

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ และ อุปกรณ์

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

1.1 แพะทดลองเพศเมีย จะจัดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้แพะสาว (แพะเพศเมียที่มีวงรอบการเป็นสัดแล้ว แต่ยังไม่เคยตั้งท้องและให้ลูกมาก่อน) ลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองไทยกับพันธุ์แองโกลนูเบียน อายุระหว่าง 1 ปี 8 เดือน ถึงอายุ 1 ปี 10 เดือน น้ำหนัก 20-26 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว (75% พื้นเมืองไทย 25% แองโกลนูเบียน 3 ตัว และ 50% พื้นเมืองไทย 50% แองโกลนูเบียน จำนวน 3 ตัว)

กลุ่มที่ 2 แพะสาว ลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองไทยกับพันธุ์แองโกลนูเบียน อายุระหว่าง 1 ปี 8 เดือน ถึงอายุ 1 ปี 10 เดือน น้ำหนัก 20-26 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว (75% พื้นเมืองไทย 25% แองโกลนูเบียน 2 ตัว และ 50% พื้นเมืองไทย 50% แองโกลนูเบียน จำนวน 4 ตัว)

กลุ่มที่ 3 แพะนาง (แพะเพศเมียที่เคยให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง) ลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองไทยกับพันธุ์แองโกลนูเบียน อายุระหว่าง 2-6 ปี น้ำหนัก 18-46 กิโลกรัม มีระดับเลือดแองโกลนูเบียนตั้งแต่ 32.875-93.75 % จำนวน 7 ตัว

กลุ่มที่ 4 แพะนาง ลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองไทยกับพันธุ์แองโกลนูเบียน อายุระหว่าง 2-8 ปี น้ำหนัก 20-56 กิโลกรัม มีระดับเลือดแองโกลนูเบียนตั้งแต่ 32.875-93.75 % จำนวน 7 ตัว

1.2 พ่อแพะที่ใช้ตรวจการเป็นสัด (teaser) จำนวน 3 ตัว เป็นพ่อแพะที่ผ่านการทำหมันโดยการตัดบางส่วนของท่อน้ำเชื้อออก (vasectomized buck) พ่อแพะทั้ง 3 ตัวจะมีแท่งสีติดกับเอี๊ยม (harness) ผูกติดไว้ที่บริเวณหน้าอก แล้วปล่อยให้คุ่มฝูงร่วมกับแพะทดลองเพศเมียตลอดการทดลอง เมื่อพ่อแพะป็นทับแม่แพะที่เป็นสัด สีที่ติดกับเอี๊ยมไว้ที่หน้าอก จะติดสะโพกของแม่แพะ ทำให้สังเกตได้ว่าแม่แพะตัวใดเป็นสัด

1.3 พ่อแพะที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (fertile buck) จำนวน 6 ตัว ใช้สำหรับผสมพันธุ์กับแพะทดลองเพศเมียที่เป็นสัด โดยแพะจะถูกเลี้ยงแบบขังคอกรวมไว้บนโรงเรือน ตัดหญ้าสดให้กิน และเสริมด้วยอาหารข้นให้กิน เข้า-เย็น มีน้ำและแร่ธาตุก้อนตั้งไว้ให้แพะกินได้ตามใจชอบ

2. อาหารชั้นและอาหารหยาบ

แพะทดลองจะปล่อยให้แพะเดิมในแปลงหญ้าผสมถั่ว ชนิดของหญ้าและถั่วที่ปลูกได้แก่ หญ้ารูซี่ หญ้าสตาร์ หญ้าเนเปียร์ และถั่วลาย แปลงหญ้าที่ใช้เลี้ยงแพะทดลองมีทั้งหมด 4 แปลง พื้นที่รวมประมาณ 10 ไร่ โดยจัดให้แพะลงแพะเดิมแบบหมุนเวียน ในวันที่ฝนตกแพะไม่สามารถออกไปแพะเดิมในแปลงหญ้าได้ จะตัดหญ้าสดให้กินหรือให้หญ้าแห้งเสริม มีน้ำและแร่ธาตุก้อนวางไว้ให้กินตลอดเวลา แพะทดลองทุกตัวจะได้รับการเสริมด้วยอาหารชั้น ที่มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 13 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 200 กรัมต่อตัวต่อวัน ส่วนประกอบของอาหาร ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสูตรอาหารชั้น

วัตถุดิบอาหารสัตว์	จำนวน (กิโลกรัม)
ข้าวโพด	47.0
กากถั่วเหลือง	12.0
กากเนื้อในของเมล็ดปาล์ม	37.5
เปลือกหอยปน	0.5
ไคแคลเซียมฟอสเฟต	1.0
เกลือ	2.0
รวม	100.0

3. วัคซีนและยาที่ใช้ในการสุขภาพป้องกันโรค

แพะทดลองทุกตัวจะได้รับการทำวัคซีน และถ่ายพยาธิตามโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมการทำวัคซีนจะทำวัคซีน ป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease, FMD) แบบรวมทั้ง 3 type (O, A, Asia I) ของกรมปศุสัตว์ โดยทำ 6 เดือนต่อครั้ง

โปรแกรมการถ่ายพยาธิทำ 3 เดือนต่อครั้ง โดยใช้ Farmbazen[®] (Albendazone) ของบริษัท H.K. Pharmaceutical Co., Ltd. เป็นยาถ่ายพยาธิภายใน และ Asuntol 50[®] ของบริษัทไบเออร์เลเวอร์เซน เยอรมันนี่ เป็นยากำจัดพยาธิภายนอก

4. ฮอริโมน
 - Follicle Stimulating Hormone, FSH (Folltropin[®] -V Vetrepharm Pty. Ltd Australia) Packing 400 mg NIH-FSH-P1 = 18 mg PPFE = 35 mg NIH
 - Prostaglandin F_{2α} analogue (Estrumate[®] Schering-Plough Pty. Ltd Australia)
5. ยาแก้ปวดประสาท xylazine hydrochloride (Rompun,[®] Bayer Vetchem Ltd.)
(ในการทดลองนี้ใช้เป็นยาสลบ)
6. ยาปฏิชีวนะ (Pendistep L.A. INJ[®] Phenix Pharmaceutical Antwere-Belgium)
7. ยาฆ่าเชื้อ
 - chloroxylenol (Dettol[®] , Colman Thailand Ltd.)
 - ทิงเจอร์ไอโอดีน
 - แอลกอฮอล์
8. น้ำเกลือสูตร Lactated Ringer's Solution
9. ซีรัมแม่แพะ
10. สารละลายบัฟเฟอร์ของฟอสเฟต (phosphate buffer saline , PBS)
11. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือ Laparoscope ประกอบด้วย
 - กล้อง laparoscope
 - สายเคเบิลนำแสง (fiber light trasmitting cable)
 - เครื่องกำเนิดแสง (light projector)
 - ชุดแท่งโลหะปลายแหลมพร้อมท่อสำหรับเจาะท้อง (trocar-cannular)
 - probe เป็นแท่งโลหะปลายมนยาวประมาณ 15 นิ้ว ส่วนปลายมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร ใช้สำหรับเขี่ยหารังไข่ และใช้ทาบบน CL และรังไข่เพื่อประมาณขนาด

2. ชุดเครื่องมือผ่าตัด ประกอบด้วย
 - ไขมีดผ่าตัดพร้อมด้าม
 - เข็มเย็บแผลพร้อมไหมเย็บ
 - กรรไกรจับเส้นเลือด
3. กระจกชีดยาพลาสติก พร้อมเข็มชีดยา
4. โต๊ะเหล็กสำหรับยึดตัวแพะ
5. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
6. กล้องจุลทรรศน์ต่อกับกล้องถ่ายภาพ
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
8. ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ
9. กระจกทรง (cylinder)
10. หลอดแก้วดัดแปลงพิเศษสำหรับดูดเอมบริโอ
11. petri dishes
12. เครื่อง centrifuge

วิธีการทดลอง

ในการทดลองการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติครั้งนี้ ใช้แพะทดลองเพศเมียจำนวน 26 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 แพะสาวจำนวน 6 ตัว (ในการทดลองนี้ใช้เป็นกลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 แพะสาวจำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3 แพะนางจำนวน 7 ตัว

กลุ่มที่ 4 แพะนางจำนวน 7 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ศึกษาการเป็นสัดตามธรรมชาติ และเก็บข้อมูลระยะต่างๆ ของการเป็นสัดของแพะทดลอง 1 วงรอบ เมื่อแพะทดลองเป็นสัดในวงรอบถัดมาผสมกับพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ในคอกผสมพันธุ์วันละ 2 เวลา (ช่วงเช้าประมาณ 7.00-9.00 น. และช่วงบ่ายประมาณ 14.00-16.00 น.) โดยในการผสมแต่ละช่วงเวลาจะใช้พ่อพันธุ์ตัวเดิม และปล่อยให้พ่อแพะได้อยู่กับแม่แพะนานประมาณ 30 นาที เมื่อผสมเสร็จแต่ละช่วงปล่อยให้แพะกลับเข้าฝูงตามเดิม ทำเช่นนี้จนกว่าแพะตัวเมียจะไม่ยอมให้ผสม หลังจากแม่แพะได้รับการผสมพันธุ์ครั้งสุดท้าย 12 วัน (โดยประมาณ) นำแพะมาเจาะท้อง (laparoscopy) เพื่อตรวจนับและวัดขนาด CL กระเพาะไข่ บนรังไข่ทั้งสองข้าง และวัดขนาดของรังไข่ทั้งสองข้าง (การวัดขนาดใช้การประมาณ

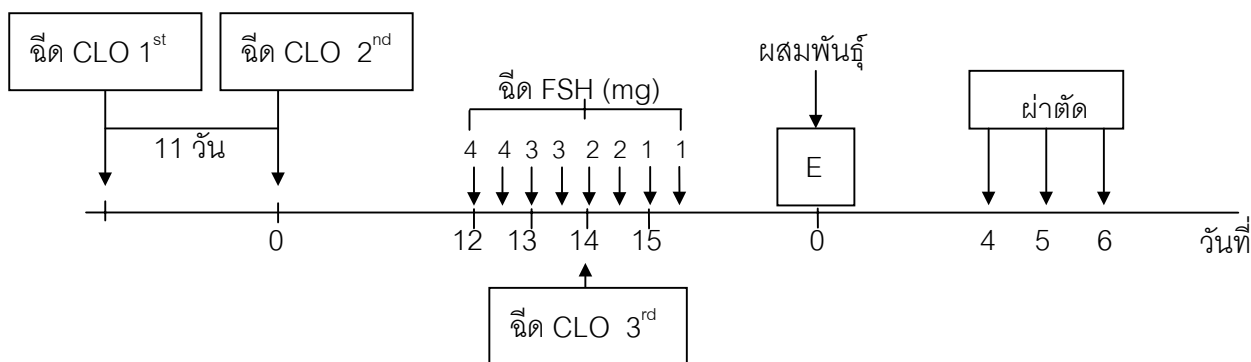
เอ็มบริโอเมื่ออายุเอ็มบริโอเท่ากัน ส่วนกลุ่มที่ 2 ผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอเมื่อเอ็มบริโอมีอายุ 4, 5 และ 6 วัน วันละ 2 ตัว

ก่อนทำการผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอทุกครั้งจะต้องทำ Laparoscopy เพื่อตรวจนับจำนวน CL บนรังไข่ทั้งสองข้างก่อน หากพบว่า

1. ไม่มี CL บนรังไข่ทั้งสองข้าง
2. พบ CL ทั้งหมดเพียง 1 อัน บนรังไข่ ในแพะทดลองที่มีอายุเอ็มบริโอตั้งแต่ 1-4 วัน
3. พบ CL จำนวน 2 อัน อยู่บนรังไข่ข้างละ 1 อัน ในแพะทดลองที่มีอายุเอ็มบริโอตั้งแต่ 1-4 วัน

ทั้งสามกรณีนี้จะไม่ผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอ แต่ถ้าแพะที่มีอายุเอ็มบริโอ 5, 6, และ 7 วัน หากตรวจพบว่ามี CL จะผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอจากแม่แพะทดลองทุกตัว

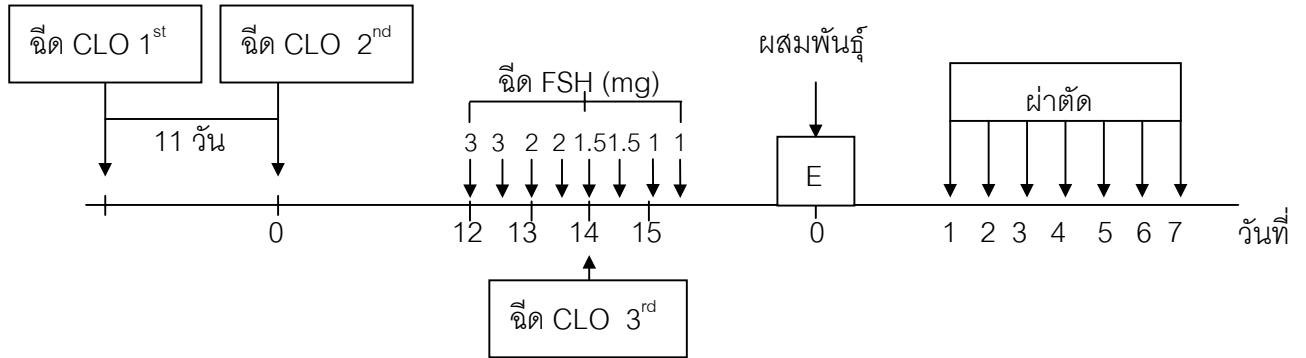
กลุ่มที่ 2 ฉีด FSH 20 mg NIH-FSH-P1 + CLO



E = เป็นสัด

ภาพที่ 2 แผนภาพโปรแกรมการผ่าตัดแพะกลุ่มที่ 2

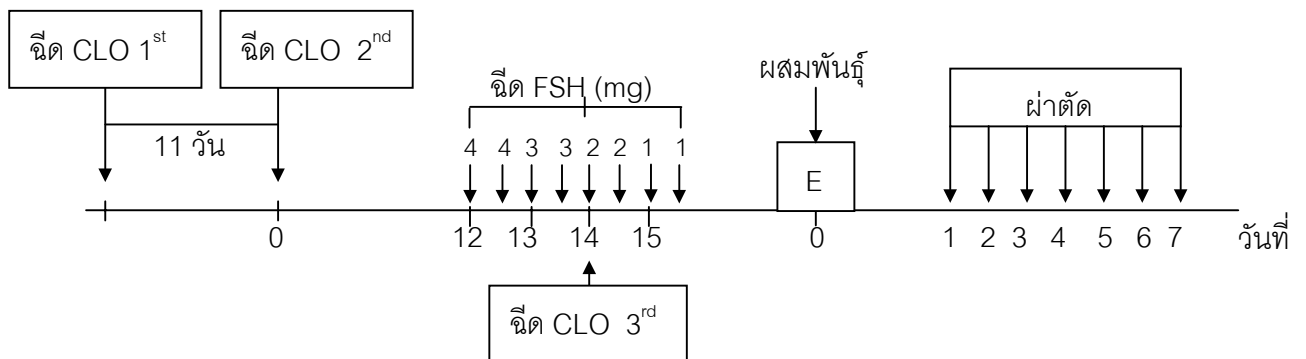
กลุ่มที่ 3 ฉีด FSH 15 mg NIH-FSH-P1 + CLO



E = เป็นสัด

ภาพที่ 3 แผนภาพโปรแกรมการผ่าตัดแพะกลุ่มที่ 3

กลุ่มที่ 4 ฉีด FSH 20 mg NIH-FSH-P1 + CLO



E = เป็นสัด

ภาพที่ 4 แผนภาพโปรแกรมการผ่าตัดแพะกลุ่มที่ 4

การตรวจการเป็นสัด ตรวจการเป็นสัดของแพะทดลองวันละ 2 เวลา ในช่วงเช้า ประมาณ 06.00-09.00 น. และช่วงเย็นประมาณ 16.00-18.00 น. โดยใช้เวลาสังเกตการเป็นสัดอย่างน้อย 30 นาที สังเกตการเป็นสัดจากอาการและพฤติกรรมของแม่แพะที่แสดงการกระดิกหาง บ่อย ๆ ปัสสาวะบ่อย ๆ อวัยวะเพศภายนอกบวมแดง มีเมือกออกมาจากอวัยวะเพศภายนอก แม่แพะกระวนกระวายไม่ยอมพักผ่อน ชอบป้อนตัวเมียด้วยกัน หรือยอมให้ตัวเมียอื่น หรือพ้อ

teaser ปีนทับ ประกอบกับการดูจากสีที่ติดบริเวณสะโพกของแม่แพะ ซึ่งเกิดจากการป็นทับของ พ่อ teaser ที่มีแท่งสีติดกับเอี่ยมผูกไว้ที่หน้าอก

ระดับสีที่ติดบริเวณสะโพกจะแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 พบสีติดบริเวณสะโพกเพียงเล็กน้อย สีไม่ชัด หรืออาจเป็นรอยขีด หรือสภาพที่พิจารณาแล้วไม่น่าเกิดจากการป็นทับของพ่อ teaser ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ โดยบังเอิญ กรณีนี้พื้นที่ติดสีไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่สะโพกทั้งหมด

ระดับที่ 2 พบสีติดบริเวณสะโพกพื้นที่ติดสีมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่สะโพกทั้งหมด

ระดับที่ 3 พบสีติดบริเวณสะโพก 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่สะโพกทั้งหมด

ระดับที่ 4 พบสีติดบริเวณสะโพก ตั้งแต่ 75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่สะโพกทั้งหมดจนถึงเต็มสะโพก

ระดับที่ถือว่าแม่แพะแสดงอาการเป็นสัดที่ชัดเจน คือ ระดับสีตั้งแต่ 2-4 สำหรับระดับที่ 1 ต้องดูอาการอย่างอื่นประกอบด้วย เช่น ลักษณะการให้ความสนใจของ teaser การบวมแดงของอวัยวะเพศภายนอก การมีเมือก เป็นต้น ถ้าแม่แพะไม่มีอาการเหล่านี้ประกอบด้วย จะไม่ถือว่าเป็นสัด เพราะสีที่ติดอาจเกิดจากเหตุบังเอิญอื่น ๆ ที่ไม่ใช่การยอมรับการป็นทับของ teaser เช่น การเดินเบียดกันแท่งสีไปโดนสะโพกหรือการแย่งกันกินอาหารทำให้แพะสาวตัวเล็กอาจไปโดนแท่งสีจากพ่อตัวผู้ได้

การนับวงรอบการเป็นสัด จะเริ่มนับความยาวของวงรอบการเป็นสัด ตั้งแต่ที่แม่แพะแสดงอาการเป็นสัดอย่างชัดเจนในระยะ estrus เช่น ยอมให้ teaser ปีนทับไปจนถึงเริ่มระยะเดียวกันนี้ในการแสดงการเป็นสัดของแม่แพะในครั้งถัดไป

การนับเวลาของระยะต่างๆ ของการเป็นสัด วงรอบการเป็นสัดแต่ละวงรอบจะถูกแบ่งออกเป็น 4 ระยะตาม Bearden และ Fuquay (1984) เรียงตามลำดับดังนี้

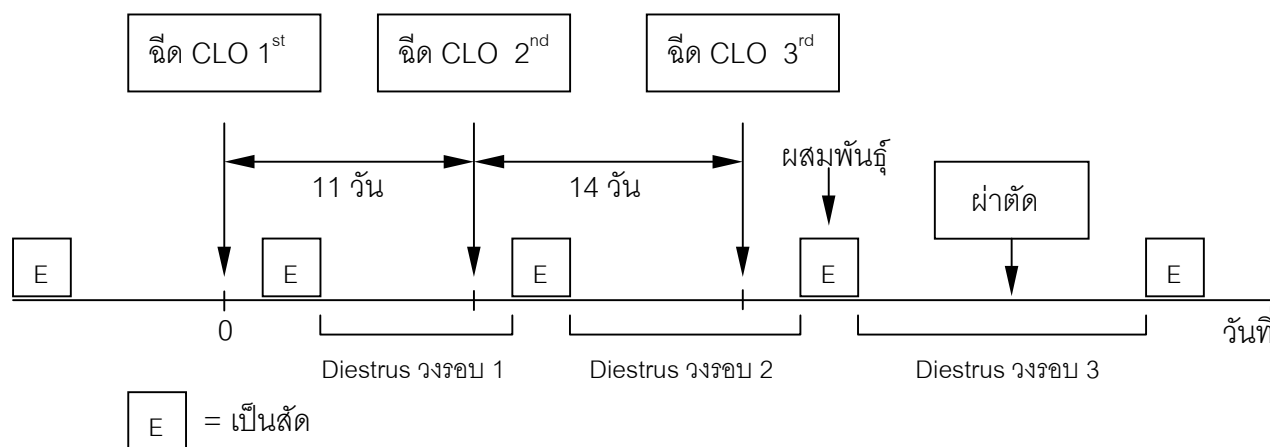
ระยะที่ 1 proestrus จะเริ่มนับระยะเวลาตั้งแต่ที่เห็นแพะเริ่มแสดงการเป็นสัดพ่อ teaser ให้ความสนใจเดินตามกระตุ้น พยายามที่จะป็นทับ แต่แม่แพะไม่ยู่หนึ่งจะเดินหนีไม่ยอมให้ป็น อาจประกอบกับการสังเกตอวัยวะเพศภายนอกเริ่มบวม หรืออาจมีเมือกออกมาจากอวัยวะเพศร่วมด้วย

ระยะที่ 2 estrus นับเวลาจากที่แม่แพะยื่นนียงยอมให้พ่อ teaser ปีนทับไปจนถึงกระทั่งแม่แพะเริ่มไม่ยอม และสังเกตจากลักษณะอื่นๆ ประกอบด้วย เช่น อาจดูที่บริเวณอวัยวะเพศภายนอกบวมแดง และขยายขนาดขึ้น มีเมือกออกมา เป็นต้น

ระยะที่ 3 metestrus เริ่มตั้งแต่เวลาที่แม่แพะไม่ยอมให้พ่อ teaser ปีนทับไปจนถึงเวลาที่แม่แพะสิ้นสุดอาการเป็นสัด พ่อ teaser ไม่ให้ความสนใจอีกต่อไป และอาจดูจากอวัยวะเพศที่มีสีซีดลงและมีเมือกออกมาน้อยลงร่วมด้วย

ระยะที่ 4 diestrus นับตั้งแต่แพะหยุดแสดงการเป็นสัด พ่อ teaser ไม่สนใจไปจนถึงที่แม่แพะเริ่มแสดงการเป็นสัดในระยะเวลา proestrus ของวงรอบถัดไป

ตัวอย่างการนับระยะ diestrus ของวงรอบการเป็นสัดในแพะที่ชักนำด้วย CLO ครั้งที่ 1, 2 และ 3 แสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การนับระยะ diestrus ของวงรอบการเป็นสัดในแพะที่ชักนำด้วย CLO ครั้งที่ 1, 2 และ 3

การนับระยะเวลาในการกลับมาเป็นสัดของแม่แพะหลังฉีดฮอร์โมน จะเริ่มนับตั้งแต่การฉีด CLO จนกระทั่งแม่แพะกลับมาแสดงการเป็นสัดในระยะเวลา estrus

การนับเวลาของแต่ละระยะใช้วิธีที่ตัดแปลงมาจากจรรยา (2540) โดยจะไม่นับเฉพาะตรงจุดเวลาที่สังเกตเห็นพฤติกรรมของระยะหนึ่งไปชนกับจุดเวลาที่สังเกตเห็นพฤติกรรมของอีกระยะหนึ่ง แต่จะทำการคำนวณโดยถือเกณฑ์ แบ่งเวลาออกเป็นส่วน ๆ ตามเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น หรือน่าจะเกิดต่อเนื่องกัน เช่น ตอนเย็นวันที่ 1 มาเช็คลูกแพะเวลา 16.00-17.00 น. พบว่า แพะไม่มี

อาการเป็นสัด (อยู่ในระยะ diestrus ของวงรอบที่ผ่านมา) ตอนเช้าของวันที่ 2 มาเช็คแพะเวลา 08.00-09.00 น. พบว่า แพะอยู่ในระยะ estrus ตอนเย็นเช็คแพะเวลา 17.00-18.00 น. พบว่า แพะอยู่ในระยะ metestrus แล้ว ดังนั้นจึงแบ่งระยะเวลาระหว่าง 17.00 ของวันที่ 1 จนถึง 08.00 น. ของวันที่ 2 (15 ชม.) ออกเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 5 ชั่วโมง โดย 5 ชั่วโมงแรกจะแบ่งไปนับรวมเป็นเวลาของระยะ diestrus ของวงรอบที่ผ่านมา 5 ชั่วโมงถัดมาเป็นเวลาของระยะ proestrus ของวงรอบใหม่ และ 5 ชั่วโมงสุดท้ายจะนับไปรวมเวลาให้กับระยะ estrus ของวงรอบใหม่ และแบ่งเวลาระหว่าง 08.00-17.00 น. ของวันที่ 2 (9 ชม.) ถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ๆ ละ 4 ชั่วโมง 30 นาที เท่า ๆ กัน โดย 4 ชั่วโมง 30 นาทีแรก จะแบ่งไปนับรวมเป็นเวลาของระยะ estrus และ 4 ชั่วโมง 30 นาทีหลังจะนับไปรวมเป็นเวลาให้แก่วาระระยะ metestrus การคิดเวลาของแต่ละระยะการเป็นสัด จะถือเกณฑ์การคำนวณทำนองเดียวกับที่ได้ยกเป็นตัวอย่างมาแล้วทั้งหมด

การเจาะท้องแพะ (laparoscopy)

1. งดให้อาหารแพะก่อนการเจาะท้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่มีน้ำให้กินตลอดเวลา
2. ทำให้แพะสลบโดยฉีดยาสลบ Rompun[®] (xylazine hydrochloride) ให้ในขนาด 0.10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม เข้าบริเวณกล้ามเนื้อคอ
3. เมื่อแพะสลบจะโกนขนบริเวณท้อง ตั้งแต่บริเวณฐานเต้านมจนถึงแนวของกระดูกซี่โครง ประมาณ 15X20 ตารางเซนติเมตร แล้วล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเช็ดให้แห้งด้วยผ้าที่สะอาด แล้วทาทิงเจอร์ไอโอดีนบริเวณที่โกนขน
4. ยกแพะขึ้นโต๊ะเหล็กสำหรับยึดแพะซึ่งสามารถปรับระดับได้ จัดให้แพะนอนหงายห้อยหัวลงท่ามุมประมาณ 60 องศา กับระดับพื้น โดยยึดขาทั้ง 4 ไว้
5. ใช้ trocar-cannula เจาะท้องด้านขวาในตำแหน่งที่ต่ำลงมาจากเต้านมประมาณ 2 นิ้ว และห่างจากแนวแกนกลางของท้องประมาณ 1.5 นิ้ว
6. ใช้ trocar-cannula ซึ่งมีท่อสำหรับใส่แก๊สอยู่ เจาะท้องด้านซ้ายในตำแหน่งเดียวกับด้านขวา (ในกรณีที่คนถนัดซ้าย เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติ ควรย้ายมาเจาะในตำแหน่งด้านขวาแทน และการเจาะท้องตามข้อ 5 ย้ายมาเจาะในตำแหน่งด้านซ้ายแทน)
7. ดึง trocar ออกจาก cannula ทั้งสองข้างแล้วเอา probe และกล้อง laparoscope ใสเข้าไปทางด้านขวาและด้านซ้าย ตามลำดับ
8. ต่อสาย fiber light transmitting cable กับกล้อง laparoscope และเครื่องกำเนิดแสง แล้วใช้กล้อง laparoscope ส่งดูภายในว่าเจาะผ่านชั้นไขมันเข้าไปในช่องท้องแล้วหรือส่งไป

ทางด้านข้างเจอมัดกล้ามเนื้อตรงโคนขา หลังจากนั้นปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในช่องท้องในระดับพอเหมาะ โดยสังเกตจากผนังท้องปองขึ้นมาเล็กน้อย

9. ใช้กล้อง laparoscope และ probe ช่วยในการเขี่ยหารังไข่เพื่อดูจำนวน ขนาด ลักษณะของ CL และกระเปาะไข่ บนรังไข่ข้างซ้ายและข้างขวา ดังภาพที่ 6

หมายเหตุ : อุปกรณ์ทุกชนิดก่อนใช้เจาะท้องแพะทำการฆ่าเชื้อโรคโดยแช่ไว้ในน้ำยาฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 6 การเจาะท้องแพะ (laparoscopy)

วิธีการผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอ

1. อุดอาหารและน้ำแม่แพะก่อนที่จะทำการผ่าตัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ฉีดยาสลบ Rompun[®] (xylazine hydrochloride) ขนาด 0.12 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ เมื่อแพะสลบทำการโกนขนบริเวณท้อง ตั้งแต่บริเวณฐานเต้านมจนถึงกึ่งกลางช่องท้อง แล้วล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ
3. นำแม่แพะขึ้นโต๊ะผ่าตัดซึ่งปรับระดับได้ จัดให้แม่แพะนอนหงาย โดยให้ส่วนหัวต่ำกว่าส่วนท้ายเล็กน้อย เช็ดทำความสะอาด และฆ่าเชื้อบริเวณผนังท้องที่จะทำการผ่าตัดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน
4. ใช้ผ้าคลุมตัวสัตว์ 4 ผืน คลุมปิดตัวสัตว์โดยเปิดช่องตรงบริเวณที่จะผ่าตัด ประมาณ 10x20 เซนติเมตร เปิดผ่าช่องท้องระหว่างฐานเต้านมซ้ายและขวายาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร

ด้วยใบมีดผ่าตัดเบอร์ 24 ดึงจับมดลูกขึ้นมาบริเวณแผลรอยเปิดด้วยความนุ่มนวลและระมัดระวัง ตรวจนับ CL และจำนวนกระเปาะไข่ขนาดต่างๆ บนรังไข่ทั้งสองข้าง พร้อมทั้งวัดขนาดโดยใช้เวอร์เนีย ดังภาพที่ 7 สำหรับแม่แพะทดลองที่มีอายุเอ็มบริโอ 1-3 วัน จะใช้กรรไกรเลาะพังผืดที่อยู่รอบๆ ท่อนำไข่ออก และใช้ไหมละลายมัดตรงรอยต่อระหว่างท่อนำไข่กับปีกมดลูก (uterotubal junction) เสริมแล้วจึงตัดส่วนของท่อนำไข่ทั้งหมดเก็บไว้ในปีกเกอร์ที่มีน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอ เก็บไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อรอการชะล้างและตรวจหาเอ็มบริโอต่อไป แม่แพะทดลองที่มีอายุเอ็มบริโอ 4-5 วัน จะตัดตรงกึ่งกลางของปีกมดลูกและส่วนของท่อนำไข่ทั้งหมด เก็บไว้ในปีกเกอร์ที่มีน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอ เก็บไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อรอการชะล้างและตรวจหาเอ็มบริโอเช่นกัน ส่วนแม่ทดลองที่มีอายุเอ็มบริโอ 6-7 วัน จะใช้ปากคีบ จับตรงบริเวณรอยต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ แล้วใช้ท่อสเตนเลสเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 2 นิ้ว เจาะใต้บริเวณที่จับด้วยปากคีบเล็กน้อย กรณีเจาะไม่เข้าจะใช้เข็มปลายแหลมเจาะนำก่อน เมื่อสอดท่อสเตนเลสเข้าไปในท่อนำไข่แล้วจะมัดปีกมดลูก ตรงบริเวณที่สอดท่อสเตนเลสเข้าไปด้วยไหมเย็บแผล เพื่อป้องกันการหลุดของท่อ ส่วนปลายท่ออีกด้านจะต่อกับสายยางซิลิโคน เพื่อรองรับเอ็มบริโอ ใช้ปากคีบอีกตัวจับตรงรอยแยกของปีกมดลูกที่แบ่งปีกมดลูกออกเป็นสองทาง (bifurcation) เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำยาชะล้างเอ็มบริโอไหลเข้าไปในมดลูก (uterus) ใช้เข็มเบอร์ 18 ที่ตัดปลายและฝนจนทุ่ แทะให้ทะลุเข้าไปในปีกมดลูกแล้วต่อด้วยกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอประมาณ 20-50 มิลลิลิตร เพื่อชะล้างเอ็มบริโอที่อยู่ในปีกมดลูกให้ไหลออกผ่านทางท่อสเตนเลสที่ต่อกับสายยางซิลิโคนลงในปีกเกอร์ที่เตรียมไว้รองรับเอ็มบริโอ ดังภาพที่ 8 แล้วนำไปเก็บไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจหาเอ็มบริโอต่อไป และทำการชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากปีกมดลูกอีกข้างโดยทำเช่นเดียวกัน (โดยจะทำการชะล้างเอ็มบริโอเฉพาะปีกมดลูกข้างที่มี CL บนรังไข่เท่านั้น)

5. จับรังไข่และปีกมดลูก ใส่คืนกลับสู่ตำแหน่งปกติในช่องท้องผ่านทางรอยแผลผ่า ฉีดหยดยาปฏิชีวนะลงในช่องท้องประมาณ 1 มิลลิลิตร เย็บปิดแผลช่องท้อง 3 ชั้น ชั้นแรกเย็บเย็บเย็บช่องท้องด้วยไหมละลาย ชั้นที่ 2 เย็บชั้นกล้ามเนื้อด้วยไหมละลายเช่นเดียวกัน ส่วนชั้นที่ 3 เย็บชั้นผิวหนังด้วยไหมเย็บแผล หลังจากนั้นฉีดยาปฏิชีวนะ (Pendistrep LA[®]) เพื่อป้องกันการอักเสบและติดเชื้อในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 20 กิโลกรัม หลังจากผ่าตัดเสร็จจะต้องให้สัตว์พักในโรงเรือนที่มีน้ำและอาหารเตรียมไว้ให้อย่างเพียงพอ ดูแลสัตว์อย่างใกล้ชิด เมื่อครบ 7 วัน หลังจากผ่าตัดทำการตัดไหม

6. นำน้ำยาที่ชะล้างเอ็มบริโอที่ได้ไปตรวจหาเอ็มบริโอ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเตอริโอที่กำลังขยาย 10-40 เท่า เพื่อบันทึกจำนวน จำแนกระยะของการพัฒนา และประเมินคุณภาพของเอ็มบริโอที่ได้อย่างละเอียดต่อไป



ภาพที่ 7 การวัดขนาดของ CL



ภาพที่ 8 การเก็บเอ็มบริโอจากปีกมดลูกแม่แพะ

การตรวจหา และการประเมินคุณภาพของเอ็มบริโอ

1. นำส่วนของท่อนำไข่ที่ตัดจากแม่แพะทดลอง เลาะเอาพังผืดออกเพื่อให้ท่อนำไข่ตรง ฉีดน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอจากปลายอีกข้างของท่อนำไข่ให้ไหลออกทาง fimbrea รองใส่ปีกเกอร์ไว้ ฉีดชะล้างซ้ำอีกครั้งหนึ่ง (แต่ละครั้งใช้น้ำยาชะล้างปริมาณ 20 มิลลิลิตร) ทำเช่นเดียวกันกับท่อนำไข่อีกข้าง เก็บน้ำยาที่ชะล้างเอ็มบริโอในแต่ละข้างของท่อนำไข่ไว้คนละปีกเกอร์กัน

2. นำน้ำยาที่ชะล้างเอ็มบริโอไปตรวจหาเอ็มบริโอ โดยเทน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอลงใน petri dishes ที่ตีช่องตารางไว้แล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอที่กำลังขยาย 10-40 เท่า

3. นับจำนวน และดูเอ็มบริโอด้วยหลอดแก้วที่ดัดแปลงพิเศษสำหรับดูเอ็มบริโอ เพื่อย้ายลงใน petri dishes ที่เตรียมไว้ใน การตรวจดูเอ็มบริโออย่างละเอียด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อเข้ากับกล้องถ่ายรูป ที่กำลังขยาย 400 เท่า

4. จำแนกเอ็มบริโอว่าอยู่ในระยะ (stage) ไດของการเจริญพัฒนา คุณภาพของเอ็มบริโอแบ่งออกเป็น 4 เกรด ตามแบบของ Lidner และ Wright (1983) ดังนี้

เกรด 1 คุณภาพดีเยี่ยม (excellent) เอ็มบริโอมีลักษณะเป็นทรงกลม มีความสมมาตร ขนาด สี่ และโครงสร้างเนื้อเยื่อมีลักษณะเฉพาะของแต่ละเซลล์ แทบไม่มีส่วนที่ผิดปกติของเซลล์

เกรด 2 คุณภาพดี (good) โครงสร้างของเซลล์ไม่ค่อยสม่ำเสมอ มีส่วนของเซลล์และเศษเนื้อเยื่อเซลล์ที่ผิดปกติบ้างเล็กน้อย

เกรด 3 คุณภาพพอใช้ (fair) เอ็มบริโอส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ แต่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีส่วนของเซลล์ที่ผิดปกติ และเศษเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก

เกรด 4 เอ็มบริโอที่เสื่อมสภาพ (degenerate) เป็นเอ็มบริโอที่ตายแล้วหรือมีการพัฒนาช้า ไม่สัมพันธ์กับอายุ เช่น เอ็มบริโอที่มีอายุ 6 วัน โดยปกติจะพัฒนาถึงระยะ morula หรือ blastocysts แต่กลับพัฒนาได้ 1-2 เซลล์ หรือ 8-16 เซลล์

5. เมื่อจำแนกคุณภาพของเอ็มบริโอเสร็จ ถ่ายรูป หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอไปเพาะเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่มีน้ำยา PBS ผสมซีรัมแม่แพะ 10 เปอร์เซ็นต์ ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิน นำไปเก็บไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จึงนำเอ็มบริโอมาตรวจดูอีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการประเมินคุณภาพในครั้งแรก

การเตรียมน้ำยาชะล้าง และน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

1. นำซีรัมแม่แพะที่เตรียมไว้ไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
2. รินน้ำเกลือสูตร Lactated Ringer's Solution ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตวงซีรัมแม่แพะ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้สารละลายมีอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปชะล้างเอ็มบริโอ
3. ในกรณีที่เตรียมน้ำยาเพื่อเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ จะทำเช่นเดียวกับข้อ 1 และ 2 ข้างต้นแต่ จะใช้สารละลาย PBS แทนน้ำเกลือสูตร Lactated Ringer's Solution

การเตรียมซีรัมจากแม่แพะ

1. จับแพะโดยขึ้นคร่อม แล้วจับส่วนหัวให้เงยหน้าขึ้น
2. ใช้หัวแม่มือซ้ายกดตรงเส้นเลือดดำใหญ่ เส้นเลือดจะนูนชัดขึ้น
3. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดบริเวณที่จะเจาะเลือด
4. ใช้เข็มเบอร์ 18 ความยาว 1 นิ้วครึ่ง แทะเจาะให้เข้าไปในเส้นเลือด เลือดจะไหลผ่านเข็ม สู่หลอดแก้วที่รองต่อกับรูกันเข็ม ดังภาพที่ 9 เมื่อเลือดไหลพยายามจับแพะให้อยู่นิ่งๆ พยายามอย่า ขยับปลายเข็มไปมา เพราะอาจจะทำให้ปลายเข็มหลุดออกจากเส้นเลือด และทำให้เลือดหยุดไหลได้
5. เมื่อได้เลือดตามที่ต้องการ (ปริมาณ 30 มิลลิลิตร) ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ กดตรงปลาย เข็มที่เจาะตรงเส้นเลือด แล้วค่อยๆ ถอดเข็มออก กดไว้ประมาณ 30 วินาที หรือจนเลือดหยุดไหล
6. นำเลือดแม่แพะที่ได้แบ่งใส่หลอดแก้ว แล้วนำไปแยกซีรัมโดยเครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Clay Adams รุ่น CAT. No. 0158 นาน 30 นาที รินเอาเฉพาะส่วนที่เป็นซีรัมที่อยู่ข้างบน เก็บไว้ใน ตู้เย็นไว้ใช้ต่อไป



ภาพที่ 9 การเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่ที่ลำคอแม่แพะ

การเก็บข้อมูล

แม่แพะ

- จำนวนแม่แพะที่แสดงการเป็นสัด
- จำนวนแม่แพะที่กลับสัด และไม่กลับสัดหลังฉีด CLO และ FSH
- จำนวนแม่แพะที่กลับสัดหลังผสมพันธุ์
- จำนวนแม่แพะที่อุ้มท้องปกติจนกระทั่งคลอดลูก
- จำนวนลูกที่คลอด น้ำหนักแรกคลอด และ เพศของลูกที่คลอด
- ระยะเวลาในการอุ้มท้อง

การเป็นสัด

- วงรอบการเป็นสัดของแม่แพะทดลอง
- ระยะเวลาของระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด
- ระยะเวลาหลังฉีดฮอร์โมนถึงเวลาที่แพะแสดงการเป็นสัดระยะ estrus
- พฤติกรรมการเป็นสัดของแพะ และข้อมูลอื่นๆ

รังไข่ และ CL

- จำนวน CL บนรังไข่ทั้งสองข้าง
- ขนาดของ CL และรังไข่ (วัดขนาดโดยใช้เวอร์เนีย แต่กลุ่มควบคุมใช้วิธีการประมาณ)
- สี ลักษณะรูปทรง และรายละเอียดอื่นๆ ที่พบ

กระเปาะไข่ (ศึกษาเฉพาะที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 2 มิลลิเมตร ขึ้นไป)

- จำนวนกระเปาะไข่ที่พบบนรังไข่
- ขนาดของกระเปาะไข่ (วัดขนาดโดยใช้เวอร์เนีย แต่กลุ่มควบคุมใช้วิธีการประมาณ)
- สี ลักษณะของกระเปาะไข่ และรายละเอียดอื่นๆ ที่พบ

เอ็มบริโอ

จำนวนเอ็มบริโอที่เก็บได้จากระบบสืบพันธุ์ของแม่แพะ

จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ

ระยะ (stage) ของเอ็มบริโอที่เก็บได้

สี ลักษณะของเอ็มบริโอ และรายละเอียดอื่นๆ ที่พบ

จำนวนเอ็มบริโอที่สามารถย้ายฝากได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ระยะเวลาหลังจากฉีดฮอร์โมนจนถึงเวลาที่แพะแสดงการเป็นสัด ระยะเวลาของระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด จำนวนและขนาดของ CL กระเปาะไข่ ขนาดรังไข่ จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ และไม่ได้รับการปฏิสนธิ จำนวนเอ็มบริโอที่สามารถย้ายฝากได้ แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$)

เปรียบเทียบความกว้างและความยาวของรังไข่ จำนวนกระเปาะไข่ทุกขนาดบนรังไข่ ระหว่างข้างซ้ายและข้างขวา ในแพะทดลองกลุ่มเดียวกัน โดยวิธีเปรียบเทียบแบบการจับคู่ (paired T-Test)

อัตราการเป็นสัดหลังจากฉีดฮอร์โมนเพื่อชักนำการเป็นสัดพร้อมๆ กัน หลังการฉีดฮอร์โมนชักนำการเป็นสัดครั้งที่ 1, 2 และการฉีดฮอร์โมนชักนำการเป็นสัดหลังจากการฉีดฮอร์โมนชักนำการตกไข่มากกว่าปกติ (ครั้งที่ 3) เปรียบเทียบสัดส่วนของกระเปาะไข่ระหว่างกลุ่มแพะทดลอง โดยใช้ Chi-square หากพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มแพะทดลอง ตรวจสอบความแตกต่างของสัดส่วนโดยแยกเปรียบเทียบทีละคู่

จำนวน CL จำนวนกระเปาะไข่ขนาดใหญ่ วิเคราะห์โดยวิธี Kruskal-Wallis Test หากพบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย จะเปรียบเทียบความแตกต่างโดย แยกเปรียบเทียบทีละคู่ โดยวิธี Wilcoxon Rank Sum Test

ระยะเวลาเฉลี่ยหลังจากฉีดฮอร์โมนจนถึงเวลาที่แพะแสดงการเป็นสัด หลังจากฉีดฮอร์โมนชักนำการเป็นสัดครั้งที่ 1, 2 และ 3 ระยะเวลาเฉลี่ยของระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด ระยะเวลาเฉลี่ยหลังจากฉีดฮอร์โมนจนถึงเวลาที่แพะแสดงการเป็นสัด ระยะเวลาของระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด ความยาววงรอบการเป็นสัด ระหว่างแพะทดลอง 4 กลุ่ม โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยวิธี general linear model (GLM) แบบแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SAS (1985)

สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการที่หมวดพะและกะ และห้องปฏิบัติการของภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา
ระยะเวลาทำการทดลอง เริ่มต้น : มกราคม 2544 สิ้นสุด : พฤษภาคม 2545