เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2553; 8(2): 105-125

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมทางเพศและระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในอุจจาระของหมาในเพศเมียที่เลี้ยงอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่

จารุวรรณ คนมี[1], สุวิชัย โรจนเสถียร[2], ฉัตรโชติ ทิตาราม[3], จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์[4], เพทาย พงศ์เพียจันทร์[5], นุชรินทร์ ศงสะเสน[6]

[1]นักศึกษามหาบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ ปีการศึกษา 2551,
[2]ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค, [3]ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า, [4]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,
[5]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,
[6]Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, USA

บทคัดย่อ หมาใน (*Cuon alpinus*) เป็นสัตว์ในตระกูล Canidae สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ ประเมินสถานภาพของหมาในปี 2553 อยู่ในระดับใกล้สูญพันธุ์ ข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของหมาในยังมีน้อยมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบและความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์และฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์กับพฤติกรรมทางเพศของหมาในเพศเมียที่เลี้ยงในสวนสัตว์ของจังหวัดเชียงใหม่เป็นระยะเวลาตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2551 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2552 โดยวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเมตาบอไลต์ในตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมียทั้งหมด 3 ตัว หมาในเพศเมีย 2 ตัว อายุ 4 ปี นำมาจากทวีปยุโรป 3 เดือนก่อนการศึกษาวิจัย และหมาในเพศเมีย 1 ตัว อายุ 7 ปี เกิดในประเทศไทยหมาในทุกตัวถูกเลี้ยงรวมกันกับหมาในเพศผู้ ได้รับอาหารเนื้อไก่สดวันละ 1 ครั้ง จดบันทึกพฤติกรรมทางเพศทุกวัน และเก็บตัวอย่างอุจจาระ 5-7 ครั้งต่อสัปดาห์ นำตัวอย่างอุจจาระมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์และฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์ด้วยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเซ พบว่า หมาในที่นำมาจากทวีปยุโรปและหมาในที่เกิดในประเทศไทยมีความแตกต่างของฤดูกาลผสมพันธุ์ หมาในที่นำมาจากทวีปยุโรปทั้ง 2 ตัว มีพฤติกรรมทางเพศ 1 ครั้ง ในเดือน มกราคม 2552 พบฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีระดับสูงเป็นระยะเวลา 9-12 วัน และพบฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีระดับสูงตามมา ส่วนหมาในที่เกิดในประเทศไทยพบพฤติกรรมทางเพศ 2 ครั้ง

ในเดือนเมษายน 2551 และกันยายน 2551 ซึ่งสอดคล้องกับการพบฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีระดับสูง 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 12-13 วัน ในแต่ละครั้งพบการขึ้นของฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์ตามมา และระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีระดับสูงอยู่เป็นระยะเวลา 77 วัน และ 112 วัน ตามลำดับ และพบการแสดงพฤติกรรมทางเพศของหมาในทุกตัวในช่วงมีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์สูง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตัวอย่างอุจจาระเพื่อใช้ติดตามการทำงานของรังไข่ของหมาใน อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับฤดูกาลผสมพันธุ์ของหมาในที่เลี้ยงในสวนสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2553; 8(2): 105-125

คำสำคัญ: หมาใน เอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน พฤติกรรมทางเพศ

บทนำ

หมาใน (*Cuon alpinus*) เป็นหมาป่าขนาดปานกลาง สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union of Conservation or Nature and Natural Resources 2009: IUCN 2009) ประเมินสถานภาพของหมาในว่าอยู่ในระดับใกล้สูญพันธุ์ (Endangered; EN) C2a(i) [1] อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: CITES) จัดหมาในอยู่ในบัญชีหมายเลข 2 (Appendix II) [2] และประเทศไทยจัดหมาในเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง [3] เนื่องจากหมาในถูกคุกคามจากการที่สัตว์เหยื่อลดจำนวนลง ถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลายและจากการถูกล่า ในอดีตเคยมีการฆ่าเพื่อเอาหนัง หมาในมักถูกกับดักวางยาเบื่อ ถูกยิง หรือแม้แต่สถานที่เลี้ยงลูกก็ถูกทำลาย การที่มนุษย์บุกรุกเข้าไปตั้งถิ่นฐานในป่าและนำสุนัขบ้านเข้าไปเลี้ยงทำให้โรคติดต่อบางอย่างแพร่ไปยังประชากรหมาใน เช่น ในประเทศอินเดียโรคไข้หัดสุนัขและโรคพิษสุนัขบ้าทำให้ประชากรหมาในลดจำนวนลงเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันหมาในได้รับการคุ้มครองในหลายประเทศ แต่ประชากรหมาในก็ยังมีจำนวนน้อย คาดว่าเหลืออยู่ประมาณ 2,500 ตัว [1, 3-5] หมาในที่อยู่ตามธรรมชาติอาศัยอยู่อย่างกระจัดกระจายในประเทศจีนตอนใต้ อินเดีย พม่า ไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย และอินโดนีเซีย [4, 5] หมาในที่พบในประเทศไทยอาศัยอยู่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว และในป่าซึ่ง

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่: สพ.ญ. จารุวรรณ คนมี ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และ สัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 E-mail address: au_vet@hotmail.com
ได้รับบทความวันที่ 17 ธันวาคม 2552

ยังไม่ทราบจำนวนที่แน่นอน[4] ข้อมูลที่ผ่านมาเป็นการสังเกตจากพฤติกรรมหมาในที่เลี้ยงในสวนสัตว์ และจากการบอกเล่าของกลุ่มคนเลี้ยงหรือกลุ่มคนที่พบเห็นหมาในในป่าเท่านั้น พบว่าหมาในเป็นสัตว์ที่ออกลูกปีละ 1 ครั้ง และตั้งท้องประมาณ 9 สัปดาห์เท่านั้น[4] การศึกษาในเชิงพฤติกรรมของหมาในที่เลี้ยงในสวนสัตว์ของประเทศอินเดีย พบว่าหมาในจะผสมพันธุ์กันตามฤดูกาลในระหว่างเดือนสิงหาคมและเดือนธันวาคม[6] และการศึกษาในเชิงพฤติกรรมของหมาในในประเทศอินเดียพบว่ามีการผสมพันธุ์กันในระหว่างเดือนพฤศจิกายนและเดือนเมษายน แต่พบว่าหมาในที่เลี้ยงในเกาะชวาของประเทศอินโดนีเซียมีการผสมพันธุ์กันในช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม[4] จากการสังเกตเชิงพฤติกรรมพบว่าหมาในเพศเมียมีการผสมพันธุ์ตามฤดูกาลและจะผสมพันธุ์หลายๆ ครั้งในฤดูกาลผสมพันธุ์เรียกว่า seasonal polyestrus ซึ่งจะผสมพันธุ์กันทุก 4-6 สัปดาห์[4] ดังนั้นจึงเป็นลักษณะที่แตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่นในตระกูล Canidae เนื่องจากสัตว์ชนิดอื่นในตระกูล Canidae เช่น maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) จะมีการผสมพันธุ์ 1 ครั้งในฤดูกาลผสมพันธุ์เรียกว่า seasonal monoestrus[7, 8] ปกติเพศเมียที่เด่นที่สุดในกลุ่ม (alpha female) จะเป็นตัวที่ถูกผสมพันธุ์ หมาในเพศเมียจะผสมพันธุ์ครั้งแรกเมื่ออายุประมาณ 3 ปี แต่การสังเกตในสวนสัตว์ของประเทศอินเดียพบว่าหมาในทั้งเพศผู้และเพศเมียสามารถผสมพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุ 2 ปี[4] การศึกษาพฤติกรรมทางเพศที่ผ่านมาพบว่าเมื่อหมาในต้องการจะผสมพันธุ์จะมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีโดยการปัสสาวะ (urine marking) และมีการส่งเสียงร้องทั้งหมาในเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นจะดมกลิ่นปัสสาวะที่ถ่ายรดไว้ โดยหมาในเพศเมียจะเลียบริเวณอวัยวะเพศและจะขึ้นขี่หมาในเพศผู้ หมาในผสมพันธุ์แบบหันหลังชนกันเช่นเดียวกับพวกสุนัขทั่วไปและพบว่าช่วงระยะเวลาเป็นสัดค่อนข้างยาว ดังนั้นหมาในจึงมีการผสมพันธุ์กันหลายครั้ง นอกจากนี้ยังมีการสันนิฐานว่าระยะเป็นสัดน่าจะยาวกว่าสัตว์ในตระกูลเดียวกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่าหมาในแสดงอาการทางเพศที่อายุประมาณ 11 เดือน[6] อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาเป็นเพียงข้อมูลจากการสังเกตพฤติกรรมของหมาในที่แสดงออกมา ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แสดงการทำงานของระดับฮอร์โมนของอวัยวะสืบพันธุ์ในรังไข่ของหมาใน การทำความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อมีความสำคัญ เพราะระบบสืบพันธุ์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโดยตรง การศึกษารูปแบบของสเตียรอยด์ฮอร์โมนของระบบสืบพันธุ์ในกระแสเลือดได้มีการใช้มานานเพื่อศึกษาวงรอบการเป็นสัด ผลของฤดูกาลและการวินิจฉัยความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ แต่เนื่องจากการเก็บตัวอย่างเลือดในทางปฏิบัตินั้นไม่เหมาะสมกับสัตว์ป่าและจะทำให้สัตว์เครียด[9] ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลการตรวจวัดระดับฮอร์โมนของระบบสืบพันธุ์ได้ วิธีการเก็บตัวอย่างแบบไม่ทำอันตรายกับตัวสัตว์ (non-invasive) จึงถูกนำมาเป็นอีกทางเลือกในการติดตามการทำงานของฮอร์โมนในอวัยวะสืบพันธุ์[10] การเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อการวิเคราะห์สเตียรอยด์

ฮอร์โมนเมตาบอไลต์จึงเป็นอีกทางเลือกที่ได้รับความสนใจ[11] แต่การเก็บตัวอย่างปัสสาวะมีปัญหาในการเข้าไปเก็บตัวอย่างปัสสาวะในสัตว์บางชนิด และสัตว์บางชนิดสเตียรอยด์ฮอร์โมนส่วนใหญ่มีการขับออกมาทางอุจจาระมากกว่าในปัสสาวะ ดังนั้นการวิเคราะห์ฮอร์โมนเมตาบอไลต์จากตัวอย่างอุจจาระจึงได้รับความนิยมมากที่สุดในวิธี non-invasive สำหรับการหาค่าข้อมูลทางด้านระบบต่อมไร้ท่อ นอกจากนี้การวิเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระยังสามารถใช้ในการตรวจการตั้งท้องในสัตว์หลายชนิดได้[10-13] ปัญหาของการจัดการประชากรหมาในในสวนสัตว์ของประเทศไทย คือ จำนวนหมาในที่อาศัยอยู่ในสวนสัตว์มีจำนวนน้อย ไม่มีข้อมูลทางด้านพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ ปัญหาเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของหมาในในสวนสัตว์ของจังหวัดเชียงใหม่ คือ อัตราการผสมพันธุ์ติดต่ำ อัตราการตายของลูกแรกคลอดสูง จำนวนลูกต่อครอกน้อย ลูกที่คลอดออกมามีร่างกายไม่แข็งแรง พิการ ทำให้การเพิ่มประชากรหมาในเป็นไปได้ค่อนข้างยาก และการขาดข้อมูลเกี่ยวกับสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ของหมาในด้วย จากข้อมูลดังกล่าวถ้าไม่ทำการศึกษาเพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับพฤติกรรมเป็นสัดและรูปแบบของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของหมาใน กลุ่มหมาในที่เลี้ยงในสวนสัตว์อาจสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยได้ ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แสดงเกี่ยวกับสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ของหมาในเพศเมีย รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของฮอร์โมนกับลักษณะพฤติกรรมของหมาในเพศเมีย ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบและความสัมพันธ์ของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนกับพฤติกรรมของหมาในเพศเมียที่เลี้ยงในสวนสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ศึกษาในหมาในเพศเมียจำนวน 3 ตัว ณ เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี หมาในเพศเมียตัวที่ 1 และหมาในเพศเมียตัวที่ 2 อายุ 4 ปี น้ำหนัก 17 กิโลกรัม เลี้ยงรวมกับหมาในเพศผู้ 2 ตัว ในกรงเลี้ยง หมาในเพศเมียทั้ง 2 ตัวนำมาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ของทวีปยุโรปประมาณ 3 เดือนก่อนทำการศึกษา ส่วนหมาในเพศเมียตัวที่ 3 อายุ 7 ปี น้ำหนัก 13 กิโลกรัม เลี้ยงรวมกับหมาในเพศผู้ 1 ตัวในกรงเลี้ยงและส่วนแสดง เป็นหมาในที่เกิดในประเทศไทย ก่อนการเก็บตัวอย่างอุจจาระ 1 วัน หมาในเพศเมียทั้ง 3 ตัว จะได้รับเนื้อไก่สดผสมกับสีผสมอาหาร Icing colors royal blue concentration paste (Wilton Industries, Inc. Woodridge, IL) วันละ 1 ครั้ง เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้เป็นของหมาในตัวใด

การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

เก็บตัวอย่างอุจจาระหมาในเพศเมียทุกตัวที่ถ่ายออกมาใหม่ๆ จากพื้นในช่วงเช้าจำนวน 5-7 ครั้ง (ตัวอย่าง) ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 1 ปี และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20^{0}C จนกว่าจะสกัดตัวอย่างอุจจาระเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

การสกัดตัวอย่างอุจจาระและการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

นำตัวอย่างอุจจาระออกจากตู้แช่แข็งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุจจาระที่แข็งนั้นมีความนิ่มลง จากนั้นเอาสิ่งแปลกปลอมซึ่งปนอยู่ในตัวอย่างอุจจาระออกให้เหลือเฉพาะตัวเนื้ออุจจาระ ชั่งตัวอย่างอุจจาระแต่ละตัวอย่างประมาณ 0.48-0.52 g ใส่ในหลอดแก้วขนาด 16X100 mm ตัวอย่างละ 1 หลอด เติมน้ำกลั่น 0.5 ml และเติมเอทานอล 4.5 ml ลงในตัวอย่างอุจจาระทุกหลอด ปิดด้วยจุกยาง ผสมตัวอย่างอุจจาระให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) เป็นเวลา 10 วินาที นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร Multi Pulse Vortexer (Glas-Col, Terre Haute, IN) เขย่าด้วยความเร็วประมาณ 60-70 รอบต่อนาที และอัตรา 1 จังหวะต่อวินาที เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างอุจจาระไปเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 RPM เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวใส (supernatant) ของตัวอย่างแยกใส่หลอดพลาสติกขนาด 12X75 mm นำมาเจือจางด้วย dilution buffer ที่ความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 20^0C จากวิธีการสกัดตัวอย่างอุจจาระได้ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency) เท่ากับ 77.90 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่า Coefficients of variation (CV) เท่ากับ 30.84 เปอร์เซ็นต์

การวัดระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเซ (Enzyme Immunoassays; EIA)

แอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน นำมาจาก Coralie Munro (University of California, Davis, CA, USA) โดย pregnane CL 425 เกิด cross react กับ progesterone metabolites ดังนี้ 4-pregnen-3,20-dione (100%), 4-pregnen-3α-ol-20-one (188%), 4-pregnen-3β-ol-20-one (172%), 4-pregnen-11α-ol-3,20-dione (147%), 5α-pregnan-3β-ol-20-one (94%), 5α-pregnan-3β,20-dione (64%), 5α-pregnan-3,20-dione (55%), 5β-pregnan-3α-ol-20-one (12.5%), 5-pregnan-3,20-dione (8%), 4-pregnen-11β-ol-3,20-dione (2.7%), and 5β-pregnan-3α-ol-20-one (2.5%)[14] และแอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนนำมาจาก Coralie Munro (University of California, Davis, CA, USA) โดยที่ EC R522-2 เกิด cross react กับ estrogen metabolites ดังนี้ estrone-3-glycoronide (100%), estrone-3 sulfate (66.6%), estrone (238%), estradiol-17-β (7.8%), estradiol-3-glucoronide (3.8%), estradiol-3-sulfate (3.3%), estradiol-17-surfate (0.1%), estradiol-3-disulfate (0.1%)[15]

จากการหา Parallelism พบว่ากราฟของตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมียเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับกราฟของ standard cure แสดงว่าสามารถใช้แอนติบอดี (CL 425) สำหรับตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และสามารถใช้แอนติบอดี (EC R

522-2) ต่อการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมียได้ และจากวิธีการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยวิธี EIA ได้ค่า CV ของ Inter-assay น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ และค่า CV ของ Intra-assay น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และค่า Assay sensitivity ของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 0.0156 ng/ml และเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนเท่ากับ 0.039 ng/ml

การศึกษาพฤติกรรมของหมาใน

สังเกตพฤติกรรมของหมาในเพศเมียทั้ง 3 ตัว เป็นเวลา 30 นาทีต่อครั้ง ในช่วงเช้าและ/หรือเย็นของทุกวัน โดยสังเกตลักษณะพฤติกรรมการอยู่เดี่ยวๆ (solitary) การอยู่รวมกันเป็นสังคม (social) และพฤติกรรมทางเพศ (sexual behavior) สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกของหมาในเพศเมียและพฤติกรรมทางเพศ ดังนี้ อวัยวะเพศบวมขยายใหญ่ (swollen vulva) มีสิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอด (vaginal discharge) เป็นสีแดงหรือสีแดงจางหรือเป็นเมือก หมาในเพศเมียเป็นที่ดึงดูดและเป็นที่สนใจหมาในเพศผู้ (solicitation) การขึ้นขี่ (mounting) การยอมรับหรือปฏิเสธการผสมจากหมาในเพศผู้ มีการปัสสาวะบ่อยขึ้นโดยการใช้ท่า squat-raise (ท่านั่งยองๆ และยกขาหลังขึ้น) ระยะเวลาการผสมพันธุ์โดยการติดกัน (copulatory lock) และหันหลังชนกัน (back to back posture) โดยนำผลการศึกษาพฤติกรรมทางเพศของหมาในเพศเมียมาศึกษาความสัมพันธ์กับรูปแบบของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ตรวจวัดได้

การวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระกับพฤติกรรมของหมาใน

ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนของหมาในเพศเมีย 3 ตัว นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับพฤติกรรมทางเพศ โดยรวมข้อมูลของระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนของหมาในเพศเมียแต่ละตัวจากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บในระยะเวลา 1 ปี ไว้ในกราฟเดียวกัน และหาค่าระดับฮอร์โมนต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (low detecting limit) หรือค่า basal line โดยใช้ค่า Mean ± 2 S.D. สำหรับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่วิเคราะห์ได้ในช่วงที่รังไข่ไม่มีการทำงาน (ovarian inactivity) คือ ระยะ anestrus ซึ่งเป็นระยะที่ต่อมาจากระยะ diestrus ระยะนี้เป็นระยะที่ไม่มีกิจกรรมทางเพศและเป็นระยะที่ไม่มีการทำงานของรังไข่ (ovarian inactivity)[16] หมาในเพศเมียตัวที่ 1 คิดค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 6 เมษายน 2551 ถึงวันที่ 30 ธันวาคม 2551 หมาในเพศเมียตัวที่ 2 คิดค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 23 มีนาคม 2551 ถึง วันที่ 5 มกราคม 2552 และหมาใน

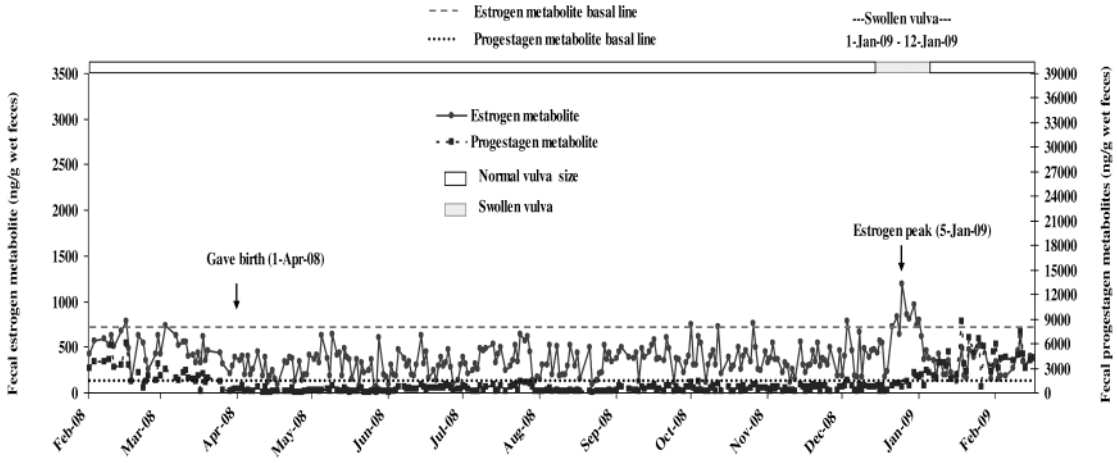
เพศเมีย ตัวที่ 3 คิดค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2551 ถึงวันที่ 13 เมษายน 2551 วันที่ 3 กรกฎาคม 2551 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2551 และวันที่ 10 มกราคม 2552 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552

ผลการศึกษา

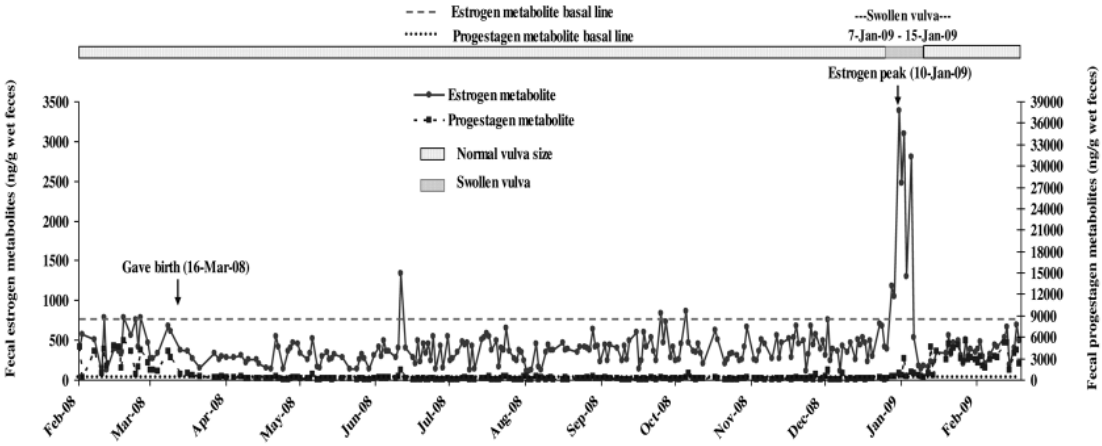
1. ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระกับพฤติกรรมเป็นสัดของหมาในตัวที่ 1 ในระยะเวลา 1 ปี (รูปที่ 1)

ระดับ basal line ของฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เท่ากับ 1,042.46 ng/g wet feces ตั้งแต่วันที่เริ่มเก็บตัวอย่าง (วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2551) พบระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line ซึ่งเป็นช่วงที่หมาในตั้งท้อง และระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์ค่อยๆ มีระดับลดลงก่อนหมาในคลอดลูกในวันที่ 1 เมษายน 2551 หลังจากหมาในคลอดลูกระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 270 วัน (วันที่ 6 เมษายน ถึงวันที่ 1 มกราคม 2552) และระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 3 มกราคม 2552 ถึงวันที่สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552)

ระดับ basal line ของฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์เท่ากับ 633.34 ng/g wet feces ตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่าง (วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2551) พบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่า basal line เล็กน้อยซึ่งในช่วงที่หมาในตั้งท้อง และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีระดับลดลงเรื่อยๆ ก่อนหมาในคลอดลูกในวันที่ 1 เมษายน 2551 พบว่าหลังจากหมาในคลอดลูกระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์



รูปที่ 1 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในตัวที่ 1 ในระยะเวลา 1 ปี



รูปที่ 2 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในตัวที่ 2 ในระยะเวลา 1 ปี

มีค่าต่ำกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 269 วัน (วันที่ 5 เมษายน ถึงวันที่ 30 ธันวาคม 2551) และพบว่าระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 12 วัน (วันที่ 1 ถึงวันที่ 12 มกราคม 2552) ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงสุดในวันที่ 5 มกราคม 2552 เท่ากับ 1,183.11 ng/g wet feces และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 13 มกราคม 2552 ถึงวันที่สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552)

พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เริ่มมีค่าสูงกว่าค่า basal line ในวันที่ 7 มกราคม 2552 หลังจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์ขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 มกราคม 2552 ซึ่งเป็นระยะเวลา 2 วัน นอกจากนี้ พบว่าช่วงที่ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line หมาในแสดงพฤติกรรมเป็นสัดคือ อวัยวะเพศบวมแดง มีระยะเวลาประมาณ 12 วัน แต่ในช่วงระยะเวลาที่ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line หมาในไม่แสดงพฤติกรรมเป็นสัด

2. ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระกับพฤติกรรมเป็นสัดของหมาในตัวที่ 2 ในระยะเวลา 1 ปี (รูปที่ 2)

ระดับ basal line ของฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เท่ากับ 568.48 ng/g wet feces ตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่าง (วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2551) พบระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line ซึ่งเป็นช่วงที่หมาในตั้งท้อง และระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์ค่อยๆ มีระดับลดลงก่อนหมาในคลอดลูกในวันที่ 16 มีนาคม 2551 หลังจากหมาในคลอดลูกระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line เป็น ระยะเวลา 284 วัน (วันที่ 31 มีนาคม 2551 ถึงวันที่ 8 มกราคม 2552) และระดับฮอร์โมนโปรเจสตา

เจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 10 มกราคม 2552 ถึงวันที่สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552)

ระดับ basal line ของฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์เท่ากับ 693.28 ng/g wet feces ตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่าง (วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2551) พบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่า basal line เล็กน้อยในช่วงที่หมาในตั้งท้อง และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีระดับลดลงเรื่อยๆ ก่อนหมาในคลอดลูกในวันที่ 16 มีนาคม 2551 พบว่าหลังจากหมาในคลอดลูกระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 294 วัน (วันที่ 18 มีนาคม 2551 ถึงวันที่ 7 มกราคม 2552) และพบว่าระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 9 วัน (วันที่ 7 ถึงวันที่ 15 มกราคม 2552) และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงสุดในวันที่ 10 มกราคม 2552 เท่ากับ 3,380.18 ng/g wet feces และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 16 มกราคม 2552 ถึงวันที่สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552)

พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เริ่มมีค่าสูงกว่าค่า basal line ในวันที่ 12 มกราคม 2552 หลังจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์ขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 มกราคม 2552 ซึ่งเป็นระยะเวลา 2 วัน นอกจากนี้พบว่าช่วงที่ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line หมาในแสดงพฤติกรรมเป็นสัดคือ อวัยวะเพศบวมแดง ซึ่งมีระยะเวลาประมาณ 9 วัน แต่ในช่วงระยะเวลาที่ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line หมาในไม่แสดงพฤติกรรมเป็นสัด

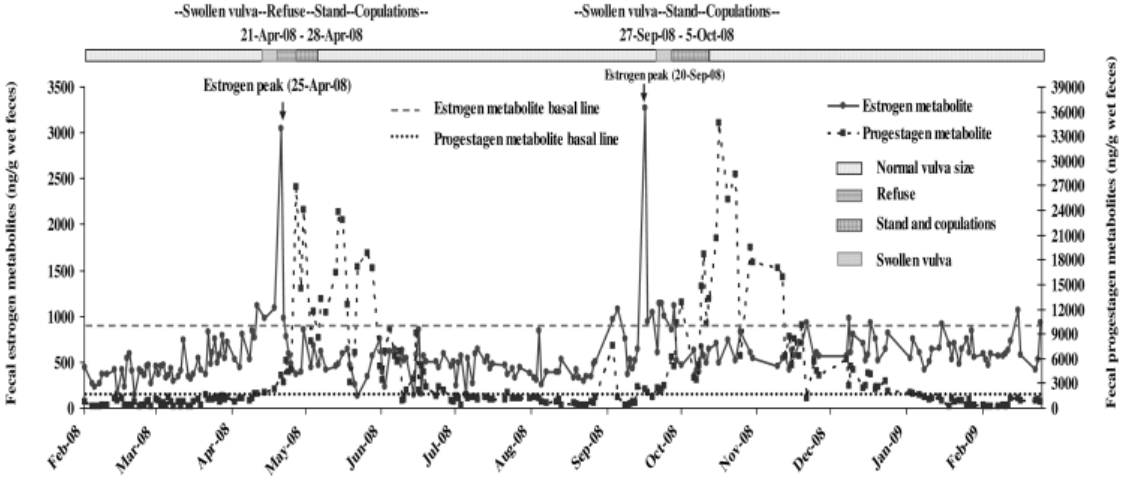
3. ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระกับพฤติกรรมเป็นสัดของหมาในตัวที่ 3 ในระยะเวลา 1 ปี (รูปที่ 3)

ระดับ basal line ของฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เท่ากับ 1,581.38 ng/g wet feces รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในแสดง 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line ตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่าง (วันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2551) ถึงวันที่ 13 เมษายน 2551 ต่อมาระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 77 วัน (วันที่ 14 เมษายน ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2551) ซึ่งหมาในมีการผสมพันธุ์แต่ไม่มีการตั้งท้อง และระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีระดับต่ำกว่าค่า basal line (วันที่ 3 กรกฎาคม 2551 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2551) ครั้งที่ 2 ระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 112 วัน (วันที่ 17 กันยายน 2551 ถึงวันที่ 7 มกราคม 2552) ซึ่งหมาในมีการผสมพันธุ์แต่ไม่มีการตั้งท้อง และระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line ตั้งแต่

วันที่ 10 มกราคม 2552 ถึงวันที่สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552)

ระดับ basal line ของฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์เท่ากับ 831.50 ng/g wet feces รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในแสดง 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 พบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่า basal line ตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่าง (วันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2551) ถึงวันที่ 12 เมษายน 2551 และพบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 8 วัน (วันที่ 21 ถึงวันที่ 28 เมษายน 2551) ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงสุดในวันที่ 25 เมษายน 2551 เท่ากับ 3,041.13 ng/g wet feces และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 27 เมษายน 2551 ถึงวันที่ 17 กันยายน 2551 ครั้งที่ 2 ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 12 วัน (วันที่ 20 กันยายน ถึงวันที่ 2 ตุลาคม 2551) และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงสุดในวันที่ 20 กันยายน 2551 เท่ากับ 3,261.20 ng/g wet feces และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าต่ำกว่าค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 3 ตุลาคม 2551 ถึงวันที่สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552)

พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระกับพฤติกรรมเป็นสัดของหมาใน 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 8 วัน (วันที่ 21 ถึง 28 เมษายน 2551) และพบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เริ่มมีระดับสูงกว่าค่า basal line ในวันที่ 14 เมษายน 2551 ก่อนระดับฮอร์โมน



รูปที่ 3 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในตัวที่ 3 ในระยะเวลา 1 ปี

เอสโตรเจนเมตาบอไลต์ขึ้นสูงสุดในวันที่ 25 เมษายน 2551 ซึ่งเป็นระยะเวลา 11 วัน นอกจากนี้พบว่าในช่วงที่ระดับฮอร์โมนเอสโตร-เจนเมตาบอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line หมาในแสดงพฤติกรรมก่อนการเป็นสัด (proestrus) คือ อวัยวะเพศบวมแดง วันที่ 21 เมษายน 2551 หมาในเพศเมียแสดงพฤติกรรมเป็นสัดแต่ไม่ยอมให้หมาในเพศผู้ผสมพันธุ์ วันที่ 22 เมษายน 2551 หมาในเพศเมียแสดงพฤติกรรมก่อนการเป็นสัด โดยไปคลอเคลียและเลียลำตัวหมาในเพศผู้ กระโดดคร่อมบนหลังหมาในเพศผู้และถ่ายปัสสาวะบ่อยโดยใช้ท่า squat-raise วันที่ 23 เมษายน 2551 มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น 1 ครั้ง และหมาในเพศเมียถ่ายปัสสาวะบ่อยโดยใช้ท่า squat-raise แต่วันนี้ไม่มีตัวอย่างอุจจาระสำหรับการตรวจวัดระดับฮอร์โมน วันที่ 28 เมษายน 2551 มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น 1 ครั้ง หมาในเพศเมียแสดงพฤติกรรมเป็นสัดโดยการยืนนิ่งและยอมให้หมาในเพศผู้ขึ้นผสมพันธุ์ ในช่วงที่หมาในเพศเมียจะถูกผสมพันธุ์ หมาในเพศเมียจะตั้งท่าเตรียมโดยหันส่วนท้ายและเบี่ยงหางให้กับหมาในเพศผู้ จากนั้นหมาในเพศผู้จะขึ้นผสมพันธุ์ หมาในเพศเมียส่งเสียงร้อง หันหลังชนกัน (back to back posture) และติดกัน (copulatory lock) อยู่นานประมาณ 15 นาที หมาในเพศเมียจะบิดตัวไปมา และบิดตัวออกมาจากหมาในเพศผู้ หมาในเพศเมียสลัดตัว ทำความสะอาดอวัยวะเพศและยังคงไปคลอเคลียหมาในเพศผู้ ครั้งที่ 2 ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตา-บอไลต์มีค่าสูงกว่าค่า basal line เป็นระยะเวลา 9 วัน (วันที่ 27 กันยายน ถึง 5 ตุลาคม 2551) และพบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสตาเจนเมตาบอไลต์เริ่มมีค่าสูงกว่าค่า basal line ในวันที่ 17 กันยายน 2551 ก่อนการเกิดฮอร์โมนเอสโตรเจนเมตาบอไลต์ขึ้นสูงสุดในวันที่ 20 กันยายน 2551 ซึ่งเป็นระยะเวลา 3 วัน พบหมาในแสดงพฤติกรรมก่อนการเป็นสัด คือ อวัยวะเพศบวมแดง และช่วงเวลาดังกล่าวหมาในเพศเมียยอมให้หมาในเพศผู้เลียอวัยวะเพศและคลอเคลียเป็นเวลานาน วันที่ 27 กันยายน 2551 มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น 1 ครั้ง หมาในหันหลังชนกัน (back to back posture) และติดกัน (copulatory lock) นานประมาณ 7 นาที วันที่ 1 ตุลาคม 2551 มีการผสมพันธุ์และหมาในหันหลังชนกัน (back to back posture) และติดกัน (copulatory lock) นานประมาณ 5 นาที (รูปที่ 3)

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้นำตัวอย่างอุจจาระมาใช้ในการตรวจด้วยวิธี EIA เนื่องจากวิธี EIA ไม่จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตรังสี เครื่องมือมีราคาถูก สารเคมีสามารถเตรียมได้ง่าย มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม ในขณะที่เทคนิค RIA จำเป็นต้องได้รับอนุญาตในการใช้สารกัมมันตรังสี เครื่องมือในการวัดปริมาณรังสีและสารกัมมันตรังสีมีราคาแพง การใช้สารกัมมันตรังสีเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม [9,10,17] ข้อมูลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่อการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ทำอันตรายต่อสัตว์สามารถสะท้อนการทำงานของฮอร์โมนในรังไข่ของหมาในเพศเมีย

ได้เช่นเดียวกับการตรวจฮอร์โมนในตัวอย่างเลือด การเก็บตัวอย่างเลือดในทางปฏิบัตินั้นไม่เหมาะสมกับสัตว์ป่าเพราะการจับบังคับสัตว์และการวางยาสลบจะทำให้สัตว์เกิดความเครียด[9] ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลการตรวจระดับฮอร์โมนของระบบสืบพันธุ์ได้ ดังนั้น จึงมีการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างอุจจาระในการตรวจด้วยวิธี EIA เพื่อติดตามการทำงานของรังไข่ในสัตว์ป่าตระกูล Canidae เช่น maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*)[7] red wolf (*Canis rufus*)[18] และ domestic dog (*Canis familiaris*)[19]

จากการศึกษารูปแบบเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของหมาในตัวที่ 1 และหมาในตัวที่ 2 เริ่มพบระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับสูงกว่าค่า basal line หลังจากที่ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนขึ้นสูงสุดประมาณ 2 วัน แต่หมาในตัวที่ 3 เริ่มพบระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับสูงกว่าค่า basal line ก่อนที่ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนจะขึ้นสูงสุดประมาณ 3 วัน และ 11 วัน โดยทั่วไปสัตว์ในตระกูล Canidae ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะค่อยๆ สูงกว่าค่า basal line ก่อนการเกิดฮอร์โมนเอสโตรเจนขึ้นสูงสุด คือ เริ่มเกิดตั้งแต่ระยะ proestrus[20] เพราะมีการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากรังไข่ก่อนการตกไข่ (follicular luteinization)[7] และเมื่อมีการตกไข่แล้วฟอลลิเคิลจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นคอปัสลูเทียมและจะมีการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในปริมาณที่มากขึ้นเรื่อยๆ และจะมีระดับสูงในระยะ diestrus[16, 21] เนื่องจากหมาในทั้ง 3 ตัว มีระยะเวลาของการเพิ่มขึ้นของระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้งก่อนและหลังการเกิดเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนขึ้นสูงสุดอาจมีสาเหตุจากลักษณะเฉพาะตัวของสัตว์ จำนวนสัตว์น้อย การเก็บตัวอย่างอุจจาระที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ทุกวัน และระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง 1 ปีอาจไม่เพียงพอสำหรับการสรุปผลการศึกษาเรื่องนี้ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้ถ้าหมาในตัวที่ 1 และหมาในตัวที่ 2 ได้เก็บตัวอย่างอุจจาระหลังจากวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552 ต่อไปจะทำให้สามารถทราบวันที่ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับต่ำกว่าค่า basal line เนื่องจากหมาในตัวที่ 3 พบระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีปริมาณน้อยลงเรื่อยๆ จนมีระดับต่ำกว่าค่า basal line ในวันที่ 77 และวันที่ 112 ของการศึกษาวิจัย งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นประโยชน์ของการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระพบว่าจะมีระดับสูงในระยะ diestrus และสามารถใช้บ่งบอกการตั้งท้องในสัตว์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน maned wolf *(Chrysocyon brachyurus)*[7, 8] พบว่าการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระสามารถบ่งบอกการตั้งท้องได้

จากการศึกษาพบว่าหมาในตัวที่ 1 และหมาในตัวที่ 2 ในช่วงที่ตั้งท้องระดับของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับสูงกว่าค่า basal line ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมน

โปรเจสเตอโรนจะค่อยลดลงก่อนหมาในคลอดลูกหลังจากหมาในคลอดลูกระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะมีระดับต่ำกว่าค่า basal line ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน maned wolf *(Chrysocyon brachyurus)*[8] แต่แตกต่างจากการศึกษาใน foxes wolves และ domestic dogs ที่ตั้งท้องพบว่ามีการขับออกของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงในช่วงต้นของการตั้งท้องและจะมีระดับลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงท้ายของการตั้งท้อง[22-24] มีรายงานว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาของสัตว์ที่ตั้งท้องมีระดับสูงกว่าสัตว์ที่ไม่ตั้งท้องในระยะ luteal phase ของ domestic dog *(Canis familiaris)*[22] การเพิ่มขึ้นของระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของหมาในเกี่ยวข้องกับการทำงานของรังไข่ แหล่งผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่มีความจำเพาะกับการตั้งท้อง (pregnancy-specific) ในสุนัขสันนิฐานว่าน่าจะมาจากลูเทียลเซลล์ (*luteal cell*) เพราะรกในสุนัขไม่มีหลั่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน[25] การศึกษาใน domestic dog *(Canis familiaris)* แสดงให้เห็นว่ารังไข่เป็นแหล่งผลิตของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนตลอดการตั้งท้อง[19, 26] ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคอปัสลูเทียมและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในสัตว์ตระกูล Canidae[7] อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาในแพะและสุกรที่มีความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันระหว่างจำนวนคอปัสลูเทียมและการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน[27, 28]

จากการศึกษาระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนของหมาในทั้ง 3 ตัวพบว่า ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนของหมาในตัวที่ 1 และหมาในตัวที่ 2 ในระยะที่ไม่ตั้งท้องมีระดับขึ้นสูงกว่าค่า basal line แสดงให้เห็นว่าเป็นระยะ follicular phase นั่นคือมีการเจริญของรังไข่จึงมีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนในปริมาณที่มาก[16] เป็นการบ่งชี้ว่าระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีประโยชน์ในการติดตามการทำงานของฟอลลิเคิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[10] งานวิจัยนี้พบว่าหมาในตัวที่ 1 มีระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีระดับสูงกว่าค่า basal line และแสดงพฤติกรรมเป็นสัดระยะเวลา 12 วัน หมาในตัวที่ 2 มีระดับสูงกว่าค่า basal line ระยะเวลา 9 วัน หมาในตัวที่ 3 มีระดับสูงกว่าค่า basal line ระยะเวลา 13 วัน (ครั้งที่ 1) และมีระดับสูงกว่าค่า basal line ระยะเวลา 12 วัน (ครั้งที่ 2) ข้อมูลจากงานวิจัยนี้แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาในเชิงพฤติกรรมของหมาใน 1 ตัวที่เลี้ยงในสวนสัตว์ของประเทศอินเดีย ในระยะเวลา 4 ปี การศึกษาดังกล่าวพบว่าหมาในมีระยะเวลาเป็นสัด (estrus period) 14-39 วัน[29] ข้อแตกต่างอาจมาจากจำนวนสัตว์ ระยะเวลาในการศึกษาวิจัย และแหล่งที่มาของข้อมูลซึ่งข้อมูลระยะเวลาการเป็นสัดจากการศึกษาครั้งนี้มาจากการศึกษาพฤติกรรมและการตรวจวัดระดับฮอร์โมน ส่วนการศึกษาที่ผ่านมาเป็นการสังเกตพฤติกรรมเท่านั้น อย่างไรก็ตามสัตว์ชนิดอื่นๆ ในตระกูล Canidae มีความแตกต่างของระยะเวลาการเป็นสัดขึ้นกับชนิดสัตว์[8] ดังนั้น ควรมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับระยะเวลาการเป็นสัดของหมาในเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

จากการศึกษารูปแบบเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในระยะเวลา 1 ปี พบว่าหมาในตัวที่ 1 และหมาในตัวที่ 2 มีระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีระดับสูงสุดในเดือนมกราคม แต่หมาในตัวที่ 3 มีระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีระดับสูงสุดในเดือนเมษายนและเดือนกันยายน เมื่อเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีระดับสูงสุดจากนั้นจะมีการเพิ่มขึ้นของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เช่นเดียวกับที่มีการศึกษาใน maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*)[7] gray wolf (*Canis lupus*)[30] fennec fox (*Vulpes zerda*)[20] และ domestic dog (*Canis familiaris*)[31-35] จากงานวิจัยนี้พบว่าหมาในที่เพิ่งนำมาจากทวีปยุโรปได้ 3 เดือน หมาในตัวที่ 1 คลอดลูก 1 ครั้ง ในเดือนเมษายน และหมาในตัวที่ 2 คลอดลูก 1 ครั้งในเดือนมีนาคม และมีการแสดงอาการเป็นสัดให้เห็นเพียง 1 ครั้ง ในเดือนมกราคม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sosnovskii (1967) ในเชิงพฤติกรรม พบว่าหมาในจะเป็นสัตว์ที่ออกลูกปีละ 1 ครั้ง[4] และการศึกษาใน maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) พบว่าจะแสดงอาการเป็นสัดเพียงปีละ 1 ครั้ง[36] แต่หมาในตัวที่ 3 เป็นหมาในที่เกิดในประเทศไทยมีการผสมพันธุ์และแสดงพฤติกรรมเป็นสัด 2 ครั้ง ในเดือนเมษายนและกันยายน การศึกษาที่ผ่านมาในเชิงพฤติกรรมเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ของหมาในที่เลี้ยงในสวนสัตว์ของประเทศอินเดีย พบว่าหมาในจะมีการผสมพันธุ์กันตามฤดูกาลในระหว่างเดือนสิงหาคมและเดือนธันวาคม[29] และมีการศึกษาในเชิงพฤติกรรมของหมาในในประเทศอินเดียพบว่ามีการผสมพันธุ์กันในระหว่างเดือนพฤศจิกายนและเดือนเมษายน แต่หมาในที่เลี้ยงในเกาะชวาของประเทศอินโดนีเซียมีการผสมพันธุ์กันในช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม[4] จากการศึกษาที่ผ่านมาและข้อมูลของหมาในแสดงให้เห็นว่าหมาในน่าจะมีการผสมพันธุ์กันตามฤดูกาล (*breeding season*) เหมือนกับสัตว์ในตระกูล Canidae หลายชนิด พบว่าฤดูกาลมีผลต่อการขับออกของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในช่วงฤดูผสมพันธุ์ของหมาใน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) เพศผู้และเพศเมีย[36] และ african wild dogs (*Lycoon pictus*)[37] gray wolf (*Canis lupus*)[24] และ red wolf (*Canis rufus*)[18] อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปสุนัขหลังจากคลอดลูกรังไข่จะไม่ทำงานประมาณ 5-6 เดือน[38] แต่งานวิจัยนี้หมาในตัวที่ 1 และหมาในตัวที่ 2 รังไข่ไม่ทำงานประมาณ 9 เดือน สาเหตุอาจเนื่องจากในแต่ละประเทศมีความยาวของช่วงแสงแตกต่างกัน (*photoperiod*) งานวิจัยนี้พบว่าหมาใน 2 ตัวที่นำมาจากทวีปยุโรปไม่มีการแสดงพฤติกรรมเป็นสัด และมีระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในระดับต่ำกว่า basal line ตั้งแต่เดือนเมษายนถึงเดือนมกราคม อาจเป็นเพราะยังไม่ถึงฤดูกาลผสมพันธุ์ หรือเนื่องจากหมาในทั้ง 2 ตัวนี้เพิ่งมาจากทวีปยุโรปก่อนทำการศึกษาวิจัยเพียง 3 เดือน มีการศึกษาใน african wild dog (*Lycaon pictus*) พบว่าเป็นสัตว์ที่มีการผสมพันธุ์กันตามฤดูกาลอย่าง

ชัดเจน[39] แสดงว่า photoperiod สามารถควบคุมวงจรการเป็นสัดในสัตว์หลายชนิด[40] และอาจเป็นสาเหตุทำให้หมาในทั้ง 2 ตัวไม่แสดงพฤติกรรมเป็นสัดตั้งแต่เดือนเมษายนถึงเดือนมกราคม นั่นคือ หมาในอยู่ในช่วง seasonal anestrus โดยจะเห็นแสดงพฤติกรรมเป็นสัดเมื่อเข้าสู่เดือนมกราคมเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา photoperiod ในสัตว์ตระกูล Canidae เพศผู้ เช่น red wolf (*Canis rufus*)[18] silver fox (*Vulpes vulpes*)[41] และ fennec fox (*Vulpes zerda*)[20] พบการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในอุจจาระมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสงและความยาวของช่วงแสงมีความสำคัญต่อการทำงานของอัณฑะ และการศึกษาใน maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) ที่เลี้ยงในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์จะผสมพันธุ์กันไม่เกิน 1 ครั้งต่อปี[8] อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปและควรจะเก็บตัวอย่างในระยะเวลาที่มากกว่า 1 ปี เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นเกี่ยวกับฤดูกาลผสมพันธุ์ของหมาในที่เลี้ยงในประเทศไทย

การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์หมาในของประเทศอินเดียเป็นการศึกษาพฤติกรรมเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของหมาใน[4, 6, 29, 42] งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนกับพฤติกรรมทางเพศของหมาในเพศเมีย การศึกษาพบว่าหมาในทุกตัวแสดงพฤติกรรมทางเพศให้เห็นในช่วงที่มีระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีระดับสูงกว่าค่า basal line คือ พบช่องคลอดบวมแดง หมาในเพศผู้เริ่มให้ความสนใจโดยพยายามจะผสมพันธุ์หมาในเพศเมีย ซึ่งการยอมรับการผสมพันธุ์ของหมาในตัวที่ 3 จะเกิดขึ้นเมื่อมีการลดลงของระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนและมีการขึ้นของระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่พบในสัตว์ตระกูล Canidae เช่น maned wolf *(Chrysocyon brachyurus)*[7] และ fennec fox *(Vulpes zerda)*[20] พฤติกรรมทางเพศต่างๆ ของหมาในมีลักษณะเหมือนกับ domestic dog *(Canis familiaris)* และ maned wolf *(Chrysocyon brachyurus)* โดยแสดงอาการดังกล่าวในระยะ proestrus และระยะ estrus งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพฤติกรรมทางเพศของหมาในเหมือนกับที่มีการศึกษาในประเทศอินเดีย คือ หมาในมีพฤติกรรมเกี้ยวพาราสี (courtship) การปัสสาวะบ่อยๆ การส่งเสียงร้อง การเลียอวัยวะเพศ การขึ้นขี่ (mounting) และการผสมพันธุ์แบบหันหลังชนกัน (back to back posture)[29] นอกจากนี้พบการติดกัน (copulatory lock) ของหมาในตัวที่ 3 ตั้งแต่ 5 นาที 7 นาที และ 15 นาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์ตระกูล Canidae หลายชนิดเช่น crap-eating fox (*Cerdocyon thous*) maned wolf (*Chrysocyon brach yurus*) silver fox (*Vulpes vulpes*) dhole (*Cuon alpinus*) คือ ประมาณ 5-20 นาที[20]

สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจส-

เตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตร-เจนในตัวอย่างอุจจาระในการตรวจด้วยวิธี EIA รวมทั้งการสังเกตพฤติกรรมทางเพศควบคู่กับการศึกษารูปแบบของฮอร์โมนสามารถติดตามการทำงานของรังไข่ของหมาในเพศเมียได้ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการจัดการประชากรของหมาในและสัตว์ชนิดอื่นในตระกูล Canidae ที่เลี้ยงสวนสัตว์ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับฤดูกาลผสมพันธุ์ของหมาในที่เลี้ยงในสวนสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ CRC Smithsonian's National Zoological Park ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและร่วมทุกท่าน นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการฮอร์โมนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ CRC Smithsonian's National Zoological Park ที่กรุณาช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการ นายสัตวแพทย์และคนเลี้ยงสัตว์ ณ เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี จังหวัดเชียงใหม่ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างและการศึกษาพฤติกรรม

เอกสารอ้างอิง

1. International Union for Conservation or Nature and Natural Resources. IUCN Red List of Threatened Species. 2009 [cited January 15th, 2009]; Available from: http://www.iucnredlist.org.
2. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2010 [cited January 15th, 2009]; Available from: http://www.cites.org.
3. Dhole. 2010 [cited January 21th. 2009]; Available from: http://www.verdan-tplanet.org.
4. Durbin LS, Venkataraman A, Hedges S, Duckworth W. Dhole (Cuon alpinus). In: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald DW (eds.), Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group, Gland, Swit-zerland and Cambridge; 2004.
5. Venkataraman A, Johnsingh AJT. Dholes. In: Macdonald DW, Sillero-Zubiri C,editors. Biology and conservation of wild canids. Oxford: Oxford University Press; 2004. p. 323-36.
6. Paulraj S, Sundararajan N, Mani-mozhi A, Sally W. Reproduction of the Indian wild dog (Cuon alpinus) in capti-vity. Zoo Biolo. 1992; 11(4): 235-41.
7. Songsasen N, Rodden M, Brown JL, Wildt DE. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolf (Chrysocyon brachyurus). Theriogenology. 2006; 66(6-7): 1743-50.
8. Velloso AL, Wasser SK, Monfort SL,

Dietz JM. Longitudinal fecal steroid excretion in Maned Wolves (Chrysocyon brachyurus). Gen Comp Endocrinol.1998; 112(1): 96-107.

9. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. Comparative aspects of steriod hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninva sively in feces. Biol Reprod. 1994; 51: 776-86.
10. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH, Monfort SL, editors. Faecal steriod analysis for monitoring ovarian and testicular function in diverse wild carnivore, primate and ungulate species. 1st International symposium on physiologie and ethology of wild and zoo animals; 1997 September 18-21, 1996; Berlin,Germany. Gustav Fischer. 1996.
11. Lasley BL, Kirkpatrick JF. Morni-toring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroid J Zoo Wildl Med. 1991; 22: 23-31.
12. Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail MN. Excretion of infused 14C- steroid hormone via faeces and urine in domestic livestock. Anim Reprod Sci. 1996; 43: 43-63.
13. Schwarzenberger F, Mostl E, Palme R, Bamberg E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of repro ductive status in farm, wild and zoo animals Anim Reprod Sci. 1996; 42: 515 -26.
14. Graham LH, Schwarzenberger F, Mostl E, Galama W, Savage A. A versatile enzyme immunoassay for the deter mination of progestogens in feces and serum. Zoo Biology. 2001; 20: 227-36.
15. Munro CJ, Stabenfeldt GH, Cragun JR, Addiego LA, Overstreet JW, Lasley BL. The relationship of serum estradiol and progesterone concen-trations to the excretion profiles of their major urinary concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as mea-sured by enzyme-immunoassay and radio immunoassay. Clin Chem. 1991; 37: 838-44.
16. Pineda MH, Dooley MP, editors. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5 th ed. Iowa: Iowa State Press; 2003.
17. Brown JL. Wildlife endocrinology manual. CRC Endocrine research laboratory. Verginia.USA.; 2008.
18. Walker SL, Waddell WT, Goodrowe KL. Reproductive endocrine patterns in captive female and male red

wolves (Canis rufus) assessed by fecal and serum hormone analysis. Zoo Biology. 2002; 21: 321-35.

19. Gudermuth DF, Concanon PW, Daels PF, Lasley BL. Pregnancy-specific evaluation in fecal concentrations of estradiol, testosterone and proges terone in the domestic dog (Canis familiaris). Theriogenology. 1998; 50: 237-48.
20. Valdespino C, Asa CS, Bauman JE. Estrous cycles, copulation, and pregnancy in the fennec fox (Vulpes zerda). J Mammology. 2002; 83(1) :99-109.
21. Wildt DE, Levinson CJ, Seager SWJ. Laparoscopic exposure and subseq uential observation of the ovary of the cycling bith. Anat Rec. 1977; 189: 443-50.
22. Smith MS, Macdonald LE. Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and preg nantcy in the dog. Endocrinology. 1974; 94(2): 404-12.
23. Bonin M, Mondain-Monval M, Dutourne B. Oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood in pregnant red foxes (Vulpes). J Reprod Fertil. 1978; 54: 37-41.
24. Seal US, Plotka ED, Mech LD. Endocrine correlates of reproduction in the wolfl I. serum progesterone, estradiol and LH during the estrous cycle. Biolo Reprod. 1979; 21: 1057-66.
25. Concanon PW. Canine pregnancy and parturition. Vet Clin North Am: Small Anim Pract. 1986; 16: 453-75.
26. Concanon PW, Tsutsui T, Shille V. Embryo development, hormonal requ ire-ments and maternal responses during canine pregnancy. J Reprod Fertil. 2001; 57: 169-79.
27. Dial GD, Dziuk PJ. Relationship between number of induced ovulations in the prepubertal gilt to the level of progesterone and to the number of spontaneous postpuberteal ovulation. J Anim Sci. 1983; 57: 1260-9.
28. Jarrel VL, dziuk PJ. Effects of number of corpura lutea and fetuses on concentrations of progesterone in blood of goats. J Anim Sci. 1991; 69: 770-3.
29. Paulraj S, Sundararajan N, Walker AMS. Reproduction of the Indian wild dog (Cuon alpinus) in captivity. Zoo Biolo. 1992; 11(4): 235-41.
30. Seal US, Plotka ED, Mech D, Packard JM. Seasonal metabolite and reproductive cycles in wolves. In: Frank H, editor Man and wolf: advances, issues, and problems in captive wolf

research. Dordrecht, Neteherlands: Dr. W. Junk Publishers; 1987. p. 109-25.

31. Edqvist LE, Jaohansson EDB, Kass trom H, Olsson SE, Richkind M. Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oes trous cycle and pregnancy. Acta Endo crinol. 1975; 78: 554-64.
32. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Goo-drowe KL. Correlation of perio-vulatory serum and fecal progestins in the domestic dog. Can J Vet Res. 2000; 64: 59-63.
33. Olson PN, Bowen RA, Behrendt MD, Olson JD, Nett TM. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, pro estrus and estrus. Biol Reprod. 1982; 27: 1196-206.
34. Wildt DE, Panko WB, Chakraborty PK, Seager SWJ. Relationship of serum estrone, estradiol 17 beta and proges terone to LH, sexual behaviour and time of ovulation in the bitch. Biol Reprod. 1979; 20: 648-58.
35. Concanon PW, Hansel W, Mcentree K. Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovula tory luteinization in the bitch. Biol Reprod. 1977 (17): 604-13.
36. Wasser SK, Velloso AL, Rodden MD. Using fecal steriods to evaluate reproductive function in female maned wolves. J Wildl Manage. 1995; 59: 889-94.
37. Monfort SL, Wasser SK, Mashburn KL, Burke M, Brewer BA, Creel SR. Stero id metabolism and validation of noni nvasive endocrine monitoring in the African wild dog (Lycoon pictus). Zoo Biology. 1997; 16: 533-48.
38. Colle HH, Cupps PT, editors. Repro-duction in domestic animals. London: Academic Press; 1977.
39. Fram LH, Malcolm JR, Frame GW, Lawich VH. Social organization of African wild dog (Lycaon pictus) on the Serengeti Plains, Tanzania 1967-1978. Z Tierpsychol. 1979; 50: 225-49.
40. Cunningham JG, Klein BG, editors. Textbook of veterinary physiology. 4 th ed.: St. Louis MO: Saunders, 2007.
41. Forsberg M, Fougner JA, Hofmo PO, Madej M, Einarsson EJ. Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (Vulpes vulpes). J Reprod Fertil. 1989; 87: 115-23.
42. Fox MW. The Whistling hunters: field studies of the Asiatic Wild Dog *(Cuon Alpinus)*. ;New York Press; 2004.