บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

แผนงานวิจัยที่ 1 เรื่อง การศึกษาการพัฒนาการของฟอลลิเคิลบนรังไข่ในโคนมแรกคลอด

แผนการทดลองและสัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการสุ่มโคนมแรกคลอดระยะกำลังให้นมเข้าทดลองตามแผนการทดลอง โดยใช้โคนมแรกคลอดพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยน ของกลุ่มสมาชิกสหกรณ์โคนมขอนแก่น จำกัด ณ บ้านเนินทอง ตำบลบ้านค้อ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น จำนวน 16 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นโคนมที่ให้ลูกครั้งแรก (primiparous cows)

กลุ่มที่ 2 เป็นโคนมที่ให้ลูกมาแล้วหลายครั้ง (multiparous cows)

วิธีการดำเนินการทดลอง

ทำการทดลองในโคนมแรกคลอดตั้งแต่วันที่ 5 หลังคลอด จนกระทั่งวันที่เกิดการตกไข่ครั้งแรก หรือในกรณีที่ไม่มีการตกไข่จะดำเนินการทดลองจนกระทั่งถึงวันที่ 90 หลังคลอด ทำการแยกคอกขังเดี่ยว ให้กินอาหารหยาบโดยมีอาหารข้นเสริมตามสมรรถภาพการให้นมของโคนมแต่ละตัว ในอัตราส่วนอาหารหยาบ : อาหารข้น เท่ากับ 40 : 60 ซึ่งเป็นไปตามความต้องการโภชนะของโครีดนม ทำการรีดนมวันละ 2 ครั้ง คือเวลา 6.00 น. และ16.00 น. และทำการบันทึกข้อมูลของผลผลิตน้ำนมเป็นประจำทุกวัน ชั่งน้ำหนักตัว ทำการประเมินระดับคะแนนร่างกายของโคนมใช้ระบบ A quarter-point scale ตั้งแต่ 1 ถึง 5 (Navanukraw et al., 2004) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง (ทุกวันพฤหัสบดี) โดยใช้ผู้เชี่ยวชาญหรือผู้มีประสบการณ์ในการประเมินอย่างน้อย 3 คน/ครั้ง

การเก็บและรวบรวมข้อมูล

1) การทำงานของรังไข่ (ovarian function) โดยการใช้เครื่องมือ ultrasonography (Pie medical, Maastricht, The Netherlands) ในการติดตามการเจริญเติบโต การพัฒนาการ และการเปลี่ยนแปลงของฟอลลิเคิลบนรังไข่ทุกๆ ระยะตลอดการทดลอง โดยการวัดขนาดของฟอลลิเคิลแบบวันเว้นวัน พร้อมกับได้การวาดรูปร่างของฟอลลิเคิลและโครงสร้างอื่นๆ ที่ปรากฏบนจอภาพของเครื่อง และได้ทำการเก็บข้อมูลจำเพาะต่างๆ ดังรายละเอียดคือ

1.1 DF เป็นฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มม. และมีช่องว่างที่มีของเหลวบรรจุอยู่ภายในและจะไม่พบฟอลลิเคิลฟองอื่นๆ ปรากฏอยู่ในขณะเวลาเดียวกัน

1.2 วงชีวิตของ DF (life span of DF) ซึ่งคำนวณได้จากจำนวนวันในระหว่างที่ฟอลลิเคิลมีขนาด 10 มม จนถึงวันที่มีการตกไข่หรือวันที่มีการฝ่อสลายตัวไป

1.3 ลักษณะถุงน้ำบนรังไข่ (ovarian cyst) ซึ่งมีลักษณะของฟอลลิเคิลที่ไม่สามารถตกไข่ได้ และ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 25 มม. และคงอยู่ 10 วัน เป็นต้นไป

1.4 การตกไข่ (ovulation) สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่อง ultrasonography และตรวจยืนยันโดยการวิเคราะห์ระดับ P4 ในซีรั่ม

1.5 โครงสร้าง corpus luteum (CL)

2) ปริมาณอาหารที่โคนมกิน น้ำหนัก และระดับคะแนนร่างกาย โดยทำการชั่งอาหารทั้งอาหารข้นและอาหารหยาบให้โคนมก่อนและหลังให้ในมื้อเช้าและมื้อเย็นทุกวัน ชั่งน้ำหนักตัว และให้ระดับคะแนนร่างกายสัปดาห์ละครั้ง

<u>แผนการวิจัยที่ 2</u> เรื่อง ศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำการตกไข่ที่เหมาะสมในโคนมแรกคลอด

แผนการทดลองและสัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการสุ่มโคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเซี่ยน ที่ไม่ตั้งท้อง (nonpregnant Holstein Friesion cows) และเป็นโคนมระยะให้นมมากกว่า 50 DIM จำนวน 24 ตัว ทำการแบ่งโคนมออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับโปรแกรม Ovsynch (ควบคุม) (Fricke et al., 1998)

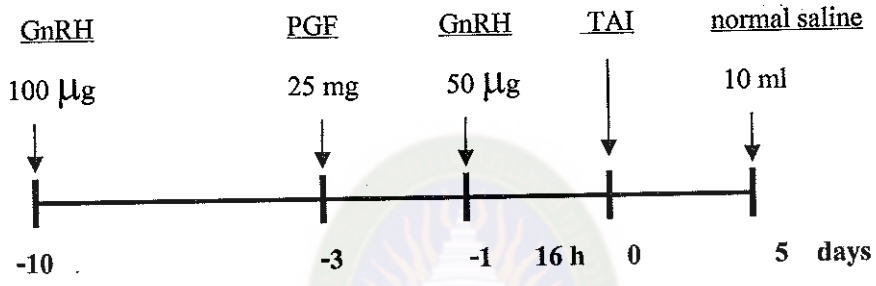
กลุ่มที่ 2 ได้รับโปรแกรม Ovsynch ร่วมกับ hCG ขนาด 3,000 IU ในวันที่ 5 หลังผสมเทียม

วิธีการดำเนินการทดลอง

สัตว์ทดลองได้รับอาหารหยาบ (หญ้าสด) และอาหารข้น ตามสมรรถภาพการให้นมของโคนมแต่ละตัว ในอัตราส่วนอาหารหยาบ : อาหารข้น เท่ากับ 40 : 60 และตามความต้องการโภชนะของโครีดนม โดยโคนมทดลองทั้งหมดได้รับรีดนมวันละ 2 ครั้ง คือเวลา 6.00 น. และ16.00 น.

<u>โปรแกรมที่ 1</u> โคนมได้รับโปรแกรมการเหนี่ยวนำการตกไข่ Ovsynch protocols โดยวันแรก (วันที่-10) โคนมได้รับฮอร์โมน GnRH เข็มแรกขนาด 100 μg หลังจากนั้น 7 วัน (วันที่ -3) ฉีด

ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ขนาด 25 mg และวันที่ -1 ฉีด GnRH เข็มที่สองขนาด 50 μg และกำหนดเวลาในการผสมเทียมในชั่วโมงที่ 16-18 หลังฉีด GnRH เข็มที่สอง และวันที่ 5 หลังผสมเทียมฉีด normal saline ขนาด 10 ml การฉีดฮอร์โมนในสัตว์ทดลองทุกตัว ทำโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) ดังรูปที่ 3-1

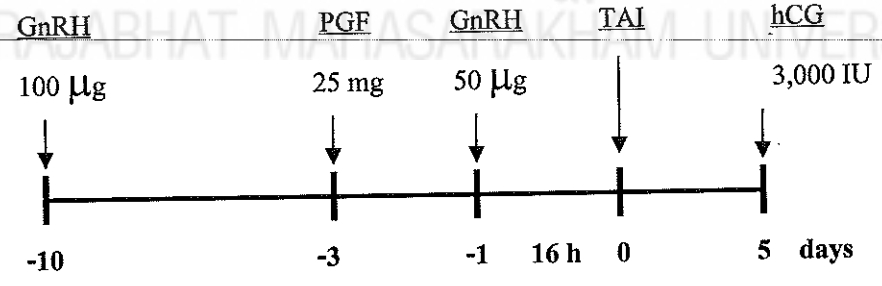


รูปที่ 3-1 วิธีการเหนี่ยวนำการตกไข่โดยโปรแกรม Ovsynch (กลุ่มควบคุม)

ที่มา : Fricke et al. (1998)

<u>**โปรแกรมที่ 2**</u> โคนมได้รับโปรแกรมการเหนี่ยวนำการตกไข่เช่นเดียวกับโปรแกรมแรก แต่โคนมได้รับฮอร์โมน hCG ขนาด 3,000 IU ในวันที่ 5 หลังผสมเทียม (รูปที่ 3-2)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



รูปที่ 3-2 วิธีการเหนี่ยวนำการตกไข่โดยโปรแกรม Ovsynch+hCG (กลุ่มทดลอง)

การเก็บและรวบรวมข้อมูล

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างฟอลลิเคิลบนรังไข่ (follicular dynamic) โดยการใช้เครื่องมือ ultrasonography (Pie medical, Maastricht, The Netherlands) ในการติดตามพัฒนาการและการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลบนรังไข่ในวันที่ -10, -8, -3, -1 และหลังฉีดฮอร์โมน GnRH เข็มสุดท้ายชั่วโมงที่ 20, 24, 30, 36, 42 และ 48 หรือจนกว่าเกิดการตกไข่ และวันที่ 5, 8 และ 12 หลังผสมเทียม

โดยการวัดขนาดของฟอลลิเคิล พร้อมกับได้การวาดรูปร่างฟอลลิเคิลและโครงสร้างอื่นๆ ที่ปรากฏบนจอภาพของเครื่อง ultrasound (Hanlon et al., 2005)

2. ระยะเวลาการตกไข่ของ DF (timing ovulation of DF) โดยใช้เครื่อง ultrasonography ติดตามการเจริญเติบโต การพัฒนาการ และการเปลี่ยนแปลงของ DF ในชั่วโมง 20, 24, 30, 36, 42, และ 48 หลังฉีดฮอร์โมน GnRH เข็มสุดท้ายหรือจนกระทั่งเกิดการตกไข่ พร้อมกับได้การวาดรูปของฟอลลิเคิลและโครงสร้างอื่นๆ ที่ปรากฏบนจอภาพและยืนยันผลการตกไข่ โดยการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมน P4

4. เปอร์เซ็นต์การตกไข่ เปรียบเทียบทั้ง GnRH ในเข็มแรกและที่สองของโคนมทั้ง 2 กลุ่ม

5. การทำงานของ CL ใช้เครื่อง ultrasonography ติดตามการเจริญเติบโต การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของ CL ในวันที่ 5, 8 และ 12 หลังกำหนดเวลาผสมเทียม โดยการวัดขนาดของ CL พร้อมกับได้การวาดรูปของ CL และโครงสร้างอื่นๆ ที่ปรากฏบนจอภาพ (Roch et al., 2002)

6. เจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมน P4 ในวันที่เวลาที่ทำการอัลตราซาวนด์เพื่อหาระยะเวลาการตกไข่ และในวันที่ -10 -3 -1 และระยะเวลาที่กำหนดเพื่อตรวจการตกไข่ รวมทั้งในวันที่ 5, 8 และ 12 หลังผสมเทียม

7. อัตราการผสมติด (conception rate) โดยทำการตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่อง ultrasonography ในวันที่ 35 หลังกำหนดเวลาผสมเทียม (Navanukraw et al., 2004)

การเก็บตัวอย่างเลือดและการวิเคราะห์ฮอร์โมน P4

เก็บตัวอย่างเลือดจาก coccygeal vein หรือ artery ด้วยหลอดเก็บเลือด heparinized tubes ขนาด10 มล. ตามวันเวลากำหนดแล้วนำตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที (Navanukraw et al., 2004) แล้วนำซีรั่ม (serum) ที่อยู่ด้านส่วนด้านบน (supernatant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ด้วยวิธี Competitive ELISA (Crane et al., 2006)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากแผนงานวิจัยที่ 1 และ 2 นำมาทดสอบความแตกต่างโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้ PROC ANOVA การตอบสนองตอบต่อการตกไข่ของฮอร์โมน P4 และอัตราการตั้งท้องต่อการผสมเทียม ด้วย LOGISTIC procedure of SAS (Navanukraw et al., 2004) และทดสอบความแตกต่างโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้

PROC ANOVA (SAS, 1985) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้โดยวิธี Student *t*-test และ Chi-square test การหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลังคลอดและเปอร์เซ็นต์การตกไข่ ตลอดจนการทำงานของรังไข่ทำได้โดยการใช้ linear regression (Sakaguchi et al., 2004) โดยมี model ของค่าสังเกตดังนี้

$$Yij = \mu + \tau i + \varepsilon ij$$

เมื่อ Yij = ค่าสังเกตจากทรีทเมนต์ที่ i

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมด

εij = Error

ส่วน logistic regression เป็น model ที่มีความเหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีการจำแนกตัวแปร (categorical outcome variables) ซึ่งในแผนงานทดลองนี้ ได้แก่ parity และ BCS ตัวแปรดังกล่าวอาจมีผลต่อค่าสังเกต อันเนื่องมาจากอิทธิพลของทรีทเมนต์ เช่น อัตราการตกไข่ และอัตราการผสมติด เป็นต้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY