

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

(Materials and Methods)

1. แผนการทดลองและสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้แพะพันธุ์พื้นเมืองไทยเพศเมีย จำนวน 16 ตัว อายุเฉลี่ย 24.7 ± 2.9 เดือน และน้ำหนักตัวเฉลี่ย 23.8 ± 1.6 กิโลกรัม ทำการถ่ายพยาธิภายนอกด้วย Neguvon® และถ่ายพยาธิภายในด้วย Albendazole® ฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยและบรูเซลโลซิส ให้แพะรุ่นที่สดเป็นแหล่งอาหารหยาด โดยจะตัดหญ้าสดให้กินหรือให้หญ้าแห้ง และเสริมด้วยอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 1.5% ของน้ำหนักตัว จัดหาน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา ให้อาหารเวลา 7.30 และ 16.30 น. ทุกวัน

แบ่งแพะออกเป็น 3 กลุ่มตามจำนวนลูกต่อครอก

กลุ่มที่ 1 แพะที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว ($n=8$)

กลุ่มที่ 2 แพะที่ตั้งท้องลูกสองตัว ($n=7$)

กลุ่มที่ 3 แพะที่ตั้งท้องลูกสามตัว ($n=1$)

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 ก่อนเริ่มเก็บข้อมูลชั่งน้ำหนักแพะทุกตัว หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักแพะทุกสัปดาห์

2.2 วัคซีนและยาที่ใช้ในการสุขภาพป้องกันโรค ก่อนนำสัตว์เข้าการทดลอง แพะทุกตัวจะได้รับการทำวัคซีนและถ่ายพยาธิตามโปรแกรม ดังนี้

2.2.1 โปรแกรมการทำวัคซีน ใช้วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease; FMD) แบบรวมทั้ง 3 type (O, A และ Asia I) ของกรมปศุสัตว์ โดยทำ 6 เดือนต่อครั้ง

2.2.2 โปรแกรมการถ่ายพยาธิ ใช้ Albendazole® เป็นยาถ่ายพยาธิภายใน และ Neguvon® เป็นยาถ่ายพยาธิภายนอก

3. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการผสมพันธุ์

ทำการสอดฮอร์โมน Medroxyprogesterone acetate (MAP) ซึ่งเป็นโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ (Synchrogest esponjas®, Spain) ในรูปฟองน้ำ (sponge) ซึ่งแต่ละอันบรรจุ Medroxyprogesterone acetate ขนาด 60 มิลลิกรัม สอดเข้าทางอวัยวะเพศ (intravaginal insertion) เป็นเวลา 14 วัน (แพะจะแสดงอาการเป็นสัดภายใน 72 ชั่วโมงภายหลังจากถอนฮอร์โมนออก)

ตรวจสอบการเป็นสัดในแพะทดลองวันละ 2 เวลา ในช่วงเช้า ประมาณ 06.00 – 07.00 น. และช่วงเย็นประมาณ 17.00-18.00 น. โดยใช้เวลาสังเกตการเป็นสัดอย่างน้อย 30 นาที สังเกตการเป็นสัดจากพฤติกรรมของแม่แพะที่แสดงการกระดิกหางบ่อย ปัสสาวะบ่อย อวัยวะเพศภายนอกบวมแดง มีเมือกออกจากอวัยวะเพศภายนอก กระวนกระวายไม่พักผ่อน ชอบป้อนนมตัวเองหรือยอมให้ตัวอื่นป้อน ตามวิธีการของ Cognie (2003) และ Gordon (1997) และเมื่อตรวจพบแพะเพศเมียที่แสดงอาการเป็นสัด จะใช้แพะเพศผู้ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ อายุประมาณ 2 ปี มาผสมพันธุ์ภายใน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักแม่แพะตลอดการทดลองทุกสัปดาห์

4. การเก็บข้อมูล

4.1 น้ำหนักตัวแม่แพะ ชั่งน้ำหนักตัวแม่แพะก่อนการทดลอง ช่วงที่แม่แพะแสดงอาการเป็นสัด ช่วงที่ผสมพันธุ์ และระหว่างการจัดท้อง(ระหว่างวันที่ 0-63)

4.2 จำนวนวันตั้งท้องของแม่แพะพื้นเมืองไทย

4.3 วัดขนาดตัวอ่อน (Crown Rump Length; CRL) วันที่ 28-56 ของการจัดท้อง โดยใช้เครื่องอัลตราซาวนด์ (Real time ultrasonography scanner) รุ่น HS-2000 (HONDA ELECTRONICS, Japan) ใช้คลื่นความถี่ระดับ 5 MHz ในการวัดความยาวของตัวอ่อน (Crown-Rump Length; CRL) โดยการใช้ electronic caliper ผ่านโปรแกรมของเครื่องอัลตราซาวนด์ สร้างสมการรีเกรซชันแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง CRL กับอายุของตัวอ่อน ตามวิธีการของ Redmer et al. (2004)

4.4 โครงสร้างของหลอดเลือดในเนื้อเยื่อรก โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ placentome ในวันที่ 130 ของการจัดท้อง จากนั้นตรึงเนื้อเยื่อ (Fixation) ด้วยสารละลายคาร์บอน (ทั้งส่วนของคาร์เนลและโคทิลิคอน) จากนั้นฝังชิ้นเนื้อลงในบล็อกพาราฟิน แล้วทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางขนาด 5 ไมโครเมตร ทำการย้อมสีด้วยสารฮีมาทอกซาลิน (Hematoxylin) และเพอริดิคิฟฟ์ (periodic acid-schiff's reagent) โดยวิธีของ Reynolds and Redmer (1992) จากนั้นถ่ายภาพโดยการสุ่มเลือกพื้นที่ถ่ายภาพประมาณ 12 พื้นที่ต่อเนื้อเยื่อต่อสัตว์ เพื่อตรวจสอบโครงสร้างของหลอดเลือดโดยใช้ Image analysis ตามวิธีของ Borowicz et al. (2007) ดัชนีที่ใช้ในการประเมินเนื้อเยื่อคาร์เนล และโคทิลิคอนในแต่ละชั้น ได้แก่ ความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย (capillary number density) จำนวนของเส้นเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ โดยทำการตัดขวางท่อเส้นเลือดและวัดขนาดเพื่อใช้ในการคำนวณ

4.5 ชนิดของ placentome โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ placentome ในวันที่ 65 และ 130 ของการจัดท้อง แบ่งออกเป็น 4 ชนิด ตามวิธีการของ Ward et al. (2006)

4.6 ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม แม่แพะทุกตัวจะถูกเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจสอบระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมทั้งก่อนการให้ฮอร์โมนตามโปรแกรม และในวันที่ให้โกนาโดโทรปินส์ จนกระทั่งถอนฮอร์โมนออกจากช่องคลอด ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บจากหลอดเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเลือด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) โดยใช้ความเร็ว 1500 g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ตามวิธีการของ Cushwa et al. (1992) สำหรับแอนติบอดีที่ใช้ คือ Goat anti-mouse IgG ทำมาจากการใช้ปฏิกิริยา P4 – horse radish peroxidase conjugate ขอความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand; BIOTEC) และทำการตรวจสอบค่า intraassay coefficients of variation และ assay sensitivity เพื่อประเมินความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์

4.7 ระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลในซีรัม เก็บเลือดจากแม่แพะที่ตั้งท้องในวันที่ 28, 84 และ 130 แล้วส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่คลินิกชุมชน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ประเมินการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและแม่แพะในรูปแบบสมการการเจริญเติบโตวันที่ 28-63 ตามวิธีการของ Redmer et al. (2004) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยค่าอัตราการเจริญต่อตัวต่อวันของแม่แพะระหว่างสองกลุ่ม คือ กลุ่มแม่แพะที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว และกลุ่มแม่แพะที่ตั้งท้องลูกแฝดสองและแฝดสามโดยใช้ student's *t*-test (Steel et al., 1997)

6. ระยะเวลาที่ทำการวิจัยและสถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนธันวาคม 2552 ถึง กุมภาพันธ์ 2553

7. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

โรงเรียนวิจัยสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

