

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดลองที่ฟาร์มโคนมของสมาชิกสหกรณ์โคนมขอนแก่น จำกัด ณ บ้านเนินทอง และบ้านซำจาน ตำบลบ้านคือ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยมีขั้นตอนและวิธีการทดลอง ดังนี้

##### 3.1 สัตว์ทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้โคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนหลังคลอดจำนวน 20 ตัว อายุระหว่าง 3-8 ปี น้ำหนักอยู่ระหว่าง 350-400 กิโลกรัม ที่อยู่ในช่วงของการให้น้ำนมระยะแรกระหว่าง 45-180 วัน และได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของแต่ละฟาร์ม และการจัดการด้านอาหารตามโปรแกรมของแต่ละฟาร์ม และโคนมทดลองทุกตัวมีประวัติวงรอบการเป็นสัดไม่สม่ำเสมอ หรือไม่แสดงพฤติกรรมการเป็นสัด โคนมทดลองทุกตัวก่อนทำการสุ่มเข้ากลุ่มทดลองได้ รับการตรวจวินิจฉัยจากพฤติกรรมที่แสดงออกของโคนมว่าเกิดความผิดปกติของรังไข่ร่วมกับ การตรวจวินิจฉัยยืนยันอีกครั้งด้วยการส่องตรวจทางทวารหนัก นอกจากนี้โคนมกลุ่มที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแยกประเภทของถุงน้ำ โดยทำการตรวจวินิจฉัยด้วยการอัลตราซาวด์อีกครั้งเพื่อยืนยันความแม่นยำ ตามวิธีการของ Hatler et al. (2003)

##### 3.2 การจัดการด้านอาหารและการรีดนม

การจัดการด้านอาหาร โคนมทดลองขึ้นอยู่กับจัดการของแต่ละฟาร์ม โดยฟาร์มโคนมทดลองของเกษตรกรผู้เลี้ยงแต่ละฟาร์มมีลักษณะการจัดการที่คล้ายคลึงกัน คือ อาหารหยาบให้กินอย่างเต็มที่ ส่วนใหญ่เป็นหญ้าสดและฟางแห้ง ส่วนอาหารข้นให้วันละ 2 ครั้ง ในช่วงรีดนม ปริมาณที่ให้คิดตามอัตราส่วนของผลผลิตน้ำนมที่ได้ของโคนมแต่ละตัว โดยคิดในอัตราส่วน 1 กิโลกรัมอาหาร : 2 กิโลกรัมน้ำนมดิบ ปริมาณเปอร์เซ็นต์โปรตีนประมาณ 18% และพลังงานประมาณ 2.8-3.5 Mcal/kg ดังนั้นโดยเฉลี่ยอาหารข้นที่ให้ประมาณ 10 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน

การจัดการด้านการรีดนมภายในฟาร์มโคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในแต่ละฟาร์ม ซึ่งมีลักษณะรูปแบบการจัดการที่คล้ายคลึงกัน คือ การรีดนมของฟาร์มรีดวันละ 2 เวลา ในช่วงเช้าและช่วงเย็น โดยในช่วงเช้ารีดนมเวลา 06.00-08.00 น. และในช่วงเย็นรีดนมเวลา 15.00-17.00 น. ซึ่งจำนวนชั่วโมงในการรีดนมของแต่ละฟาร์มแตกต่างกันไปตามจำนวนแม่โคนม

### 3.3 แผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ group t-test โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว โดยมีทรีทเมนต์ ดังนี้ คือ

ทรีทเมนต์ที่ 1 กลุ่มโคนมทดลองที่ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นถุงน้ำในรังไข่ประเภทใด และได้รับการแก้ไขโดยการให้โปรแกรม Ovsynch

ทรีทเมนต์ที่ 2 กลุ่มโคนมทดลองที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแยกประเภทของถุงน้ำในรังไข่ด้วยการอัลตราซาวด์ โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ follicular cysts จำนวน 6 ตัว ได้รับการแก้ไขด้วยการให้ GnRH และ luteal cysts จำนวน 4 ตัว ได้รับการแก้ไขด้วยการให้  $\text{PGF}_{2\alpha}$

### 3.4 วิธีการทดลอง

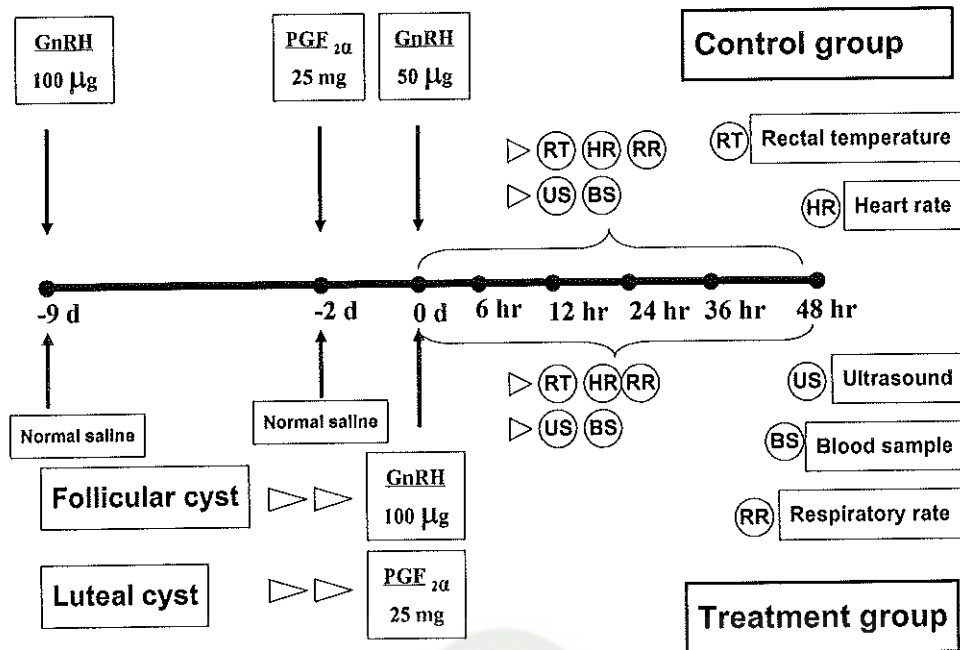
การทดลองครั้งนี้ทำการทดลองในช่วงระยะเวลา 6 เดือน คือ จากเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2550 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 โดยมีขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย ดังนี้

1. กลุ่มโคนมทดลองที่ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแยกประเภทของถุงน้ำในรังไข่ชนิดใด โดยการให้โปรแกรม Ovsynch

2. กลุ่มโคนมทดลองที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแยกกว่าเป็นถุงน้ำชนิดใด โดยการใช้เครื่อง Ultrasonography ความถี่ 8 MHz (Pie medical, Masstricht, Netherland) เพื่อตรวจวินิจฉัยว่าเป็นถุงน้ำในรังไข่ชนิดใด โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.1 ถุงน้ำในรังไข่ชนิด follicular cysts โดยการให้ GnRH ขนาด 100  $\mu\text{g}$  ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ hamstring muscle บริเวณโคนขาหลังใกล้กับอวัยวะเพศเมีย (vulva) ครั้งเดียว

2.2 ถุงน้ำในรังไข่ชนิด luteal cysts โดยการให้  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ขนาด 25 mg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ hamstring muscle บริเวณโคนขาหลังใกล้กับอวัยวะเพศเมีย (vulva) ครั้งเดียว (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 โปรแกรมการรักษาอุ้งน้ำในรังไข่ของโคนมหลังคลอดตามแผนการทดลอง โดยมีขั้นตอนและวิธีการ ดังต่อไปนี้ กลุ่มควบคุม วันที่ -9 คือ วันที่โคนมได้รับ GnRH เข็มแรกขนาด 100 µg, วันที่-2 คือ วันที่โคนมได้รับ PGF<sub>2α</sub> ขนาด 25 mg, วันที่ 0 คือ วันที่โคนมได้รับ GnRH เข็มที่สอง ขนาด 50 µg และกลุ่มที่รีทเมนต์ วันที่ -9 และ -2 คือ วันที่โคนมได้รับ normal saline, วันที่ 0 กลุ่ม follicular cysts คือ วันที่โคนมได้รับ GnRH ขนาด 100 µg และกลุ่ม luteal cysts คือ วันที่โคนมได้รับ PGF<sub>2α</sub> ขนาด 25 mg หมายเหตุ โคนมทดลองทุกตัวในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 หลังการรักษา จะได้รับการวัดอุณหภูมิของทวารหนัก อัตราการเต้นของหัวใจ อัตราการหายใจ การอัลตราซาวด์รังไข่ และการเก็บตัวอย่างเลือด

### 3.5 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูล ดำเนินการในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2550-เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 โดยข้อมูลที่เก็บในงานวิจัยครั้งนี้ คือ

3.5.1 บันทึกค่าอัตราการเต้นของ หัวใจ (heart rate) อัตราการหายใจ (respiratory rate) และ อุณหภูมิของทวารหนัก (rectal temperature) โดยค่าอัตราการเต้นของหัวใจ มีวิธีการวัดดังนี้ คือ นำ เครื่อง stethoscope มาวางลงตรงบริเวณหน้าอกใต้ขาหน้าด้านขวาของแม่โคนม ทำการวัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย การวัดค่าอัตราการหายใจ มีวิธีการดังนี้ คือ นำเครื่อง stethoscope มาวางลงตรง

บริเวณช่องอกส่วนของกระดูกซี่โครง หรืออาจจะไม่ต้องใช้เครื่อง stethoscope ก็ได้ แต่สังเกตการหุบและกางของช่องอกหรือช่องท้องก็ได้ ทำการวัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และการวัดค่าของอุณหภูมิของทวารหนัก จะใช้เทอร์โมมิเตอร์สอดเข้าทางทวารหนักนานประมาณ 2 นาที ทำการวัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ในการวัดค่า vital sign ต่างๆ นี้จะทำการวัดหลังการรักษาในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มทดลอง

3.5.2 บันทึกค่าคะแนนร่างกายของแม่โคนมทดลองทุกตัว ตามวิธีการของ Edmonson et al. (1989) เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง โคนม กลุ่มที่ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแยกกว่าเป็นถุงน้ำในรังไข่ชนิดใด และกลุ่มโคนมที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยเพื่อแยกกว่าเป็นถุงน้ำในรังไข่ชนิด follicular cysts หรือชนิด luteal cysts

3.5.3 บันทึกระยะเวลาการให้น้ำนม (วัน) ของแม่โคนมทดลองทุกตัว

3.5.4 บันทึกปริมาณน้ำนมของแม่โคนม ในตอนเช้าและตอนเย็นตลอดระยะเวลาการทดลอง เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำนมเฉลี่ยต่อตัวต่อวันในแม่โคนมทดลอง

3.5.5 บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในรังไข่ โดยเก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของลักษณะถุงน้ำในรังไข่หลังการรักษา ระยะเวลาการเสื่อมสลายของถุงน้ำที่เกิดขึ้นในรังไข่ภาย หลังการรักษา โดยมีวิธีการดังนี้ คือ ใส่ถุงมือล้างตรวจโดยใส่มือด้านที่ไม่ถนัด แล้วล้วงเอาอุจจาระออกให้หมด หลังจากนั้นจึงใช้ probe ของเครื่องอัลตราซาวด์ล้วงเข้าทางทวารหนักเพื่อตรวจดูภายในรังไข่ โดยล้วงตรวจหลังจากการรักษาในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จนกระทั่งแม่โคนมแสดงการเป็น สัตว์

3.5.6 สังเกตพฤติกรรมการเป็นสัตว์ของ โคนมทดลองภายหลังการรักษา เพื่อประเมินผลของประสิทธิภาพของการรักษา โดยสังเกตพฤติกรรมการเป็นสัตว์ คือ อวัยวะเพศบวมแดง มีน้ำเมือกใสจากช่องคลอด ขึ้นทับตัวอื่น เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบระหว่างโคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นถุงน้ำในรังไข่ชนิดใด แต่ได้รับการแก้ไขโดยการให้โปรแกรม Ovsynch และกลุ่มโคนมที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยเพื่อแยกกว่าเป็นถุงน้ำในรังไข่ชนิด follicular cysts และชนิด luteal cysts นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบระหว่าง โคนมที่เป็นถุงน้ำชนิด follicular cysts และ ชนิด luteal cysts

3.5.7 การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ P4 ในซีรัม โดยเจาะเก็บเลือดตำแหน่งเส้นเลือดดำ coccygeal vein บริเวณโคนหาง ในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เก็บประมาณ 5 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และแยกซีรัมใส่หลอดแก้วพลาสติก ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ P4 ในซีรัม

### 3.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ P4

3.6.1 ตัวอย่างเลือดที่เก็บประมาณ 5 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และแยกซีรัมใส่หลอดแก้วพลาสติก ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $-20$  องศา-เซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ P4 ในซีรัม

3.6.2 การเตรียมตัวอย่างสกัด โดยดูดตัวอย่างซีรัม ขนาด  $200 \mu\text{l}$  เติมลงไปหลอดขนาด 1.5 มล. แล้วเติม petroleum ether ขนาด 3 ml/หลอด นำไปแช่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งแห้งกับ methanol จนกว่าตัวอย่างซีรัมจะตกตะกอน แล้วเทส่วนใสด้านบนเก็บไว้ในหลอดขนาด 5 มล. (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้ตั้งทิ้งไว้ในตู้ปลอดเชื้อจนกว่าจะแห้ง ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมน P4

3.6.3. การเตรียม standard curve P4 ตามความเข้มข้นที่ต้องการ 9 ความเข้มข้น คือ 0.038, 0.078, 0.16, 0.32, 0.61, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/ml

3.6.4. การวิเคราะห์ความหาความเข้มข้นของ P4 ด้วยวิธี competitive ELISA ตามวิธีการของ Crane et al. (2006) ซึ่งมีรายละเอียดการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาคผนวก

ในการตรวจหาระดับความเข้มข้นของ P4 ด้วยวิธี competitive ELISA ในครั้งนี้มีค่า intraassay coefficients of variation เท่ากับ 7.69% และ assay sensitivity เท่ากับ 0.025 ng/ml

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ ลักษณะทั่วไปและสรีรวิทยาบางประการของโคนม การตอบสนองต่อการรักษาถุงน้ำในรังไข่ ระดับความเข้มข้นของ P4 ในซีรัมของโคนม การเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ P4 ในซีรัมของโคนมที่เวลา 0 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ภายหลังการรักษา และอัตราการลดลงของขนาดถุงน้ำในรังไข่และปริมาตรของถุงน้ำในรังไข่ ชนิด follicular cysts ที่รักษาด้วย GnRH ขนาด  $200 \mu\text{g}$  โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้อด้วยวิธี Student t-test (SAS, 2001)