โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ วงรอบวันและการตอบสนองต่อความเครียดของการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Circadian cycle and stress response of corticosterone secretion in hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in captivity at Talu island, Prachuap Khirikhan province

ชื่อนิสิต ชิฏิภัสร์ ณ ระนอง **เลขประจำตัว** 5832020023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ชื่อโครงงานวิจัย : วงรอบวันและการตอบสนองต่อความเครียดของการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน
ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ : นาย ชิฏิภัสร์ ณ ระนอง
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
ภาควิชา : ชีววิทยา

บทคัดย่อ

เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* เป็นเต่าทะเล 1 ใน 4 ชนิดที่มีการรายงานการขึ้นมาวางไข่บนชายหาดของประเทศไทย เต่ากระถูกจัดเป็นสัตว์ที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ตาม IUCN เนื่องจากแนวโน้มประชากรที่ลดลง ในประเทศไทยพบการทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จึงเกิดโครงการอนุรักษ์เต่ากระแบบ head-start program ที่เกาะทะลุโดยนำไข่เต่ากระไปเพาะฟักจนออกจากไข่ และอนุบาลลูกเต่าในบ่อเลี้ยงจนแข็งแรงเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต แล้วจึงปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ การเลี้ยงเต่ากระในบ่อเลี้ยงอาจทำให้เต่ากระมีความเครียดและตอบสนองโดยการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนซึ่งส่งผลกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ดี การใช้ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนเป็นตัวชี้วัดสุขภาวะในเต่ากระยังมีข้อจำกัดอยู่ เนื่องจากระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีความแตกต่างกันตลอดทั้งวัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบ 1) การเปลี่ยนแปลงในรอบวันของการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน และ 2) การตอบสนองของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนต่อการถูกจับและการกระทำที่ทำให้เกิดความเครียด ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ โดยเก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 ชั่วโมง จำนวน 14 ช่วงเวลาในรอบวัน โดยใช้เต่ากระวัยอ่อน 5 ตัวต่อช่วงเวลา เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน และ เก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0, 30, 60, 120, 240 และ 480 นาทีหลังจากจับตัวเต่ากระวัยอ่อนจำนวน 6 ตัว เพื่อใช้ศึกษาการตอบสนองต่อความเครียด นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงและแยกเก็บพลาสมาในน้ำแข็งระหว่างการเคลื่อนย้าย หลังจากนั้นจึงนำไปเก็บในตู้แช่ -20°C ก่อนนำมาตรวจสอบระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและกลูโคส ผลของการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในเต่ากระวัยอ่อนมีความแตกต่างในรอบวันโดยมีระดับสูงสุดในช่วงเริ่มมีแสงแดด (7:30 น.) และมีระดับต่ำสุดในช่วงแสงแดดเริ่มหมด (19:30 น.) ส่วนระดับกลูโคสมีความแตกต่างในรอบวันโดยมีการหลั่งสูงสุดในเวลา 9:30 น. หรือหลังจากระดับฮอร์โมนคอติโคสเตอโรนขึ้นสูงสุด 2 ชั่วโมง ทั้งนี้ไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยทางชีวภาพ แต่พบสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนกับกลูโคสที่เวลาต่างกัน 2 ชั่วโมง อีกทั้งยังพบว่าเต่ากระมีการตอบสนองในการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนต่อการกระทำที่ทำให้เกิดความเครียด ผลการศึกษาที่ได้ทำให้เข้าใจถึงสรีรวิทยาเกี่ยวกับความเครียดของเต่ากระในบ่อเลี้ยงได้ดีขึ้น

คำสำคัญ: กลูโคส, จังหวะในรอบวัน, เต่าทะเล, ปัจจัยสิ่งแวดล้อม, สรีรวิทยาเกี่ยวกับความเครียด

Research title : Circadian cycle and stress response of corticosterone secretion in hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in captivity at Talu island, Prachuap Khirikhan province

Student name : Mr.Chitipat Na Ranong

Advisor : Assistant Professor Dr.Noppadon Kitana

Department : Biology

Abstract

Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, is one of the four sea turtles that lay their eggs in Thailand. With the current rate of population decline, *E. imbricata* has been listed as a critically endangered species by the IUCN. In Thailand, hawksbill turtle nestings have been found at the Talu island, Prachuap Khirikhan province. As a result, a head-start program has been established at the island so that the eggs are incubated until hatch, and hatchlings are reared in captivity to increase the survival rate before release to the wild. Raising turtle in captivity may lead to stress response including corticosterone secretion and, consequently, suppression of immune system. However, there is a limitation on using corticosterone as a marker of health since corticosterone level is known to vary throughout the day. This study thus aims to examine for 1) circadian variation of corticosterone secretion, and 2) corticosterone response to capture and handling stress, of *E. imbricata* raised in captivity at Talu island. For circadian variation, blood samples were collected every 2 hours for 14 time points in a day with an independent set of juvenile turtles (n=5) for each time point. For stress response, blood samples were collected from a single set of juvenile turtles (n=6) at 0, 30, 60, 120 and 240, 480 minutes after capture and handling. Blood samples were centrifuged, and plasma samples were kept on ice during transportation and stored at -20°C. Plasma samples were assayed for corticosterone and glucose levels. The results shows that corticosterone secretion in the juvenile hawksbill turtle exhibits a diurnal rhythm with the peak of secretion at dawn (07:30 am) and baseline secretion at dusk (07:30 pm). Blood glucose also shows circadian variation with the peak at 9:30 am, or 2 hours after corticosterone secretion.However, there is no correlation between environmental factors and biological factors but significant correlation between corticoster one and glucose at different time 2 hours and found that sea turtle response to increase cortiocosterone on stressor . These results can be used as a basis for stress physiology of the hawksbill turtles in captivity.

Keywords: diurnal rhythm, environmental factors, glucose, sea turtle, stress physiology

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากผู้ที่เกี่ยวข้องหลายๆฝ่ายโดยเฉพาะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำและสอนการทำงานวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงการช่วยปรับปรุงและแก้ไขงานให้ออกมาสมบูรณ์ลุล่วงไปได้ด้วยดี จนกระทั่งงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงบประมาณโครงการศึกษาวิจัยเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ขอขอบพระคุณคุณปรีดา เจริญพักตร์ พี่บุญเลิศ เผือกทอง เกาะทะลุ ไอส์แลนด์ รีสอร์ท และมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ที่พัก อาหาร และอนุญาตให้ใช้เต่ากระในการทำงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณสมาชิก BioSentinel Laboratory ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษามาโดยตลอด รวมถึงช่วยเหลือในการออกภาคสนามที่เกาะทะลุ และขอขอบพระคุณพี่รชตะ มณีอินทร์ พี่พชร สิทธิชีวภาค ที่คอยให้คำแนะนำและสอนขั้นตอนต่าง ๆ ในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา เพื่อน และทุก ๆ คนที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ผ่านไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณโครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบเงินทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัยชิ้นนี้

สารบัญ

บทคัดย่อ.....ก

Abstract.....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....จ

สารบัญภาพ.....ฉ

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....3

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....12

บทที่ 4 ผลการศึกษา.....16

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา.....29

เอกสารอ้างอิง.....31

ภาคผนวก ก ข้อมูลลักษณะสัณฐานของเต่ากระ.....34

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวัน (เดือนตุลาคม 2561) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์.....12

ตารางที่ 3.2 ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (เดือนพฤศจิกายน 2561) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์.....13

ตารางที่ 4.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricate* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561.....16

ตารางที่ 4.2 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและระดับกลูโคสในเลือดของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม2561.....18

ตารางที่ 4.3 สหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางชีวภาพของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561.....21

ตารางที่ 4.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561.....22

ตารางที่ 4.5 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและระดับกลูโคสในเลือดของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561.....24

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 เต่าตนุ (green turtle) *Chelonia mydas* 4

ภาพที่ 2.2 เต่ากระ (hawksbill turtle) *Eretmochelys imbricata* 4

ภาพที่ 2.3 เต่าหญ้า (olive ridley turtle) *Lepidochelys olivacea* 5

ภาพที่ 2.4 เต่าหัวฆ้อน (loggerhead turtle) *Caretta caretta* 5

ภาพที่ 2.5 เต่ามะเฟือง (leatherback turtle) *Dermochelys coriacea*.....6

ภาพที่ 2.6 การจำแนกเต่าทะเลที่พบในประเทศไทย.....7

ภาพที่ 2.7 ลักษณะทั่วไปของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* 8

ภาพที่ 2.8 แผนที่การกระจายตัวของเต่ากระในมหาสมุทรทั่วโลก.....8

ภาพที่ 2.9 บ่ออนุบาลลูกเต่าทะเล ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี.....9

ภาพที่ 2.10 การอนุบาลลูกเต่าทะเลจากแหล่งวางไข่ในธรรมชาติ ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี.....10

ภาพที่ 2.11 การปล่อยเต่าทะเลคืนสู่ธรรมชาติ ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี.....10

ภาพที่ 2.12 กลไกการตอบสนองต่อความเครียดในการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโสเตอโรนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 11

ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงในรอบวันบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561.....17

ภาพที่ 4.2 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561.....19

ภาพที่ 4.3 ระดับกลูโคสของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561.....20

ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงในรอบวันบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561.....23

ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบกลางคืน (19:30 น. – 03:30 น.).....25

ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบเช้า (07:00 น. – 15:00 น.).....26

ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบกลางคืน (19:30 น. – 03:30 น.).....27

ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบเช้า (07:00 น. – 15:00 น.).....28

บทที่ 1
บทนำ

เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) เป็นเต่าทะเลขนาดกลาง มีการกระจายพันธุ์ในเขตอบอุ่นในมหาสมุทรทั่วโลก อีกทั้งยังเป็นเต่าทะเล 1 ใน 4 ชนิดที่มีการรายงานเกี่ยวกับการขึ้นมาวางไข่บน ชายหาดของประเทศไทย (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2556) โดยจะมีฤดูวางไข่ตลอดปีทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) เต่ากระเป็นสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ถูกจัดในกลุ่ม สิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ (critically endanger – CR) ตาม IUCN Red List (Mortimer and Donnelly, 2008) และมีอัตราการลดลงของประชากรอย่างต่อเนื่อง (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) ซึ่งสาเหตุการลดลงของเต่ากระมาจากหลายปัจจัย อาทิ สาเหตุจากมนุษย์ การติดเครื่องมือชาวประมง การลักลอบเก็บไข่เต่าทะเล การสูญเสียพื้นที่วางไข่ อีกทั้งเหตุจากธรรมชาติของตัวเต่าเองเช่น ข้อจำกัดทางชีววิทยาและวงจรชีวิตของเต่าทะเล ที่มีอัตราการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนประชากรช้าทำให้อัตราการอยู่รอดในธรรมชาติมีน้อย การถูกทำร้ายจากสัตว์ที่มีขนาดใหญ่กว่า รวมทั้งการเจ็บป่วยที่เกี่ยวข้องกับความเครียด

ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (corticosterone) คือสเตียรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) ผลิตจากต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) ในสัตว์กลุ่มนก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ฟันแทะ ซึ่งจะหลั่งออกมาเพื่อตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์ที่มีสาเหตุมาจาก ปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ ทำให้ hypothalamic-pituitary-adrenal axis กระตุ้นต่อม หมวกไตชั้นนอกหลั่งฮอร์โมนชนิดนี้เข้าสู่กระแสเลือด เมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นมีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนออกมาจะทำให้ระดับกลูโคสในเลือดของสัตว์สูงขึ้น ตลอดจนลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ โดยในกรณีของเต่าทะเลพบการเกิดโรค fibropapillomas เกิดเป็นเนื้องอกตามบริเวณต่างๆ ของร่างกายในเต่าที่มีอาการเครียดเรื้อรัง (Aguirrel et al., 1995) ทั้งเต่าที่อยู่ในธรรมชาติและเต่าในบ่อเลี้ยง (Lucero et al., 2012)

การหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในเต่าทะเลบางชนิด เช่น เต่าตนุ *Chelomia mydas* มีการหลั่งออกมาเป็นรอบ จากงานของ Jessop และคณะในปี 2001 พบว่าฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันของเต่าตนุอายุก่อนวัยเจริญพันธุ์ในบ่อเลี้ยงมีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญในเวลา 6:00 ถึง 15:00 น. ก่อนที่จะลดลงในเวลากลางคืนซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมในแต่ละวันของเต่าตนุ วงรอบการหลั่งของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันนั้นเป็นแบบ circadian คือมีการหลั่งสูงสุดตอนเช้ามืดก่อนตื่นนอนจนถึงเช้า และจะต่ำสุดในช่วงกลางคืน และยังพบว่าการหลั่งฮอร์โมนยังได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่น เช่น ระยะเวลาในการได้รับแสง (photoperiod) และฤดูกาล (season) เป็นต้น (Joseph and Meier, 1973; Muñoz et al., 2000) และยังพบว่าสัตว์มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนเพื่อ

ตอบสนองต่อความเครียดจากการถูกรบกวนในการจับตัวสัตว์อีกด้วย โดยจากงานของ Hunt และคณะในปี 2016 พบว่าเมื่อนักวิทยาศาสตร์ใช้เวลาจับและทดลองกับเต่ามะเฟือง *Dermochelys coriacea* มากขึ้น จะทำให้ปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในเต่ากระนั้นยังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจสอบวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันหรือผลของความเครียดจากการถูกจับตัวต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคเสตอโรน

เกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นพื้นที่ปกปักพันธุกรรมในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ร่วมกับมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม ได้มีการดำเนินโครงการเป็นเกาะปิดและฟื้นฟูแนวปะการังมากกว่า 12 ปี ต่อมาได้พบเต่ากระจากธรรมชาติ ขึ้นมาวางไข่บนชายหาดของเกาะ จึงนำไข่เต่ากระไปเพาะเลี้ยง อนุบาลลูกเต่าจนแข็งแรงและโตพอจึงปล่อยคืนธรรมชาติ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเต่ากระเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีส่วนทำให้จำนวนประชากรเต่ากระในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นในอนาคตด้วย (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากร ทะเลสยาม, 2013) การเลี้ยงลูกเต่ากระจำเป็นต้องควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น การควบคุมสภาพน้ำ อุณหภูมิ ชนิดอาหาร และความหนาแน่นของลูกเต่าในบ่อเลี้ยง เป็นต้น หากสภาวะต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นไม่เหมาะสมอาจนำมาซึ่งความเครียดของลูกเต่ากระในที่เพาะเลี้ยงได้ (Reece and Lisa, 2011)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
2. เพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

บทที่2

ทบทวนวรรณกรรม

1. เต่าทะเลในประเทศไทย

การจำแนกเต่าทะเลตามอนุกรมวิธาน

อาณาจักร: Animalia

ไฟลัม: Chordata

ชั้น: Reptilia

อันดับ: Testudines

อันดับย่อย: Cryptodira

เต่าทะเลที่พบในประเทศไทยมี 5 ชนิด แบ่งได้เป็น 2 วงศ์ (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) คือ

1. วงศ์ Cheloniidae มีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่

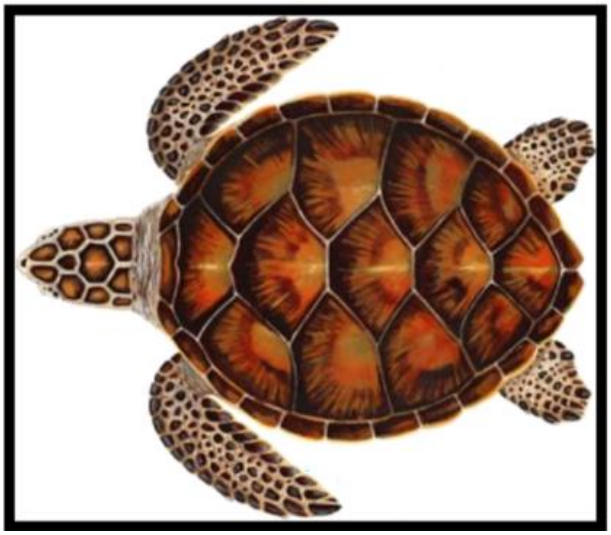
1.1 เต่าตนุ (green turtle) *Chelonia mydas* ลักษณะเด่นคือ เกล็ดส่วนหัว (prefrontal scute) มีจำนวณ 1 คู่ กระดองด้านข้าง (costal scute) จะมีเกล็ดเรียงกัน 4 แผ่น และขอบเกล็ดจะมีลักษณะที่เชื่อมต่อกันไม่ซ้อนทับกัน (ภาพที่ 2.1 และ 2.6)

1.2 เต่ากระ (hawksbill turtle) *Eretmochelys imbricata* ลักษณะเด่นคือ บริเวณปากค่อนข้างแหลมคล้ายปากเหยี่ยว เกล็ดส่วนหัว (prefrontal scute) มีจำนวน 2 คู่ และขอบเกล็ดจะมีลักษณะซ้อนกัน (ภาพที่ 2.2 และ 2.6)

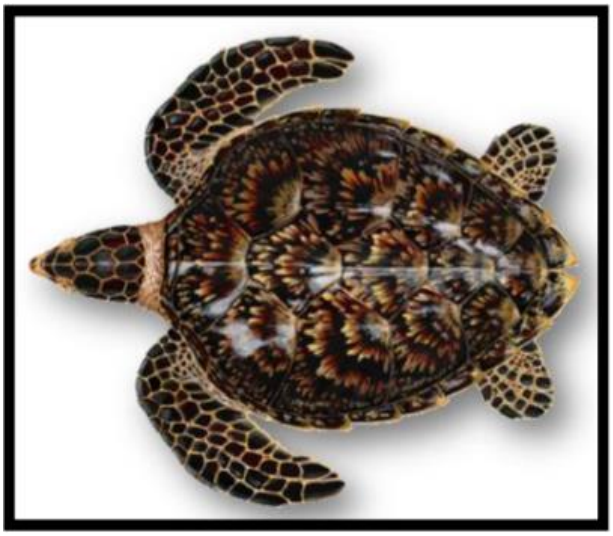
1.3 เต่าหญ้า (olive ridley turtle) *Lepidochelys olivacea* ลักษณะเด่นคือ บริเวณปากจะมน เกล็ดบนกระดองด้านข้าง (costal scute) จะมีจำนวน 6-8 แผ่น (ภาพที่ 2.3 และ 2.6)

1.4 เต่าหัวฆ้อน (loggerhead turtle) *Caretta caretta* ลักษณะเด่นคือ เกล็ดส่วนหัว (prefrontal scute) มีจำนวน 2 คู่ กระดองด้านข้าง (costal scute) จะมีเกล็ดเรียงกัน 5 แผ่น (ภาพที่ 2.4 และ 2.6)

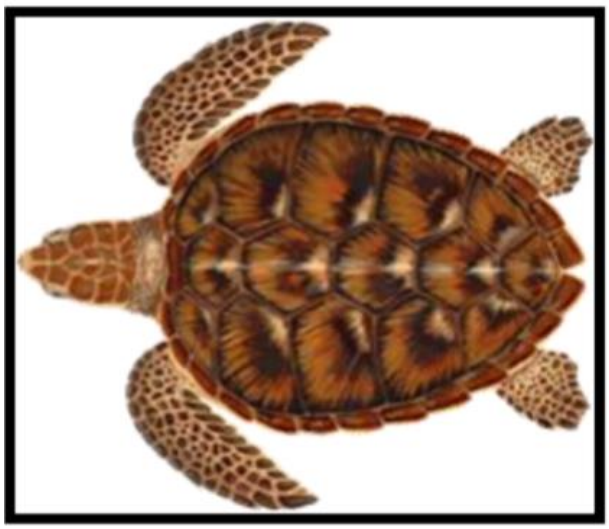
2. วงศ์ Dermochelyidae มีทั้งหมด 1 ชนิด ได้แก่ เต่ามะเฟือง (leatherback turtle) *Dermochelys coriacea* ลักษณะเด่นคือ ลักษณะของกระดองเป็นแผ่นหนังหนาสีดำ ไม่มีเกล็ดปกคุลมตลอดลำตัว และบริเวณปากมีลักษณะเป็นหยัก 3 หยัก (ภาพที่ 2.5 และ 2.6)



ภาพที่ 2.1 เต่าตนุ (green turtle) *Chelonia mydas* (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556)

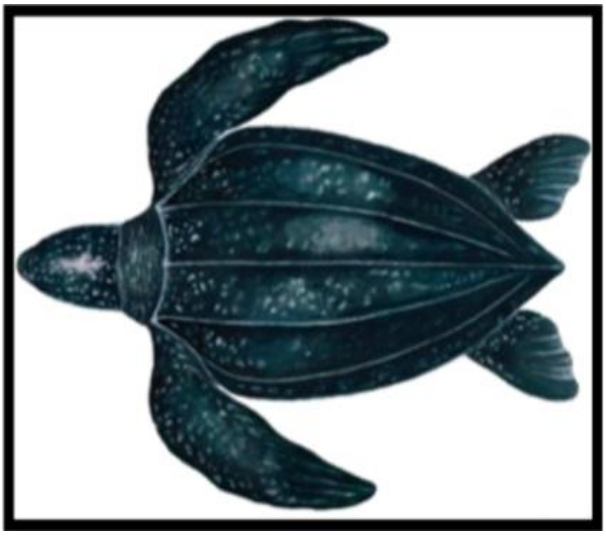


ภาพที่ 2.2 เต่ากระ (hawksbill turtle) *Eretmochelys imbricata* (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556)

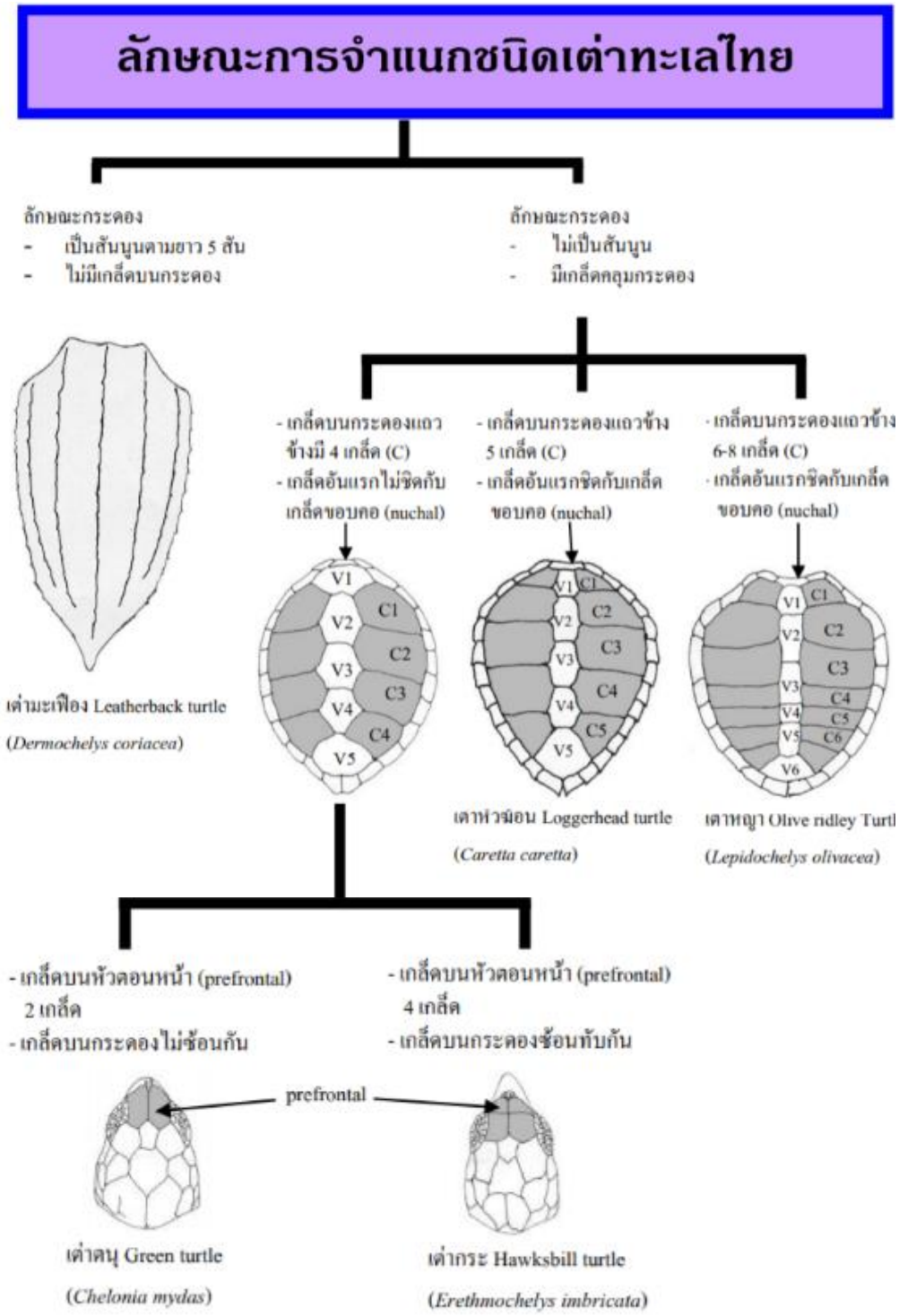


ภาพที่ 2.3 เต่าหญ้า (olive ridley turtle) *Lepidochelys olivacea* (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556)

ภาพที่ 2.4 เต่าหัวฆ้อน (loggerhead turtle) *Caretta caretta* (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556)



ภาพที่ 2.5 เต่ามะเฟือง (leatherback turtle) *Dermochelys coriacea* (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556)

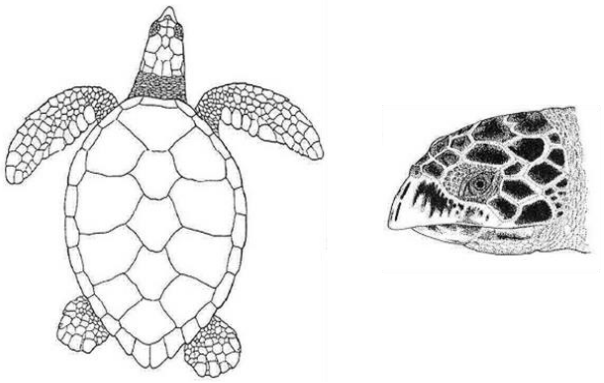


แผนผังแสดงการจำแนกชนิดเต่าทะเลของไทย (ดัดแปลงมาจาก Limpus, 1992)

ภาพที่ 2.6 การจำแนกเต่าทะเลที่พบในประเทศไทย (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556)

2. เต่ากระ *Eretmochelys imbricata*

เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) เป็นเต่าทะเลขนาดกลาง มีการกระจายพันธุ์ในเขตอบอุ่นในมหาสมุทรทั่วโลก อีกทั้งยังเป็นเต่าทะเล 1 ใน 4 ชนิดที่มีการรายงานเกี่ยวกับการขึ้นมาวางไข่บน ชายหาดของประเทศไทย (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2556) โดยจะมีฤดูวางไข่ตลอดปีทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามันของประเทศไทย (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) แต่ในปัจจุบันมีแนวโมที่จะลดลงของประชากรเต่ากระทั่วโลก (National Marine Fishries Sevice and U.S Fish and Wildlife Service, 2013) โดยการลดลงของประชากรโดยมีสาเหตุมาจาก การติดเครื่องมือชาวประมง การสูญเสียพื้นที่วางไข่ การลักลอบเก็บไข่เต่าทะเล อีกทั้งเหตุจากข้อจำกัดทางชีววิทยาของตัวเต่าทะเล รวมถึงการเจ็บป่วยที่เกิดขึ้น ในประเทศไทยเกาะทะลุ จ. ประจวบคีรีขันธ์ เป็นสถานที่ที่พบเต่ากระจากทะเลขึ้นวางไข่ที่เกาะแห่งนี้ อีกทั้งยังเป็นพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ร่วมกับมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม ได้ทำการเก็บไข่เต่ามาทำการฟัก อนุบาลก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ



ภาพที่ 2.7 ลักษณะทั่วไปของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus 1766) (North Carolina Aquarium at Fort Fisher, 2019)

ภาพที่ 2.8 แผนที่การกระจายตัวของเต่ากระในมหาสมุทรทั่วโลก (North Carolina Aquarium at Fort Fisher, 2019)

3. Headstart Program

การนำไข่เต่าทะเลจากธรรมชาติมาทำการเพาะฟัก และทำการอนุบาลลูกเต่าทะเลให้สุขภาพที่แข็งแรง จนสามารถมาเอาชีวิตรอดในธรรมชาติได้ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตของลูกเต่าทะเลเพิ่มสูงขึ้น หรือHeadstart Program จะสามารถส่งผลให้การอนุรักษ์ประชากรของเต่าทะเลในธรรมชาติได้ ที่ผ่านมาในหลายที่ได้จัดตั้ง Head Program สำหรับเต่าทะเล และพบว่าประสบความสำเร็จในการเลี้ยงดูลูกเต่าทะเล ก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติได้ เช่น ที่เกาะ Fenfushi, Maldives ได้ทำการเก็บไข่เต่าตนุ *Chelonia mydas* จากธรรมชาติทำการเพาะฟัก และอนุบาลก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ หรือจะเป็นที่ เกาะ Padre ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (*Bowen et al., 1994*) ได้ทำการเก็บไข่เต่าหญ้าแอตแลนติก *Lepidochelys kempii* จากธรรมชาติทำการเพาะฟัก และอนุบาลก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ และ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีการนำไข่เต่าตนุ *Chelonia mydas* ที่วางไข่จากหาดธรรมชาติในอ่าวไทย มาทำการเพาะฟัก และอนุบาลก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ (ภาพที่ 2.9-2.11)

Headstart Program มีรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการอนุรักษ์เต่าทะเล โดยเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดในระยะแรกฟัก แต่ในการเลี้ยงดูเต่าทะเลในบ่อเลี้ยงจำเป็นต้องความคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น การควบคุมสภาพน้ำ อุณหภูมิ ชนิดอาหาร และความหนาแน่นของลูกเต่าในบ่อเลี้ยง โดยถ้าการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้การอนุบาลลูกเต่ามีประสิทธิภาพที่ดี จะทำให้สามารถปล่อยเต่าทะเลสู่กลับธรรมชาติได้ แต่ถ้าปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นไม่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกเต่าจะทำให้เกิดความเครียดของลูกเต่ากระในที่เพาะเลี้ยงได้ ความเครียดที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อสุขภาวะของเต่าทะเลในบ่อเลี้ยงได้ทำให้ Headstart Program จะมีประสิทธิภาพที่ลดลงได้

ภาพที่ 2.9 บ่ออนุบาลลูกเต่าทะเล ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี

ภาพที่ 2.10 การอนุบาลลูกเต่าทะเลจากแหล่งวางไข่ในธรรมชาติ ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี

ภาพที่ 2.11 การปล่อยเต่าทะเลคืนสู่ธรรมชาติ ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จังหวัดชลบุรี

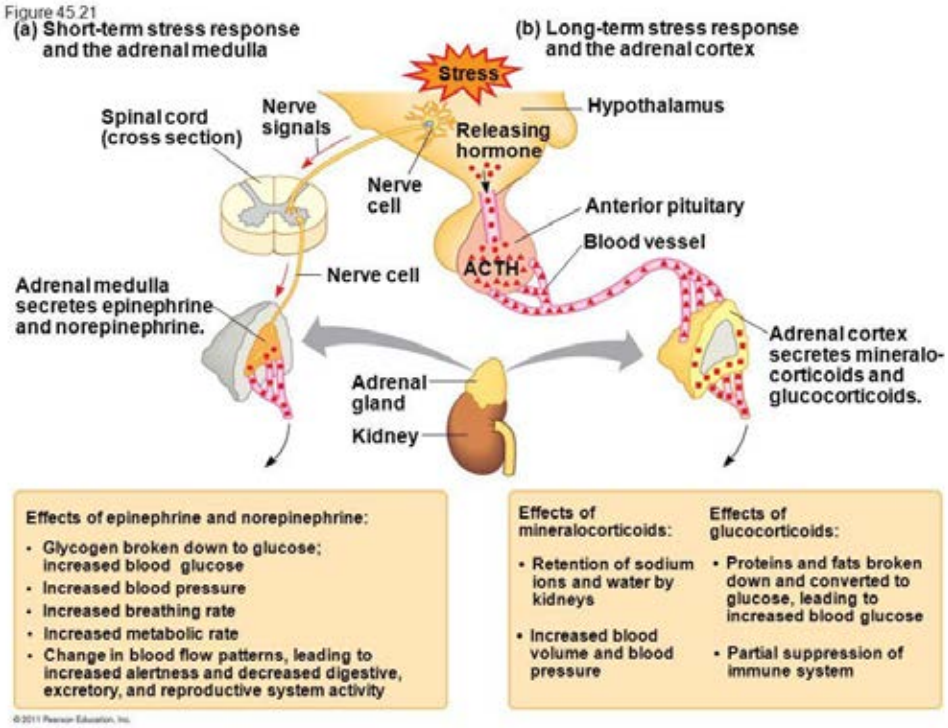
4. ฮอร์โมนความเครียด (Corticosterone)

การตรวจสอบสุขภาวะของเต่าทะเลก่อนที่จะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ สามารถตรวจสอบได้จากระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนที่หลั่งออกมาเพื่อต่อสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น โดยเมื่อสัตว์ได้รับความเครียดจะหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนซึ่งเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ โดยจะหลั่งออกมาเพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นทำให้ hypothalamic-pituitary-adrenal axis กระตุ้นต่อมหมวกไตชั้นนอกหลั่งฮอร์โมนชนิดนี้เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับกลูโคส และ ลดการทำงานระบบภูมิคุ้มกัน (ภาพที่ 2.12; Reece and Lisa, 2011) และจากการศึกษาของ Madiger และคณะในปี 2016 พบว่าฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนเป็นตัวชี้วัดผลกระทบทางสรีรวิทยาทางความเครียดของเต่าทะเลและเป็นตัวชี้วัดสุขภาวะของเต่าทะเล

การใช้ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนเป็นตัวชี้วัดสุขภาวะของเต่ากระในบ่อเลี้ยงยังมีข้อจำกัด เนื่องจาก การศึกษาของ Jessop และคณะในปี 2001 พบว่าในเต่าตนุ *Chelonia mydas* ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันอย่างมีนัยสำคัญ โดยจะมีระดับของฮอร์โมนสูงที่สุดในช่วงที่เต่าตนุได้รับแสงแดด และมีค่าต่ำสุดในช่วงที่ไม่มีแสงแดด การเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงเวลาที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนที่ไม่เท่ากัน ทำให้การใช้ความเครียด

ในการเป็นตัวชี้วัดสุขภาวะของเต่ากระต้องทราบว่ามีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน เพื่อนำมาใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างเลือด

การกระทำที่ทำให้เกิดความเครียดก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน จากการศึกษาของ Hunt และคณะในปี 2016 ได้ทำการศึกษาเวลาในการกระทำต่อตัวเต่ามะเฟือง *Dermochelys coriacea* ต่อระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน พบว่าเวลาในการกระทำต่อเต่ามะเฟืองมากจะส่งผลให้ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีค่ามากขึ้น



ภาพที่ 2.12 กลไกการตอบสนองต่อความเครียดในการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโสเตอโรนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Reece and Lisa, 2011)

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

สัตว์ทดลอง

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “สุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเลในระบบนิเวศเกาะ” ซึ่งได้รับอณุญาตให้ทำการประมงเพื่อประเพื่อประโยชน์ทางวิชาการจากกรมประมง (หนังสืออนุญาตเลขที่ 11/2559 ลงวันที่ 23 กันยายน 2559) และขั้นตอนในการกระทำต่อสัตว์ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการการ ควบคุมดูแล การเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย (Animal Use Protocol Number 1623013)

ใช้เต่ากระอายุประมาณ 10-13 เดือน จากบ่ออนุบาลลูกลูกเต่ากระ เกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเก็บตัวอย่างเลือด 2 ครั้ง ในเดือนตุลาคม 2561 เพื่อศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน จำนวน 70 ตัว และในเดือนพฤศจิกายน 2561 เพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน จำนวน 12 ตัว รวมทั้งหมด 80 ตัว

การบันทึกปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของบ่อเลี้ยง

บันทึกปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ เวลาที่พระอาทิตย์ขึ้นและตก, ความเข้มแสง, อุณหภูมิอากาศ บริเวณบ่อเลี้ยง, อุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยง, pH และความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยง

การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (เดือนตุลาคม 2561) จะเก็บตัวอย่างเลือดในเต่ากระจำนวน 5 ตัวทุก 2 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวัน (เดือนตุลาคม 2561) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์

	วันที่ 13 ตุลาคม 2561						วันที่ 14 ตุลาคม 2561							
ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
เวลา	13:30	15:30	17:30	19:30	21:30	23:30	01:30	03:30	05:30	07:30	09:30	11:30	13:30	15:30

การเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (เดือนพฤศจิกายน 2561) จะเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ 2 รอบ (รอบละ 6 ตัว) คือ รอบเช้า (07:00) และรอบค่ำ (19:30) ในช่วงหลังเก็บตัวอย่างเลือดในครั้งแรก (07:00 และ 19:30) จะทำการ ชั่งน้ำหนัก วัดความกว้างความยาว เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะสัณฐานของเต่ากระ และ ถ่ายรูป ซึ่งใช้เวลาในการกระทำต่อสัตว์ประมาณ 6-12 นาที และจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดซ้ำตามระยะเวลา ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3.2 ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (เดือนพฤศจิกายน 2561) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์

	เวลา					
รอบเช้า	07:00	07:30	08:00	09:00	11:00	15:00
รอบเย็น	19:30	20:00	20:30	21:30	23:30	03:30

เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มขนาด 25 Ga ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาที่กลั้วด้วย heparin เจาะเลือดบริเวณ dorsal cervical sinus ซึ่งอยู่บริเวณใต้กระดองด้าน dorsal ใกล้กับกระดูกคอชิ้นสุดท้าย เจาะในแต่ละครั้งจะไม่เกินครั้งละ 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม (Heatley and Johnson, 2009) นำใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไปแช่ในถังน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน corticosterone ในพลาสมาด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELSA)

นำเลือดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไปปั่นเหวี่ยงด้วย microcentrifuge ด้วยความเร็ว 1000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดแยกส่วนพลาสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปตรวจหาระดับฮอร์โมนและระดับน้ำตาลกลูโคสต่อไป

นำพลาสมาของเต่ากระที่มาตรวจหาระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ชุดการตรวจสอบ Corticosterone EIA Kit จากบริษัท Arbor assays ซึ่งอาศัยการจับตัวอย่างจำเพาะของแอนติบอดีกับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน และมีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้ (วรภัทร สวัสดิ์วงษ์, 2559)

นำตัวอย่างพลาสมา 10 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ dissociation reagent 10 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาเจือจางด้วย assay buffer 180 ไมโครลิตร (คิดเป็นอัตราส่วนการเจือจาง 1:20) เพื่อให้มีปริมาณฮอร์โมนเหมาะสมต่อการตรวจสอบ

เติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5 และ 156.25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate ที่เคลือบด้วย donkey anti-sheep IgG ตัวอย่างละ 2 หลุม และเติม assay buffer ลงในหลุม non-specific binding (NSB) 75 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุม กับหลุม maximum binding (B0 หรือ 0 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุม

เติมสารละลาย corticosterone-peroxidase conjugate 25 ไมโครลิตรลงไปในทุกหลุม ตามด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน 25 ไมโครลิตรลงไปในทุกหลุม (ยกเว้นหลุม NSB) ก่อนปิดด้วย plate sealer และเขย่าด้วย orbital plate shaker ด้วยความเร็วต่ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เทตัวอย่างในเพลททิ้ง เคาะเพลทบนกระดาษซับ แล้วล้างเพลทด้วย wash buffer 4 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะเติม wash buffer ลง 96 well plate หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วเทสารในเพลททิ้ง และเคาะเพลท บนกระดาษซับ

เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ peroxidase (TMB substrate) 100 ไมโครลิตรลงไปในทุกหลุม ปิดด้วย plate sealer แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม stop solution (1M hydrochloric acid) 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader (Multiskan EX, ThermoLabsystems) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณฮอร์โมนของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

การตรวจวัดปริมาณ glucose โดยวิธี LT Test™ Glucose (Oxidase)

ส่งตัวอย่างพลาสมาเต่ากระไปตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อวิเคราะห์ระดับน้ำตาลกลูโคส

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลปริมาณปัจจัยทางกายภาพได้แก่ ความเข้มแสง, อุณหภูมินอกบ่อเลี้ยง, อุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยง, pH และความเค็ม หาค่าเฉลี่ย (mean) โดยใช้โปรแกรม Excel 2016 และนำข้อมูลปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนและกลูโคส มาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และทดสอบการกระจายตัวปกติแบบของข้อมูลและความเท่าเทียมของความแปรปรวนก่อนนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย เพื่อดูวงรอบการหลั่งของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและดูผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนโดยใช้ parametric test (one-way ANOVA และ Tukey HSD) หรือ non parametric test (Kruskal Wallis test และ Dunn test) ส่วนการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกสิ่งแวดล้อมกับปัจจัยทางชีวภาพจะใช้ Pearson’s หรือ Spearman's correlation

บทที่ 4

ผลการศึกษา

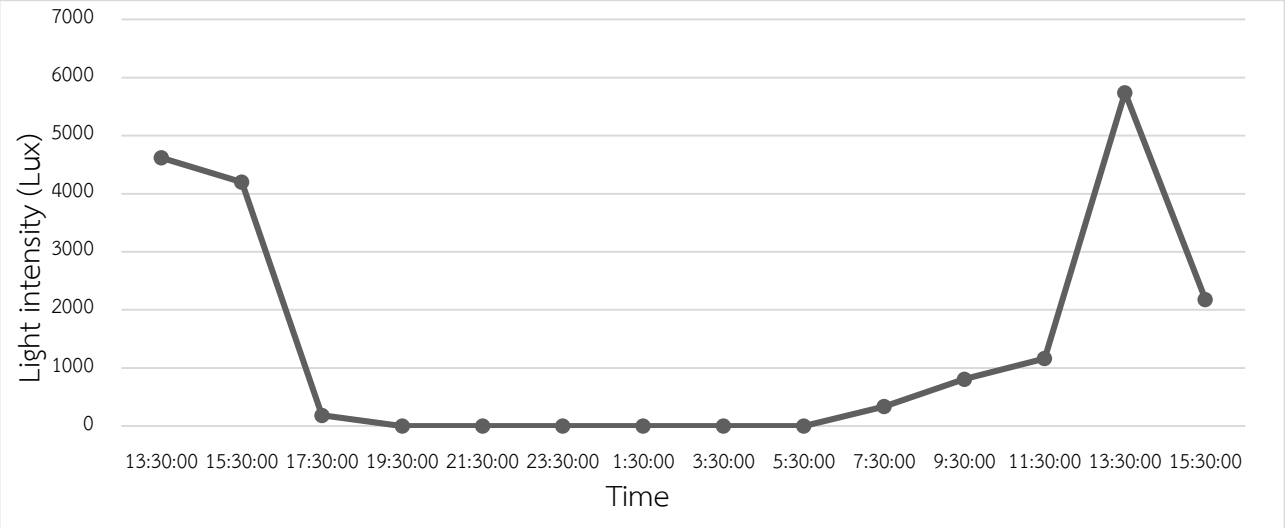
1. การศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันของเต่ากระในบ่อเลี้ยง

การศึกษานี้ ได้เก็บปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบริเวณบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561 ทั้งหมด 4 ค่า ได้แก่ อุณหภูมิอากาศ, อุณหภูมิน้ำ, ค่ากรด-ด่างของน้ำในบ่อเลี้ยง (pH) และค่าความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยง (salinity) ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561

วันที่	เวลา	อุณหภูมิอากาศ (°C)	อุณหภูมิน้ำ (°C)	pH	Salinity (ppt)
13/10/2561	13:30	30	30.4	6	30
13/10/2561	15:30	30	30.3	6	29
13/10/2561	17:30	28	28.1	6	29
13/10/2561	19:30	27	27.2	6	30
13/10/2561	21:30	28	28.0	6	30
13/10/2561	23:30	28	26.8	6	29
14/10/2561	01:30	26	26.0	6	29
14/10/2561	03:30	25	25.6	6	30
14/10/2561	05:30	28	26.3	6	29
14/10/2561	07:30	27	27.5	6	30
14/10/2561	09:30	28	29.7	6	29
14/10/2561	11:30	30	30.4	6	29
14/10/2561	13:30	31	31.1	6	28
14/10/2561	15:30	30	30.7	6	30

การวัดความเข้มแสงในรอบวันบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561 ได้ค่าดังแสดงในภาพที่ 4.1 โดยพบว่าช่วงเวลาที่พระอาทิตย์ตก (หลัง 17:30 น.) จนถึงช่วงก่อนพระอาทิตย์ขึ้น (06:00 น.) เป็นช่วงที่มีความเข้มแสงต่ำที่สุด



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงในรอบวันบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561 มาทำการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน และระดับกลูโคสในเลือด ได้ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.2

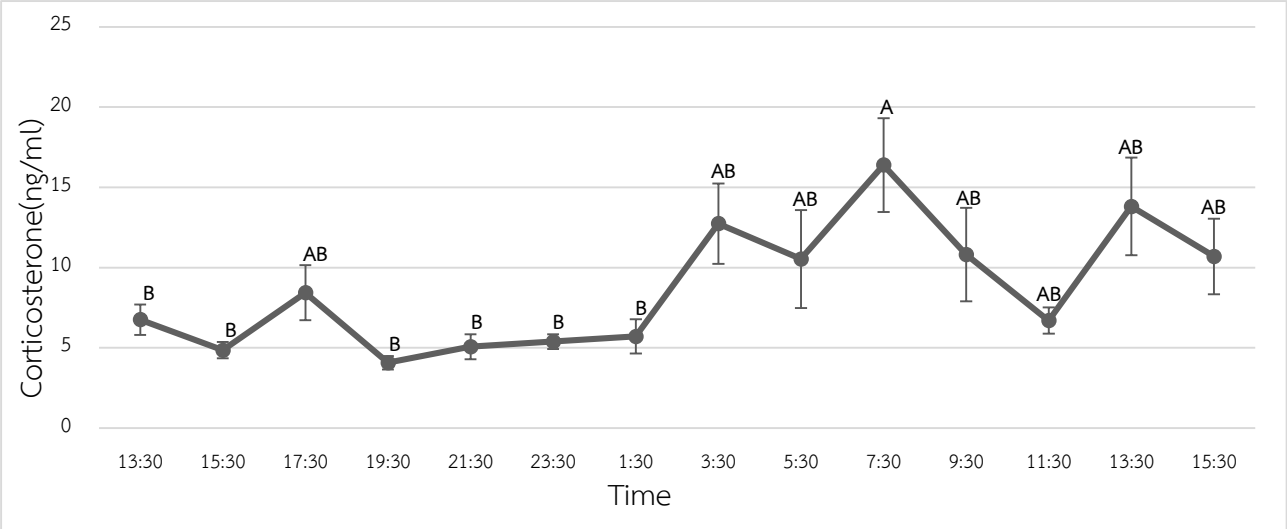
ตารางที่ 4.2 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและระดับกลูโคสในเลือดของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561

วันที่	เวลา	จำนวนตัวอย่าง	ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (ng/ml)	กลูโคส (mg/dl)
13/10/2561	13:30	5	6.75±2.12	102.2±11.05
13/10/2561	15:30	5	4.85±1.16	94.6±7.17
13/10/2561	17:30	5	8.43±3.82	103.2±15.42
13/10/2561	19:30	5	4.07±0.94	92.8±17.77
13/10/2561	21:30	5	5.06±1.74	105.2±24.56
13/10/2561	23:30	5	5.38±1.02	112.6±11.57
14/10/2561	01:30	5	5.71±2.38	114.0±15.73
14/10/2561	03:30	5	12.73±5.61	123.2±23.05
14/10/2561	05:30	5	10.53±6.83	117.2±8.32
14/10/2561	07:30	5	16.39±6.56	127.2±9.96
14/10/2561	09:30	5	10.81±6.50	170.4±71.37
14/10/2561	11:30	5	6.69±1.83	132±20.24
14/10/2561	13:30	5	13.81±6.79	145.4±7.17
14/10/2561	15:30	5	10.70±5.27	134.6±7.96

เมื่อนำข้อมูลมาทดสอบหาความแตกต่างของระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนที่เวลา 13:30 น. และ 15:30 น. ของวันที่ 13 และ 14 ตุลาคม 2561 เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่มีการซ้อนทับกัน พบว่าที่เวลา 13:30 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.057$) ในส่วนเวลา 15:30 น. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.042$) เนื่องจากมีความแตกต่างกันบางช่วงเวลา จึงไม่นำข้อมูลมารวมกัน และวิเคราะห์ข้อมูลแบบ 14 ช่วงเวลา โดยมีระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนอยู่ในช่วง 3.09 – 23.20 ng/mL

1.1 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในรอบวัน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าระดับของฮอรโมนคอร์ติโคสเตอโรนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ภาพที่4.2) โดยมีค่าสูงสุดของระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนอยู่ในช่วงเวลา 07:30 น. เป็นช่วงเวลาที่เริ่มมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มแสงในรอบวัน และมีค่าต่ำสุดของ ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนอยู่ในช่วงเวลา 19:30 น. เป็นช่วงเวลาที่ไม่มีแสง



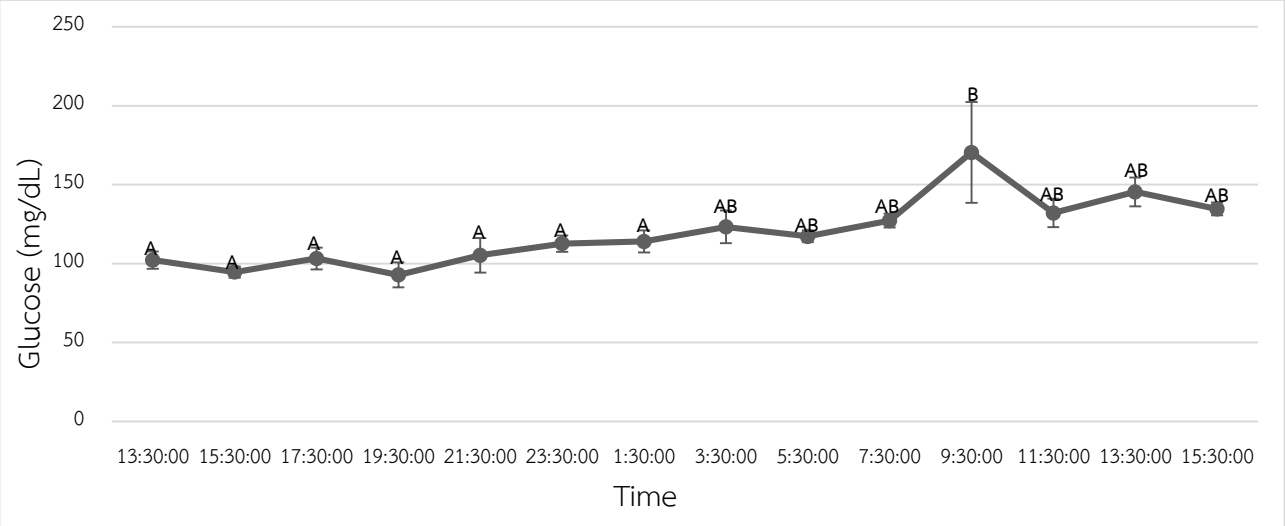
ภาพที่ 4.2 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Kruskal Wallis test และจัดกลุ่มด้วย Dunn test

1.2 ระดับกลูโคสของเต่ากระ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบหาความแตกต่างของระดับกลูโสที่เวลา 13:30 น. และ 15:30 น. ของวันที่ 13 และ 14 ตุลาคม 2561 เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่มีการซ้อนทับกัน พบว่าทั้งสองช่วงเวลา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างวัน จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ 14 ช่วงเวลา

พบว่าระดับกลูโคสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$,ภาพที่ 4.3) โดยมีค่าสูงสุดของระดับกลูโคสอยู่ในช่วงเวลา 09:30 น. เป็นช่วงเวลาที่เริ่มมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มแสงในรอบวันผ่านไป 2 ชั่วโมง และมีค่าต่ำสุดของระดับกลูโคสอยู่ในช่วงเวลา 19:30 น. เป็นช่วงเวลาที่ไม่มีแสง



ภาพที่ 4.3 ระดับกลูโคสของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย One-way ANOVA และจัดกลุ่มด้วย Tukey HSD

1.3 ค่าสหสัมพันธ์

1.3.1 สหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางชีวภาพ (ตารางที่ 4.3)

เมื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (pH, ความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยง, อุณหภูมิอากาศบริเวณบ่อเลี้ยง, อุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยง และความเข้มแสง) และปัจจัยทางชีวภาพ (คอร์ติโคสเตอโรน และกลูโคส) ที่ได้จากการศึกษา ไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสอง

ตารางที่ 4.3 สหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางชีวภาพของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561

	Glucose	Salinity	Temperature (air)	Temperature (water)	light intensity	Corticosterone level
Glucose		r=-0.0524 p=0.829	r=-0.0640 p=0.828	r=0.313 p=0.276	r=0.900 p=0.760	r=0.161 p=0.184
Salinity			r=-0.381 p=0.178	r=-0.243 p=0.403	r=-0.331 p=0.248	r=-0.0524 p=0.859
Temperature (air)				r=0.909 p=0.00000652	r=0.791 p=0.000748	r=-0.0640 p=0.828
Temperature (water)					r=0.791 p=0.000755	r=0.0353 p=0.905
light intensity						r=0.102 p=0.727

1.3.2 สหสัมพันธ์ระหว่างคอร์ติโคสเตอโรนและกลูโคส

เมื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์คอร์ติโคสเตอโรน และกลูโคสในช่วงเวลาที่ตรงกัน ที่ได้จากการศึกษา ไม่พบสหสัมพันธ์คอร์ติโคสเตอโรนและกลูโคสในช่วงเวลาที่ตรงกัน (ตารางที่ 4.3)

อย่างไรก็ดีเมื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์คอร์ติโคสเตอโรน และกลูโคสในช่วงเวลาที่ต่างกัน 2 ชั่วโมง ที่ได้จากการศึกษาพบสหสัมพันธ์คอร์ติโคสเตอโรนและกลูโคสในช่วงเวลาที่ต่างกัน 2 ชั่วโมง (Pearson’s correlation : r=0.243, p=0.0427)

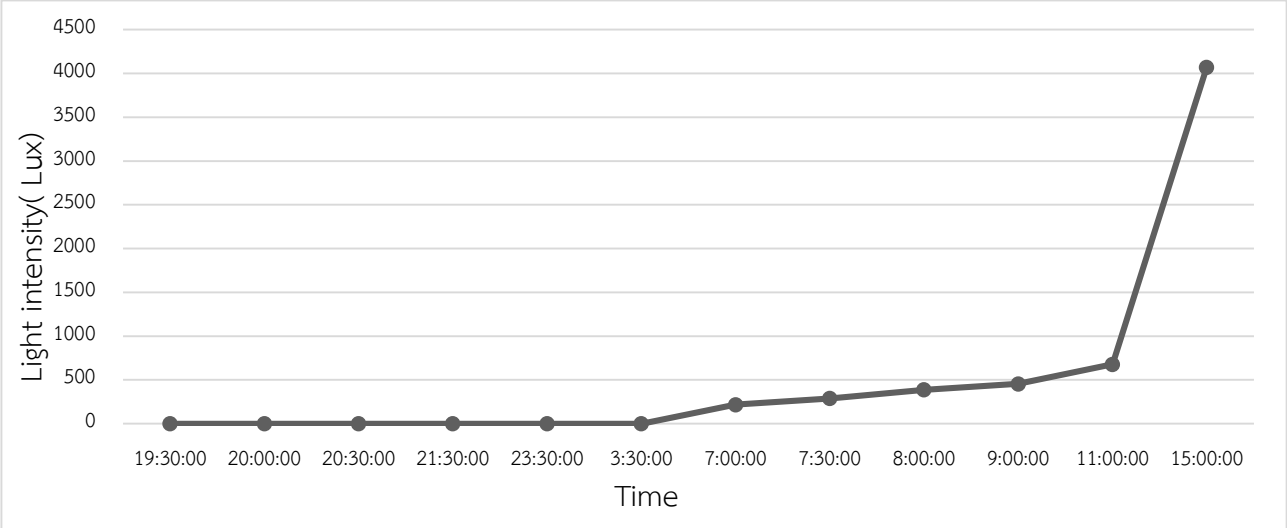
2. การศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง

การศึกษาตอนที่ 2 ได้เก็บปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบริเวณบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561 ทั้งหมด 4 ค่า ได้แก่ อุณหภูมิอากาศ, อุณหภูมิน้ำ, ค่ากรด-ด่างของน้ำในบ่อเลี้ยง (pH) และค่าความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยง (salinity) ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561

วันที่	เวลา	อุณหภูมิอากาศ (°C)	อุณหภูมิน้ำ (°C)	pH	Salinity (ppt)
24/11/2561	19:30	28.5	27.1	6.5	32
24/11/2561	20:00	28.5	26.9	6.5	32
24/11/2561	21:30	28.5	27.2	6.5	32
24/11/2561	23:30	28.0	26.9	6.5	32
24/11/2561	21:30	28.0	27.2	6.5	32
25/11/2561	03:30	26.0	26.8	6.5	32
25/11/2561	07:00	25.5	26.6	6.0	32
25/11/2561	07:30	26.0	26.4	6.0	31
25/11/2561	08:00	26.5	26.7	6.0	31
25/11/2561	09:00	28.0	25.9	6.0	31
25/11/2561	11:00	29.5	25.8	6.0	31
25/11/2561	15:00	30.0	25.2	6.0	31

เมื่อทำการวัดความเข้มแสงในรอบวันบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561 ได้ค่าดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยพบว่าช่วงที่ไม่มีแสงจากพระอาทิตย์แล้ว คือ ช่วง 07:30 - 04:00 น. (โดยประมาณ)



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงในรอบวันบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561

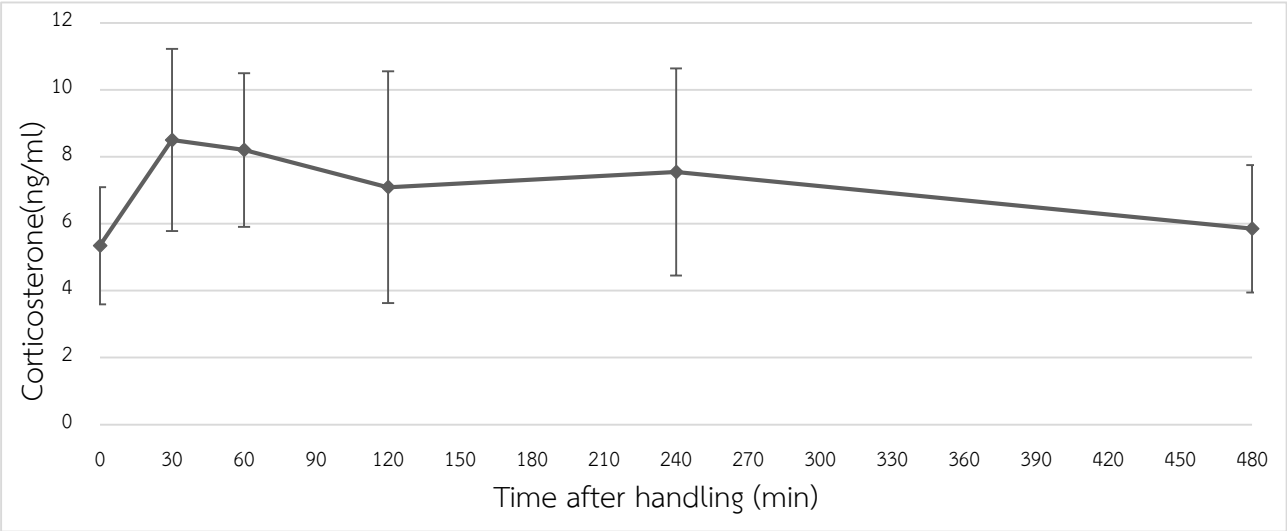
จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561 มาทำการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน และระดับกลูโคสในเลือด ได้ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและระดับกลูโคสในเลือดของเต่ากระกระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561

วันที่	เวลา	จำนวนตัวอย่าง	ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (ng/ml)	กลูโคส (mg/dl)
รอบกลางคืน (ไม่มีแสงแดด)				
24/11/2561	19:30	6	5.34±1.75	96.33±11.25
24/11/2561	20:00	6	8.50±2.72	107.60±47.30
24/11/2561	21:30	6	8.20±2.30	105.83±24.91
24/11/2561	23:30	6	7.09±3.46	111.33±18.16
24/11/2561	21:30	6	7.54±3.10	113.60±50.56
25/11/2561	03:30	6	5.85±1.90	110.25±58.34
รอบเช้า (มีแสงแดด)				
25/11/2561	07:00	6	6.87±1.79	105.50±10.13
25/11/2561	07:30	6	18.79±6.16	106.83±6.40
25/11/2561	08:00	6	14.38±5.74	108.00±48.57
25/11/2561	09:00	6	8.93±1.61	114.33±13.53
25/11/2561	11:00	6	6.58±0.80	106.25±56.14
25/11/2561	15:00	6	6.78±1.80	113.83±11.60

2.1 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในรอบกลางคืน (ไม่มีแสงแดด)

จากการศึกษาในรอบกลางคืน พบว่าเมื่อเริ่มกระทำให้เกิดความเครียดโดยจับเต่ากระจากบ่อเลี้ยงนำมาเจาะเลือด ชั่งน้ำหนัก วัดขนาดสัณฐาน และบันทึกภาพ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6-12 นาที พบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบกลางคืนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.248, ภาพที่ 4.5)

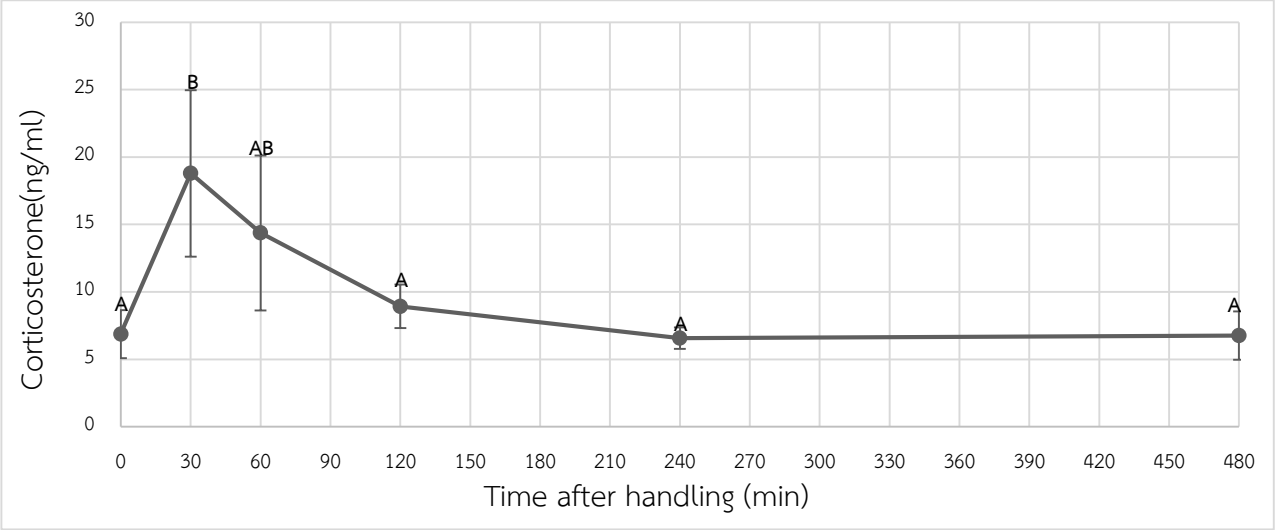


ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบกลางคืน (19:30 น. – 03:30 น.)

หมายเหตุ ทดสอบด้วย One-way ANOVA

2.2 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในรอบเช้า (มีแสงแดด)

จากการศึกษาในรอบเช้า พบว่าเมื่อเริ่มกระทำให้เกิดความเครียดโดยจับเต่ากระจากบ่อเลี้ยงนำมาเจาะเลือด ชั่งน้ำหนัก วัดขนาดสัณฐาน และบันทึกภาพ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6-12 นาที ทำให้ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบเช้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$, ภาพที่ 4.6) โดยระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเรอโรนที่เวลา 30 นาที หลังจากการสร้างความเครียดโดยการจับเต่าจากบ่อเลี้ยง มีค่าสูงขึ้นจากระดับพื้นฐาน (0 นาที) อย่างมีนัยสำคัญ แล้วค่อย ๆ ลดลงจนกลับสู่ระดับใกล้เคียงกับระดับพื้นฐานที่เวลา 120 นาที หลังถูกจับ

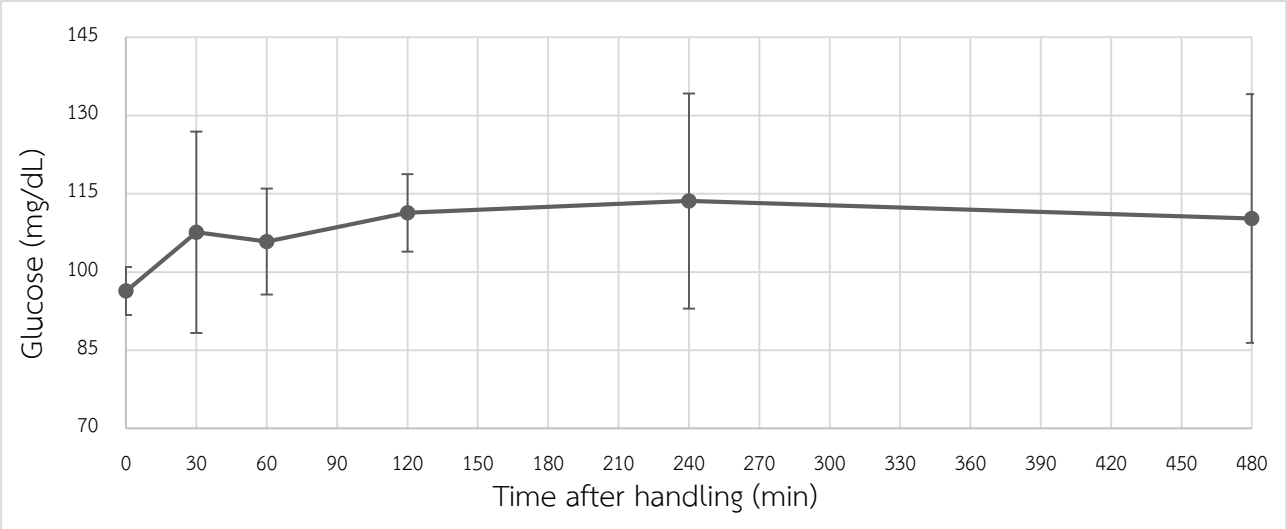


ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบเช้า (07:00 น. – 15:00 น.)

หมายเหตุ ทดสอบด้วย One-way ANOVA และจัดกลุ่มด้วย Tukey HSD

2.3 ระดับกลูโคสของเต่ากระในรอบกลางคืน (ไม่มีแสงแดด)

จากการศึกษาในรอบกลางคืน พบว่าเมื่อเริ่มกระทำให้เกิดความเครียดโดยจับเต่ากระจากบ่อเลี้ยงนำมาเจาะเลือด ชั่งน้ำหนัก วัดขนาดสัณฐาน และบันทึกภาพ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6-12 นาที พบว่าระดับกลูโคสในรอบกลางคืนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.642, ภาพที่ 4.7)

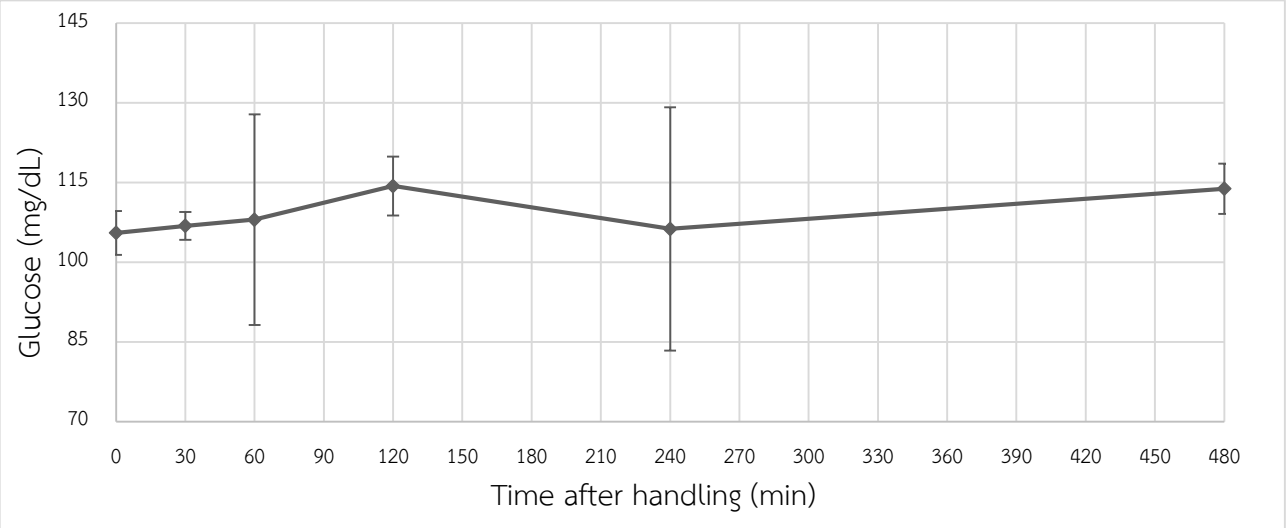


ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบกลางคืน(19:30 น. – 03:30 น.)

หมายเหตุ ทดสอบด้วย One-way ANOVA

2.4 ระดับกลูโคสของเต่ากระ (มีแสงแดด)

จากการศึกษาในรอบเช้า พบว่าเมื่อเริ่มกระทำให้เกิดความเครียดโดยจับเต่ากระจากบ่อเลี้ยงนำมาเจาะเลือด ชั่งน้ำหนัก วัดขนาดสัณฐาน และบันทึกภาพ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6-12 นาที พบว่าระดับกลูโคสในรอบเช้าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.794, ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพหลังการกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับในรอบเช้า(07:00 น. – 15:00 น.)

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Kruskal Wallis test

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

1. การศึกษาวงรอบการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันของเต่ากระในบ่อเลี้ยง

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของเต่ากระ เพื่อนำมาประเมินหาวงรอบการหลั่งของระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวัน และดูผลของการเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดของเต่ากระ โดยจะมีการตรวจสอบสหสัมพันธ์โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ 1. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม กับปัจจัยทางชีวภาพ และ 2. ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน กับ กลูโคส

ระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ มีค่าอยู่ในช่วง 3.09 – 23.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลาพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ามีของการเปลี่ยนแปลงในรอบวันของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน โดยมีค่าต่ำสุดของฮอร์โมนที่ช่วงเวลา 19:30 น. และ มีค่าสูงสุดอยู่ที่ช่วงเวลา 7:30 น. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jessop และคณะในปี 2001 ที่ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการหลั่งของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในรอบวันของเต่าตนุ พบว่าเต่าตนุมีการหลั่งฮอร์โมนที่มีการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน โดยจะมีการเริ่มหลั่งเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่มีแสงแดด และหลั่งลดต่ำลงในช่วงไม่มีแสงแดด โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดลองในเต่ากระ พบว่ามีลักษณะของการหลั่งที่คล้ายกันคือมีการเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเริ่มมีแสงแดด และลดต่ำลงในช่วงไม่มีแสงแดดเช่นเดียวกัน โดยคาดว่าการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน เป็นผลมาจากความต้องการพลังงานเพื่อทำกิจกรรมที่เกิดขึ้น ซึ่งช่วงเวลาที่ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนเริ่มสูงขึ้น เป็นช่วงที่เต่าเริ่มตื่นจากการนอนช่วงเวลาที่จะได้รับอาหาร จึงทำให้เต่ากระมีความต้องการใช้พลังงานในทำกิจกรรมต่างๆ เช่นเดียวกับช่วงที่ฮอร์โมน เริ่มลดลงเป็นช่วงที่เต่าไม่ได้ต้องการใช้พลังงาน กิจกรรมต่างๆจึงลดน้อยลง ส่งผลให้ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีค่าลดลง

เมื่อนำระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในเต่ากระที่ได้จากการศึกษานี้ (8.71$\pm$3.76 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เทียบกับระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในเต่าทะเลชนิดอื่นจากรายงานก่อนหน้านี้ เช่น จากการศึกษาของ Ikonomopoulou และคณะในปี 2014 พบว่า เต่าตนุ *Chelonia mydas* มีค่า 13.17$\pm$6.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, เต่าหลังแบน *Natator depressus* มีค่า 16.19$\pm$5.77 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาของ Hunt และคณะในปี2016 พบว่าเต่ามะเฟือง *Dermochelys coriacea* ที่มีสุขภาพดี มีค่า 4.97 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในเต่ากระที่ได้จากการศึกษานี้ มีค่ามากกว่าในเต่ามะเฟือง แต่มีค่าน้อยกว่าในเต่าตนุ และเต่าหลังแบน

ส่วนระดับของกลูโคสในเต่ากระ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่าจะมีการหลั่งสูงสุดในช่วงเวลา 9:30 น. หรือเวลาที่ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนได้หลั่งสูงสุดในรอบวันไปแล้ว 2

ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของฮอร์โมนคอร์ติโคเสตอโรนในการตอบสนองต่อความเครียดโดยทำให้ระดับกลูโคสในกระเลือดของสัตว์มีเพิ่มสูงขึ้น

เมื่อตรวจสอบค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อม (pH, ความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยง, อุณหภูมิอากาศบริเวณบ่อเลี้ยง, อุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยง และความเข้มแสง) และปัจจัยทางชีวภาพไม่พบสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าดังกล่าวซึ่งเป็นไปได้ว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนแต่ขึ้นอยู่ปัจจัยภายในร่างของตัวเต่ากระ แต่พบว่าระหว่างคอร์ติโคสเตอโรนและกลูโคสช่วงเวลาที่ต่างกัน 2 ชั่วโมง มีสหสัมพันธ์ระหว่างกัน ($r=0.243$, $p=0.0427$) แสดงให้เห็นว่าคอร์ติโคสเตอโรนจะใช้เวลานานที่จะทำให้ระดับกลูโคสเพิ่มขึ้นในเลือด (Reece et al, 2011)

2. การศึกษาผลของความเครียดต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระภายหลังถูกกระทำให้เกิดความเครียดจากการจับและศึกษาลักษณะสัณฐาน มาตรวจสอบระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระในตัวเดิม ที่เวลา 0, 30, 60, 120, 240 และ 480 นาที

พบว่าในช่วงที่มีแสงแดดระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าจะมีการหลั่งสูงสุดในช่วง 30 นาทีหลังจากการเก็บตัวอย่างเลือดในครั้งแรก (0 นาที) เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างเลือดในครั้งแรกจะต้องทำการวัดความกว้าง ความยาว และชั่งน้ำหนัก ส่งผลให้เวลาในการกระทำต่อตัวเต่ากระมีเวลามากที่สุด (6 - 12 นาที) โดยฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีค่าสูงขึ้นจาก 6.87 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 18.79 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือประมาณ 3 เท่าและพบว่าในช่วงอื่นที่ทำการเจาะเลือดเพียงอย่างเดียวจะไม่ค่อยมีผลกับการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมากนักซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hunt และคณะในปี 2016 ได้ทำงานวิจัยในเต่ามะเฟือง โดยทำการเปรียบปริมาณฮอร์โมนกับเวลาที่กระทำต่อตัวเต่า พบว่าเต่ามะเฟืองมีการตอบสนองของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนต่อการถูกจับและการกระทำที่ทำให้เกิดความเครียด โดยเมื่อเวลาที่มากขึ้นจะทำให้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้นซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้พบว่าช่วงเวลา หลังจากการเจาะเลือดในครั้งแรกมีแนวโน้มว่า เมื่อเวลาในการจับมากขึ้นฮอร์โมนคอร์โคสเตอโรนจะมีค่าสูงขึ้นด้วย ส่วนในช่วงที่ไม่มีแสงแดดระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจจะเป็นผลมาจากในช่วงเวลาที่ไม่มีแสงแดดเป็นช่วงเวลาที่เต่ากระนอนอยู่ในบ่อเลี้ยง ทำให้ร่างกายไม่ตอบสนองต่อการกระทำที่ทำให้เกิดความเครียดที่เกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jessop และคณะในปี 2001

เอกสารอ้างอิง

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง2556.ระบบฐานข้อมูลกลางและมาตรฐานข้อมูลทรัพยากรทางทะเลและ ชายฝั่ง:สถานภาพเต่าทะเลในน่านน้ำไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://marinegiscenter.dmcr.go.th/km/seaturtle_doc10/#.VtR-hEBTIYE [19กุมภาพันธ์ 2561].

มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม. 2013. ความเป็นมาของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.siammarine.or.th/about-us.html [19 มีนาคม 2561].

วรภัทร สวัสดิ์วงษ์. 2559. สหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระ *Eretmochelysimbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์. 2556. การอนุรักษ์เต่าทะเลของไทย. ใน เต่าทะเลไทย: ชนิด ชีววิทยา การศึกษาและการอนุรักษ์. สงขลา: ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง. หน้า 34-37.

Aguirre A.A., Balazs G.H., Spraker T.R. and Gross T.S. 1995. Adrenal and hematologicalresponses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. Physiological Zoology 68: 831-854.

Heatley J.J. and Johnson M. 2009. Clinical technique: Amphibian hematology: A practitioner's guide. Journal of Exotic Pet Medicine 18: 14-19.

Hunt K.E., Innis C.J., Merigo C., Rollland R.M. 2016. Endocrine responses to diverse stressors of capture, entanglement and stranding in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). Conservative Physiology 4: cow022. DOI: 10.1093/conphys/cow022

Ikonomopoulou M.P., Bradley A.J., Ibrahim K., Limpus C.J., Frenandez-Rojo M.A., Vagenas D., Whittier J.M. 2014. Hormone and metabolite profiles in nesting green and flatblack turtle : turtle species with different life histories Advances in Zoology. 2014: 503209. DOI: 10.1155/2014/503209

Jessop T.S., Limpus C.J., and Whittier J.M. 2001. Nocturnal activity in the green sea turtle altersdaily profiles of melatonin and corticosterone. Hormones and Behavior 41: 357-365.

Joseph M.M., and Meier A.H. 1973. Daily rhythms of plasma corticosterone in the commonpigeon, *Columba livia*. General and Comparative Endocrinology 20: 326-330.

Kanghae H., Thongprajukaew K., Jatupornpitukchat S., and Kittiwattanawong K. 2016. Optimal rearing density for head-starting green turtles (*Chelonia mydas*, Linnaeus, 1758). ZooBiology 35: 454-461.

Katsu Y. and Iguchi T. (2016). Subchapter 95A - Corticosterone A2. In Ando. H. and Tsutsui K. (eds). Handbook of Hormones. San Diego: Academic Press. pp. 527-e5 95A-523.

Lucero R.S., Avenido P.M., Parcsio S.C., Labis P., Lucero M.J., Lucero F.K.S., Angliongto L.Y. and Segovia J.R. 2012. Fibropapillomatosis: A case in marine turtle reared in captivity in the Southern Philippines. Proceedings of the 7th International Symposium on SEASTAR2000 and Asian Bio-logging Science (The11th SEASTAR2000 workshop). Bangkok, Thailand. pp. 65-67.

Mortimer J.A and Donnelly M. 2008. *Eretmochelys imbricata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. [online]. Available from: http://www.iucnredlist.org/details/8005/0 [19 February 2018].

Muñoz F.J., Galván A., Lerma M., and De la Fuente M. 2000. Seasonal changes in peripheral blood leukocyte functions of the turtle *Mauremys caspica* and their relationship with corticosterone, 17-β-estradiol and testosterone serum levels. Veterinary Immunology and Immunopathology 77: 27-42.

National Research Council., Commission on Life Sciences, Committee on Sea Turtle Conservation. 1990. Decline of the Sea Turtles: Causes and Prevention. Washington, DC: The National Academies Press. pp. 3-8.

North Carolina Aquarium at Fort Fisher. 2019. Hawksbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*). [online]. Available from:

https://seaturtleexploration.com/explore-and-learn/sea-turtle-facts/hawksbill/#details.

Reece, J.B. and Lisa, L.A. 2011. Campbell Biology. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, pp. 1036-1038

ภาคผนวก

ข้อมูลลักษณะสัณฐานของเต่ากระ

วันที่	เวลา	หมายเลข	น้ำหนักตัว (kg)	Carapace length (cm)	Carapace width (cm)
13/10/2561	13:30	TL1018-01	0.535	16.7	13.2
13/10/2561	13:30	TL1018-02	0.425	14.2	12.0
13/10/2561	13:30	TL1018-03	0.515	16.5	12.5
13/10/2561	13:30	TL1018-04	0.555	16.0	13.8
13/10/2561	13:30	TL1018-05	0.455	15.4	13.9
13/10/2561	15:30	TL1018-06	0.435	14.4	11.6
13/10/2561	15:30	TL1018-07	0.435	14.9	12.6
13/10/2561	15:30	TL1018-08	0.525	15.1	13.6
13/10/2561	15:30	TL1018-09	0.590	15.7	13.3
13/10/2561	15:30	TL1018-10	0.600	16.5	13.9
13/10/2561	17:30	TL1018-11	0.454	14.8	12.7
13/10/2561	17:30	TL1018-12	0.545	15.8	12.0
13/10/2561	17:30	TL1018-13	0.675	16.1	15.4
13/10/2561	17:30	TL1018-14	0.525	14.9	14.3
13/10/2561	17:30	TL1018-15	0.405	14.1	14.2
13/10/2561	19:30	TL1018-16	0.850	19.2	15.4
13/10/2561	19:30	TL1018-17	0.660	17.5	14.1
13/10/2561	19:30	TL1018-18	0.450	14.7	13.3
13/10/2561	19:30	TL1018-19	0.580	16.3	13.7
13/10/2561	19:30	TL1018-20	0.540	14.5	12.8
13/10/2561	21:30	TL1018-21	0.500	15.6	14
13/10/2561	21:30	TL1018-22	0.455	14.2	12.2
13/10/2561	21:30	TL1018-23	0.455	14.3	12.0
13/10/2561	21:30	TL1018-24	0.455	15.4	13.2

ข้อมูลลักษณะสัณฐานของเต่ากระ

วันที่	เวลา	หมายเลข	น้ำหนักตัว (kg)	Carapace length (cm)	Carapace width (cm)
13/10/2561	21:30	TL1018-25	0.645	17.6	14.5
13/10/2561	23:30	TL1018-26	0.350	13.6	12.6
13/10/2561	23:30	TL1018-27	0.460	14.5	12.8
13/10/2561	23:30	TL1018-28	0.695	16.8	14.4
13/10/2561	23:30	TL1018-29	0.430	13.6	12.6
13/10/2561	23:30	TL1018-30	0.440	13.6	12.2
14/10/2561	01:30	TL1018-31	0.395	13.6	12.0
14/10/2561	01:30	TL1018-32	0.510	15.8	15.0
14/10/2561	01:30	TL1018-33	0.590	16.4	13.5
14/10/2561	01:30	TL1018-34	0.405	14.1	12.1
14/10/2561	01:30	TL1018-35	0.550	15.5	14.8
14/10/2561	03:30	TL1018-36	0.480	15.3	13.0
14/10/2561	03:30	TL1018-37	0.530	15.8	13.2
14/10/2561	03:30	TL1018-38	0.515	14.8	12.4
14/10/2561	03:30	TL1018-39	0.680	17.9	14.0
14/10/2561	03:30	TL1018-40	0.790	17.3	14.9
14/10/2561	05:30	TL1018-41	0.460	14.6	13.0
14/10/2561	05:30	TL1018-42	0.595	16.4	14.0
14/10/2561	05:30	TL1018-43	0.595	16.2	14.7
14/10/2561	05:30	TL1018-44	0.640	16.8	14.9
14/10/2561	05:30	TL1018-45	0.520	15.2	13.3
14/10/2561	07:30	TL1018-46	0.625	16.0	14.4
14/10/2561	07:30	TL1018-47	0.405	15.3	12.8
14/10/2561	07:30	TL1018-48	0.745	17.3	16.0
14/10/2561	07:30	TL1018-49	0.460	14.6	13.1
14/10/2561	07:30	TL1018-50	0.585	15.7	13.9

ข้อมูลลักษณะสัณฐานของเต่ากระ

วันที่	เวลา	หมายเลข	น้ำหนักตัว (kg)	Carapace length (cm)	Carapace width (cm)
14/10/2561	09:30	TL1018-51	0.555	15.9	14.2
14/10/2561	09:30	TL1018-52	0.440	14.9	13.6
14/10/2561	09:30	TL1018-53	0.465	15.1	13.9
14/10/2561	09:30	TL1018-54	0.740	17.2	15.2
14/10/2561	09:30	TL1018-55	0.555	15.9	13.2
14/10/2561	11:30	TL1018-56	0.495	15.5	13.2
14/10/2561	11:30	TL1018-57	0.390	14.5	13.1
14/10/2561	11:30	TL1018-58	0.585	16.1	13.5
14/10/2561	11:30	TL1018-59	0.655	16.8	15.1
14/10/2561	11:30	TL1018-60	0.650	17.9	14.6
14/10/2561	13:30	TL1018-61	0.810	17.9	16.5
14/10/2561	13:30	TL1018-62	0.730	16.6	15.5
14/10/2561	13:30	TL1018-63	0.745	17.3	14.4
14/10/2561	13:30	TL1018-64	0.550	15.8	12.5
14/10/2561	13:30	TL1018-65	0.495	14.6	12.7
14/10/2561	15:30	TL1018-66	0.490	15.4	12.5
14/10/2561	15:30	TL1018-67	0.395	14.3	13.1
14/10/2561	15:30	TL1018-68	0.680	16.3	14.9
14/10/2561	15:30	TL1018-69	0.775	18.0	16.7
14/10/2561	15:30	TL1018-70	0.525	16.3	12.7
24/11/2561	19:30	TL1118-01	0.795	18.8	15.1
24/11/2561	19:30	TL1118-02	0.740	17.6	14.1
24/11/2561	19:30	TL1118-03	0.595	16.1	13.0
24/11/2561	19:30	TL1118-04	0.665	17.1	13.1
24/11/2561	19:30	TL1118-05	0.615	16.7	13.2
24/11/2561	19:30	TL1118-06	0.830	18.9	14.5

ข้อมูลลักษณะสัณฐานของเต่ากระ

วันที่	เวลา	หมายเลข	น้ำหนักตัว (kg)	Carapace length (cm)	Carapace width (cm)
25/11/2561	07:00	TL1118-17	0.610	16.2	13
25/11/2561	07:00	TL1118-18	0.540	16.1	11.5
25/11/2561	07:00	TL1118-19	0.755	18.2	14.6
25/11/2561	07:00	TL1118-20	0.505	15.1	11.3
25/11/2561	07:00	TL1118-21	0.980	19.8	15.1
25/11/2561	07:00	TL1118-22	0.795	18.7	13.2