บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย
(Materials and Method)

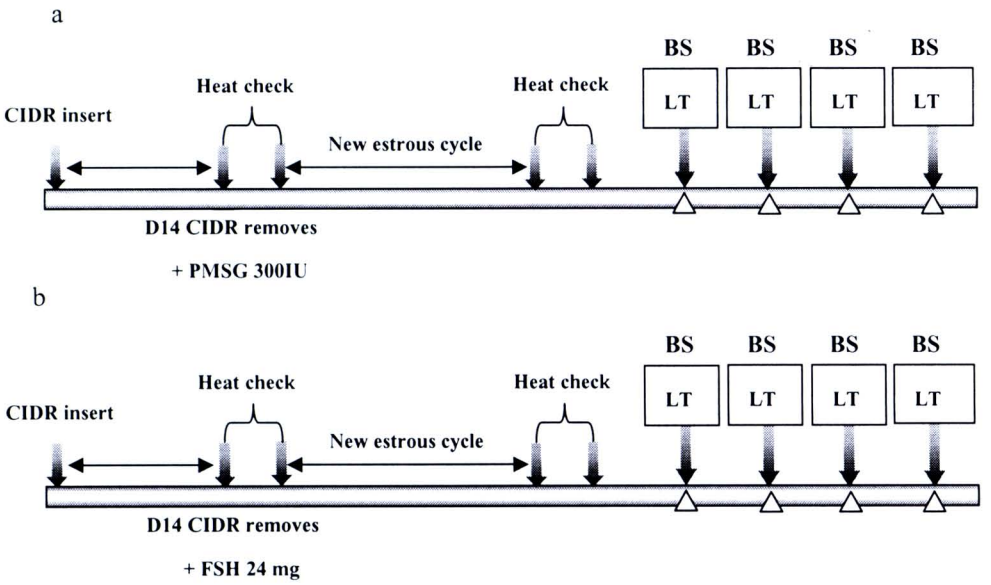
ในการทดลองครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้คำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง โดยมีการเลี้ยงดูสัตว์และมีการจัดการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองอย่างเคร่งครัด ตามระเบียบของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลองแล้ว ตามหนังสือลำดับที่: จส. มข.09/2554 เลขที่: ศธ 0514.1.12.2/87 (การทดลองที่ 1 และ 2)

1. อุปกรณ์และวิธีการ

1.1 การวิจัยครั้งนี้ใช้แม่แพะพันธุ์พื้นเมือง อายุเฉลี่ย 7 เดือนขึ้นไป น้ำหนักแพะโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 16.9 ± 3.7 กิโลกรัม จำนวน 12 ตัว ทำการถ่ายพยาธิภายนอกด้วย Neguvon® และถ่ายพยาธิภายในด้วย Albendazole® ฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยและบรูเซลโลซิส ให้หญ้ารูซี่สดเป็นแหล่งอาหารหยาบ โดยจะตัดหญ้าสดให้กินหรือให้หญ้าแห้ง และเสริมด้วยอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 1.5% ของน้ำหนักตัว จัดหาน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา ให้อาหารเวลา 7.30 และ 16.30 น. ทุกวัน ทำการตรวจการเป็นสัดของแม่แพะพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้แพะเพศผู้ที่ผ่านการทำหมันหรือทำการผ่าตัดท่อส่งน้ำเชื้อ (vasectomized buck) ตรวจดูการแสดงอาการเป็นสัด และระยะเวลาที่แสดงอาการเป็นสัด

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาการพัฒนาของคอร์ปัส ลูเทียม ในช่วงวงรอบการเป็นสัด

โดยศึกษาจากการปรากฏของจำนวน CH และ CL บนรังไข่ การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการสุ่มแม่แพะสาวเข้าทดลองตามแผนการทดลองโดยใช้แม่แพะจำนวน 12 ตัว อายุเฉลี่ย 7 เดือนขึ้นไป น้ำหนักแพะโดยเฉลี่ย 16.9 ± 3.7 กิโลกรัม เพื่อให้เกิดวงรอบการเป็นสัดที่พร้อมเพียงกัน โดยทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมน P4 สังเคราะห์ (CIDR) สอดเข้าทางช่องคลอด เป็นเวลา 14 วัน และถอนฮอร์โมน (CIDR) ออกจากช่องคลอดในวันที่ 14 พร้อมด้วยการฉีดฮอร์โมน PMSG เปรียบเทียบกับ FSH ในวันที่ทำการถอนจากนั้นทำการตรวจอาการเป็นสัดโดยใช้แพะเพศผู้ที่ผ่าตัดท่อส่งน้ำเชื้อ เพื่อลดอิทธิพลจากฮอร์โมนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดทำได้โดยการรอวงรอบใหม่



LT= Laparotomy

D = Day

BS= Blood Sample

ภาพที่ 6 ภาพโปรแกรมการเหนี่ยวนำวงรอบการเป็นสัด (a) ใช้ PMSG (b) ใช้ FSH

1.2 ทำการผ่าตัด laparotomy ในชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96 ของการเป็นสัด จำนวน 3 ตัว ต่อวัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโดยตัดรังไข่ตามวิธี ovariectomy (Almond and Dial, 1990) และแยกส่วนที่เป็น CL ออกโดยจะเก็บข้อมูลของรังไข่และ CL ทั้ง 2 ข้างโดยนับ จำนวน CL ช่วงหลังมีการตกไข่เกิดขึ้นชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96 ของวงรอบการเป็นสัด จากนั้นนำรังไข่ที่ได้มาเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บและประเมินโอโอไซต์

1.3 การศึกษาปริมาณโปรตีน ต่อ ดีเอ็นเอโดยการเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ และวัดคุณภาพของโอโอไซต์แบ่งกลุ่มออกเป็น 1. รังไข่ที่ปรากฏโอโอไซต์คุณภาพดี 2. รังไข่ที่ปรากฏโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง จากนั้นแยกเนื้อเยื่อ CL ออกจากรังไข่กลุ่มนั้นๆ มาประมาณ 100 ไมโครกรัม แล้วนำไป homogenated (Reynolds et al., 1990) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยวิธี diphenylamine procedure และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการ Bradford assay ดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบกับค่า ดีเอ็นเอ มาตรฐานจาก BSA คำนวณค่าปริมาณ ดีเอ็นเอ และโปรตีนในโอโอไซต์ และเนื้อเยื่อ CL ซึ่งจะได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ (hyperplasia) และอัตราส่วนโปรตีนต่อดีเอ็นเอ เป็นดัชนีบ่งบอกการเพิ่มขนาดเซลล์ (hypertrophy) (Reynolds et al., 1990; Baserga, 1985)

1.3.1 วิธีการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดจาก โอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม

การวัดปริมาณโปรตีนใช้วิธีการ Bradford assay ดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ชุด Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad Laboratory, CA, USA., catalog 500-0006) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลายแบรดฟอร์ดโดยการเจือจางสารละลายสี Bio- Rad Protein assay (Bio-Rad) 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 4 ส่วน

2. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

3. ดูดตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ทราบความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดแก้ว เติมน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายแบรดฟอร์ด 1 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

4. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

5. นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานและ ตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง uv ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยอ่านให้เสร็จภายใน 1-2 ชั่วโมง

6. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน มาสร้าง กราฟมาตรฐานโดยปริมาณโปรตีน (µg) เป็นแกน X และค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกน Y หลังจากนั้นสร้างสมการจากกราฟที่ได้

7. คำนวณปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากสมการกราฟมาตรฐานในข้อ 6

1.3.2 วิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม

1. การสกัดดีเอ็นเอจากโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม

นำเนื้อเยื่อ CL ที่ผ่านการ homogenated ใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 30 ไมโครลิตร และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการเตรียมดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป นำตัวอย่างของโอโอไซต์ และเนื้อเยื่อ CL ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C มาละลายที่อุณหภูมิห้องเพื่อสกัดดีเอ็นเอ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาทีหลังจากนั้นนำหลอดที่ผ่านการต้มไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 17 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 248977
เลขเรียกหนังสือ

2. วิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอจาก โอโอไซต์และคอร์ปัส ลูเทียม

การวัดปริมาณดีเอ็นเอใช้วิธีการ Diphenylamine assay ดัดแปลงตามวิธีของ Burton (1956) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (Deoxyribonucleic acid, type I from calf thymus) ให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

2. ดูดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่ทราบความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดแก้ว เติม 0.4 M PCA 90 ไมโครลิตร

3. เติม 2 มิลลิลิตร ของ DNA working solution ลงในแต่ละหลอดทดลองรวมทั้งสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

4. ปิดหลอดทดลองด้วย parafilm หุ้มด้วยกระดาษ foil จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C ปิดฝา ปฏิกิริยาจะเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลา ประมาณ 14-16 ชั่วโมง

5. นำสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานและตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง uv ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยอ่านให้เสร็จภายใน 1-2 ชั่วโมง

6. นำค่าการดูดกลืนแสงของละลายดีเอ็นเอมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยปริมาณดีเอ็นเอ (µg) เป็นแกน X และค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกน Y หลังจากนั้นสร้างสมการจากกราฟที่ได้

7. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอในสารละลายตัวอย่างจากสมการกราฟ มาตรฐานในข้อ 6

1.3.3 การวัดระดับของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในพลาสมา

แม่แพะทุกตัวจะถูกเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจสอบระดับของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในพลาสมาทั้งก่อนการให้ฮอร์โมนตามโปรแกรม และในวันที่ให้โกนาโดโทรปินส์ จนกระทั่งถอนฮอร์โมนออกจากช่องคลอด ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บจากหลอดเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเลือดที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดหรือ EDTA solution จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) โดยใช้ความเร็ว 1500 g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbant 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) และทำการตรวจสอบหาค่า intraassay coefficients of variation และ assay sensitivity เพื่อประเมินความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์

การเก็บและรวบรวมข้อมูล

1) จำนวนของ Corpus hemorrhagica (CH), Corpora lutea (CL) จากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ P4 สังเคราะห์ ร่วมกับ PMSG หรือ FSH

2) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และดีเอ็นเอของโอโอไซต์ และเนื้อเยื่อ CL

3) วิเคราะห์ความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 จากตัวอย่างเลือดที่เก็บ

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวน CL จำนวนลูกและรก (placental) กับหลอดเลือดและความหนาแน่นของหลอดเลือดในระหว่างการตั้งท้อง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แพะพันธุ์พื้นเมืองไทยเพศเมีย จัดกลุ่มแพะเข้างานทดลองเป็นสามกลุ่มตามจำนวนลูกที่ตั้งท้องได้ อายุเฉลี่ย 7 เดือนขึ้นไป และน้ำหนักตัวเฉลี่ย 16.9 ± 3.7 กิโลกรัม ทำการถ่ายพยาธิภายนอกด้วย Neguvon® และถ่ายพยาธิภายในด้วย Albendazole® ฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยและบรูเซลโลซิส ให้หญ้ารูซี่สดเป็นแหล่งอาหารหยาบ โดยจะตัดหญ้าสดให้กินหรือให้หญ้าแห้ง และเสริมด้วยอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 1.5% ของน้ำหนักตัว จัดหาน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา ให้อาหารเวลา 7.30 และ 16.30 น. ทุกวัน

โครงสร้างของหลอดเลือดในเนื้อเยื่อรก โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ placentome ในวันที่ 65 และ 130 ของการตั้งท้อง โดยให้ได้แม่แพะที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว (single pregnancy) ที่ตั้งท้องลูกสองตัว (twin pregnancy) และที่ตั้งท้องลูกสามตัว (triplet pregnancy) จากนั้นตรึงเนื้อเยื่อ (Fixation) ด้วยสารละลายคาร์นอย (ทั้งส่วนของคารันเคิลและโคทิลิดอน) จากนั้นฝังชิ้นเนื้อลงในบล็อกพาราฟิน แล้วทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางขนาด 5 ไมโครเมตร ทำการย้อมสีด้วยสารฮีมาทอกไซลิน (Hematoxylin) และเพอริดิกชิฟฟ์ (periodic acid-schiff's reagent) โดยวิธีของ Reynolds and Redmer (1992) จากนั้นถ่ายภาพโดยการสุ่มเลือกพื้นที่ถ่ายภาพประมาณ 12 พื้นที่ต่อเนื้อเยื่อต่อสัตว์ เพื่อตรวจสอบโครงสร้างของหลอดเลือดโดยการใช้ Image analysis ตามวิธีของ Borowicz et al. (2007) ดัชนีที่ใช้ในการประเมินเนื้อเยื่อคารันเคิล และโคทิลิดอนในแต่ละชิ้น ได้แก่ ความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย (capillary number density) จำนวนของหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ โดยทำการตัดขวางท่อหลอดเลือดและวัดขนาดเพื่อใช้ในการคำนวณ

การเก็บและรวบรวมข้อมูล

1. จำนวนตัวในการตั้งท้องต่อแม่ และจำนวน CL ที่ปรากฏ
2. น้ำหนักของรกในแม่แพะที่ตั้งท้องในวันที่ 65 และ 130
3. ปริมาณของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงรก (placenta) ในระหว่างการตั้งท้อง Capillary Area Density (CAD) ความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย Capillary Number Density (CND) จำนวนของหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่

วิธีการจัดการการใช้สัตว์และการดูแล (animal use and care procedures)

คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงคุณค่าของชีวิตและศีลธรรมตามหลักศาสนา ดังนั้นการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองจะเป็นไปตามเงื่อนไขของคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัย ซึ่งทำหน้าที่ในการติดตามและดูแลการใช้สัตว์ทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนท์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้ General Linear Model procedure of SAS และ Duncan's Multiple Range Test (SAS, 2001)

4. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนกันยายน 2553 ถึง เมษายน 2554

5. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

โรงเรือนวิจัยสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น