว่ามีผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวม

การเข้าสู่รอบการเป็นสัด

สุนัขทุกตัวที่ได้รับการฝัง GnRH agonist (12/12) แสดงอาการเป็นสัด จากการสังเกตพบสิ่งคัดหลั่งปนเลือดจากอวัยวะเพศ อวัยวะเพศมีการบวมแดง ตรวจเซลล์เยื่อช่องคลอดพบเป็น intermediate cell มากกว่าร้อยละ 80 และตรวจพบระดับฮอร์โมน progesterone >2 ng/ml (ตารางที่ 2) โดยสุนัขทุกตัวทั้งกลุ่มทดลองที่ 1 และกลุ่มทดลองที่ 2 เข้าสู่รอบการเป็นสัดภายใน 25 วันหลังจากที่ได้รับการฝัง GnRH agonist เมื่อเปรียบเทียบช่วงระยะเวลาการคงอยู่ของระดับ progesterone ในกระแสเลือด ซึ่งสุนัขทั้ง 2 กลุ่มได้รับการตรวจวัดระดับฮอร์โมนนาน 8 สัปดาห์ภายหลังจากที่แสดงอาการเป็นสัด พบว่าสุนัขกลุ่มทดลองที่ 2 มีระยะเวลาการคงอยู่ของ progesterone >4 ng/ml ในกระแสเลือดยาวนานมากกว่า 7 สัปดาห์ ส่วนสุนัขในกลุ่มทดลองที่ 1 มีการคงอยู่ของฮอร์โมนน้อยกว่า 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 3) โดยพบว่าระดับ progesterone ในสุนัขทั้ง 2 กลุ่มการทดลองเริ่มสูงขึ้น >2 ng/ml เฉลี่ยใน 11.83 วันหลังจากวันที่ฝัง โดยที่สุนัขในกลุ่มทดลองที่ 1 นั้นระดับ progesterone ลดลง <2 ng/ml เฉลี่ยในวันที่ 51.5 หลังจากวันที่ฝัง ส่วนสุนัขกลุ่มทดลองที่ 2 เฉลี่ยลดลงในวันที่ 12.83 นับจากวันที่ฝัง (ตารางที่ 5) จะเห็นว่าสุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 มีระดับ progesterone >2 ng/ml คงอยู่นานเฉลี่ย 39.67 วัน แต่สุนัขกลุ่มทดลองที่ 2 เฉลี่ยคงอยู่นาน 1 วัน ความเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน progesterone ตั้งแต่ก่อนทำการฝังจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 1 และเมื่อเปรียบเทียบระดับ progesterone ในกระแสเลือดของสุนัขในกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 ไม่พบว่ามีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญใน

ช่วงแรกก่อนทำการฝัง GnRH agonist ตลอดจนถึงเข้าสู่ระยะเป็นสัด (estrus) แต่เมื่อสุนัขในกลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการถอด GnRH agonist ออก ทำให้พบว่ามีค่าความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญของระดับ progesterone ที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วง 1-6 สัปดาห์นับจากวันที่ฝัง GnRH agonist เป็นวันแรกดังในตารางที่ 4 ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับ progesterone ในกระแสเลือดในช่วงสัปดาห์ที่ 1-6 ภายหลังจากเข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัด

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสุนัขที่เข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัด ของสุนัขที่ได้รับการถอด deslorelin ออก ภายหลังจากที่เข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัด (กลุ่มทดลองที่ 1) เมื่อเทียบกับสุนัขที่ไม่ได้รับการถอด deslorelin (กลุ่มทดลองที่ 2)

กลุ่ม	จำนวน สุนัข	มีการบวมขยายใหญ่และมี สิ่งคัดหลั่งปนเลือดจาก อวัยวะเพศ	ตรวจพบเซลล์ เยื่อบุช่อง คลอดเป็นชนิด intermediate	ระดับ Progesterone ในกระแสเลือด > 2 ng/ml
กลุ่มที่ 1	6	6	6	6
กลุ่มที่ 2	6	6	6	6

ตารางที่ 3 ระยะเวลาการคงอยู่ของ progesterone ในกระแสเลือดระหว่างสุนัขที่ได้รับการถอด deslorelin ออก (กลุ่มทดลองที่ 1) และสุนัขที่ไม่ได้รับการถอด deslorelin ออก (กลุ่มทดลองที่ 2)

กลุ่ม	ระยะเวลาที่ใช้ในการ ทดลอง (สัปดาห์)	ระดับ progesterone ใน กระแสเลือด >2 ng/ml (สัปดาห์)
กลุ่มที่ 1	8	>7
กลุ่มที่ 2	8	<4

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของระดับ progesterone ในกระแสเลือด ระหว่างสุนัขที่ได้รับการถอด deslorelin ออก (กลุ่มทดลองที่ 1) และสุนัขที่ไม่ได้รับการถอด deslorelin ออก (กลุ่มทดลองที่ 2) ตลอด 8 สัปดาห์ของการทดลองตั้งแต่วันที่ทำการฝัง deslorelin จนถึง 8 สัปดาห์หลังจากฝัง (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

กลุ่ม	ระดับ progesterone เมื่อวันที่ทำการ ฝัง	ระดับ progesterone เมื่อวันที่ตกไข่	ระดับ progesterone ในสัปดาห์ที่ 1- 6 หลังทำการฝัง	ระดับ progesterone ในสัปดาห์ที่ 7- 8 หลังทำการฝัง
กลุ่มที่ 1	0.35±0.17 ^a	3.98±2.48 ^a	26.63±12.85 ^b	5.92±7.49 ^a
กลุ่มที่ 2	0.42±0.17 ^a	1.19±3.67 ^a	2.38±4.86 ^a	0.29±0.26 ^a

a-b มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับฮอร์โมน progesterone ในกระแสเลือดเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 ภายหลังจากที่สุนัขเข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัด

กลุ่ม	P4 สัปดาห์ ที่ 1 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 2 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 3 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 4 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 5 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 6 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 7 (ng/ml)	P4 สัปดาห์ ที่ 8 (ng/ml)
กลุ่มที่ 1	16.22 ^a	37.43 ^a	37.77 ^a	31.18 ^a	21.82 ^a	15.37 ^a	8.27 ^a	3.57 ^a
กลุ่มที่ 2	5.67 ^b	4.65 ^b	1.7 ^b	1.53 ^b	0.42 ^b	0.3 ^b	0.31 ^a	0.15 ^a

P4 ฮอร์โมน progesterone

a-b มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

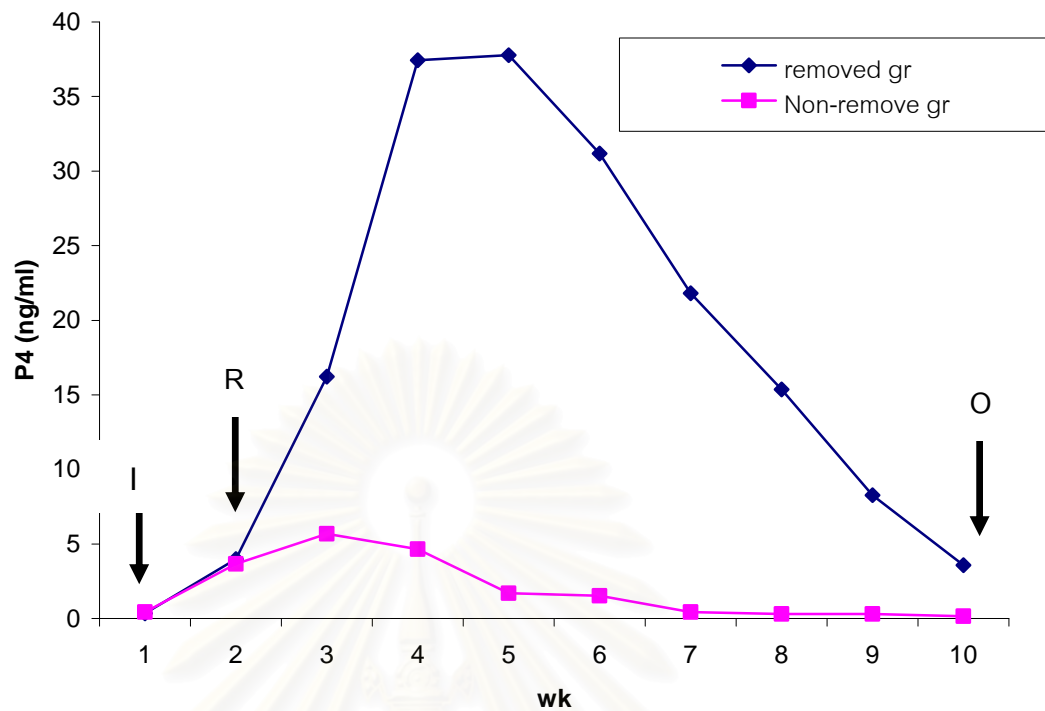
ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของวันที่มีระดับ progesterone เพิ่มขึ้นกว่า 2 ng/ml ในสุนัขทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง และค่าเฉลี่ยของวันที่มี progesterone ลดลงต่ำกว่า 2 ng/ml ในสุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2

กลุ่ม	ระดับ progesterone ที่เพิ่มสูงขึ้น >2 ng/ml นับจากวันที่ฝัง (วัน)	ระดับ progesterone ที่ลดลง <2 ng/ml นับจากวันที่ฝัง (วัน)
กลุ่มที่ 1	11.67	55
กลุ่มที่ 2		15.17

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของจำนวนวันที่มีระดับ progesterone >4 ng/ml ระหว่างสุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยของวันที่มีระดับ progesterone >4 ng/ml (วัน)
กลุ่มที่ 1	44.33
กลุ่มที่ 2	17.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



I= implantation, R= remove, O=OVH

รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ progesterone ในกระแสเลือดเปรียบเทียบระหว่างสุนัข
กลุ่มที่ถอด deslorelin (removed gr: n= 6) และกลุ่มที่ไม่ได้ถอดออก (non-remove gr:
n= 6)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

สุนัขทั้ง 12 ตัวได้รับการผ่าตัดทำหมันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากมดลูก และรังไข่ของสุนัขทุกตัวได้ถูกเตรียมและผ่านขั้นตอนทางพยาธิวิทยา ไม่พบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับมดลูกและรังไข่ของสุนัขทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่พบร่องรอยการตกไข่ดังแสดงในรูปที่ 2 และการคงอยู่ของ corpus luteum ในรังไข่สุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในรังไข่สุนัขกลุ่มทดลองที่ 2 (ตารางที่ 8)

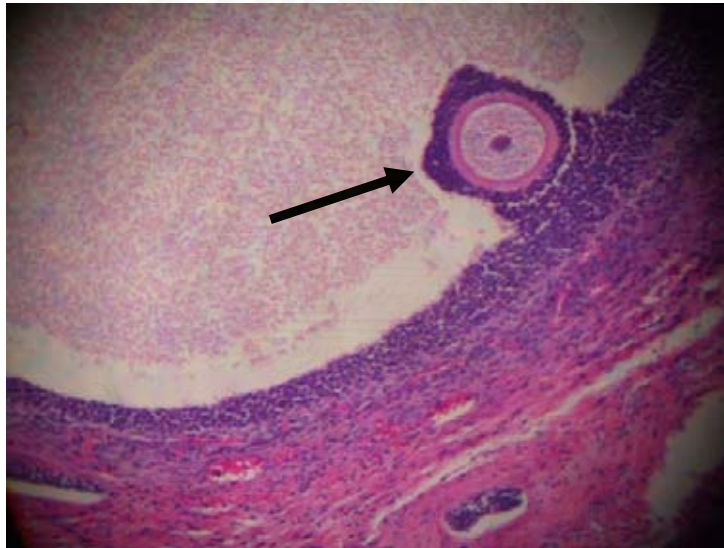
ตารางที่ 8 ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของมดลูกและรังไข่ในสุนัขทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง

กลุ่ม	ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบในรังไข่	ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบในมดลูก
กลุ่มทดลองที่ 1	Multiple island of corpus luteum, small follicles in epithelium cortex	NRC
กลุ่มทดลองที่ 2	NRC	NRC

NRC No remarkable change

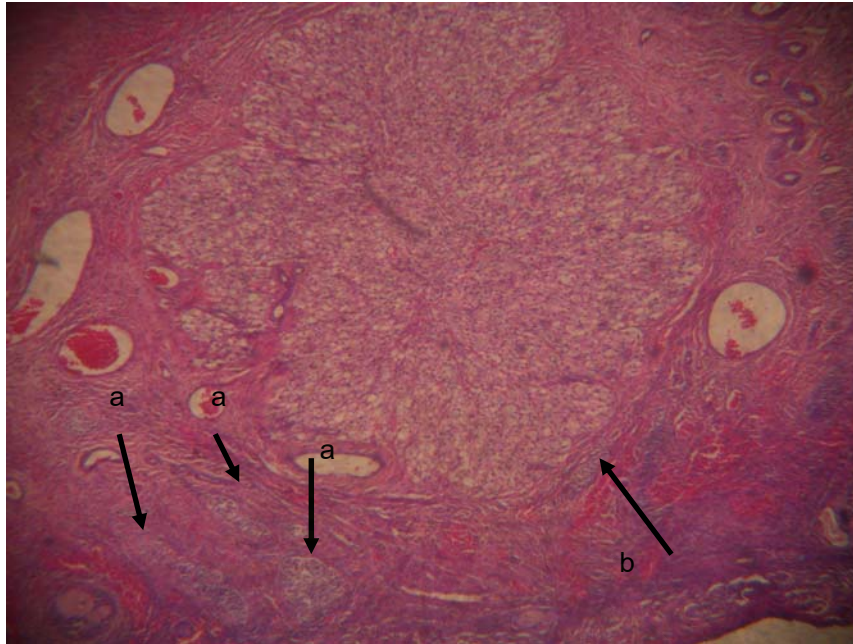


รูปที่ 2 รังไข่จากสุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 แสดงให้เห็นการตกไข่บริเวณปลายลูกศรชี้ (กำลังขยาย x100)

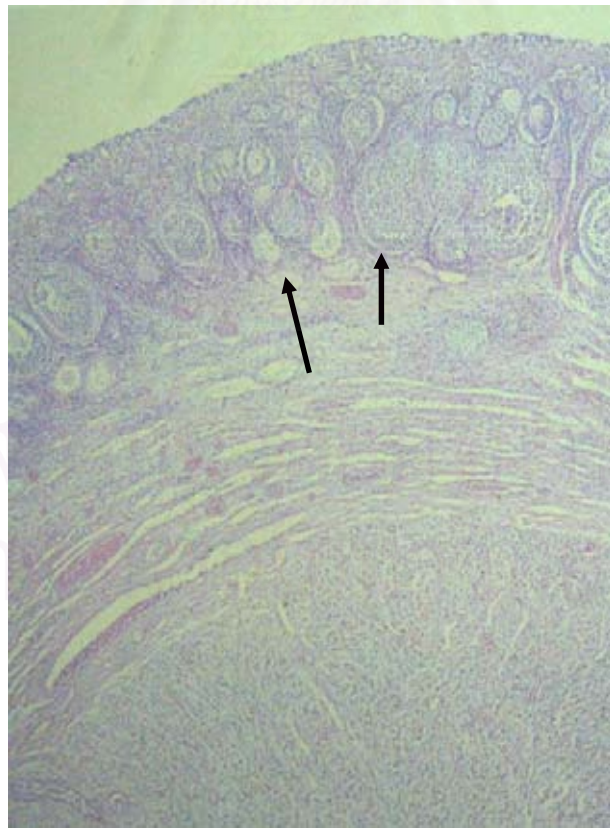


รูปที่ 3 รังไข่จากสุนัขกลุ่มทดลองที่ 2 ที่ปลายลูกศรชี้คือ oocyte (กำลังขยาย x60)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 รั้งไข่จากสุนัขกลุ่มทดลองที่ 1 บริเวณปลายลูกระไข่ a คือ small follicle และ b คือ corpus luteum (กำลังขยาย x60)



รูปที่ 5 รั้งไข่สุนัข ปลายลูกระไข่แสดงให้เห็นถึง multi small follicles

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ผลจากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ของ GnRH agonist (deslorelin) จากการฝังเข้าชั้นใต้ผิวหนังของสุนัขเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ โดยวัตถุประสงค์หลักในการออกฤทธิ์เพื่อควบคุมวงจรการเป็นสัดหรือเพื่อยืดระยะเวลาการเข้าสู่รอบการเป็นสัดออกไป

ได้มีการศึกษาถึงคุณประโยชน์จากการใช้ GnRH agonist ในหลายๆวัตถุประสงค์ด้วยกัน ซึ่งได้มีการศึกษามาแล้วหลายครั้ง ได้แก่ การศึกษาเพื่อนำไปใช้เป็นสารออกฤทธิ์คุมกำเนิด (Nester, 1984 cited by Vickery et al., 1989; McRae et al., 1985; Vickery et al., 1987 cited by Vickery et al., 1989; Vickery et al. 1989; Trigg et al. 2001; Wright et al., 2001) ใช้เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เข้าสู่รอบการเป็นสัดทั้งในสุนัข โค และหมู (McRae et al., 1985; Vanderlip et al., 1987; Cain et al., 1988; Cain, 1989; Concannon, 1989; Vickery et al. 1989; Cain et al., 1990; Cinone et al., 1996; Concannon et al., 1997; Concannon, 1998; Inaba et al., 1998; Rajamahendran et al., 1998; Trigg et al., 2001; Wright et al., 2001; Kutzler et al., 2002; Padula et al., 2002) และวัตถุประสงค์ในการรักษา เช่น การรักษาเนื้องอกเต้านมและมะเร็งเต้านม

ในการทดลองครั้งนี้ สุนัขที่ได้รับการฝัง deslorelin เข้าชั้นใต้ผิวหนัง ไม่มีตัวใดที่แสดงอาการผิดปกติในบริเวณที่ฝังตลอด 7 วันที่ทำการสังเกตและกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง กล่าวได้ว่า deslorelin เมื่อถูกฝังไว้ที่ใต้ผิวหนังจะไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองหรือส่งผลให้เนื้อเยื่อรอบๆและบริเวณใกล้เคียงเกิดปฏิกิริยาต่อต้าน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Trigg และคณะในปี 2001 และ Ponglowhapan และคณะที่ทำการศึกษาไว้ในปี 2002 โดยไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพโดยรวมสามารถสรุปได้ว่า deslorelin มีความปลอดภัยเมื่อทำการฝังไว้ที่ชั้นใต้ผิวหนัง

จากการทดลองในครั้งนี้ ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า GnRH agonist หรือ deslorelin สามารถใช้เพื่อวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมวงจรการเป็นสัดในสุนัขวัยเจริญพันธุ์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งโดยปกติแล้ว GnRH จะหลั่งจากสมองส่วน hypothalamus ผ่านทางการควบคุมการทำงานของ GnRH-secreting neurons แต่การที่ร่างกายได้รับ GnRH หรือสารออกฤทธิ์คล้าย GnRH (GnRH agonist) จากภายนอกอย่างต่อเนื่องนั้นส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากของ receptor ที่อยู่บริเวณต่อมใต้สมองส่วนหน้า (pituitary) แต่ทำให้มีการตอบสนองต่อการหลั่งของ GnRH น้อยลงหรือที่เรียกว่า down-regulation (Pralong et al., 2000) การได้รับ GnRH จากภายนอกใน

ขนาดสูงนั้นอาจไประงับการหลั่ง GnRH จาก hypothalamus ในร่างกายตามธรรมชาติ ได้เช่นกัน จากที่ Kang และคณะกล่าวถึงในปี 2000

การทำงานของ GnRH เป็นไปในลักษณะ up-down regulation ซึ่งถูกควบคุมให้มีการลดจำนวนตัวรับและทำให้ตัวรับมีความไวรับน้อยลง ด้วยตัวรับชนิดเดียวกันที่ทำหน้าที่คล้ายกัน เรียกว่า homologous regulation (Sallese et al., 2000) การได้รับ GnRH จากภายนอกอย่างต่อเนื่อง ทำให้ GnRH นั้นเกิดการควบคุมในแบบ down-regulation การฝัง GnRH agonist (deslorelin)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า GnRH agonist (deslorelin) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เมื่อทำการฝัง GnRH agonist ที่ชั้นใต้ผิวหนังสุนัขในขนาด 4.7 mg/ชิ้น จำนวน 1 ชิ้น พบว่าหากทำการฝัง GnRH agonist ในระยะ ที่มีระดับ progesterone <5 ng/ml หรือระยะท้ายของ dioestrus ไปจนถึงระยะ proestrus สุนัขจะถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่วงรอบการเป็นสัดก่อน แล้วจึงเกิดการยับยั้งตามมา ในขณะที่การศึกษาก่อน จะเกิดการออกฤทธิ์ยับยั้งวงรอบการเป็นสัด (estrus cycle) ซึ่งหากทำการฝังในระยะที่มีระดับ progesterone >5 ng/ml หรือในระยะ estrus และช่วงแรกของระยะ dioestrus (Trigg et al., 2001) ผลที่เกิดขึ้นคือสุนัขจะมีถูกยับยั้งการเป็นสัด

ในสุนัขเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ในการศึกษาครั้งนี้ การฝัง GnRH agonist (deslorelin) เหนี่ยวนำให้สุนัขทั้ง 12 ตัว (100%) เข้าสู่วงรอบการเป็นสัด โดยเมื่อทำการตรวจวัดระดับ progesterone ในกระแสเลือดพบว่าสุนัขทุกตัวมีระดับ progesterone > 2 ng/ml และตรวจพบเซลล์เยื่อช่องคลอดเป็นชนิด intermediate cell >50% ซึ่งหมายความว่าสุนัขทุกตัวเข้าสู่ระยะ proestrus โดยทั่วไปสุนัขจะมีระยะ proestrus และ estrus ยาวนานเฉลี่ยประมาณช่วงละ 9 วัน ก่อนจะเข้าสู่ระยะ diestrus สุนัขที่มีวงรอบการเป็นสัดปกติจะตรวจพบว่ามี progesterone >4 ng/ml ในระยะ diestrus นั้น progesterone ได้จากการสร้างของ corpora lutea ซึ่งจะขึ้นสูงสุดที่ 15-80 ng/ml ในวันที่ 15-30 ของระยะนี้ สุนัขที่ไม่ได้ตั้งท้องจะยังคงมี progesterone สูงอยู่แต่น้อยกว่าสุนัขที่ตั้งท้อง (Gobello et al., 2004) และจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดระยะนี้ ประมาณ 65 วันแล้วจึงเข้าสู่ระยะพักหรือ anoestrus

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สุนัขที่ได้รับการฝัง GnRH agonist และได้รับการถอดออก หรือการฝังระยะสั้น ผลการออกฤทธิ์จะเป็นไปในลักษณะกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้สุนัขเข้าสู่วงรอบการเป็นสัด และพบว่าเมื่อทำการฝังโดยไม่มีการถอดออก หรือฝังระยะยาว การออกฤทธิ์จะเป็นการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้สุนัขเข้าสู่วงรอบการเป็นสัด ในระยะแรกก่อน แล้วจึงเกิดการเป็นสัดในระยะต่อมา ซึ่งวงรอบการเป็นสัดที่เกิดจากการฝังทั้งในระยะสั้นและระยะยาว วงรอบการเป็นสัดในระยะ proestrus และ oestrus ที่เกิดขึ้นตามหลังการฝัง GnRH agonist จะ เป็นไปในลักษณะที่ปกติ แต่พบว่าสุนัขที่ได้รับการฝัง GnRH agonist ระยะยาวจะมีช่วงระยะ

dioestrus ผิดปกติไป กล่าวคือ มีช่วงระยะ dioestrus ที่สั้นกว่าปกติ ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงระดับ progesterone ที่ลดต่ำลงจนมีค่าน้อยกว่า 2 ng/ml ภายใน 15.17 วันนับจากวันแรกที่ฝังตัวตารางที่ 4.4 ได้แสดงให้เห็นว่า ดังนั้นหากสุนัขได้รับการผสมก็จะไม่สามารถตั้งท้องจนถึงการคลอดได้ เนื่องจากไม่สามารถรักษาระดับ progesterone ไว้ได้จนครบกำหนดระยะเวลาปกติของการตั้งท้อง หรือประมาณ 65 วัน โดยถ้ามีการปฏิสนธิขึ้น อาจเกิดการ resorption ของตัวอ่อนเนื่องจากระดับ progesterone ที่ลดต่ำลง ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่มีระดับ progesterone ที่สูงกว่า 4 ng/ml ในสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าสุนัขในกลุ่มทดลองที่ 1 มีการลดลงของ progesterone <4 ng/ml ในสัปดาห์ที่ 8 ส่วนสุนัขในกลุ่มทดลองที่ 2 ลดลง <4 ng/ml ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ภายหลังจากที่สุนัขเข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัด ซึ่งแสดงผลการศึกษาในตารางที่ 4.3 และจะพบได้ว่าในสัปดาห์ที่ 7-8 ของการศึกษา สุนัขในกลุ่มทดลองที่ 1 มีค่าความแปรปรวนของระดับ progesterone ในกระแสเลือดค่อนข้างสูง แต่ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่สุนัขแต่ละตัวมีความแตกต่างกันของการเพิ่มขึ้นและลดลงของระดับ progesterone บางตัวลดลงเร็ว บ้างลดลงช้า จึงทำให้ค่าความแปรปรวนที่ออกมาสูง โดยเมื่อนำไปคำนวณทางสถิติแล้วไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงกล่าวได้ว่า เมื่อทำการฝัง GnRH agonist ในช่วงเวลาสั้นๆ จะเกิดประโยชน์ด้านการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในสุนัข และหากทำการฝังในช่วงเวลายาวนาน การออกฤทธิ์จะเป็นแบบการกระตุ้นการเป็นสัดในช่วงแรกแล้วจึงยับยั้งการเป็นสัดในเวลาต่อมา และสอดคล้องกับผลการตรวจทางพยาธิวิทยาเมื่อทำการตัดรังไข่สุนัขมาทำการตรวจภายหลังสิ้นสุดการทดลอง โดยพบหลักฐานการคงอยู่ของ corpus luteum (multiple island of corpus luteum) และการตกไข่ (small follicles) ในสุนัขกลุ่มที่ 1 แต่ไม่พบว่ามี การคงอยู่ของ corpus luteum และการตกไข่ในสุนัขกลุ่มที่ 2 แต่อย่างใด โดยอาจกล่าวได้ว่าสุนัขในกลุ่มที่ 2 นั้นเกิดการตกไข่ เนื่องจากมีระดับ progesterone >4 ng/ml แต่ไม่มีการคงอยู่ของ corpus luteum จากระดับ progesterone ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว

การทดลองครั้งนี้ สุนัขทั้ง 6 ตัวที่ได้รับการถอด deslorelin ออกและทุกตัวมีวงจรการเป็นสัดปกติ โดยยืนยันจากระดับ progesterone ที่คงอยู่ >4 ng/ml นาน 6 สัปดาห์ แต่สุนัขอีก 6 ตัวที่ไม่ได้รับการถอด deslorelin ออกกลับไม่สามารถรักษาระดับ progesterone ให้คงอยู่ในกระแสเลือดได้กว่า 4 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการสลายไปของ corpus luteum ทำให้ระดับ progesterone ในกระแสเลือดลดลง และการสลายไปของ corpus luteum นี้เอง เกิดจากการขาด LH ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องของการที่ deslorelin ไปกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อ GnRH แบบ down-regulation โดยการผลิต progesterone นั้นจะขึ้นอยู่กับการผลิตของต่อมใต้สมองส่วนหน้าเป็นหลัก (Wright et al., 2001; Trigg et al., 2006) นอกจากนี้ยังบ่งชี้ได้ถึงอัตราการเจริญของ follicle ต่ำเนื่องจากขาด FSH และ LH ซึ่งเป็นฮอร์โมนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการ

เจริญและพัฒนาของ follicle จนกระทั่งตกไข่และเปลี่ยนไปเป็น corpora lutea โดยในช่วงก่อนตกไข่ นั้นระดับ progesterone จะยังต่ำอยู่ แต่ LH จะสูงสุดแล้วจึงเกิดการตกไข่โดยการกระตุ้นของ LH จากนั้นจึงจะลดลงและเปลี่ยนเป็น progesterone ที่จะเข้ามามีบทบาทสำคัญในระยะของ luteal phase หรือ dioestrus (Jeffcoate, 1998) ในขณะที่ LH นั้นมีความสำคัญและมีความจำเป็นต่อการรักษา corpus luteum ให้คงอยู่ (Olson et al., 1989; Onclin et al., 2000) การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wright และคณะในปี 2001 ที่พบว่าระดับ progesterone ในกระแสเลือดจะลดต่ำลงภายใน 1 เดือน โดยที่สุนัขทุกตัวในการทดลองครั้งดังกล่าวเข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัดหลังได้รับการฝัง deslorelin สุนัข 4 ตัวจากทั้งหมด 9 ตัวได้รับการผสมพันธุ์และมี 2 ตัวที่ตรวจพบว่ามี การตั้งท้อง แต่ทั้ง 2 ตัวไม่ประสบความสำเร็จในการรักษาการท้องจนครบกำหนดคลอดซึ่งครั้งนั้นเกิดความล้มเหลวใน 40 วันของการตั้งท้อง การออกฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดสามารถพบได้บ่อยจากการใช้สารออกฤทธิ์เหมือน GnRH ซึ่งเป็นผลแรกเริ่มที่เกิดจากการกระตุ้นของการหลั่ง gonadotrophin และ gonadal steroid ก่อนจะไปกดที่ pituitary-gonadal axis (Vickery et al., 1989) แรกเริ่มนั้นจะมีผลไปกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนเพิ่มขึ้นก่อนแล้วจึงไปลดการตอบสนองของตัวรับตามมา เราเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า flare effect

5.2 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การฝัง deslorelin เข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังในสุนัขเพศเมียวัยเจริญพันธุ์เพียง 1 ครั้งในขนาด 4.7 mg สามารถนำไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการคุมกำเนิดจากการออกฤทธิ์ยับยั้งและควบคุมวงจรการเป็นสัดได้อย่างปลอดภัยในสุนัขเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวมของสุนัขแต่อย่างใด

การศึกษานี้ สุนัขในกลุ่มควบคุมใช้ การฝัง GnRH agonist (deslorelin) ในระยะสั้น โดยมีการถอน deslorelin ออกจากใต้ผิวหนัง เพื่อทำการสังเกตการใช้ deslorelin เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัด โดยมีสมมุติฐานว่า ทุกระยะของการเป็นสัดควรอยู่ในรูปแบบและระยะเวลาที่ปกติ ดังเช่นสุนัขที่เข้าสู่ช่วงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ และผลการศึกษาเป็นไปตามสมมุติฐาน

ส่วนในกลุ่มทดลอง ใช้ การฝัง GnRH agonist (deslorelin) ในระยะยาว โดยพบว่า ภายหลังจากการเป็นสัด เมื่อ GnRH agonist ยังทำงานอย่างต่อเนื่องในร่างกายสุนัขอยู่ จะไปรบกวนการหลั่งฮอร์โมนอื่นๆตามมา โดยเฉพาะเกิดการตอบสนองต่อ GnRH แบบ down-regulation ซึ่งน่าจะไปทำให้เกิดการกดการหลั่ง LH ทำให้มีผลต่อการรักษา corpus luteum จึงเกิดการสลาย corpus luteum ในระยะเวลาที่รวดเร็ว ส่งผลให้ สุนัขมีระยะ dioestrus ที่สั้นลง

จึงกล่าวได้ว่า เมื่อทำการฝัง GnRH agonist ในช่วงเวลาสั้นๆ จะเกิดประโยชน์ด้านการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในสุนัข และหากทำการฝังในช่วงเวลายาวนาน การออกฤทธิ์จะเป็นแบบ

กระตุ้นการเป็นสัดก่อน แล้วจึงยับยั้งการเป็นสัด และถึงแม้จะเกิดการเป็นสัดภายหลังการฝังตามมา สุนัขที่ได้รับการผสมก็อาจจะไม่สามารถตั้งท้องให้ลูกได้เนื่องจากมีระยะ dioestrus ที่ไม่สมบูรณ์ จึงเป็นประโยชน์สำคัญในการใช้ GnRH agonist (deslorelin) เพื่อการคุมกำเนิด

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ามีค่าความแปรปรวนของ progesterone ที่สูงอยู่ ในการศึกษาเพิ่มเติมครั้งต่อไปจึงควรเพิ่มจำนวนสุนัขที่ใช้ในการทดลองให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามความแปรปรวนเนื่องจากสุนัขแต่ละตัวเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องตระหนัก

การศึกษาถึงคุณสมบัติและประโยชน์ด้านอื่นของ deslorelin และการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ด้านการจัดการ การรักษาที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ รวมไปถึงข้อบ่งใช้ในสุนัขตั้งท้องนั้นยังไม่เคยมีรายงานไว้ จึงเป็นที่น่าศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลและประโยชน์ต่อวงการสัตวแพทย์ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Bearden, H.J. and Fuguay, J.W. 1997. Neuroendocrine regulators of reproduction. In : Applied animal reproduction. 4th ed. pp. 33-51. Prentic Hall,
- Bertschinger, H.J., Asa, C.S., Calle, P.P., Long, J.A., Bauman, K., DeMatteo, K., Jochle, W., Trigg, T.E. and Human, A. 2001. Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue deslorelin: preliminary observations. . J Reprod Fertil Suppl 57 : 275-283.
- Cain, J. L., Cain, G. R., Feldman, E. C., Lasley, B. L. and Stabenfeldt, G. H. 1988. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. Am J Vet Res. 49(11) : 1993-1196.
- Cain, J. L., Lasley, B. L., Cain, G. R., Feldman, E. C. and Stabenfeldt, G. H. 1989. Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH. J Reprod Fertil Suppl. 39. : 143-147.
- Cain, J.L., Davidson, A.P., Cain, G.R., Stabenfeldt, G.H., Feldman, E.C. and Lasley, B.L. 1990. Induction of ovulation in bitches using subcutaneous injection of GnRH analog. J Vet Intern Med. 4(2) : 124.
- Carter, C.N. 1990. Pet population control : Another decade without solution ?. JAVMA. 197 (2) : 192-195.
- Cinone, M., Minoia, P., Lacalandra, G., Dell'Aquila, M. 1996. Oestrus induction in the bitch with buserelin implant. In: Reproduction in Dogs and Other Carnivores P Concannon, ed., pp. 32. Proc. Satell. Mtg. 13th ICAR, Sydney.
- Concannon, P. W. 1989. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. J Reprod Fertil Suppl. 39 : 149-160.
- Concannon, P.W. and Digregorio, G.B. 1986. Canine vaginal cytology. In : Small Animal Reproduction and Infertility, pp. 96-111. Philadelphia : Lea and Febiger Press.
- Concannon, P.W., Lasley, B., and Vanderlip, S. 1997. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. J Reprod Fertil Suppl. 51 : 41-54.

- Concannon, P.W. 1998. Oestrus induction in dogs : use of gonadotrophins, GnRH therapies and dopamine agonists. Advances in Canine Reproduction. Proceeding of the Mini-Symposium at SLU, September 3. Edited by Linde-Forsberg C. CRB Report 3. : 21-26.
- Clayton, R.N., Solano, A.R., Garcia-Vela, A., Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1980. Regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 107 :699 - 706.
- Conn, P.M. 1994. The molecular mechanism of gonadotrophin-releasing hormone action in the pituitary. In: *The physiology of reproduction*, 2nd edition. Knobl E. and Neill D. eds. pp. 1815-1827. Raven Press.
- England, G.C. 1998. Pharmacological control of Reproduction in the Dog and Bitch. In : *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. Simpson G., England G.C.W. and Horvey M. eds. pp. 197-218. British Small Animal Veterinary Association.
- Feldman, E.C. and Nelson, R.W. 1996. Ovarian cycle and vaginal cytology. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2nd edition, pp. 526-546. Philadelphia : W.B. Saunders.
- Gobello, C., Caste,x G., Sota, L.D. and Corrada, Y. 2004. Shortening of interestrous interval with carbergoline in bitches. *J Amer Ann Ass* 40 : 115-119.
- Gobello, C. 2006. A review of dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction. *Theriogenology*. 66 : 1560-1567.
- Gregg, D.W. and Nett, T.M. 1989. Direct effects of estradiol-17 beta on the number of gonadotropin- releasing hormone receptors in the ovine pituitary. *Biol. Reprod.* 40 : 288-293.
- Guyton, A.C. and Hall, J.E. 1996. Introduction to Endocrinology. In : *Textbook of Medical Physiology* 9th ed. pp. 925-932, Philadelphia : W.B. Saunders.
- Inaba, T., Tani, H., Gonda, M., Nakagawa, A., Ohmura, M., Mori, J., Torii, R., Tamada, H. and Sawada, T. 1998. Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*. 49(5) : 975-982.

- Jeffcoate, I. 1998. Physiology and endocrinology of the bitch. In: Manual of small animal reproduction and neonatology, pp. 1-10. Cheltenham : British Small Animal Veterinary Association.
- Kaiser, U.B., Sabbagh, E., Katzenellenbogen, R.A., Conn, P.M. and Chin, W.W. 1995. A Mechanism for the Differential Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Expression by Gonadotropin-Releasing Hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 12280-1228
- Kang, S.K., Chang, K.W., Nathwani, P.S., Choi, K.C. and Leung, P.C. 2000. Autocrine role of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in ovarian cancer cell growth. Endocrine. 13 : 297-304.
- Kutzler, M.A., Wheeler, R., Lamb, S.V. and Volkmann, D.H. 2002. Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. Proceedings of the Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory animals. : 96.
- Kutzler, M.A. 2005. Induction and synchronization of estrus in dogs. Theriogenology. 64 : 766-775.
- LaPolt, P.S., Oikawa, M., Jia, X.C., Dargan, C. and Hsueh, A.J. 1990. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. Endocrinology. 126(6) : 3277-3279.
- Lincoln, D.W. 1992. Human contraception : developement of new scientific opportunities. J Reprod Fert Suppl. 45 : 175-192.
- Lombardi, P., Florio, S., Pagnini, U., Crispino, A. and Avallone, L. 1999. Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But⁺)[6]-Arggly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. J Vet Pharmacol Ther. 22(1) : 56-61.
- Lloyd, J.B. 1988. Alternatives to surgical sterilisation of the dog and cat. Aus Vet Practice. 18 (2) : 68-72.

- Matsuo H., Baba, Y., Nair, R.M.G., Animura, A., and Schally, A.V. 1971. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 1334-1339.
- McRae, G.I., Roberts, BB., Worden, A.C., Bajka, A. and Vickery, B.H. 1985. Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil.* 74(2) : 389-397.
- Miller, W.L. 1993. Regulation of pituitary gonadotrophins by gonadotrophin-releasing hormone, estradiol, progesterone, inhibin, and activin. In: *Genes in mammalian reproduction*. pp. 247-269. Wiley-liss.
- Nester, JJ. Jr. 1984. Development of agonistic LHRH analogs. In *LHRH and Its analogs. Contraceptive and Therapeutic Applications*. pp. 3-10. MTP Press. Lancaster.
- Olson, P.N., Nett, T.MI, Bowen, R.A., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D. 1989. Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. *J Reprod Fertil Suppl.* 39 : 27-40.
- Onclin, K., Verstegen, J. and Concannon, P.W. 2000. Time related changes in canine luteal regulation. *J. Reprod. Fertil.* 118 : 417-424.
- Pace, J.N., Miller, J.L. and Rose, L.I. 1991. GnRH agonists : gonadorelin, leuprolide and nafarelin. *Am Fam Physician.* 44(5) :1777-1782 .
- Ponglowhapan, S., Lohachit, C., Swangchanuthai, T. and Trigg, T.E. 2002. The effect of the GnRH agonist deslorelin on prostatic volume in dogs. *Proceedings of the Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory animals.* 150.
- Padula, A.M., Borman, J.M., Wright, P.J. and Macmillan, K.L. 2002. Temporary suppression of pulsatile LH release following a single injection of a GnRH (deslorelin) in ovariectomised Holstein dairy cows. *Animal Reproductive Science* 70 : 37-47.
- Pralong, F.P., Voirol, M.J., Giacomini, M., Gaillard, R.C. and Grouzmann, E. 2000. Acceleration of pubertal development following central blockade of the Y1 subtype of neuropeptide Y receptors. *Regulatory Peptides* 95 : 47-52.

- Rajamahendran, R., Ambrose, J.D., Thatcher, M-J. and Thatcher, W.W. 1998. Effects of buserelin in jection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpusluteum in Holstein cows. *Theriogenology* 50 : 1141-1155.
- Sallese, M., Iacovelli, L., Cumashi, A., Capobianco, L., Cuomo, L. and Blasi, A.D. 2000. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Biochimica Acta*. 1498: 112-121.
- Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A., Martin, G.B., Doyle, A.G. and Walsh, J. 2001. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl*. 57 : 255-261.
- Trigg, T.E., Doyle, A.G., Walsh, J.D. and Swangchan-uthai, T. 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 66. : 1507-1512.
- Vanderlip, S. L., Wing, A. E., Felt, P., Linkie, D., Rivier, J., Concannon, P. W. and Lasley, B. L. 1987. Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. *Lab Anim Sci*. 37(4) : 459-464.
- Verstegen, J. P., Onclin, K., Silva, L. D. and Concannon, P. W. 1999. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*. 51(3) : 597-611.
- Vickery, B.H., McRae, G.I. and Goodpasture, J.C. 1987. Clinical uses of LHRH analogs in dogs. In : *LHRH and its analogs : Contraceptive and Therapeutic Application*, Part 2. Vickery B.H. and Nestor J.J.Jr. eds. pp. 517-546. MTP Press. Lancaster,
- Vickery, B.H., McRae, G.I., Goodpasture, J.C. and Sanders, L.M. 1989. Use of Potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*. 39 : 175-187.
- Volkman, D.H., Kutzler, M.A., Wheeler, R. and Krekeler, N. 2006. The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrus bitches. *Theriogenology* 66 : 1497-1501.

- Wang, Q.F., Farnworth, P.G., Findlay, J.K. and Burger, H.G. 1989. Inhibitory effect of pure 31-kilodalton bovine inhibin on gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-induced up-regulation of GnRH binding sites in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*. 124 : 363 - 368.
- Wank, M.M., Farina, J., Loza, M.H., Rebuelto, M. and Concannon, P.W. 1997. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human Menopausal Gonadotropin (hMG). *Theriogenology* 47 : 935-942.
- Wingard, JR L.B., Brody, T.M., Lerner, J. and Schwartz, A. 1991. Hypothalamic-pituitary Hormones. In: *Human Pharmacology Molecular to clinical*. pp. 561-574, Mosby.
- Wise, M.E., Nieman, D., Stewart, J. and Nett, T.M. 1984. Effect of number of receptors for gonadotropin-releasing hormone on the release of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 31 : 1007-1013.
- Wright, P.J., Vestegen, J.P., Onclin, K., Jochle, W., Armour, A.F., Martin, G.B. and Trigg, T.E., 2001. Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *J Reprod Fertil Suppl.* 57 : 263-268.
- Wright, P.J. and Parry, B.W. 1989. Cytology of the canine reproduction system. *Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice.* 19 : 851-874.
- Young, L.S., Naik, S.I. and Clayton, R.N. 1984. Adenosine 3',5'-monophosphate derivatives increase gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Endocrinology.* 114 : 2114 - 2122.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1

การย้อมสีชิ้นเนื้อมดลูกตามขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยา

1. การย้อมสี hematoxylin และ eosin stain

- ล้างน้ำยาบัพเฟอร์ฟอร์มาลินออกด้วยน้ำเปล่า (Washing) โดยปล่อยให้ น้ำไหลผ่านชิ้นเนื้อ ประมาณ 1/2 ชั่วโมง
- ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่ชิ้นเนื้อผ่านลงในเมทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 30, 40, 60% และ absolute alcohol ตามลำดับ (ความเข้มข้นละ 40 นาที)
- ทำให้ชิ้นเนื้อใส (Clearing) ด้วยไซลีนอีก 40 นาที
- แช่ชิ้นเนื้อลงในพาราฟินซึ่งเนื้อเยื่อจะถูกฝังอยู่ในบล็อกพาราฟินนี้
- ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4-5 μm
- ย้อมสีชิ้นเนื้อให้ผ่านขั้นตอนการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (Deparaffinization) โดยใช้ไซลีนเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (Rehydration) และแช่ใน absolute alcohol จาก 95, 85 และ 70% ตามลำดับ
- ทำการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H&E stain)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 2

การเตรียมสาร 10% Paraformaldehyde (PFA) Fixative

1. เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ นำไปอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 60°C บน hot plate ใส่แท่งแม่เหล็กช่วยในการ

หมุนปั่นของน้ำ

2. ระหว่างที่หมุนปั่น เติมผง paraformaldehyde ปริมาณ 20 กรัม ปั่นต่อที่อุณหภูมิคงที่

3. เติม 2N NaOH 5 หยด (1 หยด/100 มล.) ปั่นต่อเนื่องจนตะกอนละลายหมด

(อย่าให้อุณหภูมิเกิน 70°C เพราะ PFA จะถูกทำลายได้)

4. นำออกจาก hot plate เติม 10xPBS ปริมาณ 50 มล. ลงไป แล้วปรับให้ได้ pH 7.2 (อาจใช้ HCl)

จะได้สารปริมาตรสุดท้าย 500 มล.

5. กรองสารละลายที่ได้ แล้วเก็บไว้ในที่เย็น ปิดด้วยฟลอยเพื่อป้องกันแสงแดด

6. นำมาใช้ได้ทันที หรือเก็บไว้ในที่เย็น -20°C เมื่อนำมาใช้ ต้องปรับให้เป็นอุณหภูมิห้องก่อน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

สัตวแพทย์หญิง กนกกาญจน์ สุภัครพงษ์กุล เกิดวันที่ 8 พฤศจิกายน 2521 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปีการศึกษา 2546 และทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์ สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547

ในปี 2546-2547 ปฏิบัติงานด้านสัตวแพทย์ในตำแหน่งสัตวแพทย์ชั่วคราว ที่คลินิกพระโขนงสัตวแพทย์ และโรงพยาบาลสัตว์ของหล่อ จากนั้นได้ลาออกจากคลินิกพระโขนงสัตวแพทย์ แต่ยังคงปฏิบัติงานที่โรงพยาบาลสัตว์ของหล่อ ในตำแหน่งสัตวแพทย์ชั่วคราวประจำแผนกอายุรกรรม ต่อมาในปี 2549 ได้ปฏิบัติงานเป็นสัตวแพทย์ ในตำแหน่งสัตวแพทย์ชั่วคราว ประจำแผนกอายุรกรรม และแผนกระบบสืบพันธุ์และมีลูกยาก โรงพยาบาลสัตว์ของหล่อ สาขาของหล่อจนถึงปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย