

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

(Materials and Method)

ในการทดลองครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้คำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง โดยมีการเลี้ยงดูสัตว์และมีการจัดการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองอย่างเคร่งครัด ตามระเบียบของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลองแล้ว โดยมีรายละเอียดของการทดลอง ดังนี้

1. อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้แพะพื้นเมืองเทศเมียหลังหย่านมอายุเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 3 เดือนจำนวน 12 ตัวที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 7.5 กิโลกรัมโดยมีการจัดการด้านอาหารที่แตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 แพะได้รับอาหารหยาบเป็นหญ้าหูลี่ โดยให้กินอย่างเต็มที่ (ad libitum)

กลุ่มที่ 2 แพะได้รับอาหารหยาบเป็นหญ้าสด และเสริมด้วยอาหารข้น 1.5% ของน้ำหนักตัว อาหารข้นมีระดับโปรตีนประมาณ 14% หรือให้ได้รับประมาณ 110 กรัม/ตัว/วัน การให้อาหารข้นเสริมจะเสริมในช่วงเช้าและเย็น โดยให้ในรางอาหารรวมที่มีพื้นที่ให้แพะทุกตัวในกลุ่มสามารถเข้าถึงได้โดยให้กินอย่างเต็มที่ (ad libitum) โดยแพะทั้งสองกลุ่มจะได้รับน้ำและก้อนแร่ธาตุไว้ให้เลี่ยนกินอย่างอิสระตลอดเวลา

ก่อนเริ่มทำการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักและให้คะแนนร่างกายแพะ (0-5) แพะทุกตัวได้รับอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 1.5% ของน้ำหนักตัว และหญ้าหูลี่สดเป็นแหล่งอาหารหยาบ โดยจะตัดหญ้าสดให้กินหรือให้หญ้าแห้งเสริม จัดหาน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา

ให้วัคซีนและยาที่ใช้ในการสุขภาพป้องกันโรค ก่อนนำสัตว์เข้าการทดลอง แพะทุกตัวจะได้รับการทำวัคซีนและถ่ายพยาธิตามโปรแกรม ดังนี้ (1) โปรแกรมการทำวัคซีน ใช้วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease; FMD) แบบรวมทั้ง 3 type (O, A และ Asia I) ของกรมปศุสัตว์ โดยทำ 6 เดือนต่อครั้ง (2) โปรแกรมการถ่ายพยาธิ ใช้ Albendazole® เป็นยาถ่ายพยาธิภายใน และ Neguvon® เป็นยาถ่ายพยาธิภายนอก

การผ่าตัดท่อนำเชื้อ ทำการผ่าตัดท่อนำเชื้อของพ่อแพะสายพันธุ์ชาแนลโตเต็มวัยด้วยวิธีการผ่าตัดมาตรฐานตามวิธีของ Turner and McIlwraith (1989) ก่อนทำการผ่าตัดผู้วิจัยได้ทำการอดอาหารและน้ำพ่อแพะก่อนที่จะทำการผ่าตัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อลดภาวะ regurgitation ให้ยาสลบ Rompun® (0.1 mg xylazine/Kg) โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จับควบคุมสัตว์และไปยังนำสัตว์ไปยังเตียงผ่าตัดในท่านอนหงาย ทำความสะอาดบริเวณที่ต้องการผ่าตัด โดยโกนขนและทำความสะอาดด้วยสารปฏิชีวนะ (betadine solution) ตรวจสอบอาการรีเฟล็กซ์ที่ตอบสนองของสัตว์ตลอดระยะเวลาที่ผ่าตัด ลงมีดบริเวณด้านบนขององอันทะ (dorsal recumbency position) เปิดผ่านเนื้อเยื่อเพื่อหาท่อนำเชื้อและตัดชิ้นเนื้อเยื่อท่อนำเชื้อความยาวประมาณ 10-15 มม. จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากที่ได้ทำการผ่าตัดเรียบร้อยแล้วเย็บแผลให้สนิทและฉีดยาแก้ปวดและยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Procaine-Penicillin G จากนั้นโรยด้วย Negasant® เพื่อป้องกันแมลงวัน

การตรวจสอบช่วงเวลาการเป็นสัด (detection onset of estrus) ทำการตรวจสอบการเป็นสัดในเวลา 6.00 และ 18.00 p.m. โดยใช้แพะเพศผู้ที่ทำการผ่าตัดท่อนำเชื้อแล้วแนะนำเข้าไปในฝูงแพะเพศเมียและสังเกตพฤติกรรมของสัตว์เป็นเวลา 45 นาที บันทึกพฤติกรรมและการแสดงอาการของสัตว์ (Stevenson et al., 1996)

การทดสอบวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมน โดยใช้แพะพื้นเมืองเพศเมียจำนวน 12 ตัว อายุเฉลี่ย 8 เดือน ซึ่งยังไม่ผ่านการผสมพันธุ์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ทำการสอด flugestone acetate ขนาด 30 mg ซึ่งเป็นโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ในช่องอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเป็นเวลา 14 วัน และทำการฉีดฮอร์โมน FSH วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน เริ่มต้นในวันที่ 12 ภายหลังการสอด flugestone acetate (ไชยณรงค์ และคณะ, 2550)

กลุ่มที่ 2 ทำการสอด flugestone acetate ขนาด 30 mg ในช่องอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเช่นเดียวกับกลุ่ม 1 แต่ทำการเหนี่ยวนำเป็นเวลาเพียง 6 วัน และทำการฉีด eCG ขนาด 380 IU เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ทำการสอด flugestone acetate (Ungerfeld and Rubianes, 2002) โดยวันที่ทำการสอด flugestone acetate ออกจากตัวสัตว์กำหนดให้เป็นวันที่ 0 (Day 0)

ทำการนับจำนวน corpora hemorrhagica (CH) ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังจากการสอด flugestone acetate (วันที่ 0) และ นับจำนวน corpora lutea (CL) ที่เวลา 192 ชั่วโมง โดยวิธี laparotomy และทำการเก็บตัวอย่างเลือด ในวันที่ 0, 2, 3 และ 8 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรน (P4) ตามวิธีการของ ไชยณรงค์ และคณะ (2552)

2. การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. อายุเมื่อเป็นสัดครั้งแรก (วัน)
2. น้ำหนักสัตว์ที่เป็นสัดครั้งแรก (กิโลกรัม)
3. วงรอบการเป็นสัด (วัน)
4. จำนวนครั้งที่แสดงวงรอบการเป็นสัดตลอดการทดลอง (ครั้ง)
5. ระยะเวลาที่แสดงอาการเป็นสัด (ชั่วโมง)
6. ความเข้มข้นหรือระดับของ progesterone
7. จำนวน CH และ CL

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลจำแนกประเภท (categorical data) ได้แก่ อัตราการตกไข่และ สภาพร่างกายของแพะ (body condition score) นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี proc. CATMODE และ Chi-square test (SAS, 2000) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ใช้วิธีการวิเคราะห์ความถดถอย (regression procedure) และข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) ได้แก่ จำนวนของฟอลลิเคิล CH, CL และระดับของ P4 วิเคราะห์โดยใช้ Proc. GLM (SAS, 2000)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของอัตราการตกไข่ทำได้โดยวิธี Mantel-Haenzel Chi-Square ส่วนข้อมูลต่อเนื่อง ได้แก่ จำนวน CH, CL และความเข้มข้นของ P4 ทำได้โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธีการ General Linear Model Procedure (SAS, 2000) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มโดยใช้ student's *t*-test (Steel et al., 1997)

4. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2553 ถึง เดือนเมษายน 2554

5. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

คอกสัตว์ทดลอง หมวกโคเนื้อ และที่ห้องปฏิบัติการสัตววิทยา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีน-ลิแกนและชีววิทยา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ภายใต้สังกัดของ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)