บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลอง

แม่สุกรเพศเมีย จำนวน 51ตัว ถูกซื้อมาจากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งในจังหวัดราชบุรีสุกรถูกนำออกจากฟาร์มในวันหย่านมและนำเข้ามาทดลองที่ โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ จังหวัดนครปฐม แม่สุกรจะถูกเลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ในกรงตับ มีรางอาหาร และ จุ๊บน้ำดื่มแบบอัตโนมัติ มีน้ำดื่มตลอด 24 ชั่วโมง แม่สุกรที่ใช้ในการศึกษาเป็นแม่สุกรที่มีลำดับครอกเฉลี่ย 6.8±0.6 (พิสัย 6-8)สุกรทุกตัวมีประวัติการคลอดและหย่านมปกติ โดยเฉลี่ยสุกรแสดงอาการเป็นสัดภายใน 4.8±0.7 (พิสัย 4-6)วัน หลังหย่านมสุกรจำนวน 2 ตัว ไม่แสดงอาการเป็นสัด และขาเจ็บ จึงถูกคัดทิ้งจากการทดลอง คงเหลือสุกร จำนวน 49 ตัว ในการทดลอง

พ่อสุกรและการรีดเก็บน้ำเชื้อ

พ่อสุกรเพศผู้ที่โตเต็มวัยผ่านการรีดน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียมมาแล้วจำนวน 10 ตัว อายุระหว่าง 1.5-3.0 ปี มีคุณภาพน้ำเชื้อปกติ พ่อสุกรแต่ละตัวถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยว มีรางอาหาร และจุ๊บน้ำอัตโนมัติ มีน้ำดื่มตลอด 24 ชม. ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกร โดยวิธี Gloved hand method โดยรีดเก็บเฉพาะส่วน sperm rich fractionหลังจากนั้นทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยตรวจดูสี ปริมาตร การเคลื่อนไหว และ ตรวจความเข้มข้นด้วย photometer (Spermacue®) น้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพจะนำมาใช้ในการแช่แข็ง (อัตราการเคลื่อนไหว >70% ปริมาตร >100 มล. ความเข้มข้น >200 ตัว/มล.) รีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรแต่ละตัวโดยมีระยะห่างของการรีดน้ำเชื้ออย่างน้อย 5 วัน น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจะทำการแช่แข็ง และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลาย ในพ่อสุกรที่มีคุณภาพน้ำเชื้อในเกณฑ์อัตราการเคลื่อนไหวหลังทำละลาย >35% ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (semen bank) เพื่อใช้ในการผสมเทียม

การแช่แข็งน้ำเชื้อและการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย Modena™ (Extender I) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อ Modena™ 1-3 ส่วน (1:1-1:3) รักษาอุณหภูมิในตู้เย็นที่ 15°C นาน 2 ชม. ปั่น (centrifuge) ที่ 800 ×g 15°C นาน 10 นาทีเทส่วนของเหลวด้านบนออกเจือจางส่วนที่เหลือด้วย Extender II (lactose solution และ egg yolk) ให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิ 1.5×10^{9}ตัว/มล. ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 1.5 ชม. ที่ 5°C ให้ทำการเจือจางเพิ่มด้วย Extender III (extender II glycerol และ Equex STM)

ในอัตราส่วน 2:1 ให้สารละลายสุดท้ายมีความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^9ตัว/มล. มี glyerol 3% ในน้ำเชื้อบรรจุสารละลายน้ำเชื้อลงในหลอดฟางขนาด 0.5 มล. แล้วปิดผนึก ลดอุณหภูมิน้ำเชื้อที่บรรจุแล้ว ด้วยการวางหลอดฟางเหนือระดับผิวของไนโตรเจนเหลวที่ 3 ซม. นาน 20 นาที ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ทำละลายน้ำเชื้อในน้ำอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 12 วินาที เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย Modena™ ก่อนนำไปผสมพันธุ์ (Chanapiwat et al., 2009)

การประเมินคุณภาพอสุจิหลังทำละลาย

หลังละลายน้ำเชื้อถูกนำมาเจือจางด้วย Modena™ ในสัดส่วน 1:20 ให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ 50-60 × 10^6 ตัว/มล. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อมาประเมินคุณภาพโดยศึกษาลักษณะผนังเซลล์ (plasma membrane integrity) และศึกษาความผิดปกติของอโครโซม (Acrosome defect) โดยการย้อมสี SYBR-14 และ PI (Fertilight® Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe BV, The Netherlands)

การตรวจการเป็นสัด

ตรวจการเป็นสัดในแม่สุกรหลังหย่านมวันละ 2 ครั้ง (6.00 น. และ 18.00 น.) โดยใช้พ่อสุกรช่วยตรวจ อาการของระยะก่อนการเป็นสัด (pro-estrus) ดูจากลักษณะของการบวมแดงของอวัยวะเพศ การกระวนกระวาย บางครั้งไม่กินอาหาร และมีพฤติกรรมสนใจพ่อสุกร หลังจากพบอาการของระยะก่อนการเป็นสัด สุกรจะถูกตรวจการยืนนิ่งทุก 8 ชั่วโมง กำหนดให้เวลาของการเริ่มยืนนิ่งคือ 4 ชั่วโมง ก่อนพบสุกรยืนนิ่งเมื่อกดหลังในครั้งแรก และเวลาของการสิ้นสุดการยืนนิ่งคือ 4 ชั่วโมง หลังพบการยืนนิ่งครั้งสุดท้าย ระยะหย่านมถึงเป็นสัดในสุกรทุกตัวถูกบันทึกและนำไปวิเคราะห์ข้อมูล โดยวันที่หย่านมนับเป็นวันที่ 0

การตรวจการตกไข่

ตรวจการตกไข่โดยใช้เครื่องอัลตราซาวน์ แบบเรียลไทม์ บี โหมด โดยใช้หัวตรวจชนิดสอดเข้าทางทวารหนักความถี่ 5 MHz (linear probe) วิธีการตรวจทำโดยนำอุจจาระออกจากทวารหนัก แล้วนำหัวตรวจที่ถูกสวมทับด้วยถุงมือยางและมีเจลอัลตราซาวน์ภายในสอดเข้าไปในทวารหนักลึกประมาณ 30-50 ซม. จากนั้นหาตำแหน่งของรังไข่โดยส่ายหัวตรวจไปมาซ้ายและขวา เมื่อเห็นตำแหน่งของรังไข่แล้ว ให้หยุดภาพอัลตราซาวน์ ทำการวัดขนาดของฟอลลิเคิลโดยเลือกฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดฟอลลิเคิลถูกวัดวันละ 1 ครั้งตั้งแต่วันหย่านม เมื่อแม่สุกรแสดงอาการเป็นสัดแล้วจะเพิ่มความถี่การวัดขนาดฟอลลิเคิลเป็นทุก 8 ชั่วโมง จนกระทั่งตกไข่ เวลาของการตกไข่คือ 4ชั่วโมง หลังจากพบ

ฟอลลิเคิลครั้งสุดท้าย แม่สุกรทุกตัวถูกตรวจรังไข่และวัดขนาดของฟองลิเคิลด้วยอัลตราซาวด์วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่ 1 วันหลังหย่านมเป็นต้นไปจนกระทั่งแม่สุกรเป็นสัดจึงเพิ่มความถี่ของการวัดเป็นทุก 8 ชั่วโมง วันที่หย่านมนับเป็นวันที่ 0 ขนาดของฟอลิเคิลใบที่ใหญ่ที่สุดที่ตรวจพบถูกบันทึกตั้งแต่วันที่ 1 เป็นต้นไป ระยะตั้งแต่เป็นสัดถึงตกไข่ในสุกรทุกตัวถูกบันทึกและนำไปวิเคราะห์ข้อมูล

การผสมเทียม

แบ่งแม่สุกรออกเป็น 3 กลุ่มโดยวิธีสุ่มตามเบอร์หู และทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดด้วยวิธี IUI (13 ตัว) ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธี IUI (24 ตัว) และ ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธี DIUI (9 ตัว) ทำการเหนี่ยวนำการตกไข่ด้วย ฮอร์โมน hCG (Choluron®, Intervet, Netherlands) 500 IU im. ในวันแรกของการเป็นสัด ผสมเทียม1 ครั้ง ก่อนไข่ตก 4-6ชั่วโมงกลุ่ม AI ใช้น้ำเชื้อปริมาตร 100 มล. และจำนวนอสุจิ 3x 10^9ตัว กลุ่ม IUIใช้อสุจิ 2x 10^9ตัว ในสารละลาย Modena™ปริมาตร 20 มล.และกลุ่ม DIUI ใช้อสุจิ1x 10^9ตัว ในสารละลาย Modena™ปริมาตร 10 มล.หลังการผสมเทียม 12 ชั่วโมง(20 ตัว) นำสุกรส่งโรงฆ่าสัตว์แล้วเก็บมดลูกทันที และส่งตรวจภายใน 20 นาที ตรวจหาจำนวนอสุจิในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ในสุกรทั้ง 3 กลุ่ม และหลังการผสมเทียม 48ชั่วโมง (26 ตัว) นำสุกรส่งโรงฆ่าสัตว์แล้วเก็บมดลูกออกมาเพื่อตรวจหาจำนวนโอโอไซต์ที่ถูกปฏิสนธิ

การเก็บตัวอย่างท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์

หลังจากส่งแม่สุกรเข้าโรงฆ่าสัตว์ เปิดผ่าช่องท้องนำรังไข่และมดลูกของแม่สุกรออกหลังจากนำอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรออกมา ทำการผูกที่ส่วนปลายสุดของท่อนำไข่ ทำการผูกและแบ่งท่อนำไข่กับส่วนปีกมดลูกแต่ละข้างออกเป็น 6 ส่วน ได้แก่ ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลา ท่อนำไข่อิสมัสส่วนต้น ท่อนำไข่อิสมัสส่วนท้าย ช่วงต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก ปีกมดลูกส่วนต้น และปีกมดลูกส่วนท้าย ส่วนต้นของปีกมดลูกในการหาตัวอสุจิในส่วนของท่อนำไข่ส่วน แอมพูลา ล้างด้วย PBS จำนวน 1 มิลลิลิตรในส่วนของอิสมัส และ UTJ จะชะล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และในส่วนของปีกมดลูกจะล้างด้วย PBSจำนวน 20 มิลลิลิตรแต่ละส่วนจะถูกชะล้างจำนวน 2 ครั้ง หลังจากชะล้างเสร็จแล้วทำให้ตัวอสุจิมีความเข้มข้นขึ้นโดยนำของเหลวที่ชะล้างมาจากส่วนต่างๆ ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่อุ่น ด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที ท่อนำไข่และมดลูกที่ทำการชะล้างตัวอสุจิออกแล้วจะนำมาดองใน 10% natural buffer formalin

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Inst. V. 9.0, Cary, NC USA) เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังทำละลาย โดยประเมินจาก อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ร้อยละของอสุจิที่ยังมีชีวิตหลังทำละลาย ร้อยละของอสุจิที่มีความผิดปกติของอโครโซม ด้วยวิธี General linear model (GLM) เปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิ ด้วยวิธี Chi-square test เปรียบเทียบจำนวนคัพภะทั้งหมดต่อครอกด้วยวิธี General linear model (GLM) ทำการหาค่าความถี่ และค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบสัดส่วนของตัวอสุจิที่ส่วนต่างๆ ในท่อทางเดินสืบพันธุ์ ได้แก่ ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ ส่วนต้นและส่วนท้ายของอิสมัส และแอมพูลล่า ทั้งสองด้าน โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) การเปรียบเทียบระหว่างด้านซ้ายและขวาภายในสัตว์ตัวเดียวกัน ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Pair *t*-test ค่า $P<0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ