

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุการทดลอง

สัตว์ทดลอง: ใช้พ่อโคพันธุ์อเมริกันบราห์มันที่มีอายุประมาณ 7 ปี จำนวน 4 ตัว ประกอบด้วยโคหมายเลข 0/26, 4/30, 19/30 และ 24/30 โคทั้งหมดอยู่ที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมขอนแก่น

สารเคมี: คาเฟอีน (caffeine) ใช้ของบริษัท Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA. รหัสสาร C-0750

ออกซิโตซิน (oxytocin) ใช้ของบริษัท Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA. รหัสสาร O-2882

การเตรียมสารเคมี :

สารละลายบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline) ประกอบด้วย NaCl 136.89 mM, KCl 2.68 mM, Na_2HPO_4 4.29 mM, KH_2PO_4 1.47 mM (Juang et al., 1990)

ออกซิโตซิน (oxytocin) ละลายออกซิโตซินในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} และ 10^{-12} โมล โดยคำนวณจากออกซิโตซินจากขวด 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น 200 IU. , 12.5 IU. เท่ากับ 21.4 ไมโครกรัม และน้ำหนักโมเลกุล 1007.2 (Reynolds, 1982)

คาเฟอีน (caffeine; 1, 3, 7-trimethyl 2, 6-dioxypurine) ละลายคาเฟอีนในสารละลายบัฟเฟอร์ (Cai and Marik, 1989) ให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิโมล โดยคำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลคาเฟอีน 194.2

ตัวเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ใช้ตัวเจือจาง Egg yolk-Tris ซึ่งมีส่วนผสมดังตารางที่ 2

สารย้อมสี eosin nigrosin stain มีส่วนผสมดังคือ sodium citrate dihydrate 3 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นให้ได้ 100 ซีซี แล้วผสม eosin B 1 กรัม กับ nigrosin 5 กรัม ลงให้เข้ากันดี (สุจินต์ และ เทวินทร์, 2529)

สารละลาย normal saline ประกอบด้วย NaCl 9 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของตัวเจือจางน้ำเชื้อ ไปแดง - ทรีด (egg yolk - Iris)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Iris (hydroxy methyl-amino methane)	30.28 g.
Citric acid	17.00 g.
Fructose	12.50 g.
Demineralized water	920.00 ml
Glycerol (7 %)	80.00 ml
Egg yolk	20.00 %
Penicillin (unit/cc.)	1,000
Streptomycin (ไมโครกรัม/ซีซี)	1,000

3.2 การแช่แข็งและการละลาย

เก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทั้งหมดตัวละ 10 ครั้ง ในเวลา 07.00 น. ลับตาหัดละ 2 ครั้งโดย artificial vagina หลังจากนั้นทำการประเมินการเคลื่อนไหวหามู (gross motility) น้ำเชื้อที่ได้คะแนน +++ ขึ้นไปจึงนำมาทำเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง จากนั้นนำน้ำเชื้อไปประเมินหาความเข้มข้นของตัวอสุจิโดยใช้ photometer แล้วละลายกับตัวเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเซลล์อสุจิ 120×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นประเมินการเคลื่อนที่อีกครั้งหนึ่งโดยใช้กล้อง phase-contrast microscope ก่อนเก็บในตู้เย็นที่ 10°C นาน 3 ชั่วโมง และก่อนบรรจุหลอด 1 ชั่วโมง ทำการเติมคาเฟอีนหรือออกซิโตซินที่เตรียมไว้ลงในน้ำเชื้อและก่อนบรรจุหลอดประเมินการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motility) และบรรจุหลอดเฉพาะน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปเท่านั้น บรรจุน้ำเชื้อในหลอด (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปอังไอน้ำในไนโตรเจนเหลวที่ -150°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวที่ -196°C ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สุ่มหลอดน้ำเชื้อจากถังไนโตรเจนเหลวมาทำการละลาย (thawing) โดยป้อนในน้ำอุ่นที่ 37°C นาน 20 วินาที ที่ 0.2 และ 4 ชั่วโมง หลังการละลาย

3.3 การเก็บตัวอย่างและข้อมูล

3.3.1 การวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิรายตัว

นำน้ำเชื้อหยดบนสไลด์ที่อุ่น 37 °C แล้วปิดทับด้วยแผ่นกระจก (cover slide) สังเกตการเคลื่อนที่ด้วยกล้อง phase-contrast microscope กำลังขยาย 400 เท่า (Bearden and Fuquay, 1984) และให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ต่ออสุจิที่ไม่เคลื่อนไหวพร้อมทั้งดูความแรงในการเคลื่อนไหวโดยแบ่งเป็นระดับคือ

- 0 เปอร์เซ็นต์ คือไม่มีการเคลื่อนไหว
- 10 เปอร์เซ็นต์ คือเคลื่อนไหว 10 ตัวในจำนวน 100 ตัวที่นับและเคลื่อนที่ช้า
- 40 เปอร์เซ็นต์ คือเคลื่อนไหว 40 ตัวในจำนวน 100 ตัวที่นับและเคลื่อนที่เร็ว
- 80 เปอร์เซ็นต์ คือเคลื่อนไหว 80 ตัวในจำนวน 100 ตัวที่นับและเคลื่อนที่เร็ว
- 100 เปอร์เซ็นต์ คือเคลื่อนไหว 100 ตัวในจำนวน 100 ตัวที่นับและเคลื่อนที่เร็ว

ทำการวัดการเคลื่อนที่หลังการเติมคาเฟอีนหรือออกซิโตซินแล้ว 1 ชั่วโมง และคัดเอาน้ำเชื้อเฉพาะที่มีการเคลื่อนที่ 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เพื่อเก็บไว้วัดการเคลื่อนที่หลังการแช่แข็งและหลังการละลายที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง

3.3.2 การวัดการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า (progressive motility)

โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลาย 0.9 % normal saline ที่อุ่นแล้วปิดทับด้วยแผ่นกระจก (cover slide) ดูการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าด้วยกล้อง phase-contrast microscope กำลังขยาย 400 เท่า (Bearden and Fuquay, 1984) แล้วคิดเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าต่อตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวอยู่กับที่หรือตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปด้านข้างหรือเคลื่อนที่เป็นวงกลมดังนี้คือ

- 0 เปอร์เซ็นต์ คือไม่มีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า
- 10 เปอร์เซ็นต์ คือมีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า 10 ตัวใน 100 ตัวที่นับ
- 40 เปอร์เซ็นต์ คือมีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า 40 ตัวใน 100 ตัวที่นับ
- 80 เปอร์เซ็นต์ คือมีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า 80 ตัวใน 100 ตัวที่นับ
- 100 เปอร์เซ็นต์ คือมีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า 100 ตัวใน 100 ตัวที่นับ

ทำการวัดการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าหลังการเติมคาเฟอีนหรือออกซิโดซีนแล้ว 1 ชั่วโมง และคัตเอาต์น้ำเชื้อเฉพาะที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เพื่อวัดการเคลื่อนที่หลังการแช่แข็งและหลังการละลายที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง

3.3.3 จำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตและสภาพอะโครโซมของเซลล์อสุจิ

ใช้สีย้อม eosin-nigrosin ที่อุณหภูมิ 1 หยด แล้วหยดน้ำเชื้อ 1 หยด ผสมให้เข้ากันตีบนแผ่นกระจกอุ่นทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำมา smear บนแผ่นกระจกอีกแผ่น (สุจินต์ และ เทวินทร์, 2529) แล้วทำการนับด้วย phase-contrast microscope กำลังขยาย 1000 เท่า นับตัวที่มีชีวิตและที่ตายโดยเซลล์อสุจิที่ตายมีสีชมพูหรือแดงตัวที่มีชีวิตไม่มีสีและสีพื้นเป็นสีน้ำเงินแก่ของ nigrosin ดูรูปร่างอะโครโซมพร้อมทั้งนับอสุจิที่มีรูปร่างของอะโครโซมปกติ (normal apical ridge)

3.4 แผนการดำเนินงานในการวิจัย

แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองคือการทดลองที่ 1 ทำการทดลองเพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อและการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเพื่อศึกษาการผสมติด

การทดลองที่ 1 เพื่อตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อโคหลังแช่แข็งโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อก (Randomized Complete Blocks Design) โดยใช้พ่อโคแต่ละตัวเป็น block ประกอบด้วย 10 ทริทเมนต์ ดังแสดงในตารางที่ 3

การทดลองที่ 2 เพื่อทดสอบการผสมติดโดยใช้ทริทเมนต์ที่ให้ผลคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย ดีที่สุดของคาเฟอีนและออกซิโดซีนอย่างละ 1 ทริทเมนต์จากผลของการทดลองที่ 1 โดยใช้ น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกัน (พ่อพันธุ์เบอร์ 1/30) ได้ทั้งหมด 3 ทริทเมนต์ คือ ทริทเมนต์ที่ 1 (กลุ่มควบคุม), 5 (คาเฟอีน 1.0 มิลลิโมล) และ 8 (ออกซิโดซีน 10^{-8} โมล) สภาเหตุที่ต้องเลือกเอาบางทริทเมนต์เท่านั้นเนื่องจากมีจำนวนแม่โคพื้นเมืองจำกัดและต้องการทดสอบว่าการเติมสารทั้ง 2 ในน้ำเชื้อแช่แข็งมีความสามารถในการผสมติดหรือไม่ นำน้ำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปผสมเทียบกับแม่โคพื้นเมือง 23 ตัว ที่เคยให้ลูกมาแล้วอย่างน้อยหนึ่งครั้ง โดยทริทเมนต์ที่ 1 ผสมโคตัวเมีย 7 ตัว ส่วนทริทเมนต์ 5 และ 8 ใช้ทริทเมนต์ละ 8 ตัว โคตัวเมียทำการเหนียวนำการเป็นสัดโดย PGF $_{2\alpha}$ หรือชื่อการค้าว่า Lutalyse โดยฉีด 15 มิลลิกรัมต่อตัวเพียงครั้งเดียวและทำการผสมเทียมเมื่อโคเป็นสัดครั้งที่ 2 หลังการฉีดฮอร์โมน ทำการสังเกตตรวจการตั้งท้องผ่านทางทวารหนักหลังการผสมหรือดูการไม่กลับสัดที่ 90 วัน หลังผสมเทียมครั้งแรก และคัตเปอร์เซ็นต์การตั้งท้อง

ตารางที่ 3 ทรีทเมนต์ที่ทำการศึกษา

ทรีทเมนต์	คาเฟอีน (มิลลิโมล/มิลลิลิตร)	ออกซิไดซิน (โมล/มิลลิลิตร)
1	-	-
2	0.4	-
3	0.6	-
4	0.8	-
5	1.0	-
6	-	10^{-4}
7	-	10^{-6}
8	-	10^{-8}
9	-	10^{-10}
10	-	10^{-12}

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแปรปรวนของตัวแปรจากการทดลองที่ 1 โดยใช้ proc GLM (SAS, 1985) และใช้ Orthogonal Comparison ในการหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่เติมคาเฟอีน ออกซิไดซินและกลุ่มควบคุมใช้ Orthogonal polynomial ในการดูแนวโน้มการตอบสนองแต่ละระดับของสารที่เติมและความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดย Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) และการทดลองที่ 2 วิเคราะห์โดยใช้ Chi-square test โดยสมมติฐานว่าทุกทรีทเมนต์ที่ทดลองมีอัตราการตั้งท้องเท่ากัน

3.6 สถานที่ทำการวิจัย

1. ศูนย์วิจัยการผสมเทียมขอนแก่น ต. ท่าพระ อ. เมือง จ. ขอนแก่น
2. หมวดโคเนื้อ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. ห้องปฏิบัติการกายวิภาคและสรีรสัตว์เลี้ยง ภาควิทยาศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.7 เวลาที่ทดลอง

ทำการทดลองช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม 2537

วิเคราะห์ตัวอย่างช่วงเดือนสิงหาคมถึงธันวาคม 2537