



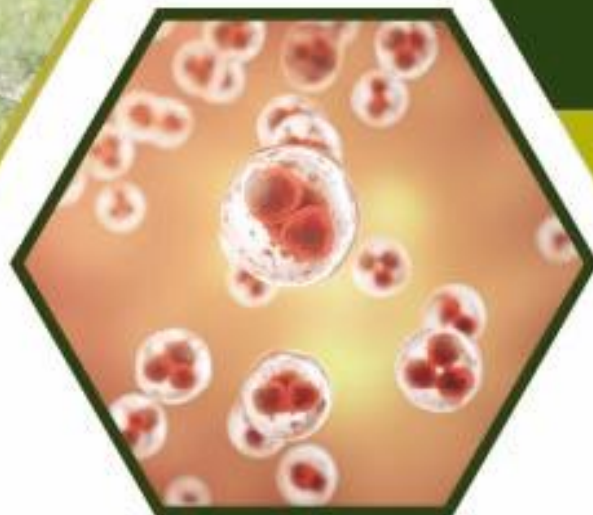
กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์

ISSN : 1905-6877



JOURNAL
OF
BIOTECHNOLOGY
IN LIVESTOCK PRODUCTION



ปีที่ 15 : พ.ศ.2567
Vol 15 : 2024

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
BUREAU OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION
DEPARTMENT OF LIVESTOCK DEVELOPMENT

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (Journal of Biotechnology in Livestock Production) มีอายุครบรอบ 15 ปี ในปี พ.ศ. 2567 นี้ ซึ่งยังคงยึดมั่นเป้าหมายในการเผยแพร่ผลงานวิจัยและบทความทางวิชาการ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาและขับเคลื่อนงานวิจัยและวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ของประเทศ ซึ่งถือเป็นยุคแห่งการเปลี่ยนผ่านสู่การผลิตปศุสัตว์โดยใช้เทคโนโลยีการปศุสัตว์ขั้นสูงที่มีความทันสมัย เพื่อสนับสนุนวงการปศุสัตว์ไทยให้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและยั่งยืน ยกระดับคุณภาพชีวิตและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันด้วยเศรษฐกิจสร้างมูลค่า โดยอาศัยความร่วมมือจากทุกภาคส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาราคาสินค้าภาคปศุสัตว์ สภาวะต้นทุนอาหารสัตว์และต้นทุนการผลิตอื่นที่เพิ่มสูงขึ้นจากวิกฤตพลังงานประกอบกับการแข่งขันในยุคการค้าเสรีที่พบในปัจจุบัน

การศึกษาวิจัยถือเป็นแรงขับเคลื่อนหนึ่งที่มีความสำคัญเพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาต่างๆ และเพิ่มศักยภาพการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น อันจะส่งผลในการเพิ่มความสามารถด้านการแข่งขันให้แก่เกษตรกร นำไปสู่การสร้างรายได้ สร้างอาชีพ สร้างความมั่นคงทางอาชีพและเศรษฐกิจฐานราก และเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศให้ดียิ่งขึ้น ไปสู่เป้าหมายตามภารกิจกรมปศุสัตว์ ดังวิสัยทัศน์ที่กล่าวว่า **“เป็นองค์กรพัฒนาการปศุสัตว์ด้วยนวัตกรรมและเทคโนโลยี เพิ่มมูลค่าสินค้าสู่ตลาดโลกและเติบโตอย่างยั่งยืน”** นำไปสู่การขับเคลื่อนภารกิจของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ **“เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตที่ดี มีรายได้เพิ่มขึ้นไม่น้อยกว่าร้อยละ 10 ต่อปี”**

วารสารฉบับนี้ ยินดีเปิดรับบทความทั้งที่เป็นบทความวิจัย และบทความวิชาการในทุกสาขา โดยทุกบทความจะได้รับการตรวจพิจารณาจากกองบรรณาธิการ เพื่อคุณภาพและคุณค่าของวารสารที่เหมาะสมต่อการเผยแพร่ และเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้า อ้างอิง โดยทางกองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะสามารถเป็นแหล่งสืบค้นและเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัย นวัตกรรมใหม่ๆ และนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในวงการปศุสัตว์และสาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป



(นายกิตติกรณ์ เจนไพบูลย์)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

วัตถุประสงค์

1. ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้า วิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์และเทคโนโลยีชีวภาพ
2. รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตปศุสัตว์และเทคโนโลยีชีวภาพ
3. ส่งเสริมความสัมพันธ์ และความร่วมมือระหว่างนักวิชาการและสถาบันต่างๆ

เจ้าของ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

สำนักงาน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ.ปทุมธานี 12000

โทร/โทรสาร 0-2501-2438

กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. กิติกรณ์ เจนไพบูลย์

บรรณาธิการ

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

สพ.ญ. วิชญาณี ภูมิพิทักษ์กุล

กองบรรณาธิการ

น.สพ. ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง

น.สพ. วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา

น.สพ. ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญกุล

น.สพ. อรุณ จันทร์กระจำง

น.สพ. พีระพงษ์ สำราญทรัพย์

น.สพ. ธวัชชัย โพธิ์คำ

น.สพ. วรพงษ์ พงษ์ศิริ

นายสมศักดิ์ เปรมปรีดิ์

น.สพ. ภัทรพล สำเร็จดี

สพ.ญ. กอบสุข ทองสอดแสง

สพ.ญ. จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์

สพ.ญ. พิงค์ลานนา กุญชร

สพ.ญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

ผู้จัดการวารสาร

นายเรีงวุฒิ วรวุฒิ

สพ.ญ. วิชญาณี ภูมิพิทักษ์กุล

นางอัมภาพันธุ์ ลีละสิริ

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ โดยวารสารจะตีพิมพ์บทความ ผลงาน ค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะตีพิมพ์

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่กองบรรณาธิการพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาตีพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงานวิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับเอกสารผลงาน จำนวน 1 ชุด พร้อมไฟล์ Microsoft word

3.2 ต้นฉบับผลงานที่ส่งมา ให้ตรวจความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 เมื่อผลงานผ่านการพิจารณาจากกองบรรณาธิการแล้ว จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงาน พร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่กองบรรณาธิการเสนอแนะ

ส่งผลงานที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อแนะนำของกองบรรณาธิการ ในรูปแบบเอกสารไฟล์ Microsoft Word และรูปแบบไฟล์ PDF มายัง e-mail : pongpeng.pj@gmail.com

โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ชื่อผลงาน.....
 ชื่อเจ้าของผลงาน.....
 ที่อยู่.....
 โทรศัพท์.....
 E-Mail.....

กรณีมีข้อสงสัย ติดต่อสอบถามได้ที่

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 08-6700-3880

คู่มือรายละเอียดย่อยเกี่ยวกับข้อแนะนำ
สำหรับผู้เขียนผลงานที่ได้
<http://www.dld.go.th/biotech>

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ชัดเจน และพิมพ์ด้วยอักษร TH SarabunPSK ขนาดตัวอักษร 16 และตัวหนา

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อ นามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆได้เนื้อหาครอบคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกินหนึ่งหน้ากระดาษ บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกัน ส่งบรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน โดยการพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เลขทะเบียนวิจัย (Registered No.) (ถ้ามี)

4.6 สังกัดผู้วิจัย และสถานที่ติดต่อ ให้ระบุไว้ในเชิงอรรถ (footnote) โดยให้ใช้ระบบเลขบนชื่อ เป็นตัวระบุในเชิงอรรถ เป็นชื่อหน่วยงานที่สังกัด สถานที่ติดต่อได้สะดวก ให้ครบทุกคน กรณีผู้วิจัยอยู่หน่วยงานเดียวกันให้ใช้ด้วย (super script) เดียวกัน

4.7 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

4.7.1 คำนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควมมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.7.2 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปให้เขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้น

4.7.3 ผลการทดลอง (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูปหรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

- **ตาราง (Tables)** ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น

- **รูปภาพ (Figures)** ควรเป็นภาพขาวดำ หรือภาพสี และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น

4.7.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและช่องทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

4.7.5 สรุปผลการทดลอง (Conclusion) ควรเป็นใจความที่สำคัญ กระชับเป็นไปตาม

วัตถุประสงค์และคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.7.6 ข้อเสนอแนะ (Suggestion) เป็นการเสนอให้นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (application) ใครหรือหน่วยงานใด ควรทำอะไร คำนี้ถึงสิ่งใดบ้าง ควรปรับปรุง พัฒนาอย่างไร และควรแสดงผลกระทบจากการนำไปใช้ด้วย

4.7.7 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงาน คำนวณวิจัยนั้นๆ

4.7.8 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิง ดังนี้คือ

1) กรณีที่อ้างอิงจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นให้ใช้คำว่า อ้างถึงโดย (cited by)

2) กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “สาโรชและสายใจ (2562), สายใจและคณะ (2562) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (สาโรชและสายใจ, 2562) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (สายใจและคณะ, 2561; จรรยาพรและวรพงษ์, 2562;)

3) กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Szyda and Komisarek (2007), Rychtarova et al. (2014) กล่าวว่า..... “ หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่างกลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Szyda and Komisarek, 2007; Rychtarova et al., 2014;)

4) กรณีอ้างอิงถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results

(Walker, J.M., unpublished data),for other protocols (Walker, J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง
ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน

1) กรณีอ้างอิงจากวารสาร ให้ระบุชื่อผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษคนแรกใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง ผู้เขียนในลำดับถัดมาให้ใช้ชื่อย่อขึ้นก่อนแล้วตามด้วยชื่อสกุล แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่องวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

สาโรช งามขำ และ สายใจ ชื่นสุข. 2562. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Butyrophilin และ DGAT1 ที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณน้ำมันในโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยวิธี Real-time PCR. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 10:1-13.

จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ และ วรพงษ์ พงษ์ศิริ. 2562. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ใน seminal plasma ของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ต่อความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อ. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 10:58-74.

Sarsaifi, K., A.W. Haron, J. Vejayam, R. Yusoff, H. Hani, M.A. Omar, L.W. Hong, N. Yimer, J.T. Ying and A.M. Othman. 2015. Two- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. Theriogenology. 84(6):956-968.

2) กรณีอ้างอิงจากตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและ บรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้า แรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

Allison, P.D. 2005. Survival analysis using SAS: A practical guide 8 th edition. SAS institute Inc.,Cary, NC, USA. 292 pp.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6 th ed. Leman, A. D. ed. Iowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

3) กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

Lacorte, G.A., M.A. Machado, M.L. Martinez, A.L. Campos, R.P. Maciel, R.S. Verneque, R.L. Teodoro, M.G.C.D. Peixoto, M.R.S. Carlvaho, and C.G. Fonseca. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazillian cattle breeds. Genetics and Molecular Research. Online.<http://www.funpecrp.com.br> [access date: 24/7/2007].

จันทร์หา แบนดัม จุฑาพร ศรีวิวัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ พิงพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด.คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา:

<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>. 27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้ใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร TH

Sarabun PSK 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X 297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม
- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกค่านั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วนท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน *Escherichia coli*
- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะพิช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*
- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....
- ที่กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือพิมพ์ด้วยตัวเอน ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. ผลสำเร็จของการเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์กระป๋องลูกผสมมูราห์ในฟาร์มเกษตรกร (นิติพัฒน์ ชุมหิรัญ สิ้นชัย วิโรจน์วุฒิกุล กิตติศักดิ์ แสงสกุล กมลชนก สร้อยเพชร)	1
2. ผลของระยะเวลาผสมเทียมหลังการเป็นสัตว์ต่อเพศลูกและอัตราการผสมติดในกระป๋องปลัก ไทย (จตุรงค์ จริยะนรวิชัย นิติพัฒน์ ชุมหิรัญ สุเทพ กันทะสี ฉัตรชัย สืบคำ ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล)	11
3. ผลของฮอโมนเอฟ เอส เอชในสารละลายไฮยาโลโรแนนต่อการเพิ่มการตกไข่ในโคเนื้อ (วิษญญาติ ภูมิพิทักษ์กุล ศุภาพิชญ์ คันธาวุฒน์ สถาปัตย์ อิมโพธิ์ อนนท์ เทืองสันเทียะ อรุณ จันทรกระจ่าง)	25
4. ผลของความแตกต่างระหว่างวิธีการทำละลายน้ำเชื้อโคในอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อลักษณะ การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์อสุจิโค (สุจิตรา ธรรมวัง วิษญญาติ ภูมิพิทักษ์กุล นิติรัฐ ถียัง มุขสุตา เรืองกรี)	46
5. การประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคนมด้วยอุณหภูมิพื้นผิวร่างกายและอุณหภูมิน้ำนมโดย ใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด (วิษญญาติ ภูมิพิทักษ์กุล กอบสุข ทองสอดแสง จิรภัทร ศักดิ์เสรีชัยกุล)	69

ผลสำเร็จของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดกระบือลูกผสมมูราห์ในฟาร์มเกษตรกร

นิติพัฒน์ ขุมศิริ¹ สิ้นชัย วิโรจน์วุฒิกุล² กิตติศักดิ์ แสงสกุล³ กมลชนก สร้อยเพชร⁴

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการเหนี่ยวนำการเป็นสัด 2 วิธีระหว่างวิธีใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุ และ วิธี Ovsynch แล้วผสมเทียมแบบกำหนดเวลาต่ออัตราการตั้งท้องในกระบือลูกผสมมูราห์ โดยคัดเลือกแม่กระบือลูกผสมมูราห์ จำนวน 60 ตัว ที่เคยมีลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว อายุระหว่าง 4-8 ปี มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ มีความสมบูรณ์พันธุ์ มีระบบสืบพันธุ์ปกติ ในฟาร์มเกษตรกรพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว โดยสุ่มกระจายช่วงอายุไปในแต่ละกลุ่มเท่าๆกัน คือ กลุ่ม 1 แม่กระบือรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุ (crestar®) และ กลุ่ม 2 แม่กระบือรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch โดยกลุ่ม 1 ทำการทดลองโดยการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (crestar®) บริเวณใบหูกระบือ หลังจากนั้น 12 วัน ทำการถอด crestar® พร้อมกับฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินเอฟ ทู อัลฟา (PGF₂α) ทำการผสมเทียมชั่วโมงที่ 56 และ 72 หลังการถอดฮอร์โมน กลุ่ม 2 แม่กระบือรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch ผสมเทียมชั่วโมงที่ 12 และ 24 หลังการฉีดฮอร์โมน GnRH และตรวจการตั้งท้องโดยการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ภายหลังจากผสมเทียม 45 วัน ผลการทดลองพบว่าอัตราการแสดงการเป็นสัดของกระบือกลุ่ม 1 และ 2 คือ 86.67% (26/30) และ 93.33% (28/30) ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และพบว่าอัตราการตั้งท้องของทั้ง 2 กลุ่มคือ 30.00% (9/30) และ 33.33% (10/30) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สรุปผลการทดลองนี้พบว่าแม่กระบือลูกผสมมูราห์ทั้ง 2 กลุ่ม มีอัตราการแสดงการเป็นสัดและอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : กระบือมูราห์ เหนี่ยวนำการเป็นสัด อัตราการตั้งท้อง

เลขทะเบียนวิจัย : 60(1)-0208-014

¹ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี

³ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

⁴ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี

Estrous Synchronization in Murrah Crossbred Buffaloes under Small Farm Holder Condition.

Nitipat Khoomhirun¹ Sinchai Wirojwutthikul² Kittisak Sangsakul³ Kamonchanok Soipet⁴

Abstract

The research objective was to investigate the effect of estrus synchronization between norgestomet ear implant (crestar®) and Ovsynch protocol, and fixed time AI on pregnancy rate in Murrah crossbred buffaloes. Sixty females Murrah crossbred buffaloes were selected from farm holder in Chachoengsao province. Animals were divided into 2 groups as group 1 and group 2. The group 1 was treated with Crestar® and group 2 was treated with Ovsynch protocol. The group 1 with Crestar® was implant ear for 12 days and treated with PGF_{2α} in the day of removal of crestar®. Fixed-time AI was performed in the animals at 56th and 72th hour after crestar® removal. The group 2 with Ovsynch protocol and fixed-time AI was performed in the animals at 12th and 24th hour after GnRH injection. All Murrah crossbred buffaloes were pregnant examined by rectal palpation and ultrasonography on 45 days after AI. The results indicated that the estrus rate in group 1 and group 2 were 86.67% (26/30) and 93.33% (28/30), respectively which were not significant different ($p>0.05$). In addition, the pregnancy rate in treatment1 and treatment2 were 30.00% (9/30) and 33.33% (10/30) respectively which were not significant different ($p>0.05$). The study showed that the Ovsynch protocol and norgestomet ear implant (crestar®) rate of estrus and rate of pregnancy were not significant different ($p>0.05$).

Keywords : Murrah Buffaloes, Synchronization, Pregnancy rate

Registered No: 60(1)-0208-014

¹Khonkean Artificial Insemination and Biotechnology research center, Mueang, Khonkean Province.

²Chonburi Artificial Insemination and Biotechnology research center, Baanbung, Chonburi Province.

³Songkha Artificial Insemination and Biotechnology research center, Haad-yai, Songkha Province.

⁴Ubonratchathani Artificial Insemination and Biotechnology research center, Mueang, Ubonratchathani Province.

คำนำ

ปัจจุบันในประเทศไทยมีเกษตรกรเริ่มให้ความสนใจการเลี้ยงกระบือมากขึ้น แต่ประสบปัญหาการผลิตและปรับปรุงพันธุ์ของกระบือหลายด้าน เช่น ปัญหาการเกิดเลือดชิด (inbreed) ในกระบือ ซึ่งควรแก้ไขปัญหาด้วยการผสมเทียม ปัญหาการเป็นสัดเจ็บบ เป็นต้น เนื่องจากกระบือจะแสดงอาการเป็นสัดไม่ชัดเจนเหมือนโคการจับสัดทำได้ยากทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับการกำหนดเวลาเพื่อผสมเทียมตามมา (EI-Wishy, 2007; Perera, 2011) ส่งผลให้อัตราการผสมติดต่ำ จากปัญหาการเป็นสัดไม่ชัดเจนดังกล่าว จึงมีผู้พยายามศึกษาการใช้ฮอร์โมนโปรแกมต่างๆ มาใช้เหนี่ยวนำการเป็นสัดในกระบือ เพื่อให้การผสมเทียมกระบือมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งมีทั้งการใช้ฮอร์โมน GnRH ร่วมกับ PGF₂ α ในโปรแกรม Ovsynch โดยฉีด GnRH 2.5 ml. เข้ากล้ามเนื้อในวันแรก หลังจากนั้นฉีด PGF₂ α ขนาด 500 μ g. เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 7 ส่วนในวันที่ 9 ฉีด GnRH เข้ากล้ามเนื้อ 2.5 ml. แล้วทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 และ 2 ในช่วงวันที่ 12 และ 24 ภายหลังจากฉีดฮอร์โมน GnRH ครั้งที่สอง (Paul and Prakash, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อผสมเทียมแบบกำหนดเวลา โดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนฝังไว้ใต้ผิวหนังบริเวณใบหูเป็นเวลา 9 ถึง 14 วัน และใช้ร่วมกับพรอสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา โดยฉีดสารเหล่านี้ 2 วันก่อนสิ้นสุดการเหนี่ยวนำด้วยโปรเจสเตอโรน เคยมีการศึกษาการใช้โปรแกรม Ovsynch และการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหูลแล้วผสมเทียมแบบกำหนดเวลาแล้วพบว่ากระบือมีอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 33.3-38.89 % (Vadhanakul et al., 1988; Virakul et al., 1992; Paul and Prakash, 2005; ธีฎาพร, 2551)

จากรายงานการศึกษาดังกล่าวข้างต้นพบว่าโปรแกรม Ovsynch และการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหูลแล้วผสมเทียมแบบกำหนดเวลา ยังให้ผลอัตราการตั้งท้องที่ยังไม่สูงมากนัก ประกอบกับยังมีผู้ศึกษาเรื่องกระบือมูร่าห์ในประเทศไทยค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดแล้วผสมเทียมแบบกำหนดเวลาทั้งสองโปรแกรมในกระบือลูกผสมมูร่าห์ เพื่อช่วยแก้ไขปัญหการจับสัดยากและทำให้ทราบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมกระบือมูร่าห์ ซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มโอกาสการผสมติด เพิ่มผลผลิตลูกกระบือมูร่าห์ได้

งานวิจัยชิ้นนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลสำเร็จของการเหนี่ยวนำการเป็นสัด 2 วิธีระหว่าง วิธีใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหู (Norgestomet; Crestar[®], Intervet, Netherlands) กับ วิธี Ovsynch แล้วผสมเทียม

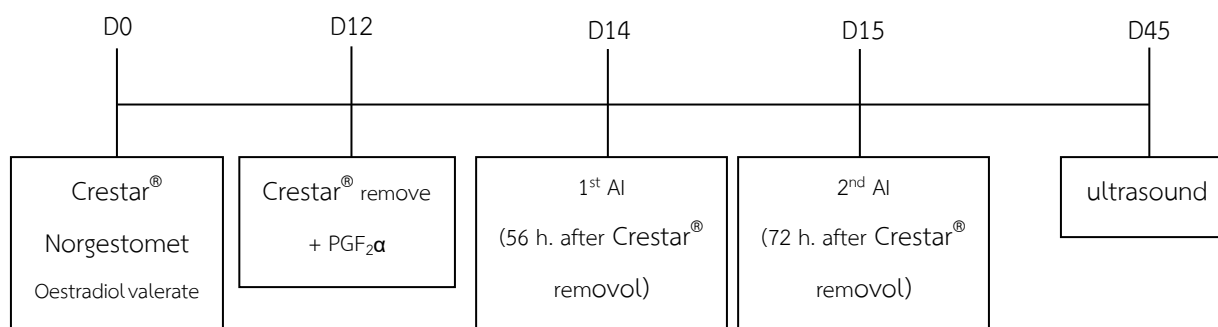
แบบกำหนดเวลาต่ออัตราการผสมติดในกระป๋องลูกผสมมูร่าห์ ซึ่งผลการศึกษาสามารถนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้กับเกษตรกรในพื้นที่ได้ต่อไป และถือเป็นการสนับสนุนและส่งเสริมให้เป็นแหล่งปศุสัตว์ที่ยั่งยืน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองในแม่กระป๋องลูกผสมมูร่าห์จำนวน 60 ตัว ที่เคยมีลูกแล้วอย่างน้อย 1 ตัว อายุระหว่าง 4-8 ปี มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ มีความสมบูรณ์พันธุ์ มีระบบสืบพันธุ์ปกติ สถานที่ทำการทดลอง คือ ฟาร์มกระป๋องมูร่าห์เอกชนแห่งหนึ่งในจังหวัดฉะเชิงเทรา แม่กระป๋องเหล่านี้จะถูกแบ่งโดยวิธีสุ่มเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว โดยสุ่มกระจายช่วงอายุไปในแต่ละกลุ่มเท่าๆ กัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Norgestomet; crestar® (Norgestomet+ Oestradiol valerate + PGF₂α)

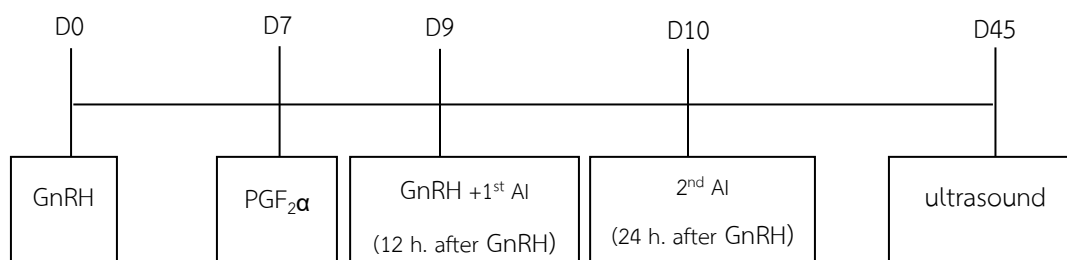
แม่กระป๋องรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุ (Norgestomet; crestar®) ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งซิลิโคนเคลือบด้วยฮอร์โมน Norgestomet โดยฝัง crestar® ที่ใบหูในวันแรก พร้อมฉีดฮอร์โมน Norgestomet 3 mg. และ Oestradiol valerate 5 mg. เข้ากล้ามเนื้อ และอีก 12 วันต่อมาถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุ พร้อมฉีด PGF₂α เข้ากล้ามเนื้อ ทำการผสมเทียมแม่กระป๋องจำนวน 2 ครั้ง หลังจากถอดฮอร์โมนในชั่วโมงที่ 56 และ 72 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดกระป๋อง โดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุ

กลุ่มที่ 2 Ovsynch (GnRH+ PGF₂α+ GnRH)

แม่กระป๋องรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch โดยฉีด GnRH 2.5 ml. เข้ากล้ามเนื้อในวันแรก หลังจากนั้นฉีด PGF₂α ขนาด 500 µg. เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 7 ส่วนในวันที่ 9 ฉีด GnRH เข้ากล้ามเนื้อ 2.5 ml. แล้วทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 และ 2 ในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ภายหลังการฉีดฮอร์โมน GnRH (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดกระบือ ด้วยวิธี Ovsynch

น้ำเชื้อพ่อพันธุ์กระบือมูร่าห์ที่ใช้เป็นน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์เดียวกันและทำการแช่แข็งครั้งเดียวกัน เจ้าหน้าที่ผสมเทียมเป็นผู้ที่มีประสบการณ์งานผสมเทียมมากกว่า 5 ปี ทำการตรวจท้องหลังผสมเทียม 45 วัน ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเป็นสัดและอัตราการตั้งท้องระหว่างกลุ่มทดลองด้วย Fisher's Exact Test กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

ผลการทดลอง และวิจารณ์

ผลการทดลองการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่กระบือลูกผสมมูร่าห์กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 พบว่าทั้งสองกลุ่มแสดงอาการเป็นสัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

Table 1 Percentage of estrus rate in Group 1 and Group 2

No. of Estrus detection	n	Treatments		p-value
		Group 1	Group 2	
Estrus	30	26 (86.67%)	28 (93.33%)	0.67
Non-estrus	30	4 (13.33%)	2 (6.67%)	

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า แม่กระบือทั้ง 2 กลุ่ม มีอัตราการเป็นสัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการแสดงการเป็นสัดที่ไม่แตกต่างกันนั้นเกิดจากการให้ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ในกระบือทั้งสองกลุ่ม มีผลทำให้ corpus luteum ที่สมบูรณ์เกิดการสลายตัว ส่งผลให้ระดับโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงภายใน 24 ชั่วโมง หลังฉีด (De Rensis and Lopes-Gatius, 2007) กระตุ้นให้มีการพัฒนาของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ฮอร์โมนเอสโตรเจนในฟอลลิ

เคล็ดจะออกฤทธิ์กระตุ้นให้แสดงพฤติกรรมการเป็นสัตว์ (Mihm et al., 2002) ซึ่งอัตราการแสดงอาการเป็นสัตว์ของกระป๋องทั้ง 2 กลุ่ม สอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษาไว้ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้กระป๋องแสดงอาการเป็นสัตว์และเกิดการตกไข่หลังจากถอดสารโปรเจสเตอโรนประมาณ 40-96 ชั่วโมง และอัตราการแสดงอาการเป็นสัตว์อยู่ระหว่าง 62-100% (Vahhanakul et al., 1988; Geary, 2001; De Rensis and Lopes-Gatius, 2007; ธีรภาพร, 2551) ขึ้นอยู่กับปริมาณของ norgestomet ฤดูกาล และสิ่งทดลองร่วม

กระป๋องลูกผสมมูราห์ทั้งสองกลุ่มการทดลอง มีอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

Table 2 Percentage of pregnancy rate in Group 1 and Group 2

No. of pregnancy	n	Treatments		p-value
		Group 1	Group 2	
pregnancy	30	9 (30.00%)	10 (33.33%)	0.99
Non-pregnancy	30	21 (70.00%)	20 (66.67%)	

กระป๋องกลุ่ม 1 มีอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 30% ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Virakul (1987) Vadhanakul et al. (1988) และ Virakul et al. (1992) ที่ใช้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์โดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุเช่นเดียวกับกระป๋องกลุ่ม 1 พบว่ามีอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 30-38.89% ส่วนในกระป๋องกลุ่ม 2 ที่มีการเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์โดยใช้โปรแกรม Ovsynch มีอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 33.33% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ ธีรภาพร (2551) ที่ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์ด้วยโปรแกรมเช่นเดียวกันกับกระป๋องในกลุ่ม 2 พบว่ามีอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 34.6% อัตราการตั้งท้องของกระป๋องลูกผสมมูราห์ที่ใช้โปรแกรม Ovsynch แล้วผสมเทียมแบบกำหนดเวลา ของการศึกษานี้พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาลักษณะเดียวกันในกระป๋องแม่น้ำในประเทศต่างๆ ได้แก่ กระป๋องเมดิเตอร์เรเนียน ในประเทศอิตาลี กระป๋องมูราห์ในประเทศอินเดีย และกระป๋องนิริ-ราวี ในประเทศปากีสถาน มีอัตราการตั้งท้องเท่ากับ 33.3-36.3% (Neglia et al., 2003; Campanile et al., 2005; De Rensis et al., 2005; Paul and Prakash, 2005; Warriach et al., 2008) ส่วนอัตราการตั้งท้องที่ไม่แตกต่างกันของกระป๋องทั้ง 2 กลุ่มนั้น อาจเกิดจากการผสมเทียมสองครั้งในกลุ่มกระป๋องทั้งสองกลุ่ม ซึ่งจะเพิ่มโอกาสการตั้งท้องสำหรับแม่กระป๋องที่มีไข่ตกช้า และไม่ได้รับการฉีดหรือไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน GnRH ซึ่งการตอบสนองต่อการให้ฮอร์โมน GnRH แตกต่างกันไปขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของโค (โคเนื้อ, โคนม) ลำดับการคลอดลูก และวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสัตว์ เป็นต้น (Peters, 2005) การที่กระป๋องทั้งสองกลุ่มในการศึกษารุ่นนี้แสดงอาการเป็นสัตว์แต่ผสมไม่ติดนั้น อาจเกิดจากกระป๋องที่แสดงอาการเป็นสัตว์แต่อาจไม่มีการตกไข่เกิดขึ้นก็เป็นได้ โดยการศึกษาของเอกชาติ และคณะ (2549) พบว่ากระป๋องปลักที่เหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหุเป็น

เวลา 10 วัน ร่วมกับฮอร์โมน PGF_{2α} มีการตกไข่เพียง 9.1% (1/11) และ Mudgal (1992) เคยทำการศึกษาการเป็นสัดในกระบือแม่น้ำ จำนวน 500 ตัว พบว่า 15% ของกระบือแสดงอาการเป็นสัด แต่ไม่พบการตกไข่ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่ระดับฮอร์โมน LH ไม่เพียงพอต่อการโน้มนำให้เกิดการตกไข่

จากการศึกษาต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่ามีผลการทดลองที่แตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกลุ่มสัตว์ที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน เช่น สภาพแวดล้อม สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น และการศึกษาของงานวิจัยครั้งนี้ถึงแม้การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรแกรมการเหนี่ยวนำของทั้งสองกลุ่มนั้นให้ผลการผสมติดที่ยอมรับได้และใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ทั้งสองโปรแกรมก็ยังมีข้อจำกัดอยู่ เช่น กลุ่ม 1 crestar® เวลาใช้ต้องฝังใต้ผิวหนังทำให้สัตว์เกิดความเจ็บปวดและยากต่อการบังคับสัตว์ทดลองเวลาฝังฮอร์โมน นอกจากใช้ฮอร์โมนชนิดฝังหุ่นแล้ว ยังมีโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดเรียกว่า CIDR-B ซึ่งให้ผลอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 30-50.6% (อภีรักษ์ และคณะ, 2545; Carvalho et al., 2013) ผลการตั้งท้องมีทั้งที่ใกล้เคียงและสูงกว่าในงานวิจัยครั้งนี้ แต่การใช้ CIDR-B ก็มีข้อเสียเช่นกันโดยอาจทำให้เกิดการปนเปื้อน และเกิดหนองในช่องคลอดได้ แต่การใช้ crestar® จะหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน และการเกิดหนองในช่องคลอดได้ ส่วนในกลุ่ม 2 ต้องเข้าปฏิบัติกับตัวสัตว์หลายครั้ง จากการกำหนดเวลาผสมเทียมจำนวน 2 ครั้ง ที่ 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากฉีด GnRH เข็มที่ 2 คาดว่ายังคงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะเกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่และอสุจิ เนื่องจากระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่ของอสุจิภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียยาวนานถึง 24-30 ชั่วโมงหลังผสม (Kasimanickam et al., 2008) และเป็นไปได้ว่าสามารถกำหนดเวลาผสมเป็น 24 ชั่วโมงหลังจากฉีด GnRH เข็มที่ 2 ได้ หากต้องการปรับเวลาผสมเทียมให้เหลือเพียง 1 ครั้ง เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน (ธัญพร, 2551) โดยในแต่ละโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดมีความแตกต่างกันในแง่ของความสะดวกในการใช้และประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำ

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสรุปได้ว่ากระบือลูกผสมมูร่าห์สามารถถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนและตั้งท้องโดยวิธีผสมเทียมแบบกำหนดเวลาได้ วิธีเหนี่ยวนำการเป็นสัดในกระบือกลุ่ม 1 และ กลุ่ม 2 ผลการทดลองพบว่าอัตราการแสดงการเป็นสัดของกระบือทั้งสองกลุ่ม คือ 86.67% (26/30) และ 93.33% (28/30) ตามลำดับ และพบว่าอัตราการตั้งท้องของทั้ง 2 กลุ่มคือ 30.00% (9/30) และ 33.33% (10/30) ตามลำดับ ทั้งสองวิธีในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้กระบือลูกผสมมูร่าห์มีอัตราการแสดงการเป็นสัดและอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีอัตราการผสมติดที่ยอมรับได้

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ ทั้งขนาดและจำนวนของคอร์ปัสลูเทียมภายหลังได้รับฮอร์โมน GnRH และระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษา

ต่อไป และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการพัฒนาฟาร์มของเกษตรกร เพื่อเพิ่มอัตราการตั้งท้อง ซึ่งผลดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ได้ นอกจากนี้โปรแกรม Ovsynch ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จำเป็นต้องปฏิบัติกับตัวสัตว์ถึง 3 ครั้งก่อนผสมเทียม และโปรแกรมที่ใช้ crestar® เวลาใช้ต้องฝังได้ ผิวหนังทำให้สัตว์เกิดความเจ็บปวดและยากต่อการบังคับสัตว์ทดลองเวลาฝังฮอร์โมนวิธีนี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม (Geary, 2001) อาจเป็นอุปสรรคในการปฏิบัติงาน ดังนั้นควรหาโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด หรือประยุกต์โปรแกรมให้ปฏิบัติกับตัวสัตว์น้อยลงกว่านี้เพื่อที่จะได้นำไปใช้ปฏิบัติงานจริงได้สะดวก และเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปปฏิบัติงาน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณ คุณธัญจวน เสงตระกุลสิน แห่ง มินิมูร่าฟาร์ม อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา, เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี ที่ให้ความร่วมมือทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ธัญญาพร ไชยคุณ. 2551. ประสิทธิภาพของโปรแกรมการเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในกระบือปลักในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ ฐานุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิรักษ์ อุทธา กิติกรณ์ เจนไพบูลย์ พุทธิพงษ์ พรหมบุญ และจิระเดช อัญชันภาติ. 2545. ผลของ CIDR-B ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในกระบือปลัก. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.** 12(2):8-15.
- เอกชาติ พรหมดิเรก วีรวัฒน์ ปัญธิวจณณ์ วันวิสาข์ วะชุม อิศวร เกลิมวนิชย์ และ มงคล เตชะกำพุ. 2549. การหาระยะเวลาตกไข่ในกระบือปลักที่ปรับวงจรการเป็นสัด. **สัตวแพทย์มหานครสาร** 1(1):65-74.
- Campanile, G., G. Neglia, B. Gesparrini, G. Galieno, A. Prandi and R. DiBlo. 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. **Theriogenology** 63(8):2334-2340.
- Carvalho, N.A.T., J.G. Soares, D.C. Souza, J.R.G. Maio, J.N.S. Sales, B. Martinsjunior, R.C. Macari and P.S.Barusellil. 2013. Use of Intravaginal Progesterone Devices during Eight or Nine Days in the Ovulation Synchronization Protocol for TAI in Buffaloes during the NonBreeding Season. **Buffalo Bulletin** 32(2):532-536.
- De Rensis, F. and F. Lopez-Gatius. 2007. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Theriogenology** 67(2):209-216.

- El-Wishy, A.B. 2007. The postpartum buffalo.II. A cyclicity and anestrus. **Animal Reproduction Science** 97(3- 4):216-236.
- Geary T. W., R. R. Salverson, and J. C. Whittier. 2001a. Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the CO-Synch protocol in suckled beef cows. **Journal of Animal Science** 79(10):2536–2541.
- Kasimanickam, R., J. B. Hall, J. F. Currin and W. D. Whittier. 2008. Sire effect on the pregnancy outcome in beef cows synchronized with progesterone based Ovsynch and CO-Synch protocols. **Animal Reproduction Science** 104(1):1-8.
- Mudgal, V.D., N.M. Tulloh and J.H.G. Holmes. 1992. Reproductive in River buffaloes. In: Buffaloproduction. **Elsiever Science Publisher** (6):171-181.
- Mihm, M., M.A. Crow, P.G. Knight. and E.J. Austin. 2002. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in domestic animals** 37(4):191-200.
- Neglia, G., B. Gasparrini, D. Palo, D. Rossella, R. Clemente, L. Zicarelli and G. Campanile. 2003. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean buffalo cows. **Theriogenology** 60(1):125-133.
- Paul, V. and B.S. Prakash. 2005. Efficacy of the Ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology** 64(5):1049-1060.
- Perera, B.M. 2011.Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science** 124(3-4):194-199.
- Peter, A.R. 2005 Veterinary clinical application of GnRH-questions of efficacy. **Animal Reproduction Science** 88(1-2):155-167.
- Rensis D., G. Ronci, P. Guarneri, B. Nguyen, G.A. Presicce, G. Huszenicza and R.J. Scaramuzzi. 2005. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementatioin in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology** 63(7):1824-1831.
- Vadhanakul, N., M. Shantitwongse and P. Sekasiddhi. 1988. Fertility of norgestomet treated buffaloes under field trial. **J Thai Vet Med. Assoc.** 33(1):21-27.
- Virakul, P. 1987. Reproductive hormones ans their applications. In: Swamp Buffalo Reproduction. **Fac. Of Vet. Sci. Chulalongkorn University** (2):125-136.

- Virakul, P., P. Chanmtarapratchee, C. Lohachit and T. Demakan. 1992. Twin pregnancy in swamp buffalo after synchronization of estrous by using norgestomet and norgestomet plus PMSG. **Thai J Vet Med.** 22(4):205-209.
- Warriach, H. M., A. A. Channa and N. Ahmad. 2008. Effect of oestrus synchronization methods on oestrus behaviour, timing of ovulation and pregnancy rate during the breeding and low breeding seasons in Nili- Ravi buffaloes. **Animal Reproduction Science** 107(1-2):62-67.

ผลของระยะเวลาผสมเทียมหลังการเป็นสัดต่อเพศลูกและอัตราการผสมติดในกระบือปลักไทย

จตุรงค์ จริยะนรวิรัช^{1/} นิติพัฒน์ ขุมศิริ^{2/} สุเทพ กันทะสี^{1/} ฉัตรชัย สืบคำ^{1/} ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาผสมเทียมแบบกำหนดเวลาหลังการเป็นสัดโดยการเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่อสัดส่วนเพศลูก และอัตราการผสมติดในกระบือปลักไทย ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดแม่กระบือปลักจำนวน 87 ตัว ด้วยวิธี Ovsynch กระบือที่แสดงอาการเป็นสัดหลังฉีด GnRH เข็มสุดท้ายมีจำนวน 80 ตัว ถูกสุ่มออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 40 ตัว คือ กลุ่มที่ 1 ผสมเทียมในช่วงเวลาที่ 6-12 และ กลุ่มที่ 2 ผสมเทียมในช่วงเวลาที่ 18-24 หลังการเป็นสัด ทำการตรวจท้องโดยใช้การล้วงตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ที่ 30 และ 60 วัน หลังการผสมเทียม ผลพบว่า กระบือแสดงอาการเป็นสัดในช่วงเวลาที่ 18.64 ± 0.47 ชั่วโมง ระยะเวลาการผสมเทียมหลังการเป็นสัดที่ภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด (22.5 และ 45.0% ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ, $P=0.08$) และสัดส่วนเพศของลูก (1:1.25 และ 1:1 ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ, $P=0.84$) อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมในช่วงเวลาที่ 18-24 หลังการเป็นสัดที่ภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัด มีแนวโน้มอัตราการผสมติดสูงกว่า การผสมเทียมในช่วงเวลาที่ 6-12 ($P=0.08$)

คำสำคัญ : กระบือปลักไทย การผสมเทียมแบบกำหนดเวลา การเหนี่ยวนำการเป็นสัด สัดส่วนเพศลูก

เลขทะเบียนวิจัย : 57(1)-0208-025

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น จ.ขอนแก่น

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี จ.สระบุรี

^{3/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จ. ปทุมธานี

Effect of AI timing postestrus on calf sex and conception rate in Thai swamp buffaloes

Jaturong Jariyanorravisse^{1/} Nitipat Khumhirun^{2/} Suthep Kantasee^{1/} Chatchai Suebkom^{1/}

Nattanant Sirirattanatanyakul^{3/}

Abstract

This study aimed to investigate the effect of the fixed timing of artificial insemination (AI) postestrus after estrous synchronization on the sex ratio of calves and conception rate in Thai swamp buffaloes. A total of 87 estrous cycling buffalo cows were synchronized using the Ovsynch protocol. Of the 80 cows displaying signs of estrus following the administration of GnRH, they were randomly divided into two groups of 40 each. Group 1 underwent AI within the 6-12 hour window, while Group 2 underwent AI within the 18-24 hour window postestrus. Pregnancy diagnosis was performed using ultrasound at 30 and 60 days after AI. Results showed that buffaloes exhibited estrus at 18.64 ± 0.47 hours. The fixed timing of artificial insemination postestrus did not significantly affect the conception rate (22.5% and 45.0% in Group 1 and Group 2, respectively, $P=0.08$) and the sex ratio of the offspring (1:1.25 and 1:1 in Group 1 and Group 2, respectively, $P=0.84$). However, there was a tendency for a higher conception rate when AI was performed within the 18-24 hour window postestrus compared to the 6-12 hour window ($P=0.08$).

Keywords: Thai swamp buffalo, fixed time artificial insemination, estrous synchronization, calf sex

Scientific No. : 57(1)-0208-025

^{1/} KhonKaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Khonkaen Province

^{2/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Saraburi province

^{3/} Bureau of Biotechnology in Livestock production, Pathumthani Province

คำนำ

ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และกระบือทั้งประเทศ พ.ศ. 2561 รายงานว่า ประเทศไทยมีกระบือเพศผู้จำนวน 338,526 ตัว กระบือเพศเมีย 842,497 ตัว รวมทั้งสิ้นจำนวน 1,181,023 ตัว โดยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือ จำนวน 217,539 ราย และมีแนวโน้มที่ปริมาณกระบือจะลดลงอย่างต่อเนื่อง สาเหตุมาจากการใช้เครื่องจักรแทนการใช้แรงงานกระบือ และเกษตรกรที่เลี้ยงกระบือส่วนใหญ่ไม่ได้ให้ความสำคัญกับการผลิต และการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม ส่งผลให้กระบือมีจำนวนที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการบริโภคน้ำกระบือปีละกว่า 200,000 ตัว ในขณะที่มีลูกกระบือเกิดใหม่เพียงปีละประมาณ 150,000 ตัว (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561) กอปรกับทางปศุสัตว์ เช่น โคเนื้อ โคนม มีความพยายามทำให้สัดส่วนของเพศลูกโคที่เกิดมีการเบี่ยงเบนไปจากค่าปกติ (1:1) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อเกษตรกร กล่าวคือ ในโคนม หากสามารถทำให้ลูกโคที่เกิดเป็นเพศเมียมากกว่าจะทำให้เกษตรกรได้ผลตอบแทนจากการให้ผลผลิตน้ำนม และลูกโคสาวทดแทน ส่วนในโคเนื้อนั้น ผู้เลี้ยงต้องการลูกเพศผู้มากกว่า เพราะมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าเพศเมีย ให้ผลผลิตเนื้อมากกว่า เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยง ในการเลี้ยงกระบือก็เช่นเดียวกัน เกษตรกรผู้เลี้ยงก็มีความต้องการที่จะสามารถเบี่ยงเบนสัดส่วนของเพศลูกกระบือที่เกิดเพื่อให้ได้ลูกกระบือเพศผู้หรือเมียตามต้องการ โดยทั่วไปเกษตรกรต้องการกระบือเพศเมียมากกว่าเพศผู้ เนื่องจากการบังคับควบคุมกระบือเพศผู้ทำได้ยาก และที่สำคัญกระบือเพศเมียสามารถให้ลูกเพื่อเพิ่มผลผลิต เพิ่มจำนวนแม่พันธุ์ในฝูงได้ เป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบืออีกทางหนึ่ง

เพศผู้หรือเมียนั้นถูกกำหนดโดยโครโมโซมเพศ เพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น XX ส่วนเพศผู้เป็น XY เนื่องจากไข่มีโครโมโซมเพศเป็น X เพียงอย่างเดียว แต่อสุจิมียีสองแบบ คือ อสุจิที่มีโครโมโซม X (อสุจิ X) และอสุจิที่มีโครโมโซม Y (อสุจิ Y) ดังนั้น ถ้าเราสามารถคัดแยกน้ำเชื้อให้ได้เฉพาะอสุจิ X หรือเอื้อโอกาสให้เฉพาะแต่อสุจิ X ได้ผสมกับไข่แล้ว จะได้ลูกเพศเมีย ทำนองเดียวกัน ถ้าเราสามารถแยกเอาแต่อสุจิ Y เท่านั้นให้ผสมไข่จะได้ลูกเพศผู้ (อนันต์, 2533) ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อให้สามารถกำหนดเพศลูกเกิดได้ตามความต้องการ เช่น การผลิตน้ำเชื้อแยกเพศเพื่อใช้ในการผสมเทียมด้วยเทคนิคแตกต่างกัน (Carvajal et al., 2004; Wolf et al., 2008) แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร อีกทั้งยังมีต้นทุนที่ค่อนข้างสูงจึงยังไม่เป็นที่นิยมของเกษตรกร การกำหนดช่วงเวลาการผสมเทียมเพื่อให้ได้สัดส่วนเพศลูกเกิดที่แตกต่างกันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะทำให้มีสัดส่วนเพศลูกเกิดตามความต้องการ โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอสุจิโครโมโซม X และ Y และสภาวะความเป็นกรด-ด่างภายในช่องคลอด (Rorie, 1999; Santos et al., 2007; Khalifa et al., 2010) Rohde et al. (1973) พบว่าอสุจิที่มีโครโมโซม Y เคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้เร็วกว่าอสุจิที่มีโครโมโซม X ผ่านเมือกที่คอมดลูก กระบวนการคัดเลือกตัวอสุจิเกิดขึ้นที่ท่อนำไข่ โดยปฏิกิริยาระหว่างเยื่อหุ้มท่อนำไข่กับตัวอสุจิ ทำให้เกิดการรวมตัวกันอยู่ในช่วงต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก (Uterotubul-isthmus junction) และเกิดกระบวนการ Capacitation ของ sperm เกิดขึ้น (กระบวนการเปลี่ยนแปลงส่วนหัวของตัวอสุจิให้พร้อมในการผสม) ตัวอสุจิตัวใดที่ผ่าน

กระบวนการนี้แล้วจะหลุดออก แล้วเคลื่อนที่ไปยังจุดผสมพันธุ์ (Hunter, 2001) การศึกษาผลของระยะเวลาผสมเทียมหลังการเป็นสัดต่อเพศลูกนั้นส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในโคนม และโคเนื้อ ซึ่งก็มีวงจรการเป็นสัดคล้ายกับกระบือ ส่วนในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มีน้อย โดยเฉพาะในกระบือปลักมีการศึกษาในเรื่องนี้น้อยมาก (Presicce et al., 2004; Campanile et al., 2005; De Rensis and Lopez-Gatius, 2007; Chaikhun et al., 2010)

การเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิล (follicle) และการตกไข่ในโคนมหลายโปรแกรม แต่ที่นิยมใช้คือโปรแกรม Ovsynch ซึ่งเป็นการใช้ฮอร์โมนหลายชนิดร่วมกัน คือ การใช้ฮอร์โมน GnRH ร่วมกับฮอร์โมน PGF_{2α} (De rensis and Lopes-Gatius, 2007) โดยโปรแกรม Ovsynch ได้มีการใช้อย่างแพร่หลายในโคและกระบือ เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดี (De Araujo Berber et al., 2002; Paul and Prakash, 2005; De rensis and Lopes-Gatius, 2007) การใช้โปรแกรม Ovsynch ในกระบือ ควรผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในช่วงระหว่างชั่วโมงที่ 12-24 หลังจากการฉีด GnRH ครั้งที่ 2 (De rensis and Lopes-Gatius, 2007) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของระยะเวลาผสมเทียมภายหลังการเป็นสัดที่แตกต่างกันโดยโปรแกรม Ovsynch ต่ออัตราการผสมติดในกระบือปลักของไทย และสัดส่วนเพศลูก

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาผสมเทียมหลังการเป็นสัดโดยการเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่อสัดส่วนของเพศลูกและอัตราการผสมติดในกระบือปลักไทยเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการที่สามารถทำให้ได้เพศลูกตามความต้องการของเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือ เป็นการพัฒนางานวิชาการในการผลิตคู่สัตว์ และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระบือปลักในประเทศไทยให้ก้าวหน้ามากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษานี้ปฏิบัติงานในศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์นครพนม จ. นครพนม โดยใช้แม่กระบือปลักไทยจำนวน 87 ตัว อายุ 3-5 ปี ที่มีลูกแล้วอย่างน้อย 1 ตัว มีสุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์ และระบบสืบพันธุ์ปกติโดยการล้างตรวจาบบสืบพันธุ์ และใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจดูรังไข่และมดลูก มีคะแนนร่างกายระหว่าง 2.5-3.5 ได้รับวัคซีนและถ่ายพยาธิตามโปรแกรม ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch (d.0 GnRH 5 ml; I/M, d.7 PGF_{2α} 2ml;I/M, d.9 GnRH 5 ml; I/M) จากนั้นสุมกระบือที่แสดงอาการเป็นสัด (standing heat) หลังฉีด GnRH เข็มสุดท้าย (d.9) จำนวน 80 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มแบบสุ่ม กลุ่มละ 40 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ผสมเทียม ณ ชั่วโมงที่ 6-12 หลังการเป็นสัด

กลุ่มที่ 2 ผสมเทียม ณ ชั่วโมงที่ 18-24 หลังการเป็นสัด

การผสมเทียมในกระบือทั้ง 2 กลุ่มใช้เจ้าหน้าที่ผู้ผสมเทียมเพียงคนเดียวและใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์กระบือตัวเดียวกันจากชุดการผลิตเดียวกันที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ไม่น้อยกว่า 60 เปอร์เซนต์

โปรแกรม Ovsynch ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยที่ได้ศึกษาโปรแกรกดังกล่าวในกระบือในต่างประเทศ (Paul and Prakash, 2005; De Rensis and Lopez-Gatius, 2006) โดยปรับเปลี่ยนช่วงเวลาการผสมเทียม ดังแสดงตาม Figure 1

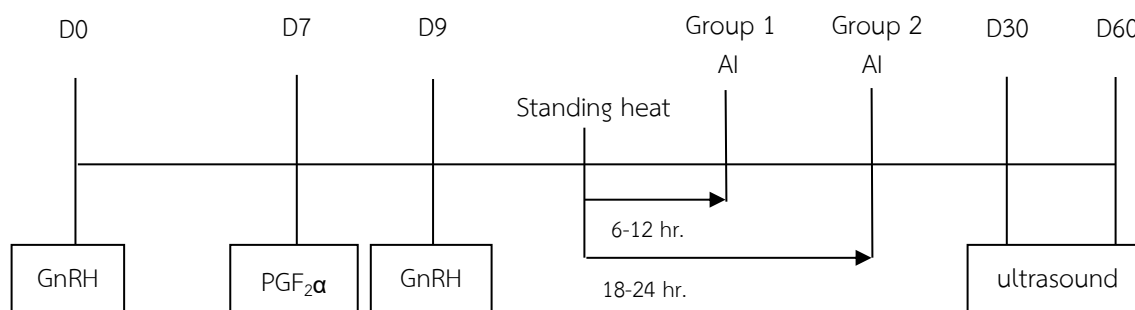


Figure 1 Estrus synchronization with modified Ovsynch protocol in Thai swamp buffaloes

การประเมินการเป็นสัด และการตั้งท้อง

ตรวจการเป็นสัดในกระบือหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัด โดยสังเกตจากอาการที่แสดงการเป็นสัด ได้แก่ อ้ววะะเพศบวมแดง แสดงอาการขึ้นขี่ตัวอื่น หรือมีกระบือตัวอื่นขึ้นขี่ พบเมื่อกบบริเวณช่องคลอด ส่งเสียงร้อง หรือไม่กินอาหาร ทำการตรวจท้องโดยใช้การล้วงตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ในวันที่ 30 และ 60 หลังการผสมเทียม บันทึกข้อมูลการเป็นสัด ระยะเวลาการเป็นสัดหลังการเหนี่ยวนำ การผสมติด จำนวนและเพศลูกที่เกิดจากการผสมเทียม คำนวณอัตราการผสมติด (สัดส่วนระหว่างจำนวนกระบือที่ตั้งท้องและจำนวนกระบือที่ได้รับการผสมเทียมทั้งหมด) และสัดส่วนเพศลูก (สัดส่วนระหว่างจำนวนเพศผู้ของลูกกระบือที่เกิดต่อจำนวนเพศเมียของลูกกระบือที่เกิด)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการเป็นสัดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยการทดสอบ t-test เปรียบเทียบอัตราการผสมติด และสัดส่วนของเพศลูกด้วยสถิติแบบไคสแควร์ (Chi-square test) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 5% ($\alpha = 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่ากระบือที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch ทั้งหมด 87 ตัว แสดงอาการเป็นสัด 80 ตัว คิดเป็น 91.95% ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ รัชฎาพร (2551) ที่ทำการศึกษาในกระบือปลักในพื้นที่จังหวัดชลบุรีโดยใช้โปรแกรม Ovsynch มีอัตราการเป็นสัดเท่ากับ 100 % การทดลองครั้งนี้กระบือแสดงอาการเป็นสัดน้อยกว่าการศึกษาที่ผ่านมาของ รัชฎาพร (2551) อาจเกิดจากปัญหาการเป็นสัดก่อนเวลา (premature estrus)

ระหว่างการให้ GnRH เข็มแรกถึงวันที่ให้ฮอร์โมน PGF_{2α} ซึ่งตรวจพบได้ 5 - 11.8% รวมถึงปัญหาการสลายตัวที่ไม่สมบูรณ์ของคอร์ปัสลูเทียมที่เกิดจากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ในวันเริ่มต้นโปรแกรม (Kim et al., 2003)

ระยะเวลาที่สังเกตพบอาการเป็นสัดภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดของกระปือพบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม ($P>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย ($\pm$ SE) เท่ากับ 18.40 ± 0.68 และ 18.88 ± 0.67 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Table 1) โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งหมดเท่ากับ 18.64 ± 0.47 ชั่วโมง ซึ่งแสดงอาการเป็นสัดช้ากว่าการศึกษาของ Chenault et al. (2003) ที่เหนี่ยวนำด้วยวิธี Ovsynch ที่พบว่ากระปือแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง ที่ 16.20 ± 1.20 ชั่วโมงภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ซึ่งการสังเกตพบอาการเป็นสัดช้ากว่า อาจเกิดเนื่องจากกระปือแสดงอาการเป็นสัดในช่วงเวลากลางคืนอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการสังเกตการเป็นสัดได้ (ตรวจพบอาการเป็นสัดช้ากว่าความเป็นจริง) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ ในกระปือปลักไทย พบว่าการศึกษาครั้งนี้มีค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่สังเกตพบอาการเป็นสัดภายหลังการเหนี่ยวนำ (18.64 ± 0.47 ชั่วโมง) อยู่ในช่วงที่เคยมีการรายงานมาก่อนโดย รัชฎาพร (2551) ที่รายงานระยะเวลาคงไข้อยู่ในช่วง 18-38 ชั่วโมง เมื่อใช้โปรแกรม Ovsynch

Table 1. On-set time of estrus (standing heat) after synchronization

Group	n	Mean (SE)	Min	Max
Group 1	40	18.40 (0.68)	12	28
Group 2	40	18.88 (0.67)	10	29
All	80	18.64 (0.47)	10	29
P-value ¹	-	0.62	-	-

¹ Comparison between Groups 1 and 2

อัตราการผสมติด

ผลการตรวจการตั้งท้องจากการผสมเทียมภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch ที่ระยะเวลาต่างกัน (กลุ่มที่ 1 : 6-12 ชั่วโมง, กลุ่มที่ 2 : 18-24 ชั่วโมง หลังการเป็นสัด) แสดงใน Table 2 โดยพบว่ากลุ่มที่ 2 มีอัตราการผสมติด (45.0%; 18/40) สูงกว่ากลุ่มที่ 1 (22.5%; 9/40) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.08$) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Paul and Prakash (2005) และ Mohan et al. (2006) ที่เหนี่ยวนำกระปือมูร่าห์ด้วยวิธี Ovsynch โดยอัตราการตั้งท้องอยู่ที่ 30% ถึง 40% เคยมีการศึกษาประสิทธิภาพที่ดีของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในกระปือโดยใช้วิธี Ovsynch โดย Rensis et al. (2005) โดยช่วยให้มีการตกไข่ที่ดีและมีผลการตั้งท้อง 44% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Neglia et al. (2003) ที่พบว่าวิธีนี้ให้ผลการตั้งท้องในกระปือ

44.4% นอกจากนี้ ยังมีรายงานอัตราการตั้งท้องที่มีค่าใกล้เคียงกันในโคนมจากการศึกษาอื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.1% (Cavestany et al., 2003) และ 29% (De Jarnette and Marshall, 2003) ในทางตรงกันข้าม Baruselli และคณะ (2004) รายงานอัตราการตั้งท้องในแม่โคนมที่ต่ำกว่าการศึกษาอื่นๆ (15%) ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าอัตราการผสมติดทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความสัมพันธ์ของเวลาตกไข่และเวลาผสมเทียมจากการกำหนดเวลาผสมเทียมในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 2 แบบ คือ ชั่วโมงที่ 6-12 (กลุ่มที่ 1) และ ชั่วโมงที่ 18-24 (กลุ่มที่ 2) หลังเป็นสัณยีนนี้ คาดว่าช่วงเวลาดังกล่าวยังคงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะเกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่และอสุจิ เนื่องจากอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียยาวนานถึง 24-30 ชั่วโมงหลังผสม (Kasimanickam et al., 2008) จากการศึกษาของ ธัญญาพร (2551) ที่ใช้โปรแกรม Ovsynch ในกระบือ ปลักพบว่าอัตราการตกไข่เท่ากับ 83.3% (10/12) ระยะเวลาตกไข่อยู่ในช่วง 18-38 ชั่วโมง การที่อัตราการผสมติดในกระบือกลุ่มที่ 1 (22.5%) มีแนวโน้มต่ำกว่า กลุ่มที่ 2 (45.0%) ($P=0.08$) นั้น อาจเนื่องมาจากขนาดของฟอลลิเคิล ณ วันเริ่มต้นโปรแกรม Ovsynch การศึกษาโปรแกรมดังกล่าวในกระบือก่อนหน้านี้พบว่าสิ่งสำคัญที่ทำให้การใช้โปรแกรม Ovsynch ประสบความสำเร็จคือการปรากฏฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ในเวลาเริ่มต้นฉีด GnRH ครั้งแรก (Thatcher et al., 2001; De Rensis et al., 2005) เนื่องจาก GnRH ที่ฉีดในครั้งแรกจะไปทำหน้าที่กระตุ้นให้ฟอลลิเคิลใหญ่เกิดการตกไข่ พร้อมทั้งกระตุ้นให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลจากคลีนฟอลลิเคิลคลีนใหม่ (Thatcher et al., 1989; Thatcher et al., 1993; Wolfenson et al., 1994; Xu et al., 2000b) Presicce et al. (2005) ให้เหตุผลว่าความล้มเหลวของการตกไข่หลังจากฉีด GnRH ครั้งแรก และการลดระดับลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในขณะที่ฉีดฮอร์โมน PGF_{2α} ร่วมกัน ส่งผลให้อัตราการเหนี่ยวนำการตกไข่และอัตราการผสมติดลดลงในกระบือ และมีการศึกษาในโคนมพบความสัมพันธ์ของการผสมติดที่ล้มเหลว กับการสลายตัวที่ไม่สมบูรณ์ของคอร์ปัสลูเตียมที่เกิดจากฟอลลิเคิลใหญ่ในวันเริ่มต้นโปรแกรม (Kim et al., 2003) นอกจากนี้ Peters and Pursley (2003) ได้รายงานวาระยะเวลาระหว่างช่วงการลดต่ำลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนถึงช่วงที่ฮอร์โมนแอลเอชสูงสุด (LH surge) ที่ยาวนาน ทำให้อัตราการผสมติดเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องจากช่วยให้อสุจิมีชีวิตรอดและเดินทางไปยังตำแหน่งปฏิสนธิได้ดีขึ้น (ธัญญาพร, 2551) ถึงแม้ว่าอัตราการผสมติดระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ในการศึกษาครั้งนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่กลุ่มที่ 2 จะมีอัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มที่ 1 ($0.05 < P < 0.1$) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ ธัญญาพร (2551) ที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่กระบือปลักด้วยวิธีเดียวกันพบว่ามีอัตราการผสมติด 42.9% (15/35) การเพิ่มจำนวนตัวอย่างอาจช่วยให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม อัตราการผสมติดในกลุ่มที่ 2 (45%) สูงกว่ากลุ่มที่ 1 (22.5%) น่าจะชี้แนะได้ว่าการผสมเทียมโดยการเหนี่ยวนำด้วย Ovsynch ควรทำที่ 18-24 ชั่วโมงภายหลังกระบือแสดงอาการเป็นสัณยีนนี้ เพราะการผสมเทียมและเหนี่ยวนำมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการผสมเทียมแล้วมีอัตราการผสมติดที่ดีกว่าจะช่วยลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้

Tabel 2. Conception rate and calf sex ratio after synchronization of ovulation in Swamp buffaloes

	Group 1	Group 2	df	χ^2	P-value
Conception rate (%)	22.50	45.00	1	4.53	0.08
Sex ratio (Male/Female)	4/5 (0.8 : 1)	9/9 (1 : 1)	1	0.07	0.84

ในต่างประเทศ ได้รายงานระยะห่างระหว่างการฉีดฮอร์โมน GnRH ครั้งที่ 2 จนกระทั่งตกไข่เท่ากับ 26.5 ± 9.6 ชั่วโมง ในกระบือลูกผสมพันธุ์มูราห์และพันธุ์เมดิเตอร์เรเนียนในประเทศบราซิล (De Araujo Berber et al., 2002) และ 23 ± 1.3 ชั่วโมง ในกระบือพันธุ์มูราห์ของประเทศอินเดีย (Paul and Prakash (2005) De rensis and Lopes-Gatius (2007) ได้แนะนำว่าควรผสมเทียมแบบกำหนดเวลา ในช่วงระหว่างชั่วโมงที่ 12-24 หลังจากการฉีด GnRH ครั้งที่ 2 เมื่อใช้โปรแกรม Ovsynch เพื่อเพิ่มผลสำเร็จในการผสมติด

สัดส่วนของเพศลูก

Table 2 แสดงสัดส่วนเพศลูกเกิดจากการผสมเทียมภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch ที่ระยะเวลาต่างกัน (กลุ่มที่ 1 : 6-12 ชั่วโมง, กลุ่มที่ 2 : 18-24 ชั่วโมง หลังการเป็นสัด) โดยพบว่า กลุ่มที่ 1 คลอดลูก 9 ตัว เป็นเพศผู้ 4 ตัว เพศเมีย 5 ตัว สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 4/5 (0.8 : 1 นั่นคือ ลูกเพศผู้ 80 ตัว ต่อ ลูกเพศเมีย 100 ตัว) และกลุ่มที่ 2 คลอดลูก 18 ตัว เป็นเพศผู้ 9 ตัว เพศเมีย 9 ตัว สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 9/9 (1:1) โดยสัดส่วนเพศลูกเกิดไม่แตกต่างกัน ($P=0.84$) ผลที่ได้ในครั้งนี้คล้ายกับรายงานในโคนมที่พบว่าช่วงเวลาที่ทำการผสมเทียมไม่มีผลต่อสัดส่วนเพศของลูกโคที่เกิด (Foote et al., 1977; Orkun et al., 2007) อย่างไรก็ตาม มีรายงานสัดส่วนเพศลูกแตกต่างกันเมื่อผสมเทียมในช่วงเวลาที่ต่างกัน Rorie (1999) รายงานถึงผลจากการผสมเทียมโค ในช่วงต้นของการเป็นสัดให้ลูกเกิดเพศเมียสัดส่วนมากกว่าลูกเพศผู้ แต่การผสมเทียมในช่วงท้ายๆ ของการเป็นสัดส่งผลให้ลูกเกิดเพศผู้สูงกว่า รายงานการศึกษาของ Martinez et al. (2004) อธิบายให้เห็นว่าการที่ลูกเกิดเป็นเพศเมียในอัตราที่สูงกว่า มีสัดส่วนผู้ต่อเพศเมีย เท่ากับ 103/141 (1:1.37) จากการผสมเทียมโคที่เป็นสัดในช่วงต้นของการเป็นสัด (ชั่วโมงที่ 8 ถึง 18) โดยไม่สูญเสียอัตราการผสมติด (66.19%) เพราะอสุจิที่มีโครโมโซม Y จะผ่านกระบวนการ Capacitation สมบูรณ์ก่อนอสุจิที่มีโครโมโซม X และจะมาถึงจุดผสมพันธุ์ก่อนการตกไข่เป็นเวลานานและตายก่อนที่จะผสมพันธุ์กับไข่ อสุจิที่มีโครโมโซม X ซึ่งผ่านกระบวนการ Capacitation มาช้ากว่าและมีอายุนานกว่า จะมาถึงจุดผสมพันธุ์ในเวลาที่เหมาะสมที่มีไข่ตกมาลงมาแล้วเกิดการผสมพันธุ์กันเกิดลูกโคเพศเมีย และเคยมีการศึกษาในการผสมเทียมโคในช่วงเวลามากกว่า 30 ชั่วโมงหลังการเป็นสัด ก็เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้น เพียงแต่ว่าอสุจิที่มีโครโมโซม Y หลังผ่านการ Capacitation เมื่อมาถึงจุดผสมพันธุ์จะมีไข่มารอรับการผสมพันธุ์และเป็นเวลาที่เหมาะสมพอดีในการจะเข้าผสมพันธุ์กับไข่จึงเกิดลูกโคเพศผู้ในอัตราส่วนที่สูง (72.06%) (Wehner et al., 1997) และจากรายงานในหลายชนิดสัตว์

สันนิษฐานในทำนองเดียวกันคือ อสุจิโครโมโซม X และ Y มีความแตกต่างในส่วนของรูปร่าง โครงสร้าง และขนาด โดยอสุจิที่มีโครโมโซม X จะมีขนาดและจำนวนของ DNA ใหญ่กว่าอสุจิที่มีโครโมโซม Y ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่และกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิแตกต่างกัน (Paasch et al., 2007) การที่ผลของสัดส่วนเพศลูกในการศึกษานี้ไม่แตกต่างกันเมื่อผสมเทียมกระป๋องปลักที่ระยะเวลาต่างกัน ภายหลังการเป็นสัดนั้น หากพิจารณาเฉพาะช่วงเวลาในการผสมเทียมเพียงปัจจัยเดียวอาจไม่มีผลต่อสัดส่วนเพศของลูก แต่น่าจะเกิดจากหลายปัจจัย เช่น รูปร่างและโครงสร้างของอสุจิ สภาพแวดล้อมภายในช่องคลอด สารคัดหลั่งภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และค่า pH (Schulman and Karabinus, 2005; Paasch et al., 2007)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ศึกษาผลของระยะเวลาผสมเทียมหลังการเป็นสัดโดยการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธี Ovsynch ต่อสัดส่วนเพศลูก และอัตราการผสมติดในกระป๋องปลักไทย กระป๋องแสดงอาการเป็นสัดในช่วงเวลาที่ 18.64±0.47 ชั่วโมง ภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ระยะเวลาการผสมเทียมหลังการเป็นสัดที่ภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัด (กลุ่มที่ 1 : 6-12 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 2 : 18-24 ชั่วโมง) ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด (22.50 และ 45.0% ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ, P=0.08) และสัดส่วนเพศ (1:1.25 และ 1:1 ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ, P=0.84) อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมที่ชั่วโมงที่ 18-24 ภายหลังกระป๋องแสดงอาการเป็นสัดยีนนิ่ง มีแนวโน้มอัตราผสมติดสูงกว่าการผสมเทียมในชั่วโมงที่ 6-12

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่เกิดขึ้นภายในช่องคลอด สารคัดหลั่งภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และค่า pH ภายในระบบสืบพันธุ์ของกระป๋องกลุ่มทดลองที่ใช้โปรแกรม Ovsynch ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาวิจัยถึงความแตกต่างดังกล่าวต่อไปในอนาคต ถึงแม้ว่าอัตราการผสมติดระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ในการศึกษาครั้งนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่กลุ่มที่ 2 จะมีอัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มที่ 1 (P=0.08) น่าจะชี้แนะได้ว่าการผสมเทียมโดยการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรแกรม Ovsynch ควรทำที่ 18-24 ชั่วโมงหลังกระป๋องแสดงอาการเป็นสัดยีนนิ่ง เพราะการผสมเทียมและเหนี่ยวนำมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการผสมเทียมแล้วมีอัตราการผสมติดที่ดีกว่าจะช่วยลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านในสังกัดศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์นครพนม ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือ ในด้านการ

ปฏิบัติงาน การเก็บรวบรวมข้อมูล และการอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในพื้นที่ที่รับผิดชอบ ทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561. ข้อมูลเกษตรกร/ปศุสัตว์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และกระบือ ปี 2561. แหล่งที่มา:
https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/yearly/2561/land/T4-1.pdf, 26 สิงหาคม 2565.
- ธัญญาพร ไชยคุณ. 2551. ประสิทธิภาพของโปรแกรมการเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในกระบือปลักในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนูเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนันต์ ศรีขาว. 2533. ความแตกต่างของอสุจิ X และ Y กับการใช้ในการกำหนดเพศ. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 8(2-3):43-46.
- Baruselli, P.S., E.L. Reis, M.O. Marques, L.F. Nasser and G.A. Bob. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science* 82:479-486.
- Campanile, G., G. Neglia, B. Gesparrini, G. Galieno, A. Prandi and R. DiBlo. 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology* 63(8): 2334-2340.
- Carvajal, G., C. Cuello, M. Ruiz, J.M. Vazquez, E.A. Martinez and J. Roca. 2004. Effect of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology* 25(3):389-396.
- Cavestany, D., J. Cibils, A. Freire, A. Sastre and J. S. Stevenson. 2003. Evaluation of two different oestrus-synchronisation methods with timed artificial insemination and resynchronization of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 77(3-4):141-155.
- Chaikhun, T., T. Tharasanit, J. Rattanatep, F. De Rensis and M. Techakumphu. 2010. Fertility of swamp buffalo following the synchronization of ovulation by the sequential administration of GnRH and PGF 2 alpha combined with fixed-timed artificial insemination. *Theriogenology* 74(8):1371-1376.

- Chenault, J.R., J.F. Boucher, K.J. Dame, J.A. Meyer and S.L. Wood-Follis. 2003. Intravaginal Progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cow. *J. Dairy. Sci.* 86(6):2039-2049.
- De Araujo Berber, R.C., Madureira, E.H. and P.S. Baruselli. 2002. Comparison of two Ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (*bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 57:1421-1430.
- De Jarnette, J.M. and C.E. Marshall. 2003. Effects of pre-synchronization using combinations PGF2 and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 77(1-2):51-60.
- De Rensis, F. and F. Lopez-Gatius. 2007. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Theriogenology* 67(2):209-216.
- De Rensis, F., G. Ronci, P. Guarneri, B. Xuan Nguyen, G.A. Presicce, G. Huszenicza. and R.J. Scaramuzzi. 2005. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementatioin in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 63(7):1824-1831.
- Foote, R.H. 1997. Sex ratios in dairy cattle under various conditions. *Theriogenology* 8(6): 349-356.
- Hunter, R. H. 2001. Histophysiology of the Fallopian tubes in relation to sperm binding, release, and completion of capacitation. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* 106(2):279-289.
- Kasimanickam, R., J. B. Hall, J. F. Currin. and W. D. Whittier. 2008. Sire effect on the pregnancy outcome in beef cows synchronized with progesterone based Ovsynch and CO-Synch protocols. *Animal Reproduction Science* 104(1):1-8.
- Khalifa, E.I., M.E. Ahmed, A.M. Abdel-Gawad and O.A. El-Zelaky. 2010. The effect of insemination timing on fertilization and embryo gender in Zaraibi goats. *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences* 5(1):271-281.
- Kim, I. H., G. H. Suh and D. S. Son. 2003. A progesterone-based timed AI protocol more effectively prevents premature estrus and incomplete luteal regression than an Ovsynch protocol in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 60(5):809-817.

- Martinez, F., M. Kaabia, F. Martinez-Pastorb, M. Alvareza, E. Anela, J.C. Boixoc, P. de Pazb and A. Luis. 2004. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. *Theriogenology* 62(7):1264-1270.
- Mondal, M., C. Rajkhowa and B. S. Prakash. 2006. Relationship of plasma estradiol-17 β , total estrogen, and progesterone to estrus behavior in mithun (*Bos frontalis*) cows. *Hormones and Behavior* 49(5):626-633.
- Neglia, G., B. Gasparri, D. Palo, D. Rossella, R. Clemente, L. Zicarelli and G. Campanile. 2003. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 60(1):125-133.
- Orkun, D., U.N. Mustafa, A. Murat and B. Tayfur. 2007. The effect of artificial insemination timing on the sex ratio of offspring and fertility in dairy cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 31(1):21-24.
- Paasch, U., S. Grunewald and H.I. Glander. 2007. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Reprod. Fertil.* 65:515-525.
- Paul, V. and B.S. Prakash. 2005. Efficacy of the Ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 64(5):1049-1060.
- Peters, M.W. and J.R. Pursley. 2003. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology* 60(6):1197-1204.
- Presicce, G.A., E.M. Senatore, A. Bella, G. De Santis, V.L. Barile and G.J. De Mauro. 2004. Ovarian follicular dynamics and hormonal profile in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. *Theriogenology* 61(7-8):1343-1355.
- Presicce, G.A., E.M. Senatore, G. De Santis and A. Bella. 2005. Follicle turnover and pregnancy rate following estrus synchronization protocols in Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reproduction in domestic animals* 40(5):443-447.
- Pursley, J.R., M.O. Mee and M.C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α , and GnRH. *Theriogenology* 44(7):915-923.

- Rensis D., G. Ronci, P. Guarneri, B. Nguyen, G.A. Presicce, G. Huszenicza and R.J. Scaramuzzi. 2005. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 63(7):1824-1831.
- Rohde, W., T. Porstman and G. Doner. 1973. Migration of Y-bearing human spermatozoa in cervical mucus. *Reproduction* 33(1):167-169.
- Rorie, R.W. 1999. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. *Theriogenology* 52(8):1273-1280.
- Rossi, P., D. Vecchio, G. Neglia, R. Di Palo, B. Gasparrini, M.J. D'Occhio and G. Campanile. 2014. Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination. *Theriogenology* 82(1):132-137.
- Santos, M.H.B., C.I.M. Gonzalez, F.Q.G. Bezerra, J.P. Neves, H.D. Reichenbach, P.F. Lima and M.A.L. Oliveira. 2007. Sexing of Dorper sheep fetuses derived from natural mating and embryo transfer by ultrasonography. *Reproduction, Fertility and Development* 19(2):366-369.
- Schulman, J.D. and D. Karabinus. 2005. Scientific aspects of preconception gender selection. *Reproductive biomedicine online* 10:111-115.
- Thatcher, W.W., M. Drost, J.D. Savio, K.L. Macmillan, K.W. Entwistle and E.J. Schmitt. 1993. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal Reproduction Science* 33(1-4):27-49.
- Thatcher, W.W., K.L. Macmillan, P.J. Hansen and M. Drost. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31(1):149-164.
- Thatcher, W.W., F. Moreira, J.E.P. Santos, R. Mattos, F.L. Lopez and S.M. Pancarci. 2001. Effects of hormonal treatment on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55(1):75-89.
- Wehner, G.R., C. Wood, A. Tague, D. Barker and H. Hubert. 1997. Efficiency of the ovate unit for estrus detection and calf sex control in beef cows. *Animal Reproduction Science* 46(1-2):27-34.
- Wolf, C.A., K.E. Brass, M.I.B. Rubin, S.E. Pozzobon, F.D. Mozzaquatro and F.D. De La Corte. 2008. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)* 5(3):110-115.

- Wolfenson, D., W.W. Thatcher, J.D. Savio, L. Badinga and M.C. Lucy. 1994. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronizability of estrus in lactating dairy cows. *Theriogenology* 42(4):633-644.
- Xu, Z.Z., G.A. Verkerk, J.F. Mee, S.R. Morgan, B.A. Clark, C.R. Burke and L.J. Burton. 2000. Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic cows after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, PGF₂ and estradiol. *Theriogenology* 54(2):273-282.

ผลของฮอร์โมนเอฟ เอส เอชในสารละลายไฮยาลูโรแนนต่อการเพิ่มการตกไข่ในโคเนื้อ

วิชญาณี ภูมิพิทักษ์กุล^{1/} ศุภาพิชญ์ คันธวัฒน์^{1/} สถาปัตย์ อิมโพธิ์^{1/} อนนท์ เทื่องสันเทียะ^{2/} อรุณ จันทรกระจ่าง^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบผลของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยการใช้ฮอร์โมนเอฟ เอส เอชแบบปกติและการใช้ฮอร์โมนเอฟ เอส เอชผสมในสารละลายไฮยาลูโรแนนซึ่งมีคุณสมบัติในการคงระดับการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟ เอส เอชให้ยาวนานยิ่งขึ้น การศึกษานี้ทำการศึกษาในแม่โคเนื้อตัวให้จำนวนทั้งสิ้น 34 ตัว ทำการแบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 17 ตัว ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่โดยการสอดฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนทางช่องคลอดและฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอชขนาดรวมจำนวน 200 มิลลิกรัมทั้ง 2 กลุ่ม โดยกลุ่มควบคุมทำการฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอชจำนวน 6 ครั้งและกลุ่มทดลองทำการฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอชละลายในสารละลายไฮยาลูโรแนนจำนวน 2 ครั้ง จับสัดและผสมเทียมจำนวน 3 ครั้งในวันที่ 13 และ 14 หลังการสอดฮอร์โมน ทำการอัลตราซาวด์และล้างเก็บตัวอ่อนในวันที่ 20 หลังการสอดฮอร์โมน บันทึกข้อมูลจำนวนฟอลลิเคิล จำนวนคอร์ปัสลูเทียม จำนวนตัวอ่อนและประเมินคุณภาพของตัวอ่อน ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ (2.29 ± 1.04 ใบ) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (5.71 ± 1.61 ใบ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ถึงแม้ว่าจำนวนคอร์ปัสลูเทียมและจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ระหว่างทั้งสองกลุ่มจะมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าร้อยละจำนวนตัวอ่อนในระยะ blastocyst ($29.13 \pm 2.96\%$, $p < 0.05$) และ degeneration ($24.41 \pm 1.98\%$, $p < 0.05$) ของกลุ่มทดลองมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม ($19.54 \pm 1.27\%$ และ $9.20 \pm 0.62\%$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอ่อนคุณภาพดีที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งเก็บไว้ได้ พบว่าโคที่ได้รับฮอร์โมนเอฟ เอส เอชในสารละลายไฮยาลูโรแนน มีร้อยละของตัวอ่อนในระยะ morula เกรด B ($8.47 \pm 0.59\%$, $p < 0.05$) และ blastocyst เกรด B ($45.76 \pm 2.53\%$, $p < 0.05$) มากกว่ากลุ่มควบคุม ($4.17 \pm 0.33\%$ และ $22.92 \pm 1.06\%$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น การกระตุ้นการตกไข่โดยการใช้ฮอร์โมนเอฟ เอส เอชในสารละลายไฮยาลูโรแนนจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตกไข่และได้จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีปกติ

คำสำคัญ: การกระตุ้นการตกไข่หลายใบ โคเนื้อ ฮอร์โมนเอฟ เอส เอช ไฮยาลูโรแนน

เลขทะเบียนวิจัย: 61(1)-0208-007

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/} ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

^{3/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ.แก่งคอย จ.สระบุรี

Effect of follicle stimulating hormone (FSH) in 5% hyaluronan solution on superovulation in beef cattle

Vichayanee Pumpitakul^{1/} Supapit Kanthawat^{1/} Sathapat Aimpot^{1/} Anon Thuangsanthia^{2/} Arun Chankrachang^{3/}

Abstract

The objective of this study was to assess the potential of a hyaluronan-based solution in enhancing the efficacy of follicle stimulating hormone (FSH) compared to the conventional superovulation protocol, which has the property of prolonging the activity of FSH. The study involved 34 beef cattle, randomly divided into two groups of 17 each. The beef cattle were induced to ovulate by vaginal progesterone administration and FSH injection, in a total volume of 200 milligram for both groups. The control group received FSH hormone injections six times, while the experimental group received FSH hormone dissolved in hyaluronan solution twice. The artificial insemination was performed three times on days 13 and 14 after hormone induction. Ultrasound examination was conducted, and embryos were flushed on day 20 after hormone induction. The data recorded included the number of follicles, the number of corpora lutea, embryo count, and embryo quality assessment. The study revealed that the experimental group had a significantly lower average number of follicles (2.29 ± 1.04) compared to the control group (5.71 ± 1.61). Although there was no significant difference in the average number of corpora lutea and flushed embryos between two groups, the experimental group showed a higher percentage of blastocyst ($29.13 \pm 2.96\%$, $p < 0.05$) and degenerated embryos ($24.41 \pm 1.98\%$, $p < 0.05$) compared to the control group ($19.54 \pm 1.27\%$ and $9.20 \pm 0.62\%$, respectively). Furthermore, when considering only high-quality embryos suitable for transfer or cryopreservation, the beef cattle that received FSH in hyaluronan solution had a higher percentage of grade B morula ($8.47 \pm 0.59\%$, $p < 0.05$) and grade B blastocyst ($45.76 \pm 2.53\%$, $p < 0.05$) compared to the control group ($4.17 \pm 0.33\%$ and $22.92 \pm 1.06\%$, respectively), with statistical significance. Therefore, utilizing FSH in hyaluronan solution is an effective method for superovulation, resulting in a comparable number of collectable embryos to the conventional method.

Keywords: superovulation, beef cattle, follicle stimulating hormone, hyaluronan

Registered number: 61(1)-0208-007

^{1/} Bureau of Biotechnology and Livestock Production, Muang, Pathum Thani

^{2/} Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center, Pakchong, Nakorn Ratchasima

^{3/} Saraburi Biotechnology and Artificial Insemination Research Center, Keangkoi, Saraburi

คำนำ

ปัจจุบัน การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทยได้ขยายวงกว้างมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากความต้องการบริโภคเนื้อภายในประเทศที่เพิ่มขึ้นทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ มีกลุ่มผู้บริโภคที่ต้องการบริโภคเนื้อคุณภาพสูง ทำให้มีตลาดในการรองรับและผลักดันให้ผู้เลี้ยงโคเนื้อที่มีมาตรฐานในการเลี้ยงโคเนื้อเพิ่มสูงขึ้น พัฒนาจากการเลี้ยงเพื่อเป็นอาชีพเสริมหรือเป็นแบบรายย่อย มาสู่การเลี้ยงที่อาศัยความรู้เชิงวิชาการและใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อเข้ามาเพิ่มผลผลิตมากยิ่งขึ้น (สุวิข, 2558) การผลิตและการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เป็นเทคโนโลยีที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายและมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและกระจายสัตว์ที่มีพันธุกรรมดีไปสู่เกษตรกรในระยะเวลานาน สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงและขยายพันธุ์สัตว์ ส่งผลให้สามารถผลิตโคเนื้อที่มีลักษณะดีได้มากกว่า 1 ตัวต่อปีโดยอาศัยการย้ายฝากตัวอ่อนสู่แม่ตัวรับ (recipient) หลายๆ ตัว โดยในกระบวนการผลิตตัวอ่อนนั้น ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ คือ การเตรียมแม่ตัวให้ (donor) โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสัดและทำการผสมเทียม จากนั้นทำการล้างเก็บตัวอ่อนที่ได้และนำตัวอ่อนนั้นเข้าฝากในแม่ตัวรับในระยะเวลาที่เหมาะสม (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2556) โดยในการเตรียมแม่โคเพื่อเป็นแม่ตัวให้นั้น การกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบ (superovulation) ถือเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำให้เกิดการผลิตและตกไข่จำนวนมากกว่ปกติ ส่งผลให้เพิ่มโอกาสในการปฏิสนธิและได้ตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากในปริมาณที่มากขึ้น (Mapletoft and Bó, 2014) ซึ่งในขั้นตอนดังกล่าวจะใช้ฮอร์โมนในกลุ่มโกนาโดโทรปิน (gonadotropin hormone) ในการกระตุ้นให้การตกไข่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ ฮอร์โมนดังกล่าวเป็นฮอร์โมนในกลุ่มเปปไทด์ที่สร้างจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary) ประกอบด้วย 2 ฮอร์โมนสำคัญ ได้แก่ ฮอร์โมนเอฟ เอส เอช (follicle-stimulating hormone; FSH) และ ฮอร์โมนแอล เอช (luteinizing hormone; LH) โดยฮอร์โมนทั้งสองจะถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่งจากฮอร์โมนจี เอ็น อาร์ เอช (gonadotropin-releasing hormone; GnRH) ซึ่งสร้างจากเซลล์ประสาทของสมองส่วนไฮโปธาลามัส (hypothalamus) และกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ต่อไป (Millar, 2005)

ในกระบวนการผลิตตัวอ่อนในระยะแรก มีการนำฮอร์โมนอี ซี จี (equine chorionic gonadotropin; eCG) มาใช้ในกระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโค โดยฮอร์โมนดังกล่าวมีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือด 40 ชั่วโมงและสามารถคงอยู่ในกระแสเลือดได้เป็นเวลา 10 วัน ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นรังไข่ที่ยาวนานกว่าปกติ ทำให้ระบบต่อมไร้ท่อต่างๆ ในโคผิดปกติ และทำให้คุณภาพของตัวอ่อนที่ได้รับมีคุณภาพที่ลดลง (Murphy & Martinuk, 1991) ต่อมาจึงได้มีการประยุกต์ใช้ฮอร์โมน FSH เข้ามาแทนที่ฮอร์โมน eCG เพื่อช่วยกระตุ้นในการสร้างฟอลลิเคิล โดยจากการศึกษาของ Monniaux et al. (1983) พบว่าโคมีการตอบสนองต่อฮอร์โมน FSH ได้ดีขึ้นกว่าการใช้ฮอร์โมน eCG เนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดที่สั้นกว่า โดยมีค่าอยู่ที่ประมาณ 5 ชั่วโมง

(Demoustier et al., 1988) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากฮอร์โมน FSH มีค่าครึ่งชีวิตที่สั้น ส่งผลให้ในกระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบส่วนใหญ่มีความจำเป็นต้องให้ฮอร์โมน FSH เข้าทางกล้ามเนื้อเนื้อจำนวน 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3-4 วัน ซึ่งมีผลให้โคตัวเกิดความเครียดอย่างต่อเนื่องและต้องใช้แรงงานในการจับบังคับ โดยความเครียดที่เกิดขึ้นในโคตัวให้ ส่งผลให้เกิดการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ไม่สมบูรณ์และมีผลในการยับยั้งการเพิ่มขึ้นสูงของฮอร์โมน LH ในกระแสเลือด (LH surge) ทำให้การกระตุ้นการตกไข่เป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ (Hasler, 2003; Stoebel & Moberg, 1982)

ต่อมาได้มีแนวคิดในการนำคุณสมบัติของสารละลายไฮยาลูโรแนนเข้ามาเป็นตัวช่วยในการแก้ปัญหาและเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการกระตุ้นการตกไข่ในโคเนื้อ โดยได้มีการใช้คุณสมบัติของไฮยาลูโรแนนเพื่อช่วยคงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน FSH ให้นานยิ่งขึ้น เพื่อหวังผลในการลดจำนวนครั้งในการฉีด ลดความเครียดของสัตว์ในการจับบังคับ ลดแรงงานและประหยัดเวลาในการควบคุมสัตว์ โดยไฮยาลูโรแนนเป็นสารประเภทโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ (biodegradable polymer) มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ได้แก่ ผิวหนังและกระดูกอ่อนและไม่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการของร่างกาย เมื่อใช้เป็นตัวทำละลายจะสามารถช่วยยืดระยะเวลาในการปลดปล่อยตัวยาได้ สารดังกล่าวเป็นสารที่มีคุณสมบัติขึ้นเหนียว สามารถละลายน้ำและอุ้มน้ำได้ดี จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการคงรูปของยา โดยไฮยาลูโรแนนจะทำหน้าที่คล้ายแหล่งกักเก็บ (depot matrix) จะทำการเก็บยาไว้และค่อย ๆ ปลดปล่อยตัวยาในรูปออกฤทธิ์ได้ออกมาในบริเวณที่ฉีด จากการศึกษาในโคนมโฮลสไตน์ โดยเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมน FSH ในพลาสมา พบว่าระดับของฮอร์โมน FSH ในพลาสมาไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มโคที่ได้รับฮอร์โมน FSH ละลายใน 0.5% ไฮยาลูโรแนนจำนวน 1 ครั้งต่อวันทางกล้ามเนื้อและกลุ่มโคนมที่ได้รับฮอร์โมน FSH จำนวน 2 ครั้งต่อวัน (Vieira et al., 2016) การใช้ฮอร์โมน FSH ผสมในไฮยาลูโรแนนดังกล่าวจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโคและสามารถช่วยลดจำนวนครั้งในการฉีดฮอร์โมน FSH ในกระบวนการเตรียมแม่ตัวให้ได้เมื่อเทียบกับการให้ฮอร์โมน FSH รูปแบบปกติ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบผลของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโคเนื้อด้วยการใช้ฮอร์โมน FSH แบบปกติที่ใช้ในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา และการกระตุ้นการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน FSH ผสมในสารละลายไฮยาลูโรแนน 5% โดยเปรียบเทียบจำนวนฟอลลิเคิล จำนวนคอร์ปัสลูเทียมบนรังไข่ จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ คุณภาพของตัวอ่อนและจำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งเก็บไว้ได้ในโคเนื้อ ดังนั้น ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะมีประโยชน์สูงสุดในการพัฒนาเทคนิคและเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายฝากตัวอ่อนในโคเนื้อ โดยช่วยให้กระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโคเนื้อเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เพิ่มโอกาสในการ

ได้ตัวอ่อนจำนวนมากขึ้นและมีคุณภาพเหมาะสมในการย้ายฝากตัวอ่อน สามารถลดความเครียดในการจับบังคับโค และช่วยให้เกิดความสะดวกต่อผู้ปฏิบัติงานมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในโคเนื้อเพศเมียจำนวน 34 ตัวที่มีอายุประมาณ 3-5 ปี มีสุขภาพแข็งแรง มีความสมบูรณ์พันธุ์ และมีประวัติให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว มีคะแนนร่างกาย (body condition score; BCS) อยู่ระหว่าง 2.5-3.5 มีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วงระหว่าง 350-500 กิโลกรัม มีประวัติในการเป็นแม่ตัวให้ โดยเคยได้รับการกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมนและล้างเก็บตัวอ่อนมาแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง ได้รับการฉีดวัคซีนและถ่ายพยาธิครบถ้วนตามโปรแกรมสุขภาพของกรมปศุสัตว์ ทำการศึกษา ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในโคเนื้อเพศเมียจำนวน 34 ตัวที่เลี้ยงในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา ทำการแบ่งโคแบบสุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบโดยใช้ฮอร์โมน FSH แบบปกติตามโปรแกรมของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ จำนวน 17 ตัว และกลุ่มทดลองซึ่งได้รับกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนน 5% จำนวน 17 ตัว

วิธีการทดลอง

1. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ

เหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยใช้ฮอร์โมน FSH โดยมีโปรแกรมการดำเนินงานในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มควบคุม

ให้ฮอร์โมน FSH (Folltropin®-V, Vetoquinol, Canada) ปริมาณทั้งหมด 200 มิลลิกรัม เพื่อกระตุ้นการตกไข่ โดยฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อบริเวณคอของโค หลังจากให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแบบสอด (CIDR-B®, InterAg, New Zealand) ในวันที่ 9, 10 และ 11 ฉีดวันละ 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง ในปริมาณ 2.5, 1.5, และ 1

มิลลิลิตร (50, 30 และ 20 มิลลิกรัม) ตามลำดับ ตามโปรแกรมปกติของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ดังแสดงใน Figure 1.

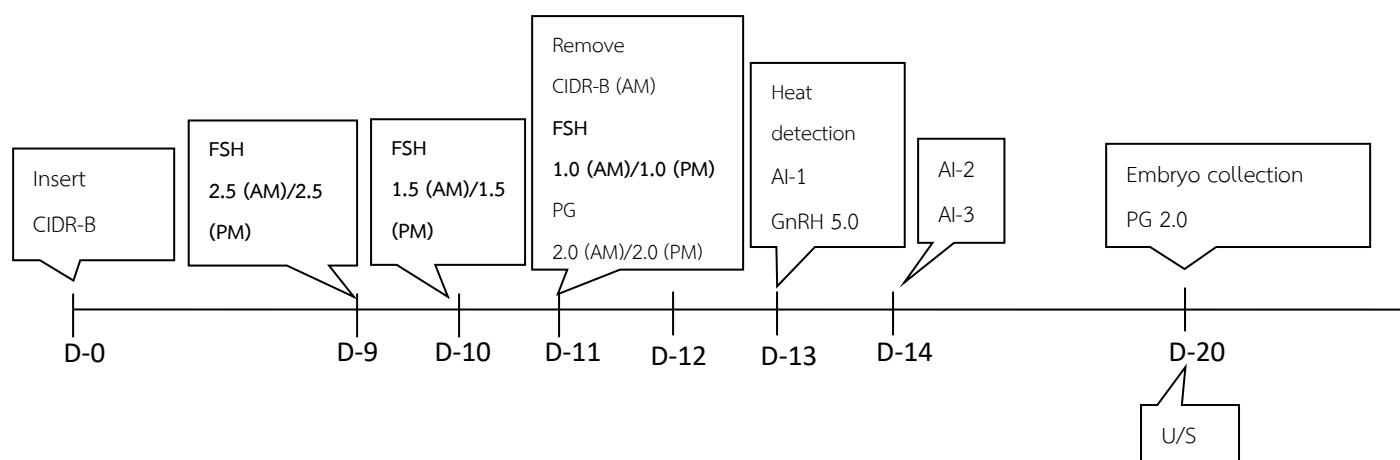


Figure 1. Synchronization and superovulation program for embryo collection in the control group.

- วันที่ 0 สอดฮอร์โมน CIDR-B® ทางช่องคลอด
- วันที่ 9 ฉีดฮอร์โมน FSH ทางกล้ามเนื้อ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (50 มิลลิกรัม) ช่วงเช้า (เวลา 6.00 น.) และช่วงเย็น (เวลา 18.00 น.)
- วันที่ 10 ฉีดฮอร์โมน FSH ทางกล้ามเนื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (30 มิลลิกรัม) ช่วงเช้า (เวลา 6.00 น.) และช่วงเย็น (เวลา 18.00 น.)
- วันที่ 11 ช่วงเช้า (เวลา 6.00 น.) ทำการถอด CIDR-B®, ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (20 มิลลิกรัม) และฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin; PG) (Estrumate®, Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัม) ทางกล้ามเนื้อ ช่วงเย็น (เวลา 18.00 น.) ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (20 มิลลิกรัม) และฮอร์โมน PG ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัม) ทางกล้ามเนื้อ
- วันที่ 13 ตรวจการเป็นสัดและยืนนิ่งของแม่โค โดยหากโคแสดงอาการเป็นสัด ให้ทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 ในช่วงเวลา 6-10 ชั่วโมงหลังโคแสดงอาการ และฉีดฮอร์โมน GnRH (Receptal®, MSD Animal Health, UK) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (20 ไมโครกรัม) ทางกล้ามเนื้อ
- วันที่ 14 ผสมเทียมครั้งที่ 2 โดยทำการผสมในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงหลังการผสมเทียมครั้งที่ 1 และผสมเทียมครั้งที่ 3 ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงหลังการผสมเทียมครั้งที่ 2

วันที่ 20 ล้างตรวจทางทวารหนักและอัลตราซาวด์เพื่อประเมินลักษณะและนับจำนวนของฟอลลิเคิลและ
คอปัสสุเทียมบนรังไข่ ล้างเก็บตัวอ่อนโค และฉีดฮอร์โมน PG ปริมาตร 2 มิลลิลิตรทางกล้ามเนื้อ

กลุ่มที่ 2: กลุ่มทดลอง

ใช้ฮอร์โมน FSH เพื่อกระตุ้นการตกไข่ในขนาดรวม 200 มิลลิกรัมละลายในสารละลายไฮยาลูโรแนน (sodium hyaluronate) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Bioniche Animal Health Inc., Canada) ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อจำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 36 ชั่วโมง ในวันที่ 9 และวันที่ 10 หลังจากให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแบบสอด โดยปริมาณฮอร์โมน FSH ที่ใช้จะลดปริมาณจากที่ใช้ในกลุ่มควบคุมในสัดส่วน 2/3 และ 1/3 คิดเป็น 6.6 และ 3.3 มิลลิลิตร (132 และ 67 มิลลิกรัม) ตามลำดับ ผสมในสารละลายไฮยาลูโรแนน 5% ปริมาณ 6.6 และ 3.3 มิลลิลิตรในอัตราส่วนปริมาณฮอร์โมน FSH 1 ส่วนต่อสารละลายไฮยาลูโรแนน 1 ส่วน โดยประยุกต์จากวิธีของ Tribulo et al. (2012) ดังแสดงใน Figure 2.

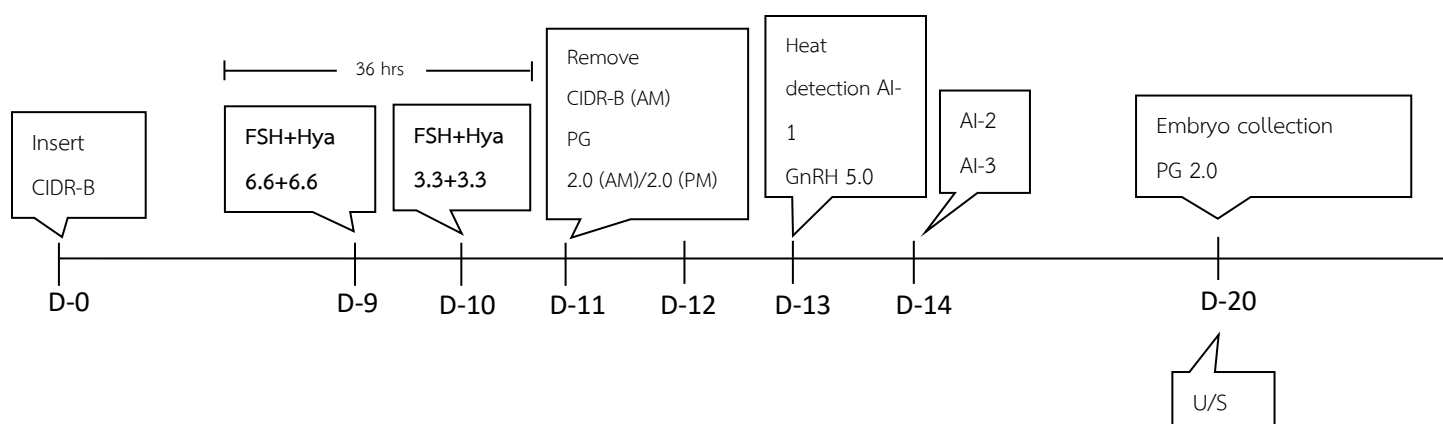


Figure 2. Synchronization and superovulation program for embryo collection in the treatment group.

วันที่ 0 สอดฮอร์โมน CIDR-B® ทางช่องคลอด

วันที่ 9 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาตร 6.6 มิลลิลิตร (132 มิลลิกรัม) ผสมในสารละลายไฮยาลูโรแนน ปริมาตร 6.6 มิลลิลิตร ช่วงเช้า (เวลา 6.00 น.) ทางกล้ามเนื้อ

วันที่ 10 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร (67 มิลลิกรัม) ผสมในสารละลายไฮยาลูโรแนน ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร ทางกล้ามเนื้อ โดยห่างจากเข็มที่ 1 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (เวลา 18.00 น.)

- วันที่ 11 ช่วงเช้า (เวลา 6.00 น.) ทำการถอด CIDR-B® และฉีดฮอร์โมน PG ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัม) ทางกล้ามเนื้อ ส่วนช่วงเย็น (เวลา 18.00 น.) ฉีดฮอร์โมน PG ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัม) ทางกล้ามเนื้อ
- วันที่ 13 ตรวจการเป็นสัดและยืนนิ่งของแม่โค โดยหากโคแสดงอาการเป็นสัด ให้ทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 ในช่วงเวลา 6-10 ชั่วโมงหลังโคแสดงอาการ และฉีดฮอร์โมน GnRH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (20 ไมโครกรัม) ทางกล้ามเนื้อ
- วันที่ 14 ผสมเทียมครั้งที่ 2 โดยทำการผสมในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงหลังการผสมเทียมครั้งที่ 1 และผสมเทียมครั้งที่ 3 ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงหลังการผสมเทียมครั้งที่ 2
- วันที่ 20 ล้วงตรวจทางทวารหนักและอัลตราซาวด์เพื่อประเมินลักษณะและนับจำนวนของฟอลลิเคิลและคอปัสสุเทียมบนรังไข่ ล้างเก็บตัวอ่อนโค และฉีดฮอร์โมน PG ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัม) ทางกล้ามเนื้อ

2. การประเมินรังไข่ด้วยการล้วงตรวจทางทวารหนักและอัลตราซาวด์

ทำการล้วงตรวจรังไข่ทั้ง 2 ข้างร่วมกับการอัลตราซาวด์ในวันที่ 20 หลังการสอดฮอร์โมน เพื่อนับจำนวนฟอลลิเคิลและจำนวนคอปัสสุเทียมบนรังไข่ทั้งด้านซ้ายและด้านขวา

3. การล้างเก็บตัวอ่อนและประเมินคุณภาพตัวอ่อน

ในวันที่ 20 ของการศึกษา ทำการล้างเก็บตัวอ่อนโดยใช้น้ำยาล้างตัวอ่อน (Vigro Complete Flush® Bioniche Animal Health, USA) ชะล้างตัวอ่อนออกจากปีกมดลูกทั้ง 2 ข้าง ข้างละ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ชุดสายยางสำหรับชะล้างตัวอ่อน (flushing set) ต่อกับท่อสวนตามวิธีของ Saito (1994) ปล่อยน้ำยาให้ไหลผ่านถ้วยกรองตัวอ่อน จากนั้นนำถ้วยกรองตัวอ่อนไปนับจำนวน ประเมินระยะของตัวอ่อนและจำแนกคุณภาพของตัวอ่อนด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (Lindner & Wright, 1983) โดยระยะของตัวอ่อนสามารถจำแนกออกได้เป็นระยะต่าง ๆ ได้แก่ ระยะ morula, early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst, degeneration และ unfertilized oocytes (UFO) โดยคำจำกัดความของตัวอ่อนอ้างอิงจาก Manual of the International Embryo Transfer Society ของแต่ละระยะมีดังนี้

- **Morula** เป็นระยะต้นของตัวอ่อนหลังจากการปฏิสนธิ โดยจะเป็นช่วงที่มีการแบ่งตัวของตัวอ่อนอย่างรวดเร็ว ประกอบด้วยเซลล์ (solid mass of cells) จำนวน 16 เซลล์หรือมากกว่าอยู่ภายในเซลล์ชั้น zona pellucida
- **Early blastocyst** เป็นระยะที่มีการเคลื่อนที่ของเซลล์ ทำให้เริ่มพบช่องว่างในตัวอ่อน (blastocoel) น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาตรตัวอ่อน
- **Blastocyst** เป็นระยะที่พบ blastocoel มากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาตรตัวอ่อน เริ่มพบการแยกส่วนระหว่างชั้น inner cell mass และ trophoblast
- **Expanded blastocyst** เป็นระยะที่ blastocoel มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่า 2 ระยะแรก ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น พบผนังชั้น zona pellucida บางลงครึ่งหนึ่งและมีการแยกส่วนของชั้น inner cell mass และ trophoblast ได้อย่างชัดเจน
- **Degeneration** เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการเสื่อมสลายของเซลล์มาก มีเซลล์ที่ยังเกาะแน่นกับเซลล์กลุ่มใหญ่ต่ำกว่าร้อยละ 40 หรือเป็นตัวอ่อนที่มีพัฒนาการช้ากว่าปกติและหยุดเจริญเติบโต ไม่สามารถนำไปย้ายฝากตัวอ่อนได้
- **Unfertilized oocyte (UFO)** เป็นระยะของตัวอ่อนที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ

โดยตัวอ่อนที่อยู่ในระยะ morula, early blastocyst, blastocyst และ expanded blastocyst จัดเป็นตัวอ่อนคุณภาพดีที่สามารถนำไปย้ายฝากตัวอ่อนหรือแช่แข็งเก็บเพื่อไว้ย้ายฝากในภายหลังได้ ดังนั้นตัวอ่อนที่อยู่ใน 4 ระยะดังกล่าวข้างต้น จะมีการประเมินคุณภาพของตัวอ่อน โดยแบ่งออกเป็นเกรด A, B และ C ตามเกณฑ์ในการประเมินคุณภาพตัวอ่อนอ้างอิงจาก Manual of the International Embryo Transfer Society และห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ดังนี้

- | | |
|--------|---|
| เกรด A | ตัวอ่อนคุณภาพดีมาก มีการพัฒนาการปกติ ลักษณะของเซลล์ตัวอ่อนหรือบลาสโตเมอร์ (blastomere) ต้องเป็นทรงกลมเกาะกันแน่น ไม่มีเซลล์แตก พบ cumulus ล้อมรอบเซลล์ไม่น้อยกว่า 2 ชั้น (cumulus-oocyte complexes) |
| เกรด B | ตัวอ่อนคุณภาพดี มีคุณภาพปกติ ลักษณะของตัวอ่อนเป็นทรงกลม มีบางเซลล์แยกออกจากเซลล์กลุ่มใหญ่คิดเป็นร้อยละ 10-20 ของเซลล์ทั้งหมด พบ cumulus ล้อมรอบเซลล์บางส่วน (partial cumulus cells) |

เกรด C ตัวอ่อนคุณภาพพอใช้ ตัวอ่อนมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีการแยกของเซลล์ออกจากเซลล์กลุ่มใหญ่ประมาณร้อยละ 30-40 ของเซลล์ทั้งหมด พบ denuded oocytes และไม่พบชั้น cumulus รอบเซลล์

4. การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลต่างๆ ของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ได้แก่ จำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ทั้งสองข้าง จำนวนคอปัสลูเทียมบนรังไข่ทั้งสองข้าง จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ทั้งหมด จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้จำแนกตามระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะ morula, early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst, degeneration และ UFO จำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งต่อไปได้ทั้งหมด และจำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากตัวอ่อนหรือแช่แข็งได้จำแนกตามคุณภาพของตัวอ่อน ได้แก่ เกรด A, B และ C ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±standard error; SE) ทดสอบการแจกแจงปกติ (normality test) ของข้อมูลทั้งหมดด้วยวิธี Shapiro-Wilk test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในข้อมูลที่มีการแจกแจงปกติ ด้วยวิธี Unpaired t-test ได้แก่ จำนวนคอปัสลูเทียมบนรังไข่ทั้งสองข้างและจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ทั้งหมด ส่วนข้อมูลที่ไม่มีการแจกแจงปกติ ได้แก่ จำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ทั้งสองข้างและจำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งได้ทั้งหมด จะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี Mann-Whitney U test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของร้อยละจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้จำแนกตามระยะต่างๆและร้อยละจำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากตัวอ่อนหรือแช่แข็งได้จำแนกตามคุณภาพของตัวอ่อนระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Two-way ANOVA และเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparisons test) ของตัวอ่อนในแต่ละระยะและในแต่ละเกรดระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Sidak method ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะพิจารณาเมื่อค่า $p < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษานี้ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลของการใช้ฮอร์โมน FSH ในการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโคเนื้อ โดยกลุ่มควบคุมใช้ฮอร์โมน FSH ขนาดรวมจำนวน 200 มิลลิกรัม ฉีดจำนวนทั้งสิ้น 6 ครั้ง ส่วนในกลุ่มทดลองใช้ฮอร์โมน FSH ขนาดรวมเท่ากับกลุ่มควบคุมผสมในสารละลายไฮยาโลโรแนนและทำการฉีดจำนวนทั้งสิ้น 2 ครั้ง ทำการประเมินผลการศึกษาด้านต่าง ๆ ดังนี้

จำนวนฟอลลิเคิลและจำนวนคอปัสสุเทียมบนรังไข่

หลังจากให้ฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการตกไข่หลายใบและเหนี่ยวนำการเป็นสัดในโคเนื้อ ทำการอัลตราซาวด์เพื่อตรวจนับปริมาณฟอลลิเคิลและคอปัสสุเทียมบนรังไข่ในโคทั้งสองกลุ่ม ผลการศึกษาพบว่าจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ทั้งสองข้างในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีปริมาณเฉลี่ย 5.71 ± 1.61 ใบต่อตัวและ 2.29 ± 1.04 ใบต่อตัวตามลำดับ โดยจำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ยในกลุ่มทดลองมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบจำนวนคอปัสสุเทียมเฉลี่ยบนรังไข่ทั้งสองด้านพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนคอปัสสุเทียมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง มีค่า 8.82 ± 1.66 และ 12.00 ± 1.61 ใบต่อตัวตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่มดังแสดงใน Figure 3. จากการศึกษาของ Tribulo et al. (2011) ได้ทำการศึกษานับจำนวนฟอลลิเคิลและคอปัสสุเทียมในโคเนื้อที่ได้รับฮอร์โมน FSH ขนาดรวม 400 มิลลิกรัม จำนวน 2 ครั้งต่อวันเข้าทางกล้ามเนื้อเป็นเวลา 4 วัน (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับโคเนื้อที่ได้รับฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาโลโรแนนขนาดรวม 400 มิลลิกรัม จำนวน 1 ครั้งเข้าทางกล้ามเนื้อ (กลุ่มทดลอง) พบว่าจำนวนฟอลลิเคิลของกลุ่มทดลองน้อยกว่าจำนวนฟอลลิเคิลในกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษานี้ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Thorne (2013) ที่ได้ทำการเปรียบเทียบจำนวนของคอปัสสุเทียมในโคตัวรับระหว่างกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน FSH ตามกระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบแบบปกติ (กลุ่มควบคุม) และในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาโลโรแนนในวันที่ 5 หลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัด (กลุ่มทดลอง) ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนคอปัสสุเทียมในกลุ่มควบคุมถึงแม้จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในโคนมของ Gutiérrez-Reinoso et al. (2022) ได้มีการเปรียบเทียบจำนวนฟอลลิเคิลและคอปัสสุเทียมบนรังไข่ในโคสาวพันธุ์โฮลสไตน์ที่ได้รับฮอร์โมน FSH แบบออกฤทธิ์ปกติ (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับโคที่ได้รับฮอร์โมน FSH ชนิดออกฤทธิ์นานแบบพิเศษ (extra-long-acting recombinant bovine FSH; bscrFSH) (กลุ่มทดลอง) พบว่าในวันที่ 15 หลังจากการสอด CIDR-B® จำนวนฟอลลิเคิลในกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่จำนวนคอปัสสุเทียมในกลุ่มทดลองมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

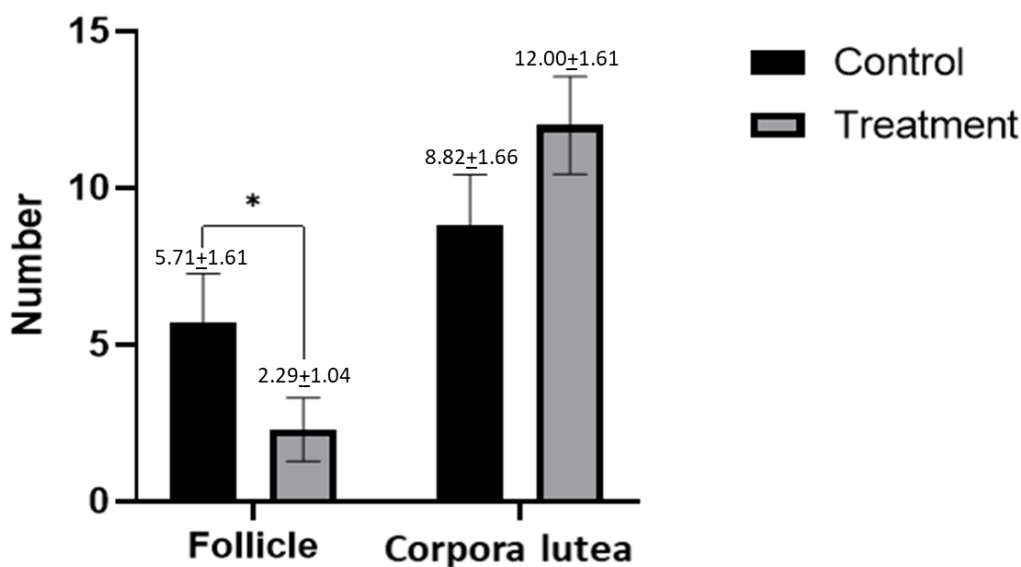


Figure 3. Bar graph represents the number of detected follicles and corpora lutea of control and treatment groups. Asterisk (*) indicates statistical significance at $p < 0.05$.

ตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้และการประเมินระยะของตัวอ่อน

หลังจากทำการชะล้างตัวอ่อนออกมาจากโพรงมดลูกของแม่โค ตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ทั้งหมดจะถูกเคลื่อนย้ายมายังห้องปฏิบัติการเพื่อนับจำนวนและประเมินระยะของตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้จากแม่โคทั้งสองกลุ่ม พบว่าจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ในกลุ่มควบคุมมีจำนวนรวมทั้งสิ้น 87 ใบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 5.12 ± 1.25 ใบต่อตัว ส่วนจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ในกลุ่มทดลองมีจำนวนรวมทั้งสิ้น 127 ใบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 7.47 ± 1.78 ใบต่อตัว ซึ่งจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น กระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนนสามารถให้จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ไม่แตกต่างจากวิธีการใช้ฮอร์โมน FSH แบบปกติที่ใช้ในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มการได้จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้มากขึ้นในกลุ่มทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าซึ่งพบว่าการใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณรวม 200 มิลลิกรัมในสารละลายไฮยาลูโรแนน 0.5% จำนวน 1 ครั้งต่อวัน สามารถให้จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ มากกว่ากลุ่มควบคุม ที่ได้รับฮอร์โมน FSH ปริมาณรวม 200 มิลลิกรัมจำนวน 2 ครั้งต่อวัน (4.70 ± 0.70 ใบและ 3.70 ± 0.70 ใบตามลำดับ) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Vieira et al., 2016)

นอกจากนี้ ตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ทั้งหมดจะนำมาประเมินระยะและนับจำนวนของตัวอ่อนจำแนกตามระยะต่างๆ เพื่อคัดกรองตัวอ่อนที่อยู่ในระยะที่เหมาะสมในการนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งเก็บไว้ต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการคัดทิ้งตัวอ่อนที่อยู่ในระยะที่ไม่เหมาะสมหรือตัวอ่อนที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิอีกด้วย ผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบตัวอ่อนในทุกระยะ โดยตัวอ่อนที่อยู่ในระยะ morula มีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 2.30 ± 0.33 ในกลุ่มควบคุมและ 4.72 ± 0.61 ในกลุ่มทดลองตามลำดับ ส่วนตัวอ่อนที่อยู่ในระยะ early blastocyst และ blastocyst มีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 32.18 ± 2.57 และ 19.54 ± 1.27 ในกลุ่มควบคุม และคิดเป็นร้อยละ 11.81 ± 1.32 และ 29.13 ± 2.96 ในกลุ่มทดลองตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อประเมินตัวอ่อนในระยะ expanded blastocyst พบว่า ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีจำนวนตัวอ่อนคิดเป็นร้อยละ 1.15 ± 0.24 และ 0.79 ± 0.24 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนในระยะ degeneration และ UFO ซึ่งเป็นตัวอ่อนที่ไม่มีคุณภาพเพียงพอในการนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งเก็บไว้ได้ มีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 9.20 ± 0.62 และ 18.29 ± 2.19 ในกลุ่มควบคุมและมีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 24.41 ± 1.98 และ 23.62 ± 2.84 ในกลุ่มทดลองตามลำดับ โดยร้อยละของตัวอ่อนในระยะ blastocyst และ degeneration ในกลุ่มทดลองมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนร้อยละตัวอ่อนในระยะ early blastocyst ในกลุ่มควบคุมมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Figure 4.

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนนมีแนวโน้มในการเพิ่มจำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ทั้งหมดให้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอ่อนที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของตัวอ่อนในระยะ degeneration ในกลุ่มทดลองด้วยเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นตัวอ่อนที่ไม่มีคุณภาพและไม่สามารถนำไปแช่แข็งหรือย้ายฝากต่อไปได้ จากรายงานของ Stroud and Hasler (2006) กล่าวว่า การกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยการใช้ฮอร์โมนในกลุ่ม gonadotropins จากภายนอก (exogenous gonadotropins) นั้น ถือเป็นวิธีการที่ไม่เป็นไปตามธรรมชาติ ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการเจริญและตกไข่ของฟอลลิเคิลจำนวนมาก ส่งผลให้มีโอกาสพบการฝ่อลง (atresia) หรือการเสื่อม (degeneration) ของฟอลลิเคิลเพิ่มขึ้นได้ ทำให้ฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นมีความไม่สมบูรณ์ ซึ่งแตกต่างจากสภาวะปกติที่มีการตกไข่เพียงใบเดียวต่อ 1 รอบการเป็นสัดเท่านั้น ดังนั้น ตัวอ่อนที่ได้จึงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำและมีโอกาสเกิดตัวอ่อนที่ไม่มีคุณภาพสูง โดยพบว่าประมาณ 20% ของแม่ตัวให้ที่ได้รับการกระตุ้นการตกไข่หลายใบจะมีโอกาสให้ตัวอ่อนที่ไม่มีชีวิตสูงขึ้นทั้งในกลุ่มโคสายพันธุ์ยุโรป (*Bos taurus*) (Lerner et al., 1986) และโคสายพันธุ์อินเดีย (*Bos indicus*) (Baruselli et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะใช้ปริมาณฮอร์โมน FSH รวมทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในปริมาณเท่ากันในการศึกษานี้ แต่ปริมาณฮอร์โมน FSH ที่ให้ในครั้งแรกของกลุ่มทดลอง (132 มิลลิกรัม) จะมีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุม (50 มิลลิกรัม) กล่าวคือมีปริมาณมากกว่าปกติประมาณ 3 เท่า ส่งผลให้ระดับของ

ฮอร์โมน FSH ในช่วงแรกของกลุ่มทดลองอยู่ในระดับที่สูงมากจากการศึกษาของ Ali et al. (2012) ได้ทำการเปรียบเทียบคุณภาพของตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้จากเมโคตัวให้ที่ได้รับฮอร์โมน FSH ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในกระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ พบว่าเมื่อโคได้รับฮอร์โมน FSH ในปริมาณสูงขึ้น จะมีโอกาสพบตัวอ่อนในระยะ degeneration จำนวนมากขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ จากการศึกษาในมนุษย์พบว่า ปริมาณของฮอร์โมน FSH ที่ได้รับในปริมาณสูง (มากกว่า 200 IU) ในช่วงต้นของกระบวนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบเพื่อทำ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) มีผลทำให้คุณภาพของโอโอไซด์ลดลงเช่นเดียวกัน (Luo et al., 2022) ส่งผลให้ตัวอ่อนที่พบในกลุ่มทดลองของการศึกษานี้มีแนวโน้มอยู่ในระยะ degeneration มากยิ่งขึ้น

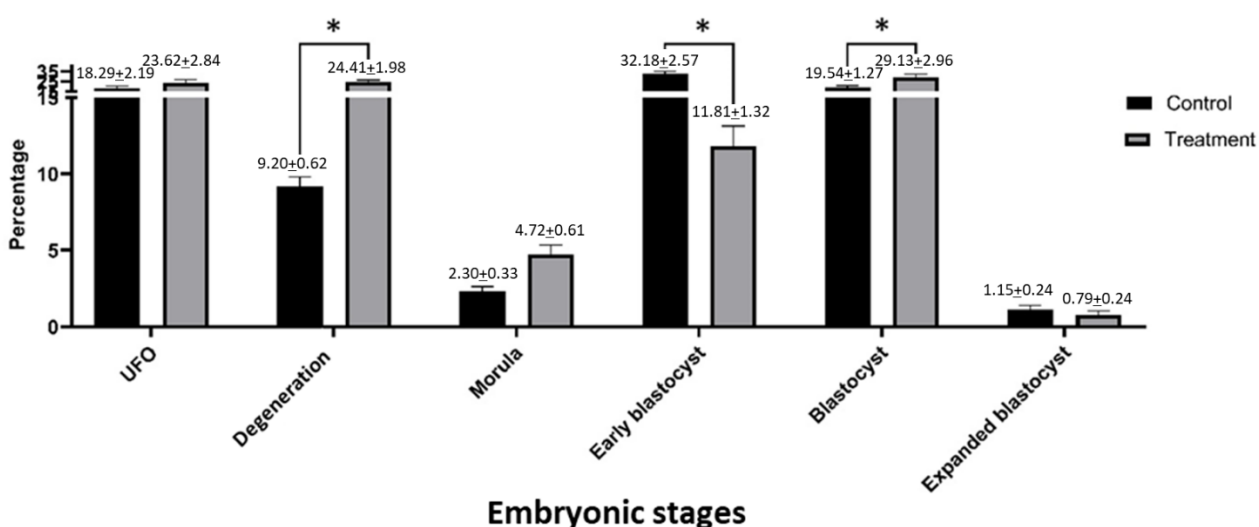


Figure 4. Bar graph shows the percentage of collected embryos at each stage of the control and treatment groups. Asterisk (*) indicates statistical significance at $p<0.05$.

ตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากต่อหรือแช่แข็งเก็บไว้ได้และการประเมินคุณภาพของตัวอ่อน

ในกรณีที่ได้อตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้อยู่ในระยะที่เหมาะสม จะมีการประเมินคุณภาพตัวอ่อนจำแนกตามเกรด และคัดเลือกตัวอ่อนเหล่านั้นมาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป โดยหากมีการเตรียมตัวแม่ตัวรับไว้เรียบร้อยแล้ว จะทำการคัดเลือกตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีเพื่อนำไปย้ายฝากในแม่ตัวรับต่อไปทันที อย่างไรก็ตาม หากตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้มีปริมาณมากเกินไปกว่าแม่ตัวรับที่เตรียมไว้ หรือไม่ได้มีการเตรียมแม่ตัวรับไว้ในวันที่ล้างเก็บตัวอ่อน ตัวอ่อนดังกล่าวจะถูกนำไปแช่แข็งและเก็บรักษาไว้เพื่อใช้ย้ายฝากสู่แม่โคในภายหลังต่อไป ซึ่งตัวอ่อนที่สามารถนำไปแช่แข็งหรือนำไปใช้ย้ายฝากได้นั้น จะต้องเป็นตัวอ่อนที่อยู่ในระยะ morula, early blastocyst, blastocyst และ expanded blastocyst เท่านั้น โดยจากการศึกษานี้พบว่าจำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปแช่แข็งหรือนำไปใช้ย้ายฝากได้มี

จำนวนรวมทั้งสิ้น 48 ใบในกลุ่มควบคุม คิดเป็นค่าเฉลี่ย 2.82 ± 0.83 ใบต่อตัว ส่วนในกลุ่มทดลองได้จำนวนตัวอ่อนทั้งสิ้น 59 ใบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 3.47 ± 1.02 ใบต่อตัว ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าโคในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ในสารละลายไฮยาโลโรแนนได้จำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปแช่แข็งหรือนำไปใช้ย้ายฝากไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tribulo et al. (2012) ที่ได้ทำการศึกษาผลของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโคเนื้อโดยให้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 400 มิลลิกรัมวันละ 2 ครั้งเข้าทางกล้ามเนื้อเป็นเวลา 4 วัน (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับกลุ่มโคที่ให้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 400 มิลลิกรัมในสารละลายไฮยาโลโรแนนจำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 48 ชั่วโมง (กลุ่มทดลอง) ผลการศึกษาพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากได้ แม้ว่าจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (3.70 ± 1.30 ใบและ 2.50 ± 0.80 ใบตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Biancucci et al. (2016) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโค โดยเปรียบเทียบจำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากและจำนวนตัวอ่อนที่สามารถแช่แข็งได้ในกลุ่มควบคุมที่ใช้ฮอร์โมน FSH แบบโปรแกรมปกติ โดยให้ฮอร์โมนรวมทั้งสิ้น 8 ครั้ง แบ่งฉีดวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 4 วันและกลุ่มทดลองที่ใช้ฮอร์โมน FSH ละลายในสารละลายไฮยาโลโรแนน ทำการฉีดจำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า จำนวนตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากและจำนวนตัวอ่อนที่สามารถแช่แข็งได้ในกลุ่มทดลอง (9.60 ± 1.40 ใบและ 9.60 ± 1.40 ใบตามลำดับ) มีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม (6.60 ± 1.00 ใบและ 6.00 ± 1.00 ใบตามลำดับ) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งต่อได้ดังแสดงไว้ใน Table 1. ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีในแต่ละระยะจะถูกนำมาจำแนกคุณภาพตามเกรดของตัวอ่อนเป็น 3 ระดับ ได้แก่ เกรด A, B และ C เรียงตามคุณภาพของตัวอ่อนจากมีคุณภาพมากไปยังมีคุณภาพน้อย เมื่อคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนทั้งหมดที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งได้ พบว่าตัวอ่อนในระยะ morula ในกลุ่มควบคุม อยู่ในเกรด B ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 4.17 ± 0.33 ในขณะที่กลุ่มทดลองพบตัวอ่อนระยะ morula เกรด A และเกรด B คิดเป็นร้อยละ 1.69 ± 0.24 และ 8.47 ± 0.59 ตามลำดับ ส่วนตัวอ่อนระยะ early blastocyst ในกลุ่มควบคุม พบตัวอ่อนเกรด A, B และ C คิดเป็นร้อยละ 4.17 ± 0.33 , 50.00 ± 2.24 และ 4.17 ± 0.49 ตามลำดับ และในกลุ่มทดลองพบตัวอ่อนเฉพาะในเกรด A และ B คิดเป็นร้อยละ 6.78 ± 0.56 และ 18.64 ± 1.32 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตัวอ่อนในระยะ blastocyst ในกลุ่มควบคุม พบตัวอ่อนในเกรด A และ B คิดเป็นร้อยละ 12.50 ± 0.70 และ 22.92 ± 1.06 ตามลำดับ และในกลุ่มทดลองพบตัวอ่อนในเกรด A, B และ C คิดเป็นร้อยละ 15.25 ± 0.87 , 45.76 ± 2.53 และ 1.69 ± 0.24 ตามลำดับ ส่วนตัวอ่อนในระยะ expanded blastocyst พบเฉพาะตัวอ่อนที่อยู่ในเกรด A ในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มทดลองคิดเป็นร้อยละ 2.08 ± 0.24 และ 1.69 ± 0.24 ตามลำดับ โดยร้อยละจำนวนตัวอ่อนใน

ระยะ morula เกรด B และระยะ blastocyst เกรด B ในกลุ่มทดลองมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ร้อยละจำนวนตัวอ่อนในระยะ early blastocyst เกรด B ของกลุ่มทดลองมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 1. The percentage of transferable or freezable embryos, categorized by the stage and grading for the control and treatment groups.

Embryonic stages and grading	Percentage of transferrable or freezable embryos (mean $\pm$ SE)	
	Control group	Treatment group
Morula		
Grade A	-	1.69 $\pm$ 0.24
Grade B	4.17 $\pm$ 0.33 ^b	8.47 $\pm$ 0.59 ^a
Grade C	-	-
Early blastocyst		
Grade A	4.17 $\pm$ 0.33	6.78 $\pm$ 0.56
Grade B	50.00 $\pm$ 2.24 ^a	18.64 $\pm$ 1.32 ^b
Grade C	4.17 $\pm$ 0.49	-
Blastocyst		
Grade A	12.50 $\pm$ 0.70	15.25 $\pm$ 0.87
Grade B	22.92 $\pm$ 1.06 ^b	45.76 $\pm$ 2.53 ^a
Grade C	-	1.69 $\pm$ 0.24
Expanded blastocyst		
Grade A	2.08 $\pm$ 0.24	1.69 $\pm$ 0.24
Grade B	-	-
Grade C	-	-

^{a,b} indicate the statistical significance at $p<0.05$ between two groups.

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งได้ ในกลุ่มควบคุมจะพบตัวอ่อนในระยะ early blastocyst จำนวนมากที่สุดโดยพบเป็นเกรด B มากที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง ส่วนในกลุ่มทดลองพบว่าตัวอ่อนที่ได้มากที่สุดจะเป็นตัวอ่อนในระยะ blastocyst โดยพบเป็นเกรด B มากที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน ดังนั้น เมื่อคัดทิ้งตัวอ่อนที่ไม่มีคุณภาพออกไปแล้ว (ตัวอ่อนในระยะ degeneration และ UFO) จะเห็นได้ว่าการกระตุ้นการตกไข่ทั้งสองวิธีสามารถให้จำนวนตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีเพื่อนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งต่อไปได้ไม่แตกต่างกัน จึงสามารถพิจารณาใช้วิธีการกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนนเข้ามาทดแทนวิธีการแบบเดิมได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาในเชิงปัจจัยทางเศรษฐกิจร่วมด้วย โดยคำนวณจากต้นทุนการผลิตตัวอ่อนเปรียบเทียบกับจำนวนของตัวอ่อนคุณภาพดีที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งเก็บไว้ได้ของทั้งสองวิธีพบว่า การผลิตตัวอ่อนโดยใช้วิธีการกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยการใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนน โคแต่ละตัวในกลุ่มทดลองจะมีต้นทุนเพิ่มขึ้นจากการใช้สารละลายไฮยาลูโรแนนเพื่อนำมาใช้ในการทำละลายฮอร์โมน FSH โดยในการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโค 1 ตัวจะต้องใช้สารละลายไฮยาลูโรแนนปริมาณรวมทั้งสิ้น 9.9 มิลลิลิตรต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ 1 ครั้ง คิดเป็นต้นทุนที่ต้องจ่ายเพิ่มจากวิธีการเดิมครั้งละ 3,500 บาท ซึ่งเมื่ออ้างอิงจำนวนตัวอ่อนที่มีคุณภาพที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า การกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยใช้สารละลายไฮยาลูโรแนนจะสามารถเพิ่มจำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีได้คิดเป็นค่าเฉลี่ย 0.65 ใบต่อโค 1 ตัวเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเดิม ดังนั้น เมื่อคำนวณจากรายได้ที่ได้เพิ่มขึ้นจากการได้ตัวอ่อนคุณภาพดีเพิ่มขึ้นหักลบกับต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้นแล้ว เกษตรกรจะยังคงได้กำไรเพิ่มขึ้นจากการจำหน่ายตัวอ่อนคิดเป็นเงินประมาณ 6,250 บาทต่อตัวอ่อน 1 ใบ (คำนวณจากราคาจำหน่ายตัวอ่อนโค 1 ใบมีมูลค่าประมาณ 15,000 บาทและต้นทุนการผลิตตัวอ่อนโคด้วยวิธีปกติมีมูลค่าประมาณ 6,200 บาทต่อตัวอ่อนโค 1 ใบ) นอกจากนี้ หากเปรียบเทียบในมุมมองของจำนวนครั้งในการจับบังคับสัตว์ที่ลดลง การลดความเครียดของสัตว์ที่เกิดจากการจับบังคับ การประหยัดเวลาและประหยัดแรงงานประกอบด้วยแล้ว พบว่าการกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยใช้ฮอร์โมน FSH ร่วมกับสารละลายไฮยาลูโรแนน ยังเป็นวิธีที่มีความสะดวกมากกว่าวิธีปกติ วิธีนี้นี้จึงเป็นทางเลือกที่มีความเหมาะสมต่อเกษตรกรในกรณีที่ค่าจ้างแรงงานมีราคาสูง มีแรงงานจำกัดหรือในกรณีที่โคจับบังคับได้ยาก โดยสารละลายไฮยาลูโรแนนแม้จะอยู่ในกลุ่มสารที่มีความขื่นหนืด แต่สามารถผสมให้เข้ากันกับฮอร์โมน FSH ได้ไม่ยากนัก ทำให้ใช้เวลาไม่นานในการเตรียมฮอร์โมน อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งที่มีการบริหารยาควรมีการเช็ดทำความสะอาดผิวหนังด้วยแอลกอฮอล์ให้เรียบร้อยก่อน และเมื่อทำการบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโคแล้วควรมีการนวดคลึงบริเวณจุดที่ฉีดเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของฮอร์โมนและลดโอกาสการเกิดก้อนไขมันขึ้นในภายหลัง การศึกษานี้จึงเป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อช่วยปรับปรุง พัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยมุ่งหวังให้การ

ผลิตโคเนื้อในประเทศไทยด้วยการย้ายฝากตัวอ่อนมีความยั่งยืน มีผลผลิตอย่างต่อเนื่องและสามารถกระจายพันธุ์กรรมโคเนื้อที่ดีได้เป็นวงกว้างให้แก่เกษตรกรต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนนเพื่อกระตุ้นการตกไข่หลายใบในการผลิตตัวอ่อนโค มีผลให้จำนวนฟอลลิเคิลน้อยกว่าการใช้ฮอร์โมน FSH แบบปกติ แต่ให้จำนวนตัวอ่อนที่ล้างเก็บได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบตัวอ่อนในระยะ blastocyst และ degeneration มากกว่าการใช้ฮอร์โมน FSH แบบปกติ ในขณะที่ตัวอ่อนคุณภาพดีที่สามารถนำไปย้ายฝากหรือแช่แข็งได้มีจำนวนไม่แตกต่างกัน

ดังนั้น การใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนนจึงเป็นทางเลือกที่มีความน่าสนใจและสามารถทดแทนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบวิธีเดิมได้โดยให้ผลลัพธ์ไม่แตกต่างกัน โดยวิธีนี้ช่วยให้ใช้แรงงานในการจับบังคับโคลดลง ประหยัดเวลาในการทำงาน ลดจำนวนครั้งในการบริหารยาและช่วยลดความเครียดของโคลงได้ ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตและย้ายฝากตัวอ่อนในประเทศไทยให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมน FSH ในกระแสเลือดโคเพิ่มเติมในช่วงก่อนและหลังการได้รับฮอร์โมนในโคแต่ละตัว เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการบ่งชี้ถึงความสามารถในการคงระดับปริมาณฮอร์โมนของสารละลายไฮยาลูโรแนน นอกจากนี้ เพื่อเป็นการลดปัจจัยความแปรปรวนภายในของสัตว์แต่ละตัว ควรทำการศึกษาทั้งสองวิธีในโคตัวเดียวกันโดยเก็บข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างก่อนและภายหลังจากการกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยวิธีปกติและการกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยใช้ฮอร์โมน FSH ในสารละลายไฮยาลูโรแนน เพื่อให้ทราบถึงจำนวนตั้งต้นของฟอลลิเคิล คอปีสลุเทียมและความสามารถในการผลิตตัวอ่อนที่มีของแต่ละตัว ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อสามารถประเมินผลของการศึกษาต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบได้อย่างครอบคลุมมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ หากสามารถเพิ่มจำนวนประชากรที่นำมาใช้ในการศึกษาได้มากขึ้นโดยเลือกใช้กลุ่มประชากรที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน จะช่วยให้ผลการทดลองมีความชัดเจนและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์ สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมาและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และสัตว์ทดลอง ตลอดจนช่วยอำนวยความสะดวกตลอดช่วงระยะเวลาการทำวิจัย ทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- สุวิข บัญโปรง. 2558. คู่มือการเลี้ยงโคเนื้อสำหรับเกษตรกรไทย. โรงพิมพ์รุ่งธนเกียรติ, กรมปศุสัตว์, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2556. คู่มือปฏิบัติงานกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค, กรมปศุสัตว์, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- Ali, M., S., M.A.M.Y. Khandoker, M.A., Afroz and A.K.F.H. Bhuiyan. 2012. Ovarian response to different dose levels of follicle stimulating hormone (FSH) in different genotypes of Bangladeshi cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 25(1): 52.
- Baruselli, P.S., M. F. de Sá Filho, C.M. Martins, L.F. Nasser, M.F. Nogueira, C.M. Barros and G.A. Bó. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology. 65(1): 77-88.
- Biancucci, A., T. Sbaragli, A. Comin, L. Sylla, M. Monaci, T. Peric and G. Stradaoli. 2016. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol?. Theriogenology. 85(5): 914-921.
- Demoustier, M.M., J.F. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J.L. Gillard and F.R. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. Theriogenology. 30(2): 379-386.

- Fernandez-Novo, A., S.S. Pérez-Garnelo, A. Villagrà, N. Pérez-Villalobos and S. Astiz. 2020. The Effect of Stress on Reproduction and Reproductive Technologies in Beef Cattle-A Review. *Animals*. 10(11): 2096.
- Gutiérrez-Reinoso, M.A., C.J. Aguilera, F. Navarrete, J. Cabezas, F.O. Castro, I. Cabezas, O. Sánchez, M. García-Herreros and L. Rodríguez-Alvarez. 2022. Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation. *Animals*. 12(2): 153.
- Hasler, J.F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal reproduction science*. 79(3-4): 245-264.
- Lerner, S.P., W.V. Thayne, R.D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E.K. Inskeep, R.A. Daily and R.L. Butcher. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *Journal of animal science*. 63(1): 176-183.
- Lindner, G.M. and R.W. Wright Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20(4): 407-416.
- Luo, X., L. Pei, Y. He, F. Li, W. Han, S. Xiong, S. Han, J. Li, X. Zhang, G. Huang and H. Ye. 2022. High initial FSH dosage reduces the number of available cleavage-stage embryos in a GnRH-antagonist protocol: Real-world data of 8,772 IVF cycles from China. *Frontiers in Endocrinology*. 13: 1-10.
- Mapletoft, R.J. and G.A. Bó. 2014. Superovulation in cattle, pp. 696-702. In R.M. Hopper, ed. *Bovine Reproduction*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Millar, R.P. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Animal reproduction science*. 88(1): 5-28.
- Monniaux, D., D. Chupin and J. Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19(1): 55-81.
- Murphy, B.D. and S.D. Martinuk. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine reviews*. 12(1): 27-44.

- Saito, N. 1994. Manual of embryo transfer and in vitro fertilization in cattle. National livestock Breeding Center, Fukushima.
- Stoebel, D.P. and G.P. Moberg. 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 65(1): 92-96.
- Stroud, B. and J.F. Hasler. 2006. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*. 65(1): 65-76.
- Thorne, J. W. 2013. Fertility of beef recipients following a fixed-time embryo transfer protocol that includes follicle stimulating hormone diluted in hyaluronan. M.S. thesis, Texas A&M University.
- Tribulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R.V. Alasino, D. Beltramo, I. Bianco, R.J. Mapletoft, and G.A. Bó. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci*. 129(2): 7-13.
- Tribulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R.J. Mapletoft and G.A. Bó. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*. 77(8): 1679-1685.
- Vieira, L.M., C.A. Rodrigues, A.C. Netto, B.M. Guerreiro, C.R.A. Silveira, B.G. Freitas, L.G.M. Bragança, K.N.G. Marques, M.F. Sá Filho, G.A. Bó, R.J. Mapletoft and P.S. Baruselli. 2016. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*. 85(5): 877-886.
- Yavas, Y., W.H. Johnson and J.S. Walton. 1999. Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone, and the induction of ovulation using hCG in postpartum beef cows. *Theriogenology*. 52(6): 949-63.

ผลของความแตกต่างระหว่างวิธีการทำละลายน้ำเชื้อโคในอุณหภูมิที่ต่างกันต่อลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์สุจิโค

สุจิรา ธรรมวัง^{1/} วิษยาณี ภูมิพิทักษ์กุล^{2/} นิติรัฐ ถียัง^{3/} มุขสุดา เรืองศรี^{4/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำละลายที่อุณหภูมิต่างๆ และประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ทำการบ่มไว้หลังการทำละลายในระยะเวลาที่ต่างกัน โดยวิเคราะห์อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง ทำการศึกษาโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของโคพ่อพันธุ์จำนวนทั้งสิ้น 240 หลอด แบ่งตัวอย่างน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มตามอุณหภูมิที่ใช้ในการทำละลาย ได้แก่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาทีตามลำดับ นอกจากนี้ นำน้ำเชื้อหลังการทำละลายของแต่ละกลุ่มไปบ่มเป็นระยะเวลา 0, 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที วิเคราะห์คุณภาพของน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA และศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE นอกจากนี้ ทำการศึกษาการปรากฏและระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 ด้วยเทคนิค Gelatin zymography ผลการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อที่ทำละลายอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีร้อยละ motility และร้อยละ ALH สูงกว่ากลุ่มที่ทำละลายน้ำเชื้อในอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ($p < 0.05$) นอกจากนี้ การบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายแล้วเป็นระยะเวลามากกว่า 60 นาทีเป็นต้นไป จะส่งผลให้การเคลื่อนที่ ได้แก่ ร้อยละ motility ร้อยละ progressive motility และความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ได้แก่ ร้อยละ VAP ร้อยละ VCL และร้อยละ VSL ลดลง ($p < 0.05$) ในส่วนรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน พบการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญในโปรตีนขนาด 135 kDa ในทุกกลุ่ม ($p < 0.05$) โดยพบการลดลงของโปรตีนขนาดดังกล่าวเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อมากกว่า 30 นาทีเป็นต้นไป ซึ่งในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนขนาด 48 kDa อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติร่วมด้วย ($p < 0.05$) โดยพบการลดลงของระดับโปรตีนเมื่อเวลาบ่มน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งการปรากฏของแถบโปรตีนดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีน MMP-1 ที่พบได้ในน้ำเชื้อ ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูการปรากฏของโปรตีน MMP-1 ในน้ำเชื้อที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพบว่าการลดลงของระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อระยะเวลาในการบ่มมากกว่า 30 นาทีเป็นต้นไป ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการระบุอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโค และนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายชีวภาพเพื่อใช้ในการบ่งชี้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไปในอนาคตเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคในประเทศไทยได้อย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง การแสดงออกของโปรตีนในน้ำเชื้อ คุณภาพน้ำเชื้อ

เลขทะเบียนวิชาการ: 67(2)-0208-034

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ.แก่งคอย จ.สระบุรี

^{2/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{3/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

^{4/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

Effect of different thawing methods on semen characteristics and protein expression profile of bull

Sujira Thammawang^{1/} Vichayanee Pumpitakkul^{2/} Nitirath Theeyoung^{3/} Muksuda Ruangkree^{4/}

Abstract

This study aims to compare the quality of bull frozen semen after thawing at different temperatures and to evaluate the quality of post-thawed semen at various incubation time points by analyzing the sperm motility rate and protein expression patterns that change over incubation times. The study utilized a total of 240 bull frozen semen samples, divided into three groups thawed at temperatures of 30, 37, and 45°C for 30 seconds each. Additionally, post-thawed semen from each group was incubated for 0, 10, 30, 60, 90, and 120 minutes. The quality of semen was analyzed using CASA machine and the protein expression patterns were studied using SDS-PAGE technique. Furthermore, the study examined the intensity level of MMP-1 proteins using gelatin zymography. The results revealed that semen thawed at 45°C exhibited significantly higher percentages of motility and ALH compared to the groups thawed at 30 and 37 °C ($p < 0.05$). Moreover, incubating the post-thawed semen for more than 60 minutes resulted in a significant decrease in the percentages of motility, progressive motility, VAP, VCL and VSL ($p < 0.05$). Significant changes were observed in the protein expression patterns, particularly in a protein with a size of a 135 kDa protein in all groups ($p < 0.05$). Furthermore, a statistically significant decrease in a protein with a size of 48 kDa was observed when the incubation time exceeded 30 minutes, especially in the group thawed at 45°C ($p < 0.05$). The appearance of this protein band was similar in size to the MMP-1 proteins found in semen. Further investigation revealed a significant decrease in MMP-1 protein levels in post-thawed semen thawed at 45°C after an incubation period exceeding 30 minutes ($p < 0.05$). Thus, this study is highly beneficial in determining the appropriate temperature and duration for thawing frozen bull semen, leading to the development of biological markers to indicate the quality of frozen semen, thereby enhancing the breeding efficiency of cattle in Thailand in the future.

Keyword: semen thawing method, protein expression, semen quality

เลขทะเบียนวิชาการ: 67(2)-0208-034

^{1/}Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Kangkoi, Saraburi.

^{2/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang Pathum Thani, Pathum Tani.

^{3/}Chiangmai Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang Chiangmai, Chiangmai.

^{4/}Ratchaburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Photharam, Ratchaburi.

คำนำ

การผสมเทียมโคโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง (Semen cryopreservation) ถือเป็นวิธีการขยายพันธุ์ปรับปรุงพันธุ์ในที่ได้รับการนิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากวิธีการดังกล่าวช่วยให้สามารถเก็บน้ำเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน ลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและการเลี้ยงพ่อพันธุ์ และช่วยลดความเสี่ยงในการกระจายของโรคติดต่อจากพ่อพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตาม น้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งจะมีคุณภาพของน้ำเชื้อลดลง โดยพบรูปร่างของอสุจิ (Sperm morphology) ที่เปลี่ยนแปลงไป มีการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Sperm motility) ที่ลดลง พบการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated phospholipids) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากของเหลว (liquid phase) ไปสู่สถานะที่มีความหนืดข้นมากขึ้น (Gel phase) และพบว่าสารพันธุกรรมในเซลล์อสุจิถูกทำลาย (DNA damage) ส่งผลให้อัตราการอยู่รอดของอสุจิ (Survival rate) ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 20-50 (Amidi et al., 2016; de Paula et al., 2006; Shahzad et al., 2016) นอกจากนี้ การที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่มีองค์ประกอบของ Unsaturated phospholipids เป็นจำนวนมากนั้น ส่งผลให้ตัวอสุจิมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในไขมัน (Lipid peroxidation) ซึ่งก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (Oxidative stress) ขึ้นในเซลล์อสุจิในช่วงกระบวนการแช่แข็งและการทำละลาย (Holt, 2000) ทั้งนี้ แม้ว่าการประสบความสำเร็จในการผสมเทียมโคจะขึ้นกับหลากหลายปัจจัยรวม ได้แก่ สุขภาพของแม่โค โรคทางระบบสืบพันธุ์ การจับสัด (Heat detection) และเทคนิคการผสมเทียมที่มีความถูกต้องและผสมในช่วงเวลาที่เหมาะสม การเลือกใช้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีและมีขั้นตอนการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเหมาะสมถือเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งที่ส่งผลต่ออัตราการผสมติดและตั้งท้อง โดยกระบวนการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นมีผลโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลาย เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) ของอสุจิ อะโครโซม (Acrosome) และไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) มีความไวต่อการแช่แข็งและการทำละลายเป็นอย่างมาก (Yilmaz et al., 2020) ซึ่งการทำละลายน้ำเชื้อในช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมถือเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญที่สามารถช่วยลดกระบวนการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Water recrystallization) ที่เป็นอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาสซึมของอสุจิ ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตหลังละลายดีขึ้น (Correa et al., 1996) การศึกษาก่อนหน้าในสหรัฐอเมริการายงานว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำละลายน้ำเชื้อโคควรอยู่ในช่วง 35-38 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 30 วินาที (Senger et al., 1980) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาจากประเทศเยอรมนี ที่ระบุว่าการทำละลายน้ำเชื้อควรทำในช่วงอุณหภูมิ 37.5-38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 วินาที (Koch et al., 2022) และการใช้อุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อมากกว่า 38 องศาเซลเซียส จะส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อจากความร้อนที่สูงเกินไป (Kaproth et al., 2005) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิและ

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งยังคงไม่มีการศึกษาชัดเจนและมีความหลากหลายแตกต่างกันไปตามการศึกษาในแต่ละประเทศ

นอกจากนี้ การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ยังส่งผลถึงการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยโปรตีนในกลุ่ม Matrix metalloproteinases (MMPs) จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Endopeptidase ที่สามารถสร้างขึ้นได้จากเซลล์หลายชนิด มีคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของของเหลวภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) และชั้น Basement membrane ในช่วงที่มีการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ (Tissue reconstruction) โดยในเซมินอลพลาสมา (Seminal plasma) ของโคจะสามารถพบ MMP-1 ได้ (Kareskoski et al., 2021) ซึ่งปริมาณของ MMPs จะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อความเข้มข้นของตัวสุจิ อัตราการมีชีวิตรอดและการเคลื่อนที่ของสุจิ จึงสามารถนำการปรากฏของโปรตีนดังกล่าวมาใช้ในการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อที่ทำละลายในอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์สุจิโคเมื่อทำการละลายน้ำเชื้อในอุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการระบุอุณหภูมิและช่วงเวลาในการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่เหมาะสมและนำไปสู่การค้นหาเครื่องหมายทางชีวภาพเพื่อใช้ในการบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไปในอนาคตได้ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มอัตราการผสมติดตั้งท้องในโค และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์ในโคของประเทศไทยให้ดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 240 หลอดที่รีดเก็บจากโคพ่อพันธุ์ที่มีอายุในช่วง 3-5 ปี จำนวน 10 ตัว โดยโคพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นพ่อโคที่อยู่ในสถานะให้ผลผลิตและสามารถรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อนำมาผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งได้ น้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้มีตัวสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 นำน้ำเชื้อสดมาเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ จากนั้นจึงนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมาผ่านกระบวนการแช่แข็ง และบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 ซีซี โดยมีความเข้มข้นของสุจิ 20 ล้านตัวต่อหลอด

การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

แบ่งตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่มตามอุณหภูมิและระยะเวลาในบ่มน้ำเชื้อ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

กลุ่มที่ 2 ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

กลุ่มที่ 3 ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

โดยหลังจากทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว ทำการบ่มน้ำเชื้อทั้ง 3 กลุ่มที่อุณหภูมิเฉลี่ย 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer assisted sperm analysis (CASA)

สุ่มเลือกน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำละลายและผ่านการบ่มแล้วกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง มาทำการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer assisted sperm analysis (CASA) โดยใช้ตัวแปรในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้

1. การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ
 - 1.1 ร้อยละการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Motility)
 - 1.2 ร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility)
 - 1.3 ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ช้า (Slow)
 - 1.4 ร้อยละของตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ (Static)
2. ความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Velocity) ได้แก่
 - 2.1 Average path velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที
 - 2.2 Straight line velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณการเคลื่อนที่จากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที
 - 2.3 Curvilinear velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที
 - 2.4 Wobble (WOB; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
3. ลักษณะเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Kinematic movement) ได้แก่
 - 3.1 Amplitude of lateral head displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา
 - 3.2 Beat cross frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ
 - 3.3 Straightness (STR; %) หมายถึง ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) ต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) คูณด้วยร้อย

3.4 Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย

การศึกษาแบบการแสดงผลของโปรตีนหลังจากการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

สุ่มเลือกน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำละลายและผ่านการบ่มในระยะเวลาที่แตกต่างกันกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $1000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลายเชื้อจากน้ำเชื้อ ทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) และนำไปปั่นเหวี่ยง $1000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูด PBS ที่ทิ้ง ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง โดยหลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วจะพบตะกอนสีขาวบริเวณก้นหลอดทดลอง (Pellet) สกัดโปรตีนออกจากเซลล์ด้วย การเติมสารย่อยโปรตีน RIPA lysis buffer ลงในหลอดทดลองที่มีตะกอน Pellet อยู่ วัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951)

เตรียมเจลชนิด Polyacrylamide gel โดยใช้สัดส่วน 4.5% (w/v) Stacking gel และ 10% (w/v) Separating gel นำโปรตีนที่สกัดได้ผสมกับ Loading buffer และนำไปต้มในอ่างน้ำร้อน (Water bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า ดังนี้

- 4.5% Stacking gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 85 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที
- 10% Separating gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 125 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

หลังจากแยกโปรตีนแล้ว นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมสี 5% Coomassie brilliant blue staining เพื่อให้ปรากฏแถบโปรตีนในตัวอย่างเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลาย Destaining solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อล้างสีส่วนเกินออกจากแผ่นเจล และแช่แผ่นเจลในน้ำกลั่นบนเครื่องเขย่าสาร (Shaker) เป็นเวลา 1 คืน สังเกตเห็นการปรากฏของแถบโปรตีนบนแผ่นเจล อ่านรูปแบบการแสดงผลของโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยเครื่อง Gel document system และบันทึกผล

การศึกษาแบบการแสดงผลของโปรตีน MMP-1 ในน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังการทำละลายด้วยเทคนิค Gelatin zymography

เตรียมเจลชนิด Polyacrylamide gel โดยใช้สัดส่วน 3% Stacking gel (ประกอบด้วย 0.5M Tris pH 6.8, 40% Acrylamide, 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% Ammonium persulphate

(APS), Tetramethylethylenediamine (TEMED) และ 8% Separating gel (ประกอบด้วย 1.5M Tris pH 8.8, 40% Acrylamide, 3% Gelatin, 10% SDS, 10% APS และ TEMED) ใช้โปรตีนของเซลล์อสุจิ ปริมาณ 15 μ g ผสมใน Zymogram buffer ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าและเวลาดังนี้

- 3% Stacking gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 85 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที
- 8% Separating gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

หลังจากแยกโปรตีนแล้ว ล้างแผ่นเจลด้วย Washing renaturation (2.5% (v/v) Triton X-100) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้งและเติม Incubation buffer นำแผ่นเจลเข้าตู้บ่ม (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 ชั่วโมง และย้อมสีแผ่นเจลด้วย 5% Coomassie brilliant blue staining เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินบนแผ่นเจลด้วยสารละลาย Destaining solution เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นบนเครื่องเขย่าสาร (Shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบโปรตีนปรากฏขึ้นบนแผ่นเจล วัดความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลด้วยเครื่อง Gel document system และบันทึกผล

การบันทึกข้อมูล

บันทึกค่าที่อ่านได้จากเครื่อง CASA ในตัวแปรต่างๆ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (ร้อยละ motility, progressive motility, slow และ static) ความเร็วในการเคลื่อนที่ (ร้อยละ VAP, VSL, VCL, WOB) และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (ร้อยละ ALH, BCF, LIN และ STR) ระดับการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE และระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 ด้วยเทคนิค Gelatin zymography

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial in randomized complete block design (RCBD) โดยกำหนดให้ปัจจัยศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อทั้ง 3 อุณหภูมิ (30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาที่ทำการบ่มน้ำเชื้อ (0, 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อโคเป็นบล็อกวิเคราะห์ข้อมูล รายงานผลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±standard deviation; SD) และวิเคราะห์ ความแตกต่างทางสถิติ ของข้อมูล ด้วยวิธี Two-way ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างคู่ (multiple comparison) ด้วยวิธี Sidak's test และทดสอบอิทธิพลของตัวแปรระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม (Interaction) โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะพิจารณาเมื่อค่า $p < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มที่แตกต่างกัน โดยเมื่อทำการทดสอบอภิตีผลของของตัวแปรระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มแล้วพบว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน จึงทำการศึกษาผลแยกแต่ละตัวแปร ดังนี้

1. อุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อ

พิจารณาผลของอุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อทั้ง 3 อุณหภูมิ ได้แก่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยทำละลายเป็นระยะเวลา 30 วินาทีเท่ากันทั้ง 3 กลุ่ม ประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ ของตัวอสุจิ โดยในด้านการเคลื่อนที่ ของตัวอสุจิ ทำการประเมินร้อยละ motility ร้อยละ progressive motility ร้อยละตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ช้าและร้อยละตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของ ร้อยละ progressive motility ในทุกกลุ่ม แต่พบความแตกต่างของ ร้อยละ motility ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ช้าและร้อยละของตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ระหว่างกลุ่ม โดยพบความแตกต่างของปัจจัยดังกล่าวในกลุ่มที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่า กลุ่มที่ 3 มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าและมีร้อยละของตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่น้อยกว่ากลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ช้าในกลุ่มที่ 3 มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ต่อมาเมื่อทำการเปรียบเทียบดัชนีที่เกี่ยวข้องกับความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ได้แก่ ร้อยละของค่า VAP, VCL, VSL และ WOB พบว่า ตัวอย่างน้ำเชื้อโคใน กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีร้อยละของค่า VAP, VCL และ VSL ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบความแตกต่างของร้อยละ WOB ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยในกลุ่มที่ 1 จะมีค่า WOB สูงสุดเมื่อเทียบกับทั้ง 3 กลุ่ม นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์ดัชนีที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ได้แก่ ร้อยละของค่า ALH, BCF, LIN และ STR พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเคลื่อนที่ของทั้ง 3 กลุ่มที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิต่างกัน กลุ่มที่ 3 มีค่าทั้ง 4 ค่า แตกต่างจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่า BCF, LIN และ STR จะมีค่าน้อยที่สุดในกลุ่มที่ 3 ส่วนค่า ALH จะมีค่าสูงสุดในกลุ่มที่ 3 ดังแสดงใน Table 1.

Table 1. The motility, velocity and kinetic parameters of thawed frozen semen samples under various thawing temperature, ranging from 30, 37 and 45 °C.

Parameters	Thawing temperature (mean±SD)		
	30°C	37°C	45°C
Motility parameter			
Motility (%)	47.79±6.10 ^b	46.50±8.60 ^b	50.42±5.37 ^a
Progressive motility (%)	17.76±5.16 ^a	18.32±5.52 ^a	18.78±4.13 ^a
Slow (%)	15.09±0.93 ^b	15.62±2.20 ^b	17.52±1.20 ^a
Static (%)	55.21±6.10 ^a	53.50±8.60 ^a	49.58±5.37 ^b
Velocity parameter			
VAP (%)	61.88±7.12 ^a	61.03±6.66 ^a	62.94±4.51 ^a
VCL (%)	112.40±11.37 ^a	94.88±10.45 ^a	115.91±6.87 ^a
VSL (%)	48.84±6.31 ^a	47.90±5.57 ^a	48.05±4.53 ^a
WOB(%)	55.94±1.10 ^a	55.44±0.84 ^{ab}	55.27±0.75 ^b
Kinetic parameter			
ALH (%)	6.00±0.35 ^a	6.02±0.31 ^a	6.39±0.16 ^b
BCF (%)	25.65±2.06 ^a	25.55±1.64 ^a	24.89±1.69 ^b
LIN (%)	44.76±1.64 ^a	43.87±0.91 ^a	42.61±1.13 ^b
STR (%)	78.01±1.21 ^a	77.26±0.63 ^a	75.33±1.01 ^b

2. ระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังทำละลาย

น้ำเชื้อที่ทำละลายแล้วจะทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะ 0, 10, 30, 60, 90 และ 120 นาทีตามลำดับ ทำการประเมินผลของระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ และลักษณะการแสดงออกของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มเติมนี้ จะช่วยให้ทราบถึงโปรตีนที่อาจมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของน้ำเชื้อและช่วยในการประเมินระยะเวลาหลังการทำละลายที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ ดังนี้

2.1 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ทำการบ่มหลังการทำละลายในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อทั้ง 3 ด้านโดยใช้ดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จากผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อที่มากขึ้นจะส่งผลให้ค่าดัชนีต่างๆที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของน้ำเชื้อลดลง ในส่วนของดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จะพบความแตกต่างของการเคลื่อนที่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อหลังการทำละลายทันทีที่ระยะเวลาบ่ม 60 นาทีเป็นต้นไป ($p < 0.05$) ทั้งในร้อยละ motility ร้อยละ progressive motility และร้อยละตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ ทั้งนี้ ค่าร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่เข้าสามารถพบการลดลงของค่าดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อหลังการทำละลายทันทีที่ระยะเวลาบ่มตั้งแต่ 10 นาทีเป็นต้นไป ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาดัชนีที่เกี่ยวข้องกับความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ พบการลดลงของความเร็วในการเคลื่อนที่เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น โดยจะพบการลดลงของร้อยละ VAP, VCL และ VSL เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อหลังการทำละลายทันทีที่ระยะเวลาบ่ม 60 นาทีเป็นต้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของร้อยละของค่า WOB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายที่แตกต่างกัน

ในส่วนของลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ พบว่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีค่าลดต่ำลงเช่นกันเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น โดยจะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของร้อยละของค่า BCF และ LIN ที่ระยะเวลาการบ่มตั้งแต่ 120 นาทีเป็นต้นไป ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มในค่าร้อยละ ALH และ STR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงใน Table 2.

Table 2. The motility, velocity and kinetic parameters of thawed frozen semen samples under various incubation time ranging from 0, 10, 30, 60, 90 and 120 °C.

Parameters	Incubation time after thawing (min)					
	0	10	30	60	90	120
Motility parameter						
Motility (%)	53.59±2.04 ^a	52.95±2.34 ^a	50.49±3.25 ^{ab}	47.44±3.99 ^b	41.89±3.13 ^c	36.94±4.93 ^d
Progressive motility (%)	22.21±0.97 ^a	23.03±0.84 ^a	21.38±0.80 ^{ab}	17.95±1.77 ^b	14.24±0.95 ^c	10.90±1.71 ^{cd}
Slow (%)	17.90±1.19 ^a	17.20±1.51 ^b	16.04±1.84 ^b	16.02±1.63 ^b	14.90±0.92 ^b	14.41±1.99 ^b
Static (%)	46.29±2.04 ^a	47.05±2.34 ^a	49.51±3.25 ^{ab}	52.57±3.99 ^b	58.11±3.13 ^c	63.06±4.93 ^d
Velocity parameter						
VAP (%)	67.7±0.37 ^a	66.52±1.72 ^a	65.93±1.32 ^a	61.80±0.53 ^b	57.59±3.37 ^c	52.39±2.84 ^d
VCL (%)	124.29±0.35 ^a	118.30±2.59 ^{ab}	118.99±1.44 ^c	112.95±6.96 ^c	106.52±6.96 ^d	98.67±5.49 ^d
VSL (%)	52.79±0.68 ^a	52.76±2.38 ^a	52.03±2.15 ^a	47.94±0.72 ^b	44.43±1.53 ^c	39.65±0.95 ^d
WOB(%)	55.66±0.22 ^a	56.70±1.13 ^a	55.96±0.35 ^a	55.47±0.24 ^a	55.10±0.66 ^a	54.40±0.69 ^a
Kinetic parameter						
ALH (%)	6.56±0.11 ^a	6.11±0.23 ^a	6.21±0.08 ^a	6.12±0.17 ^a	5.97±0.46 ^a	5.86±0.38 ^a
BCF (%)	26.36±0.58 ^{ac}	27.55±1.17 ^{ab}	26.47±0.66 ^a	24.99±0.43 ^{ac}	23.88±0.47 ^{cd}	22.94±0.40 ^d
LIN (%)	43.48±0.64 ^{ab}	45.39±2.13 ^a	44.44±0.98 ^{ab}	43.57±0.87 ^{ab}	43.29±1.48 ^{ab}	42.36±1.40 ^b
STR (%)	76.45±0.64 ^a	77.84±2.08 ^a	77.38±1.35 ^a	76.64±1.29 ^a	76.79±1.83 ^a	76.08±2.01 ^a

Table 3. Analysis of motility of thawed semen samples across different time intervals (0-10, 10-30, 30-60, 60-90 and 90-120 minutes) of incubation

Parameters	Thawing temperature		
	30°C	37°C	45°C
Differential motility changes during the time intervals of incubation (%)			
0-10 min	2.54	1.64	2.70
10-30 min	5.19	8.57	0.18
30-60 min	9.57	2.97	5.77
60-90 min	6.50	17.45	10.63
90-120 min	10.85	18.28	7.03
Motility rate changes during the time intervals of incubation (%/min)			
0-10 min	0.25	0.16	0.27
10-30 min	0.26	0.43	0.01
30-60 min	0.32	0.10	0.19
60-90 min	0.22	0.58	0.35
90-120 min	0.36	0.61	0.23
The incubation time point of motility rate < 40%	120 min	90 min	-

ในการศึกษานี้ ได้ทำการวิเคราะห์ร้อยละ motility เพิ่มเติม เนื่องจากเป็นดัชนีที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยพบว่าร้อยละ motility จะมีค่าลดต่ำลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการละลายนานขึ้นในทุกอุณหภูมิที่ทำการละลายน้ำเชื้อ ซึ่งในช่วงระยะเวลาการบ่มที่ 60-90 นาทีเป็นต้นไป จะเห็นการลดลงของร้อยละ motility อย่างชัดเจน โดยในกลุ่มที่ทำละลายน้ำเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส จะพบอัตราการเปลี่ยนแปลงสูงถึง 0.58 และ 0.61 ในช่วงระยะเวลาการบ่มน้ำเชื้อที่ 60-90 นาทีและ 90-120 นาทีตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีและให้อัตราการผสมติดที่ดีควรมีค่าร้อยละ motility มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 40 ขึ้นไปหลังการละลาย จากผลการศึกษาจะเห็นได้ชัดเจนว่าน้ำเชื้อที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 45

องศาเซลเซียส เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้หลังการทำละลายเป็นเวลามากกว่า 120 นาทียังคงไม่พบน้ำเชื้อที่มีร้อยละ motility น้อยกว่าร้อยละ 40 ในขณะที่น้ำเชื้อที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายบ่มไว้เป็นเวลา 120 และ 90 นาทีตามลำดับจะสามารถพบน้ำเชื้อที่มีร้อยละ motility น้อยกว่าร้อยละ 40 หลังการทำละลายได้ดังแสดงใน Table 3.

ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อมีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งในภาพรวมการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไม่พบความแตกต่างในด้านดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ แต่การทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที มีผลให้ดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่มีค่าดีขึ้นและค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเคลื่อนที่บางค่า ได้แก่ ร้อยละของ ALH มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ถึงความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่เพิ่มมากขึ้นจากการทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมินี้ อย่างไรก็ตาม ค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ เช่น ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ช้า และค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่บางค่า เช่น ร้อยละค่า WOB, BCF, LIN และ STR มีค่าน้อยกว่าน้ำเชื้อที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้น การศึกษาเพิ่มเติมถึงการใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาทีในการทำละลายน้ำเชื้อจึงยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปก่อนการนำไปใช้จริงในพื้นที่ โดยใช้การตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อด้วยวิธีอื่นๆ ประกอบด้วย เช่น การประเมินความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิด้วยการย้อมสี การประเมินความผิดปกติของอสุจิส่วนอะโครโซม และการนับจำนวนอสุจิที่มีชีวิตและตาย ซึ่งจะช่วยให้สามารถวิเคราะห์ถึงคุณภาพของตัวอสุจิได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

ผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Al-Badry (2012) ที่รายงานว่าในการทำละลายน้ำเชื้อโคที่อุณหภูมิสูงในระยะเวลาอันสั้นเป็นวิธีการทำละลายน้ำเชื้อที่ดีที่สุด จะช่วยให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตหลังละลายสูงกว่าการทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วินาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rastegarnia et al. (2013) ที่พบว่าการทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 50 องศาเซลเซียสมีความปลอดภัยและช่วยให้อัตราการเคลื่อนที่หลังละลายดีขึ้นในกระบือ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อโคที่ 36, 38 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 38 และ 40 องศาเซลเซียสสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ รูปแบบการเคลื่อนที่และความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity) ได้ (Zenteno et al., 2022) อย่างไรก็ตาม การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของโคประเทศไทยในปัจจุบัน นิยมใช้อุณหภูมิในการทำละลายที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ซึ่งจากการศึกษาของ Goshme et al. (2021) ได้ทดลองทำการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิและ

เวลาเท่ากันแต่ใช้วิธีการทำละลายน้ำเชื้อจากหน่วยงานที่แตกต่างกัน (เมือง Baso, เมือง Chacha และเมือง Debre-Birhan) พบว่าแม้จะกำหนดให้ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำละลายเท่ากัน แต่วิธีและขั้นตอนในการทำละลายที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ต่างกัน โดยอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิจะสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม (ambient temperature) ในขณะนั้น นอกจากนี้ ปัจจัยอื่นๆ เช่น พันธุ์ อายุและฤดูกาลล้วนมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อหลังการทำละลาย การกำหนดวิธีการทำละลายน้ำเชื้อมาตรฐาน (standard protocol) จึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญเพื่อช่วยลดความแปรปรวนต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อลงได้

ในการศึกษานี้ ได้มีการศึกษาถึงระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายต่อการเคลื่อนที่ ความเร็ว และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิด้วย เพื่อใช้ในการบ่งชี้ถึงระยะเวลามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพของน้ำเชื้อหลังการทำละลาย จากผลการทดลองพบว่า หลังการทำละลายน้ำเชื้อแล้ว หากไม่นำไปผสมเทียมทันที เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น จะส่งผลให้การเคลื่อนที่ ความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายที่มากกว่า 60 นาทีเป็นต้นไป มีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ในภาพรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยจากการศึกษาของ Diskin (2018) ระบุว่าระยะเวลาในการผสมเทียมที่ดีที่สุด ควรนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมภายใน 6-8 นาทีหลังการทำละลายน้ำเชื้อ นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ร้อยละของตัวอสุจิที่หยุดนิ่งและอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดในน้ำเชื้อโคที่ทำการละลายแล้ว และบ่มไว้เป็นเวลา 0, 60, 120 และ 180 นาทีตามลำดับ ผลการศึกษารายงานว่า ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าและอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น ($p < 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบร้อยละของตัวอสุจิที่หยุดนิ่งมีค่าสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีร้อยละของตัวอสุจิที่หยุดนิ่งสูงสุดเมื่อทำการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายไว้เป็นเวลา 180 นาที (Karunakaran and Devanathan, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม การทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีให้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพหลังการทำละลายได้ดีที่สุด โดยสามารถบ่มน้ำเชื้อไว้หลังการทำละลายได้นานมากกว่า 120 นาทีเป็นต้นไป โดยไม่พบตัวอสุจิที่มีร้อยละการเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 40

2.2 การประเมินรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในน้ำเชื้อที่ทำการบ่มหลังการทำละลายในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

การศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนหลังทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที โดยมีระยะเวลาการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่า ในทุกกลุ่มพบการแสดงออกของแถบโปรตีนจำนวน

ทั้งสิ้น 13 แถบบน SDS-PAGE โดยพบการแสดงออกของโปรตีนในแถบที่ชัดเจนจำนวนทั้งสิ้น 6 แถบ ได้แก่ ที่น้ำหนักโมเลกุล 48, 65, 70, 75, 100 และ 135 kDa ดังแสดงใน Figure 1-3 เมื่อประเมินระดับการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละกลุ่มพบว่า ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสพบความแตกต่างของระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะโปรตีนขนาด 135 kDa ($p < 0.05$) โดยเมื่อพิจารณาในกลุ่มที่ทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบการแสดงออกของระดับโปรตีนที่ลดลงเมื่อเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น โดยพบความแตกต่างของระดับโปรตีนที่ลดลงในช่วงระยะเวลาการบ่มที่ 30, 60 และ 120 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการบ่มที่ 0 และ 10 นาที ($p < 0.05$) ส่วนในกลุ่มน้ำเชื้อที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนขนาด 135 kDa อย่างมีนัยสำคัญในช่วงการบ่มหลังการทำละลายน้ำเชื้อที่ 10 นาที จากนั้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อนานขึ้น พบการลดลงของระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Figure 1. และ Figure 2. อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบความแตกต่างของระดับโปรตีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่โปรตีนขนาด 48 และ 135 kDa โดยพบการลดลงของระดับโปรตีนในช่วงเวลาการบ่มที่ 30 นาทีเป็นต้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของโปรตีนทั้งสองขนาดดังแสดงใน Figure 3.

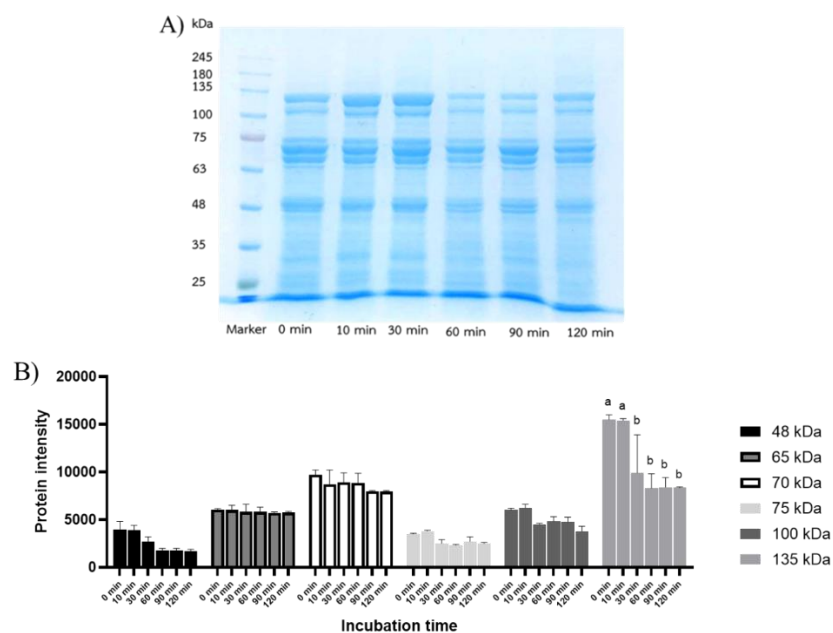


Figure 1. The protein expression pattern and intensity of semen samples, subjected to thawing at 30°C for 30 seconds, followed by incubating at various time points (0, 10, 30, 60, 90 and 120 minutes). The protein bands and intensity are presented in A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and B) a bar chart. ^{a,b,c} indicate the statistical significant difference at $p < 0.05$ among various incubation times.

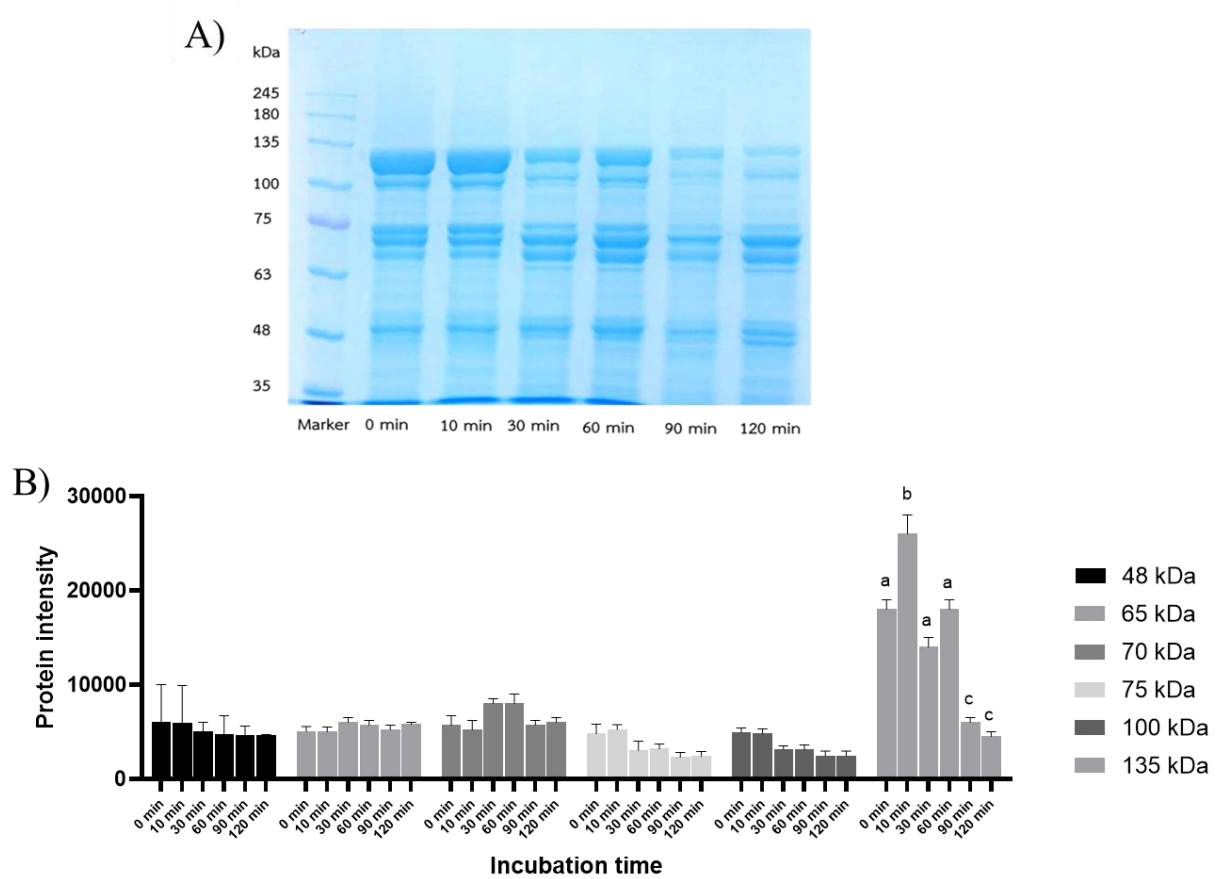


Figure 2. The protein expression pattern and intensity of semen samples, subjected to thawing at 37°C for 30 seconds, followed by incubating at various time points (0, 10, 30, 60, 90 and 120 minutes). The protein bands and intensity are presented in A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and B) a bar chart. ^{a,b,c} indicate the statistical significant difference at $p < 0.05$ among various incubation times.

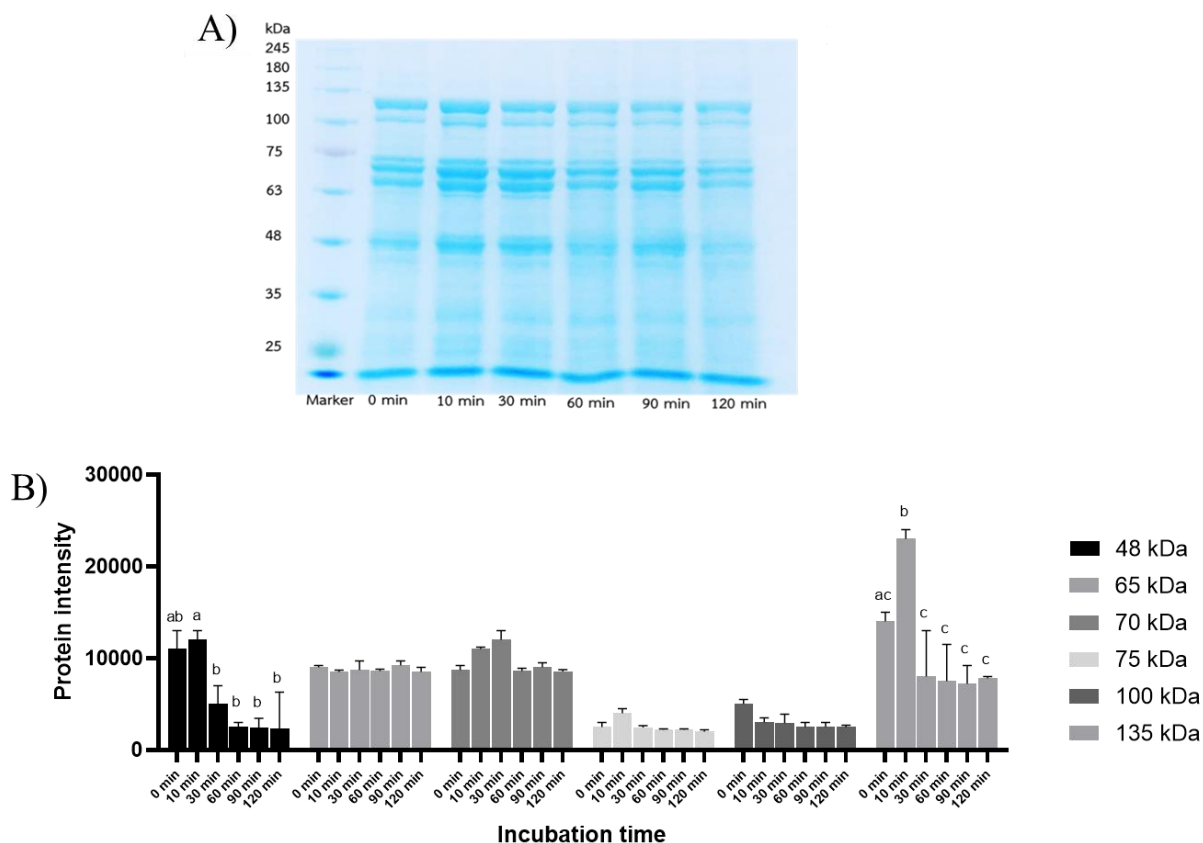


Figure 3. The protein expression pattern and intensity of semen samples, subjected to thawing at 45°C for 30 seconds, followed by incubating at various time points (0, 10, 30, 60, 90 and 120 minutes). The protein bands and intensity are presented in A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and B) a bar chart. ^{a,b,c} indicate the statistical significant difference at $p < 0.05$ among various incubation times.

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการทำลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆและระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในน้ำเชื้อ โดยพบรูปแบบของโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน ได้แก่ โปรตีนขนาดประมาณ 48 และ 135 kDa โดยแถบโปรตีนขนาด 48 kDa เป็นขนาดที่มีความใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีน MMP-1 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับกระบวนการย่อยสลายโปรตีนและมีผลต่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวอสุจิ โดยมีการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า การปรากฏของโปรตีนในกลุ่ม MMPs มีความเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตของตัวอสุจิ กระบวนการคาพาซิเทชัน (Capacitation) และอัตราการปฏิสนธิ (Kim et al., 2013) นอกจากนี้ การพบแถบโปรตีนขนาด 135 kDa มีความใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ Heparin binding proteins ซึ่งโปรตีนนี้มีความเกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิและสามารถใช้บ่งชี้ถึงความสามารถของตัวอสุจิในการป้องกันอันตรายที่เกิดจากความเย็นจากกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Singh et al., 2019) โดย

โปรตีนทั้งสองกลุ่มจะพบลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายมีระยะเวลานานขึ้น แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาหลังการทำละลายที่นานขึ้นส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งอาจเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพและการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ ดังนั้น การใช้น้ำเชื้อทันทีหลังการทำละลายและผสมเทียมโคให้สำเร็จอย่างรวดเร็วที่สุด จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยลดคุณภาพของน้ำเชื้อและเพิ่มอัตราการผสมติดในโคได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนที่ปรากฏได้อย่างชัดเจน จะทำได้เพียงประเมินรูปแบบและเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงเท่านั้น การศึกษาทางโปรตีโอมิกส์อื่นๆเพิ่มเติม เช่น การใช้เทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (LC-MS/MS) จะช่วยให้สามารถทราบชนิดของโปรตีนจากลำดับของกรดอะมิโน หรือการใช้ western blotting เพื่อใช้แอนติบอดีในการระบุชนิดของโปรตีนตามแถบที่ปรากฏต่อไป

2.3 การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 ในน้ำเชื้อโคที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในระยะเวลาในการบ่มที่แตกต่างกันด้วยวิธี Gelatin zymography

จากผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ข้างต้น ในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทำละลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เป็นกลุ่มตัวอย่างที่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่ขนาดประมาณ 48 kDa เมื่อมีระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งขนาดของโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน MMP-1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ การศึกษานี้จึงได้นำตัวอย่างน้ำเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมาทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการปรากฏของแถบโปรตีนว่าเป็นโปรตีน MMP-1 ด้วยวิธี Gelatin zymography ซึ่งเป็นวิธีเฉพาะในการหาโปรตีนชนิดดังกล่าวจากการสังเกตการปรากฏของแถบสีที่เกิดจากการย่อยสลายเจลาตินที่อยู่บนแผ่นเจล

จากผลการทดลองนี้พบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 ในระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกันพบว่า โปรตีน MMP-1 ในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทำการบ่มเป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที มีระดับการแสดงออกของโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่ได้ทำการบ่ม ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่พบบน SDS-PAGE ดังแสดงใน Figure 4. โดยการลดลงของโปรตีน MMP-1 มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับคุณภาพของน้ำเชื้อและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ลดลง ดังนั้น ระยะเวลาหลังการทำละลายน้ำเชื้อที่เพิ่มขึ้น มีผลโดยตรงต่อการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 และสอดคล้องกับคุณภาพของน้ำเชื้อที่ลดลงอย่างชัดเจน น้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านกระบวนการทำการละลายแล้วจึงควรนำไปใช้ผสมเทียมในระยะเวลาที่เร็วที่สุด เพื่อช่วยลดความเสียหายของตัวอสุจิที่อาจเกิดขึ้นได้นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน MMP-1 ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ผลของการศึกษานี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการบ่งชี้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำละลายน้ำเชื้อและระยะเวลาหลังการทำละลายที่จะส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ การแสดงออกของโปรตีนยังคงมีความสัมพันธ์ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ และสามารถพัฒนาต่อยอดไปสู่การค้นหาเครื่องหมาย

โมเลกุลเพื่อใช้ในการบ่งชี้คุณภาพน้ำเชื้อในอนาคต ซึ่งมีความสำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์ในฝูงโคและช่วยสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมได้อย่างยั่งยืน

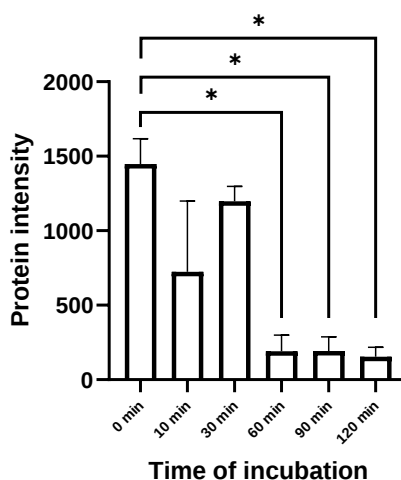


Figure 4. The intensity of MMP-1 protein in thawed semen samples at 45°C for 30 seconds, measured at various incubation time points (0, 10, 30, 60, 90 and 120 minutes). * denotes the statistical significant difference at $p < 0.05$ among various incubation times.

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้สรุปได้ว่า อุณหภูมิในการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งมีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ ความเร็วและลักษณะในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที มีผลให้ดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ได้แก่ ร้อยละ motility และ ร้อยละ ALH มีค่าสูงกว่าการทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ในส่วนของระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การบ่มน้ำเชื้อเป็นเวลานานเกินกว่า 60 นาทีเป็นต้นไป จะส่งผลต่อค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ได้แก่ ร้อยละ motility ร้อยละ progressive motility ร้อยละ VAP ร้อยละ VCL และร้อยละ VSL โดยมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ อุณหภูมิในการทำละลายและระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายยังส่งผลต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน โดยพบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของโปรตีนขนาด 45 และ 135 kDa ในน้ำเชื้อที่ทำละลายด้วยอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ซึ่งเมื่อนำน้ำเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมาทดสอบ พบระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 ที่ลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อนานขึ้นโดย

จะพบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อบ่มน้ำเชื้อทิ้งไว้นานกว่า 60 นาทีเป็นต้นไป ดังนั้น น้ำเชื้อที่ทำการละลายแล้วจะมีคุณภาพดีใกล้เคียงกับน้ำเชื้อที่ทำการละลายทันทีอยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 60 นาทีแรก หลังการทำการละลาย อย่างไรก็ตาม การใช้น้ำเชื้อทันทีโดยผสมเทียมโคในระยะเวลาที่สั้นที่สุดหลังการทำการละลาย น้ำเชื้อจะช่วยคงคุณภาพของน้ำเชื้อและอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ส่งผลให้เพิ่มโอกาสการผสมติดและตั้งท้องโคได้มากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้สามารถประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน ควรมีการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อด้วยวิธีอื่นๆเพิ่มเติม เช่น การประเมินความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิด้วยการย้อมสี การประเมินความผิดปกติของอสุจิส่วนอะโครโซม และการนับจำนวนอสุจิที่มีชีวิตและตาย เพื่อให้การวิเคราะห์ผลการทดลองมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ เพื่อให้ทราบถึงผลของความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนและชนิดของโปรตีนในน้ำเชื้อหลังการทำการละลายอย่างชัดเจนและครอบคลุม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคอื่นๆเข้ามาช่วยร่วมด้วยในการศึกษา เช่น การทำ western blotting หรือการใช้เทคนิคเชิงโปรตีโอมิกส์ (shotgun proteomics) ด้วยเครื่องมือต่างๆ เช่น mass spectrometry หรือ LC-MS/MS และเทียบสายโปรตีนที่ได้ในระบบฐานข้อมูล (database) เพื่อให้ได้ข้อมูลของโปรตีนทั้งหมดออกมา ทั้งความยาวของโปรตีน กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนนั้นและชื่อของโปรตีน และทำการเลือกชนิดของโปรตีนที่น่าสนใจเพื่อนำมาทำการศึกษาต่อไป ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีนที่สนใจ (protein-protein interaction) และความสัมพันธ์ของโปรตีนชนิดนั้นๆต่อกลไกต่างๆ (pathway analysis) จะช่วยให้เราเห็นถึงโปรตีนอื่นๆที่มีส่วนเกี่ยวข้อง หน้าที่ของโปรตีนนั้นเพื่อใช้บ่งชี้ถึงความเสี่ยงของตัวอสุจิหลังการทำการละลายที่อุณหภูมิต่างกันได้อย่างชัดเจน

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิชาการนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสัตวแพทย์หญิงจรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยการผลิตและมาตรฐานน้ำเชื้อ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิลาสสินี อัญญาวิเลิศ อาจารย์คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความอนุเคราะห์คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลและให้คำปรึกษาจนกระทั่งงานวิชาการฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Al-Badry, K. I. 2012. Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of Friesian bulls in Iraq. *International Journal of animal and veterinary advances*, 4(6), 384-388.
- Amidi, F., A. Pazhohan, M. Shabani, M. Nashtaei, M. Khodarahmian and S. Nekoonam. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*, 17, 745-756.
- Correa, J. R., M. C. Rodriguez, D. J. Patterson and P. M. Zavos. 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46(3), 413-420.
- de Paula, T. S., R. P. Bertolla, D. M. Spaine, M. A. Cunha, N. Schor and A. P. Cedenho. 2006. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and sterility*, 86(3), 597-600.
- Diskin, M. G. 2018. Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal*, 12(1), 75-84.
- Goshme, S., T. Asfaw, C. Demiss and S. Besufekad. 2021. Evaluation of motility and morphology of frozen bull semen under different thawing methods used for artificial insemination in North Shewa zone, Ethiopia. *Heliyon*, 7(10).
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 62(1), 3-22.
- Kaproth, M. T., H. E. Rycroft, G. R. Gilbert, G. Abdel-Azim, B. F. Putnam, S. A. Schnell, R. W. Everett and J. E. Parks. 2005. Effect of semen thaw method on conception rate in four large commercial dairy heifer herds. *Theriogenology*, 63(9), 2535-2549.

- Kareskoski, M., J. Vakkamäki, K. Laukkanen, M. Palviainen, A. Johannisson and T. Katila. 2021. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, semen quality and sperm longevity in fractionated stallion semen. *Theriogenology*, 164, 93-99.
- Karunakaran, M. and T. G. Devanathan. 2017. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 136-144.
- Kim, S. H., Y. S. Song, S. Y. Hwang, K. S. Min and J. T. Yoon. 2013. Effects of hormones on the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in bovine spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(3), 334.
- Koch, J., L. P. Weber, M. Heppelmann, F. Freise, M. Klingelmann and L. Bachmann. 2022. Effect of different thawing methods for frozen bull semen and additional factors on the conception rate of dairy cows in artificial insemination. *Animals*, 12(18), 2330.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. L. Farr and R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Rastegarnia, A., A. Shahverdi, T. R. Topraggaleh, B. Ebrahimi and V. Shafipour. 2013. Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal*, 14(4), 306.
- Senger, P. L. 1980. Handling frozen bovine semen—Factors which influence viability and fertility. *Theriogenology*, 13(1), 51-62.
- Shahzad, Q., M. U. Mehmood, H. Khan, A. ul Husna, S. Qadeer, A. Azam, Z. Naseer, E. Ahmad, M. Safdar and M. Ahmad. 2016. Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 167, 83-88.

- Singh, A. K., P. S. Brar and R. S. Cheema. 2020. Heparin binding proteins in seminal plasma of breeding buffalo bulls and their relation with semen freezability and in vivo fertility. Indian. Journal of Animal Sciences, 90, 41-45.
- Yilmaz, E., K. Ak and A. Baran. 2019. Effect of different thawing time and high temperature on frozen thawed bull semen traits. Journal of Animal and Veterinary Advances, 18(7), 239-45.
- Zenteno, E. S., B. Rojano and G. R. Betancur. 2022. Influence of thawing temperature on sperm motility, structure, and metabolism of frozen bovine semen. Ciência Rural, 53, e20210731.

การประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคนมด้วยอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายและอุณหภูมิน้ำนมโดยใช้

เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด

วิชาญณี ภูมิพิทักษ์กุล^{1/} กอบสุข ทองสอดแสง^{1/} จิรภัทร ศักดิ์เสรีชัยกุล^{2/}

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยการตั้งท้องในช่วงระยะต้นของการตั้งท้องมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์และช่วยลดจำนวนวันท้องว่างในฝูงโค อย่างไรก็ตาม การตรวจการตั้งท้องระยะต้นจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญและใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ประยุกต์ใช้การวัดอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายและอุณหภูมิน้ำนมโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดเพื่อระบุตำแหน่งการวัดที่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิแกนกลางร่างกายทางทวารหนักและใช้ในการประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคนมได้ โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองในโคเพศเมียที่เลี้ยงในฟาร์มโคนมในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 จำนวน 31 ตัว วัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกายทางทวารหนักโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอทและวัดอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายจำนวน 4 ตำแหน่ง และอุณหภูมิน้ำนมโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดตั้งแต่วันที่ 1-28 หลังการผสมเทียม เก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อหาปริมาณฮอโมนโปรเจสเตอโรนในวันที่ 5, 10, 15 และ 28 และระดับโปรตีนที่สร้างจากรก (pregnancy-associated glycoproteins; PAGs) ในวันที่ 28 หลังการผสมเทียม ผลการศึกษาพบว่า อุณหภูมิ น้ำนมมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอุณหภูมิแกนกลางร่างกายมากกว่าอุณหภูมิพื้นผิวที่วัดในตำแหน่งต่างๆ ($r=0.38$, $p<0.05$) โดยกลุ่มโคที่ตั้งท้องมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายระหว่างวันที่ 26-28 และอุณหภูมิน้ำนมระหว่างวันที่ 14-16 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบในกลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้อง และพบการลดลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายและอุณหภูมิน้ำนมในโคที่ตั้งท้องเปรียบเทียบกับโคไม่ตั้งท้องในวันที่ 27 และ 28 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำนมในวันที่ 15 และวันที่ 28 มีความสัมพันธ์กับการตั้งท้อง ($r=0.41$ และ $r=-0.60$, $p<0.05$) และระดับฮอโมนโปรเจสเตอโรนและ PAGs ในวันที่ 28 ตามลำดับ ($r=0.35$ และ $r=0.47$, $p<0.05$) ดังนั้น การวัดอุณหภูมิจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคนม เนื่องจาก เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อนและเกษตรกรสามารถทำได้ด้วยตนเองได้ โดยสามารถใช้การวัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกายทางทวารหนักโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอท ควบคู่กับการวัดอุณหภูมิน้ำนมโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดในการประเมินการตั้งท้องเบื้องต้นในโคได้

คำสำคัญ: การตรวจการตั้งท้องระยะต้น โคนม อุณหภูมิน้ำนม อุณหภูมิพื้นผิว

เลขทะเบียนวิจัย 63(1)-0208-022

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี

The application of infrared thermometer to detect body surface and milk temperature for early pregnancy diagnosis in dairy cattle

Vichayanee Pumpitakkul^{1/} Korbsook Thongsodsaeng^{1/} Jirapat Saksereechaikul^{2/}

Abstract

The early pregnancy diagnosis is a particularly crucial approach in improving reproductive performance and reducing the days open in the herd. However, early pregnancy diagnosis requires skilled personnel and expensive equipment. In this study, surface body temperature and milk temperature were measured using an infrared thermometer to identify the measurement positions related to the core temperature and assess early pregnancy. The experiment was conducted on 31 female cattle in the local farm, located at Chonburi province. The core body temperature was measured at rectum via the thermometer while the surface and milk temperature were determined using an infrared thermometer. The temperature values of all area were recorded from day 1 to day 28 post-artificial insemination. We then collected the milk samples on days 5, 10, 15, and 28 to analyse the levels of progesterone and pregnancy-associated glycoproteins (PAGs). The study found a low positive correlation between milk temperature and body core temperature, more than with surface temperature at different positions ($r=0.38$, $p<0.05$). In the pregnant group, significant changes in body core temperature were observed between days 26-28 and in milk temperature between days 14-16. These patterns of change were not observed in the non-pregnant group. Additionally, significant decreases in body core temperature and milk temperature were found in pregnant cows compared to non-pregnant cows on days 27 and 28, respectively. Furthermore, when assessing the correlation coefficient values (r), changes in milk temperature on days 15 and 28 showed low positive and moderate negative correlations, respectively, with pregnancy ($r=0.41$ and $r=-0.60$, $p<0.05$). Similar correlations were found with progesterone hormone levels and PAGs on day 28 at low levels ($r=0.35$ and $r=0.47$, respectively, $p<0.05$) with pregnancy. Therefore, temperature measurement is an alternative method for assessing early pregnancy in dairy cows due to its simplicity, allowing farmers to perform it independently. Measuring body core temperature using a rectal thermometer alongside milk temperature using an infrared thermometer can initially assess early pregnancy in cows.

Keywords: early pregnancy diagnosis, dairy cattle, milk temperature, body surface temperature

Registered number: 63(1)-0208-022

^{1/} Bureau of Biotechnology and Livestock Production, Muang, Pathum Thani

^{2/} Chonburi Biotechnology and Artificial Insemination Research Center, Banbuang, Chonburi

คำนำ

การเลี้ยงโคนมเป็นอาชีพที่มีความสำคัญอย่างยิ่งของประเทศไทย โดยมีรูปแบบการเลี้ยงทั้งในระดับเกษตรกรรายย่อยและระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่มีความทันสมัยเข้ามาสนับสนุนการเลี้ยง จากข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในปี พ.ศ. 2565 รายงานว่าในประเทศไทยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมจำนวนทั้งสิ้น 24,117 ราย โดยมีจำนวนโคนมรวมทั้งสิ้น 812,235 ตัว พบการเลี้ยงหนาแน่นที่สุดในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 คิดเป็นจำนวนโคร้อยละ 32.26 ของจำนวนโคนมทั้งหมดในประเทศ (กรมปศุสัตว์, 2565) โดยเป้าประสงค์หลักของการเลี้ยงโคนมคือต้องการให้โคนมติดและตั้งท้องได้อย่างต่อเนื่องทุกปี เพื่อให้สามารถให้ผลผลิตน้ำนมอย่างต่อเนื่องเพียงพอและสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมอย่างยั่งยืน การตรวจการตั้งท้องภายหลังการผสมเทียมจึงถือเป็นการจัดการทางระบบสืบพันธุ์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้โคนมสามารถให้ผลผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ โดยหากสามารถตรวจการตั้งท้องภายหลังการผสมเทียมได้เร็วตั้งแต่ช่วงระยะต้นของการตั้งท้อง (early pregnancy diagnosis) จะช่วยลดโอกาสการสูญเสียตัวอ่อนในระยะแรกของการตั้งท้อง (early embryonic loss) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Humboldt, 2001; Albaaj et al., 2022) ส่งผลให้ลดค่าดัชนีทางระบบสืบพันธุ์ต่างๆ ในโคนมได้ เช่น จำนวนวันท้องว่าง (days open) และระยะห่างการคลอดลูก (calving interval) นอกจากนี้ ยังช่วยให้สามารถปรับการจัดการด้านอาหารและการดูแลเลี้ยงดูโคท้องได้อย่างเหมาะสม และจัดการแก้ไขปัญหสำหรับโคที่ผสมไม่ติดได้อย่างทันท่วงที โดยในกระบวนการตรวจยืนยันการตั้งท้องโคที่ปฏิบัติในพื้นที่โดยทั่วไปจะใช้วิธีการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก (rectal palpation) ในช่วงเวลา 60–90 วันหลังการผสมเทียม (Romano et al., 2006) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการยืนยันการตั้งท้องและให้ความแม่นยำในการตรวจสูง เนื่องจากผู้ตรวจจะสามารถสัมผัสได้ถึงการขยายตัวของปีกมดลูกด้านที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจทำให้แม่โคมีความเครียดจากการจับบังคับและการล้วงตรวจและเริ่มตรวจการตั้งท้องได้ล่าช้ากว่าวิธีอื่น

ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เครื่องมืออื่นๆ เข้ามาช่วยในการยืนยันการตั้งท้องในโค เช่น การใช้การอัลตราซาวด์เพื่อตรวจการตั้งท้องผ่านทางทวารหนัก (transrectal ultrasonography) (Nation et al., 2003) หรือการประยุกต์ใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อประเมินระดับของฮอร์โมนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตั้งท้อง ได้แก่ การตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) (Pennington et al., 1976) หรือระดับโปรตีนที่สร้างจากรก (pregnancy associated glycoproteins, PAGs) จากตัวอย่างเลือดหรือตัวอย่างน้ำนม (Whitlock and Maxwell, 2008; Romano and Larson, 2010; Ghaidan et al., 2019) วิธีการเหล่านี้ช่วยให้การตรวจการตั้งท้องมีความแม่นยำและสามารถทราบผลได้ตั้งแต่ช่วงระยะต้นของการตั้งท้อง อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญในการตรวจและแปลผล เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจมีราคาสูง และอาจไม่สามารถนำผลการวิเคราะห์ไปใช้แก้ไขปัญหาได้อย่างทันท่วงทีได้ จากข้อจำกัดด้านกระบวนการส่งตัวอย่างไปห้องปฏิบัติการและรายงานผล ดังนั้น วิธีการตรวจการตั้ง

ห้องที่เกษตรกรสามารถอ่านผลได้เองเบื้องต้นและเฝ้าระวังการตั้งท้องได้ในช่วงต้นของการตั้งท้องโดยใช้เครื่องมือที่มีราคาไม่สูงและไม่มีความซับซ้อนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจการตั้งท้องในโคนม ส่งผลให้โคสามารถผสมติดและตั้งท้องตามกำหนดเวลาที่ต้องการได้

จากการศึกษาของ Gil et al. (2001) รายงานถึงความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิร่างกายและอุณหภูมิน้ำนมในโคนมต่อการตั้งท้อง โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วงตั้งท้องระยะต้นเป็นผลมาจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของแม่โคเมื่อมีการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนเข้าสู่โพรงมดลูก การประยุกต์ใช้การตรวจวัดอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายและอุณหภูมิน้ำนมมาใช้ในการประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคนม จึงเป็นทางเลือกที่มีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ เนื่องจากสามารถปฏิบัติได้อย่างสะดวกในพื้นที่ เกษตรกรสามารถทำได้ด้วยตนเองภายในฟาร์มและอ่านผลเบื้องต้นเองได้โดยใช้อุปกรณ์ที่มีราคาไม่สูง นอกจากนี้ การนำเครื่องวัดอุณหภูมิแบบอินฟราเรดเข้ามาแทนที่การวัดอุณหภูมิร่างกายด้วยเทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอทผ่านทางทวารหนัก (rectal temperature) แบบปกติทั่วไป จะช่วยให้การวัดอุณหภูมิโคทำได้ง่ายและสะดวกมากยิ่งขึ้น โดยเป็นวิธีทางเลือกที่ไม่ทำให้โคเจ็บปวดและลดการสัมผัสตัวโคในขณะวัด (non-invasive technique) การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการวัดอุณหภูมิพื้นผิwr่างกาย (surface temperature) ในตำแหน่งต่างๆ และอุณหภูมิน้ำนมโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดเทียบกับการวัดอุณหภูมิร่างกายผ่านทางทวารหนักโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอท เพื่อหาดำแหน่งที่เหมาะสมในการเป็นตัวแทนระบุอุณหภูมิแกนกลางร่างกายโค (core temperature) และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายโคและอุณหภูมิน้ำนมต่อการประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคนม ผลที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการประเมินการตั้งท้องในช่วงต้นของการตั้งท้อง ได้ กระบวนการใหม่ในการตรวจการตั้งท้องเบื้องต้นภายในพื้นที่ ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์โดยตรงแก่เกษตรกร นำไปสู่การเลี้ยงและการจัดการระบบสืบพันธุ์ในฝูงโคนมที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในโคนมเพศเมียพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ที่เลี้ยงในฟาร์มโคนมเครือข่ายผลิตพ้อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ 1 แห่งในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 จำนวน 31 ตัว อายุระหว่าง 3-7 ปี มีคะแนนร่างกายระหว่าง 2.5-3.5 เป็นโคที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง มีประวัติการให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว มีระบบสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ ไม่มีโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ได้รับวัคซีนและการถ่ายพยาธิอย่างครบถ้วนตามโปรแกรมสุขภาพของกรมปศุสัตว์

วิธีการทดลอง

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมโค

ทำการล้วงตรวจระบบสืบพันธุ์โคเพื่อตรวจประเมินความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ในส่วนของมดลูกและรังไข่ เหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-B®, InterAg, New Zealand) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการฉีดฮอร์โมนพลอสตาแกลนดิน (prostaglandin; PG) (Estrumate®, Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ในวันที่ทำการถอดฮอร์โมนชนิดสอดช่องคลอดออก สังเกตอาการเป็นสัด จับสัดและผสมเทียมโคในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมโดยใช้น้ำเชื้อที่ผ่านการรับรองและตรวจคุณภาพจากกรมปศุสัตว์ ในการศึกษานี้จะทำการเหนี่ยวนำโคเป็นชุดๆ และทำการศึกษาต่อเนื่องในฤดูกาลเดียวกัน เพื่อลดอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมที่อาจเข้ามามีผลกระทบ

การวัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกาย อุณหภูมิพื้นผิwr่างกายและอุณหภูมิน้ำนม

วัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกาย อุณหภูมิพื้นผิwr่างกาย และวัดอุณหภูมิน้ำนมหลังจากการรีดนม โดยวัดอุณหภูมิวันละ 2 ครั้ง ได้แก่ ช่วงเช้าเวลา 6.00 น. และช่วงเย็นเวลา 15.00 น. ในช่วงขณะที่ทำการรีดนม บันทึกอุณหภูมิตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 28 หลังการผสมเทียม ที่ระดับทศนิยม 1 ตำแหน่ง ดังนี้

- **การวัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกาย** ทำการวัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอทผ่านทางทวารหนัก วัดอุณหภูมิจำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที และคำนวณค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ 3 ครั้ง
- **การวัดอุณหภูมิพื้นผิwr่างกาย** ทำการวัดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด วัดอุณหภูมิจำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ด้านข้างลำตัว (บริเวณซี่โครงคู่ที่ 13 ด้านซ้าย) ฐานเต้านมด้านซ้าย ช่องหูด้านซ้ายและดวงตา ด้านซ้ายตามการศึกษาของ Švejdová et al. (2013) วัดอุณหภูมิจำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที และคำนวณค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ 3 ครั้ง
- **การวัดอุณหภูมิน้ำนม** รีดน้ำนมโคใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการวัดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดในน้ำนมโคทันทีหลังจากการรีดเก็บเป็นเวลา 1 นาที วัดอุณหภูมิจำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที และคำนวณค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ 3 ครั้ง

การตรวจการตั้งท้องระยะต้นโดยการวัดปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและโปรตีน PAGs จากตัวอย่างน้ำนมในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างน้ำนมโคปริมาณ 10 มิลลิลิตรในวันที่ 0, 5, 10, 15 และ 28 หลังการผสมเทียม เพื่อตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และใช้ตัวอย่างน้ำนมวันที่ 28 หลังการผสมเทียมเพื่อตรวจโปรตีน PAGs โดยตัวอย่างน้ำนมทั้งหมดจะส่งมาทดสอบที่ห้องปฏิบัติการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี เก็บรวบรวมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งถึงวันที่ทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดในการทดสอบดังนี้

การตรวจวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนม

ตรวจวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เก็บในวันที่ 0, 5, 10, 15 และ 28 หลังการผสมเทียมด้วยชุดทดสอบ Progesterone ELISA kit (5081PROG) (EuroProxima, Netherlands) ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนการทดสอบโดยกำจัดไขมันในน้ำนมออกด้วยการบ่มน้ำนมปริมาณ 2 มิลลิลิตรในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 2,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตัดเฉพาะส่วนใสเก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรสำหรับใช้ทดสอบด้วยวิธี enzyme-linked immunoassay (ELISA) โดยเตรียมตัวอย่างโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน (standard) ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 0.0625, 0.1250, 0.2500, 0.5000, 1.0000 และ 5.0000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสาร standard ทั้ง 7 ความเข้มข้นลงในหลุมทดสอบและปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบที่เหลือ เติมสาร horseradish peroxidase ปริมาณ 25 ไมโครลิตร เพื่อทำหน้าที่เป็นคอนจูเกต (conjugate) ในปฏิกิริยา จากนั้นเติมแอนติบอดี (antibody) ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ เติมซับสเตรท (substrate) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติมสารเพื่อหยุดปฏิกิริยา (stop solution) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร อ่านผลการทดสอบที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาค่าร้อยละการดูดกลืนแสงสูงสุด (percentage of maximal absorbance) จากสมการ

$$\text{ร้อยละการดูดกลืนแสงสูงสุด} = 100 \times \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสาร standard ที่ความเข้มข้น 0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร}}$$

สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยกำหนดให้แกน y แสดงร้อยละการดูดกลืนแสงสูงสุดของสาร standard ทั้ง 7 ความเข้มข้น และแกน x แสดงปริมาณความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนใน standard ที่อ่านค่าได้จากเครื่อง microplate reader (หน่วยเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร) สร้างสมการจากกราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณหาปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่ส่งตรวจ บันทึกผล

การตรวจวัดปริมาณ PAGs ในตัวอย่างน้ำนม

ตรวจวัดปริมาณ PAGs ในตัวอย่างน้ำนมที่เก็บในวันที่ 28 หลังการผสมเทียมด้วยชุดทดสอบ IDEXX Milk Pregnancy Test (IDEXX Laboratories, Inc., USA) ด้วยเทคนิค ELISA ทำการปิเปตตัวอย่างน้ำนมตัวควบคุมผลบวก (positive control) และตัวควบคุมผลลบ (negative control) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ลงในภาชนะทดสอบที่เคลือบแต่ละหลุมด้วยแอนติบอดีต่อ PAGs (anti-PAGs capture antibody) จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (biotinylated antibody) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติมคอนจูเกต (horseradish peroxidase) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติมซับสเตรท (TMB substrate) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาทั้งหมดด้วย stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร สังเกตการเปลี่ยนสีของตัวอย่างในหลุมทดสอบโดยจะแปรผันตรงกับปริมาณของ PAGs ในตัวอย่าง อ่านผลการทดสอบที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง

spectrophotometer คำนวณค่า S-N value ในตัวอย่างทดสอบ โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง หักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ negative control ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (sample OD – negative control OD) และแปลผลการทดสอบดังนี้

S-N value < 0.100	หมายถึง โคไม่ตั้งท้อง (open)
S-N value $\geq$ 0.250	หมายถึง โคตั้งท้อง (pregnant)
S-N value = 0.100-0.250	หมายถึง สงสัย ควรทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม (recheck)

การตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์และการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก

ตรวจการตั้งท้องในแม่โคทุกตัวด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ในวันที่ 45 หลังการผสมเทียมและล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักในวันที่ 60 หลังการผสมเทียมเพื่อยืนยันการตั้งท้อง บันทึกผลการตรวจการตั้งท้องของแม่โคทุกตัว

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลของโคทั้งหมดที่ทำการศึกษารวมทั้งสิ้น 31 ตัวอย่าง โดยบันทึกข้อมูลทั่วไปของโค ได้แก่ อายุ และลำดับท้องของโค อุณหภูมิทางทวารหนัก อุณหภูมิพื้นผิwr่างกายและอุณหภูมิในน้ำนม วันละ 2 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 28 หลังการผสมเทียม และคำนวณอุณหภูมิเฉลี่ย (เช้าและเย็น) ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่ส่งตรวจในวันที่ 0, 5, 10, 15 และ 28 หลังการผสมเทียม ปริมาณ PAGs ในตัวอย่างน้ำนมวันที่ 28 หลังการผสมเทียม และผลการตรวจการตั้งท้องที่ยืนยันด้วยวิธีอัลตราซาวด์และการล้วงตรวจทางทวารหนักในวันที่ 45 และ 60 หลังการผสมเทียม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลอายุ ลำดับท้อง อุณหภูมิแกนกลางร่างกาย อุณหภูมิพื้นผิwr่างกาย (อุณหภูมิด้านข้างลำตัว บริเวณซี่โครงคู่ที่ 13 ด้านซ้าย อุณหภูมิฐานเต้านมด้านซ้าย อุณหภูมิช่องรูหูด้านซ้ายและอุณหภูมิดวงตา ด้านซ้าย) อุณหภูมิในน้ำนม ปริมาณโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนมและปริมาณ PAGs ในตัวอย่างน้ำนมในรูปแบบสถิติเชิงพรรณนา แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ standard deviation; SD) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา ได้แก่ อายุและลำดับท้อง ระดับฮอร์โมน PAGs ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 10, 15 และ 28 หลังการผสมเทียม และระดับฮอร์โมน PAGs ที่เก็บตัวอย่างในวันที่ 28 ระหว่างกลุ่มโคที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง ด้วยวิธี unpaired t-test

นอกจากนี้ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอุณหภูมิแกนกลางร่างกาย อุณหภูมิพื้นผิwr่างกายที่ตำแหน่งต่างๆ และอุณหภูมิในน้ำนมที่เก็บตัวอย่างระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 28 หลังการผสมเทียมและค่าเฉลี่ยอุณหภูมิในแต่ละวัน ระหว่างกลุ่มโคที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้องในแต่ละช่วงเวลาด้วยวิธี two-way repeated measure ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างแต่ละคู่ของข้อมูล (post-hoc analysis) ด้วยวิธี Sidák's method ร่วมกับการหาความ

แตกต่างของอุณหภูมิเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิในวันก่อนหน้า โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะพิจารณาเมื่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเทียบกับวันก่อนหน้ามากกว่า 2 เท่าของค่า standard error (SE) ตามวิธีการของ Gil et al. (2001) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำนม ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิพื้นผิวร่างกายที่วัดแต่ละตำแหน่ง และค่าเฉลี่ยอุณหภูมิแกนกลางร่างกายตั้งแต่วันที่ 1-28 หลังการผสมเทียม และหาค่า r ระหว่างผลการตั้งท้องที่ยืนยันด้วยวิธีอัลตราซาวด์และการล้วงทางทวารหนัก อุณหภูมิทางทวารหนัก การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทางทวารหนักเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้า อุณหภูมิน้ำนม การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำนมเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้า ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และระดับของ PAGs ในวันที่ 5, 10, 15 และ 28 หลังการผสมเทียม ด้วยวิธี Spearman's rank correlation และพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ การแปรผลระดับความสัมพันธ์ของค่า r อ้างอิงตามการศึกษาของ Mukaka (2012) โดยแบ่งเป็น ไม่มีความสัมพันธ์กัน ($r=0-0.3$) ความสัมพันธ์ระดับต่ำ ($r=0.3-0.5$) ความสัมพันธ์ระดับปานกลาง ($r=0.5-0.7$) ความสัมพันธ์ระดับสูง ($r=0.7-0.9$) และความสัมพันธ์ระดับสูงมาก ($r=0.9-1.0$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ข้อมูลประชากรโคที่ทำการศึกษาและการตรวจการตั้งท้องทางห้องปฏิบัติการด้วยการวัดระดับโปรตีน PAGs และระดับโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำนม

จากข้อมูลทั่วไปของโคทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจำนวนทั้งสิ้น 31 ตัว พบว่าโคมีอายุเฉลี่ย ($\pm$ SD) 4.1 ± 1.2 ปี และมีลำดับท้องเฉลี่ยที่ 2.8 ± 1.0 (Table 1) โดยเมื่อตรวจยืนยันการตั้งท้องด้วยวิธีอัลตราซาวด์และล้วงตรวจทางทวารหนักในวันที่ 45 และ 60 หลังการผสมเทียมพบว่า มีโคตั้งท้องจำนวนทั้งสิ้น 5 ตัว คิดเป็นร้อยละ 16.13 และโคไม่ตั้งท้องทั้งสิ้น 26 ตัวคิดเป็นร้อยละ 83.87 แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มตามผลการตรวจยืนยันการตั้งท้อง ได้แก่ กลุ่มโคตั้งท้องและกลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้อง

Table 1 Demographic profile of cows used in this study comparing between pregnant and non-pregnant groups (mean $\pm$ SD).

Parameters	Pregnant group	Non-pregnant group	p-value
Number (heads)	5 (16.13%)	26 (83.87%)	-
Age (years)	4.3 ± 1.2	4.1 ± 1.2	0.16
Number of parity	4.3 ± 0.8	2.8 ± 1.0	0.32
S-N value of PAGs test at day 28 post AI	0.82 ± 0.48	0.03 ± 0.06	< 0.001
Progesterone level at day 28 post AI (ng/mL)	1.44 ± 0.21	0.91 ± 0.11	0.04

เมื่อพิจารณาในกลุ่มโคไม่ตั้งท้อง พบว่าโคมีอายุเฉลี่ย 4.1 ± 1.2 ปีและมีค่าเฉลี่ยลำดับท้องที่ 2.8 ± 1.0 ส่วนกลุ่มโคตั้งท้อง โคมีอายุเฉลี่ย 4.3 ± 1.2 ปี และมีค่าเฉลี่ยลำดับท้องที่ 4.3 ± 0.8 ซึ่งข้อมูลทั่วไปของโคทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าประชากรที่คัดเลือกเข้ามาในโครงการวิจัยไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ จากผลการตรวจวินิจฉัยการตั้งท้องในห้องปฏิบัติการโดยใช้ระดับ PAGs จากตัวอย่างน้ำนมที่เก็บในวันที่ 28 หลังการผสมเทียม ในกลุ่มโคที่ตั้งท้องมีค่าเฉลี่ย S-N value สูงกว่ากลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้องอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.82 ± 0.48 และ 0.03 ± 0.06 ตามลำดับ ทั้งนี้ พบว่าโคทุกตัวที่มีระดับ PAGs บ่งชี้ว่าตั้งท้อง ได้รับการตรวจยืนยันว่าตั้งท้องจริงจากการอัลตราซาวด์และล้างตรวจทางทวารหนักทั้งหมด จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าระดับ PAGs ในตัวอย่างน้ำนมสามารถใช้วินิจฉัยการตั้งท้องระยะต้นในวันที่ 28 หลังจากการผสมเทียมได้และมีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนในกลุ่มตั้งท้อง

การตรวจวัดระดับโปรตีน PAGs ถือเป็นหนึ่งในการตรวจการตั้งท้องและสามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพการผสมเทียมในโคได้ (Barbato et al., 2022) เนื่องจากฮอร์โมนดังกล่าวถูกสังเคราะห์จากเซลล์ทรอโฟบลาสต์ (trophoblast) ทั้งชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononucleated trophoblast) และชนิดนิวเคลียสคู่ (binucleated trophoblast) (Touzard et al., 2013) โดยพบการแสดงออกได้มากในชั้น epithelial cell ของรกในสัตว์กีบคู่รวมทั้งในโค (Green et al., 2000) จากการศึกษาของ Romano and Larson (2010) รายงานว่าการตรวจการตั้งท้องด้วยการวัดระดับ PAGs ในวันที่ 28 หลังการผสมเทียมมีความไวในการตรวจการตั้งท้อง (sensitivity) สูงถึงร้อยละ 93.9 และมีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 95.5 อย่างไรก็ตามในการศึกษาี้พบว่าโคที่ตรวจ PAGs และให้ผลเป็น recheck จำนวนทั้งสิ้น 4 ตัว ซึ่งมีค่า S-N value อยู่ในช่วงระหว่าง 0.162-0.243 คิดเป็นค่าเฉลี่ย S-N value 0.20 ± 0.04 แต่เมื่อตรวจยืนยันการตั้งท้องด้วยการใช้อัลตราซาวด์และล้างตรวจทางทวารหนักแล้วพบว่าไม่ตั้งท้อง ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการเกิดการสูญเสียตัวอ่อนในช่วงระยะต้นของการตั้งท้อง ทำให้มีการปรากฏของโปรตีนที่สร้างจากรกขึ้นแล้วแต่ยังมีปริมาณไม่สูงมากพอ (Ricci et al., 2015) ดังนั้นผลการตรวจการตั้งท้องด้วยโปรตีน PAGs ในวันที่ 28 หลังการผสมเทียม ถึงแม้จะเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะที่สูง แต่อาจไม่ใช้ในการยืนยันการตั้งท้องด้วยวิธีเดียวได้

เมื่อพิจารณาแนวโน้มของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน พบว่าทั้งสองกลุ่มมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนคล้ายคลึงกัน โดยในวันที่ 0 ค่าเฉลี่ยฮอร์โมนจะมีค่าต่ำสุดและจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและสูงสุดในวันที่ 15 หลังการผสมเทียม จากนั้นระดับฮอร์โมนจะลดต่ำลงในวันที่ 28 และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 28 ระหว่างกลุ่มตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง ($p < 0.05$) (Figure 1) โดยในวันที่ 28 โคที่ตั้งท้องมีระดับฮอร์โมนเฉลี่ยอยู่ที่ 1.44 ± 0.21 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าระดับฮอร์โมนในโคที่ไม่ตั้งท้อง (0.91 ± 0.11 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

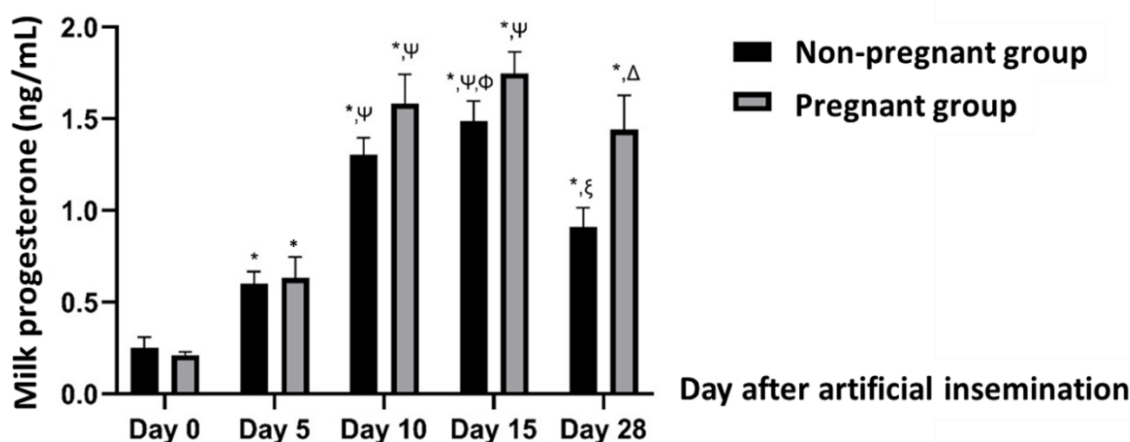


Figure 1 Bar graph shows the level of milk progesterone between pregnant and non-pregnant groups on day 0, 5, 10, 15, and 28 after artificial insemination.

* indicates $p < 0.05$ compared to day 0 within the same group

ψ indicates $p < 0.05$ compared to day 5 within the same group

ϕ indicates $p < 0.05$ compared to day 10 within the same group

ξ indicates $p < 0.05$ compared to day 15 within the same group

Δ indicates $p < 0.05$ compared to non-pregnant group on the same day

เมื่อเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในกลุ่ม ทั้งภายในกลุ่มโคที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง ระดับฮอร์โมนในวันที่ 5, 10, 15 และ 28 จะมีค่าสูงกว่าวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามในกลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้อง ระดับฮอร์โมนในวันที่ 28 จะลดลงจากวันที่ 15 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งไม่พบความแตกต่างนี้ในกลุ่มโคที่ตั้งท้อง โดยระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนี้นั้นมีผลโดยตรงต่อกระบวนการตั้งท้องและอัตราการผสมติด (Omontese et al., 2020) โดยสามารถพบว่าโคที่ผสมติดจะมีระดับฮอร์โมนสูงกว่าโคที่ไม่ผสมติดได้ตั้งแต่ช่วง 7 วันหลังการผสมเทียม นอกจากนี้ ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ลดต่ำลงในช่วงวันที่ 19-24 หลังการผสมเทียมจะสามารถใช้ทำนายการไม่ตั้งท้องในโคได้ โดยมีค่าความแม่นยำคิดเป็นร้อยละ 95 (O'Connor, 1998) ทั้งนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ จะเริ่มเห็นความแตกต่างของระดับฮอร์โมนระหว่างกลุ่มโคที่ตั้งท้องกับไม่ตั้งท้องในวันที่ 28 หลังการผสมเทียม และเริ่มเห็นการลดลงของระดับฮอร์โมนในช่วงวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้อง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากประชากรที่ใช้ในการศึกษานี้มีขนาดเล็กและมีจำนวนโคในกลุ่มที่ตั้งท้องไม่มากนัก

การเปรียบเทียบค่าอุณหภูมิแกนกลาง อุณหภูมิน้ำนมและอุณหภูมิพื้นผิวร่างกายที่ตำแหน่งต่างๆ ในกลุ่มโคที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง และศึกษาความสัมพันธ์เทียบกับอุณหภูมิแกนกลาง

ทำการวัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกาย อุณหภูมิน้ำนม และอุณหภูมิพื้นผิวร่างกายจำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ด้านข้างลำตัว ด้านหน้าด้านซ้าย ช่องหูด้านซ้ายและดวงตาด้านซ้ายตั้งแต่วันที่ 1-28 หลังการผสมเทียมในกลุ่ม

โคตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง (Table 2) ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิในทุกตำแหน่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิตั้งแต่วันที่ 1-28 หลังการผสมเทียม จึงไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการแยกความแตกต่างระหว่างโคตั้งท้องและไม่ตั้งท้องได้

Table 2 The average temperatures of pregnant and non-pregnant groups from day 1-28 post artificial insemination, measured at six different areas (rectum, milk, left body at rib 13th, left udder, left ear canal, and left eye) (mean±SD).

Groups	Area of temperature measurement					
	Rectum	Milk	Left body (Rib 13 th)	Left udder	Left ear canal	Left eye
Pregnant	38.36±0.19 ^a	37.30±0.57 ^b	36.83±0.16 ^c	36.95±0.29 ^c	36.64±0.18 ^d	36.89±0.19 ^d
Non-pregnant	38.44±0.09 ^a	37.19±0.42 ^b	36.83±0.09 ^{bc}	37.03±0.11 ^{bc}	36.57±0.08 ^{bd}	36.82±0.09 ^{bd}

a, b, c, d Different letters in the same column and row indicate significant differences between groups at the $p < 0.05$.

เมื่อพิจารณาภายในกลุ่ม พบว่าทั้งในกลุ่มโคตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง อุณหภูมิวัดทางทวารหนักจะมีค่าสูงที่สุด เนื่องจากการวัดอุณหภูมิแกนกลางภายในร่างกายและมีอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมภายนอกน้อยกว่าตำแหน่งอื่น และอุณหภูมิน้ำนมจะเป็นอุณหภูมิที่มีค่ารองลงมา โดยในกลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้อง อุณหภูมิน้ำนมจะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายที่วัดในตำแหน่งอื่น แต่ในกลุ่มโคตั้งท้องจะพบความแตกต่างของอุณหภูมิน้ำนมเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งพื้นผิวอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำนมที่วัดด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิพื้นผิวทั้ง 4 ตำแหน่งที่วัดด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด และค่าเฉลี่ยอุณหภูมิแกนกลางร่างกายจากการวัดทางทวารหนักด้วยเทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอทโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) (Figure 2) พบว่า อุณหภูมิที่วัดจากตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน จะมีความสัมพันธ์อยู่ในระดับปานกลางเชิงบวก (มากกว่า 0.5 ขึ้นไป) เช่น อุณหภูมิระหว่างดวงตาและช่องรูหู ($r = 0.73$, $p < 0.05$) และอุณหภูมิระหว่างเต้านมและด้านข้างลำตัวบริเวณซี่โครง ($r = 0.54$, $p < 0.05$) นอกจากนี้ อุณหภูมิด้านข้างลำตัวบริเวณซี่โครงยังมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิดวงตาและอุณหภูมิช่องรูหูอย่างมาก โดยมีค่า r เป็น 0.74 และ 0.77 ตามลำดับ โดยการวัดอุณหภูมิในทุกคู่จะมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

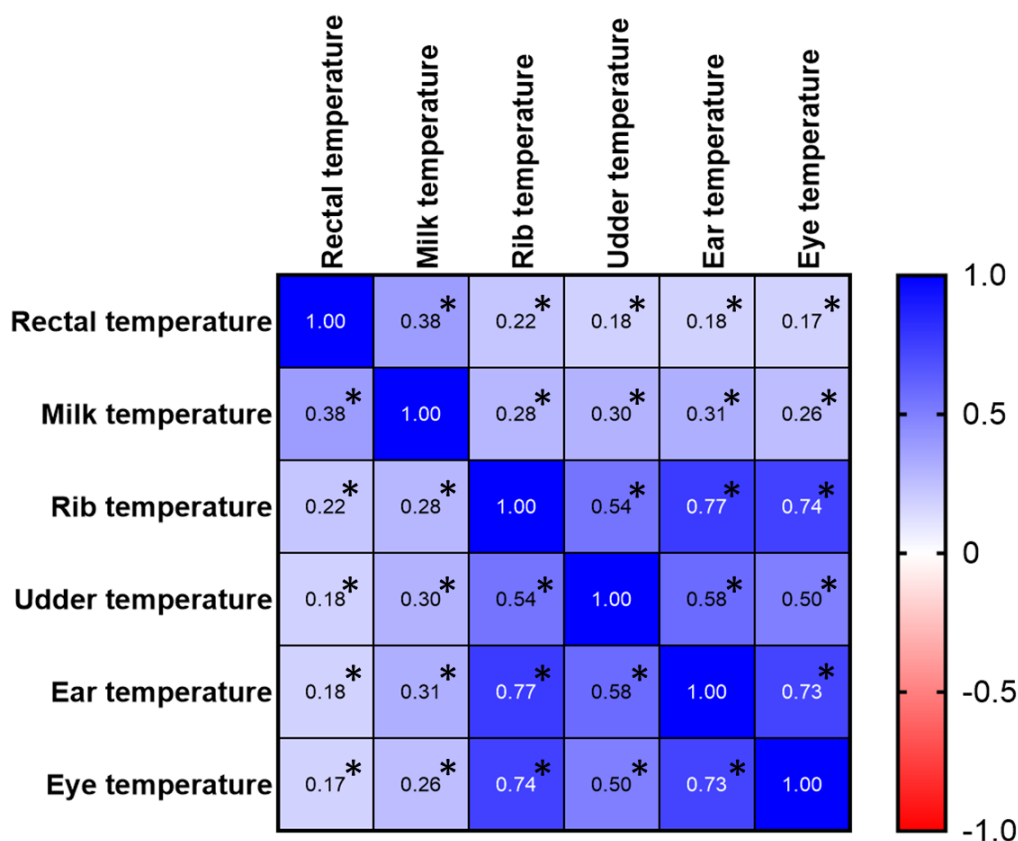


Figure 2 The Spearman correlation coefficient (r) of the averages of rectal temperature, milk temperature and surface temperature, measured at 4 areas (left body at rib13, left udder, left ear canal and left eye) from day 1 - 28 after artificial insemination.

* indicates correlation values with a p -value < 0.05 . and the level of correlation was categorized as follows: negligible ($r=0-0.3$), low ($r=0.3-0.5$), moderate ($r=0.5-0.7$), high ($r=0.7-0.9$) and very high ($r=0.9-1.0$) correlation.

ทั้งนี้ เมื่อประเมินระดับความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิทางทวารหนักซึ่งเป็นตำแหน่งมาตรฐานในการวัดอุณหภูมิแกนกลางร่างกายกับอุณหภูมิน้ำนม พบว่ามีค่า r มากที่สุดเมื่อเทียบกับการวัดอุณหภูมิพื้นผิวยังร่างกายในตำแหน่งอื่นๆ โดยมีค่าความสัมพันธ์ในระดับต่ำเชิงบวก ($r=0.38$, $p<0.05$) (Figure 2) โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้เช่นกันที่รายงานความสัมพันธ์ของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายทางทวารหนักและอุณหภูมิน้ำนม แต่มีค่าความสัมพันธ์ในระดับสูงเชิงบวก ($r=0.87$) (West et al., 2003) อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิพื้นผิวยังร่างกายที่วัดด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดในการศึกษานี้ ยังคงได้ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิแกนกลางมากกว่าการศึกษานี้ (Berry et al., 2003; Venjakob et al., 2016; Carvalho et al., 2019; Shu et al., 2022) ซึ่งความแตกต่างของอุณหภูมิที่วัดได้ในแต่ละการศึกษาอาจเป็นผลมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ความแตกต่างของสถานที่เลี้ยงสัตว์ สภาพภูมิอากาศของแต่ละพื้นที่ที่ทำการศึกษาและความเครียดที่เกิดกับโคในขณะที่มีการวัดอุณหภูมิ

(Crump et al., 2022) ดังนั้น แม้ว่าความสัมพันธ์ของอุณหภูมิที่วัดจากน้ำนมและทางทวารหนักจะมีค่าไม่สูงมากนักในการศึกษารุ่นนี้ แต่ยังคงมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกและมีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบการวัดอุณหภูมิพื้นผิwr่างกายที่ตำแหน่งอื่นๆ ในการศึกษานี้จึงได้ใช้อุณหภูมิน้ำนมมาเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการหาความสัมพันธ์กับการตั้งท้องในโค ร่วมกับอุณหภูมิแกนกลางร่างกาย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายที่วัดทางทวารหนักและอุณหภูมิน้ำนมในกลุ่มโคตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง

ทำการศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละวัน (temperature dynamics) ตั้งแต่วันที่ 1-28 หลังการผสมเทียม ดังแสดงใน Figure 3 ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มโคที่ตั้งท้องจะไม่พบรูปแบบของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงจากวันก่อนหน้าอย่างชัดเจนในช่วงระหว่างวันที่ 1-25 หลังการผสมเทียม แต่ในช่วงระหว่างวันที่ 26-28 จะพบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อเทียบกับวันก่อนหน้ามากกว่าร้อยละ 0.5 โดยในวันที่ 27 จะพบการลดลงของอุณหภูมิเมื่อเทียบกับวันที่ 26 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 0.64 (0.2 องศาเซลเซียส) และในวันที่ 28 จะพบการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเมื่อเทียบกับวันที่ 27 คิดเป็นร้อยละ 0.82 (0.3 องศาเซลเซียส) ส่วนในกลุ่มที่ไม่ตั้งท้อง จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้าเลย รวมทั้งในช่วงวันที่ 26-28 หลังการผสมเทียม

นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิแกนกลางร่างกายระหว่างกลุ่มตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง จะพบความแตกต่างของอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในวันที่ 27 หลังผสมเทียม โดยโคไม่ตั้งท้องจะมีอุณหภูมิเฉลี่ย 38.52 ± 0.09 และโคที่ตั้งท้องจะมีอุณหภูมิเฉลี่ย 38.07 ± 0.10 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Figure 3A) อย่างไรก็ตาม การลดลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายจะในวันที่ 27 หลังการผสมเทียมในโคที่ตั้งท้องที่พบในครั้งนี้ ยังไม่เคยมีรายงานปรากฏในการศึกษาก่อนหน้า แต่สามารถพบได้การลดลงของอุณหภูมิเช่นกันในการวัดอุณหภูมิที่กระเพาะอาหารส่วนเรติคิวลัม (Bewley et al., 2008) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์ระดับสูงเชิงบวกต่ออุณหภูมิแกนกลางร่างกายที่วัดบริเวณทวารหนัก ($r = 0.645$) (Kim et al., 2021) ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงเวลาที่มีการสร้างรกขึ้น (cotyledon formation) โดยจะเริ่มเห็นการปรากฏของรกโคได้ในช่วงวันที่ 30 และการสร้างรกสมบูรณ์ในช่วงวันที่ 190 ของการตั้งท้อง (Davenport et al., 2023) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ของปรากฏการณ์ดังกล่าวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิร่างกายในแม่โคต่อไป ซึ่งอาจจะสามารถนำความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อการปรากฏของรกมาใช้ในการทำนายการตั้งท้องในโคได้

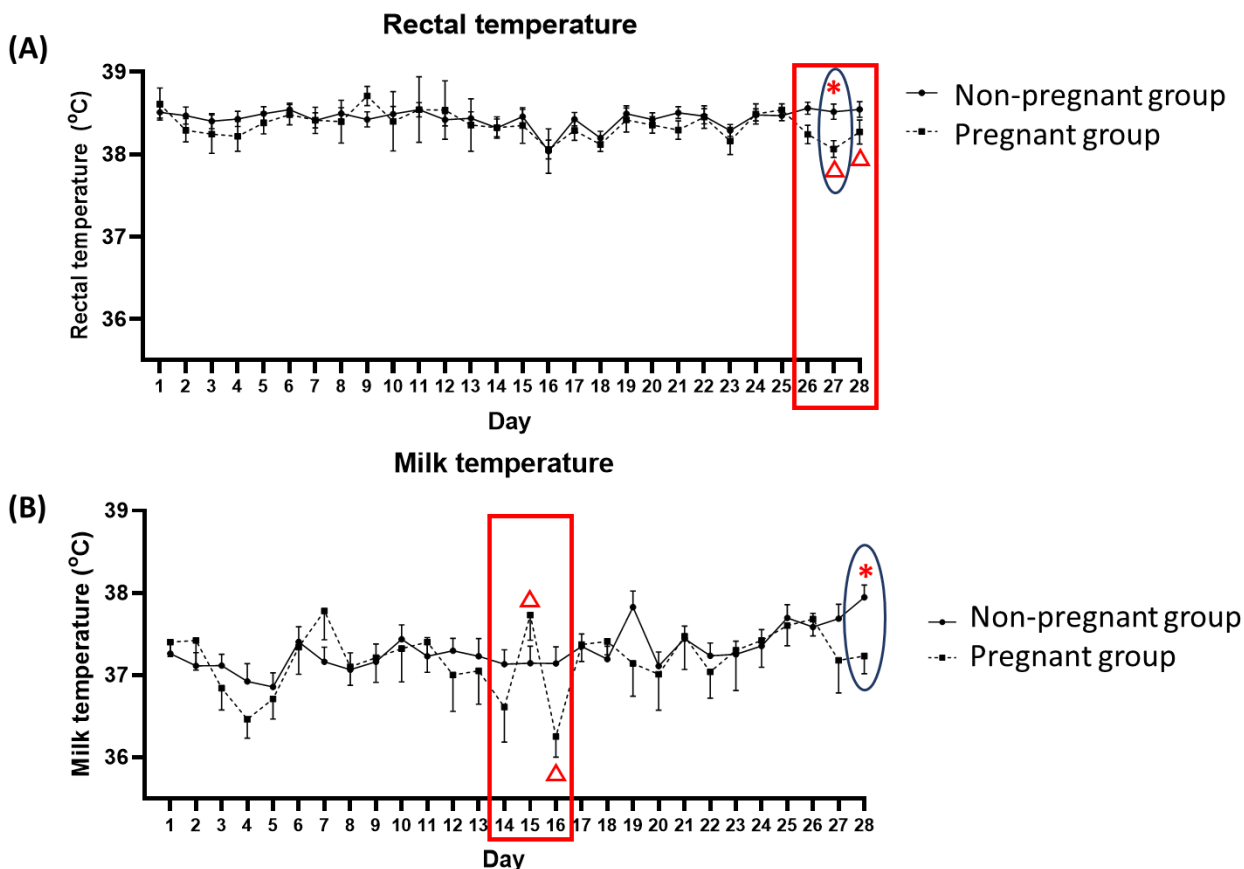


Figure 3 Temperature dynamics of non-pregnant and pregnant groups throughout 28 days after artificial insemination, recorded from (A) rectum and (B) collected milk. Data are represented as mean $\pm$ S.E.

Δ indicates temperature changing more than two times of S.E. from the previous day ($p < 0.05$)

* indicates $p < 0.05$ comparing between pregnant and non-pregnant groups on the same day after artificial insemination.

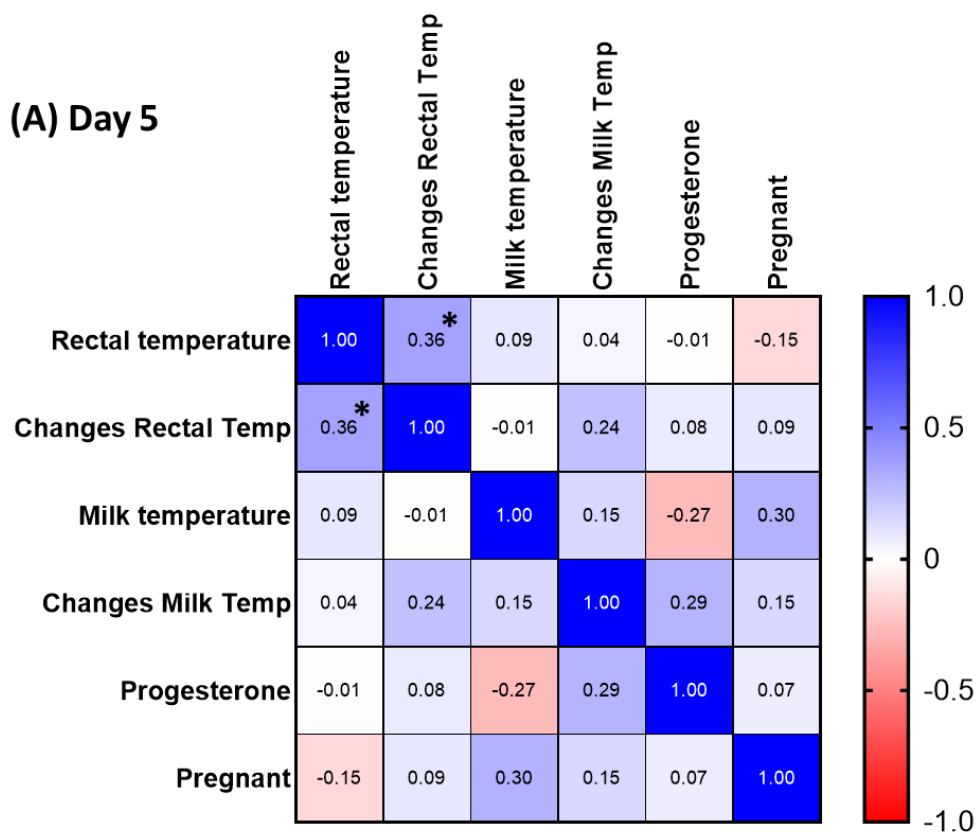
ในส่วนของอุณหภูมิน้ำนมที่วัดโดยเครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรดนั้น การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างชัดเจนในช่วงระหว่างวันที่ 14-16 หลังการผสมเทียมในกลุ่มโคที่ตั้งท้อง โดยในวันที่ 15 กลุ่มโคที่ตั้งท้องมีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 2 เท่าของค่า S.E. เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 14 ($p < 0.05$) คิดเป็นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพิ่มขึ้นร้อยละ 4.31 (1.6 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ ในวันที่ 16 ยังพบการลดลงของค่าเฉลี่ยอุณหภูมิมากกว่า 2 เท่าของค่า S.E. เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 15 ($p < 0.05$) โดยคิดเป็นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิลดลงร้อยละ 3.91 (1.5 องศาเซลเซียส) (Figure 3B.) ส่วนในกลุ่มที่ไม่ตั้งท้อง จะไม่พบความแตกต่างของอุณหภูมิเลยตั้งแต่วันที่ 1-28 หลังการผสมเทียม จากการศึกษาของ Gil et al. (2001) รายงานการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำนมในโคว่าในกลุ่มโคที่ตั้งท้องจำนวนร้อยละ 88.30 เพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำนมอย่างมี

นัยสำคัญในช่วงระหว่างวันที่ 5, 6 หรือ 7 หลังการผสมเทียม โดยพบการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำนม 0.64 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำนมวันก่อนหน้า โดยในช่วงวันที่ 15-16 หลังการผสมเทียมเป็นต้นไป จะเป็นช่วงเวลาที่เริ่มเกิดการรับรู้การตั้งครรภ์ในแม่โค (pregnancy recognition) และเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างมดลูกของแม่ในชั้น endometrium และตัวอ่อน ซึ่งสามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านร่างกายต่างๆในแม่โคได้ รวมถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ (Sánchez et al., 2019) นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิน้ำนมระหว่างกลุ่มโคที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง ในกลุ่มโคที่ตั้งท้องยังพบการลดลงของอุณหภูมิน้ำนม เมื่อเทียบกับโคในกลุ่มไม่ตั้งท้องในวันที่ 28 หลังการผสมเทียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีอุณหภูมิ 37.23 ± 0.22 และ 37.94 ± 0.15 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งการลดลงของอุณหภูมิน้ำนมในช่วงเวลาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการพบการลดลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายเช่นกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลาง อุณหภูมิน้ำนม อุณหภูมิพื้นผิวที่ตำแหน่งต่างๆ และการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนต่อการประเมินการตั้งท้อง

ทำการศึกษาตัวแปรทั้งหมดในการศึกษานี้เพื่อหาความสัมพันธ์ต่อผลการตั้งท้องในโคซึ่งยืนยันด้วยวิธีอัลตราซาวด์และการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก ได้แก่ ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน อุณหภูมิแกนกลางที่วัดทางทวารหนัก อุณหภูมิแกนกลางที่วัดทางทวารหนักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้า อุณหภูมิน้ำนม และอุณหภูมิน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้า และระดับโปรตีน PAGs ทำการเปรียบเทียบในวันที่ 5, 10, 15 และ 28 หลังผสมเทียม หาความสัมพันธ์และแสดงผลโดยใช้ heat map ดังแสดงใน Figure 4 และ Figure 5

(A) Day 5



(B) Day 10

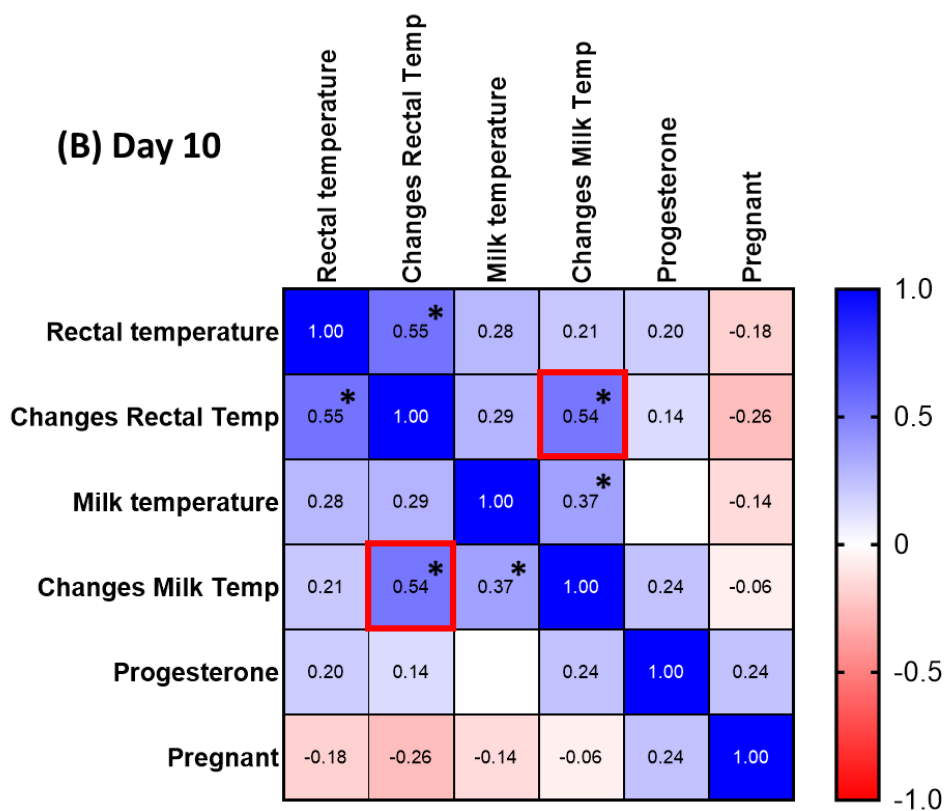


Figure 4 Heat map illustrates the Spearman's correlation coefficient (r) between the rectal temperature, changes in rectal temperature, milk temperature, changes in milk temperature, progesterone level and the pregnancy result of the cows on (A) day 5 and (B) day 10 post artificial insemination.

* indicates correlation values with a p -value < 0.05 and the level of correlation was categorized as follows: negligible ($r=0-0.3$), low ($r=0.3-0.5$), moderate ($r=0.5-0.7$), high ($r=0.7-0.9$) and very high ($r=0.9-1.0$) correlation.

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 5 และ 10 หลังการผสมเทียม ไม่มีตัวแปรใดที่มีความสัมพันธ์กับการตั้งท้อง ($p>0.05$) (Figure 4A และ Figure 4B) แต่พบความสัมพันธ์ระดับปานกลางเชิงบวกระหว่างการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแกนกลางที่วัดทางทวารหนักเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้าและอุณหภูมิน้ำนมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 10 หลังการผสมเทียม ($r=0.54$, $p<0.05$)

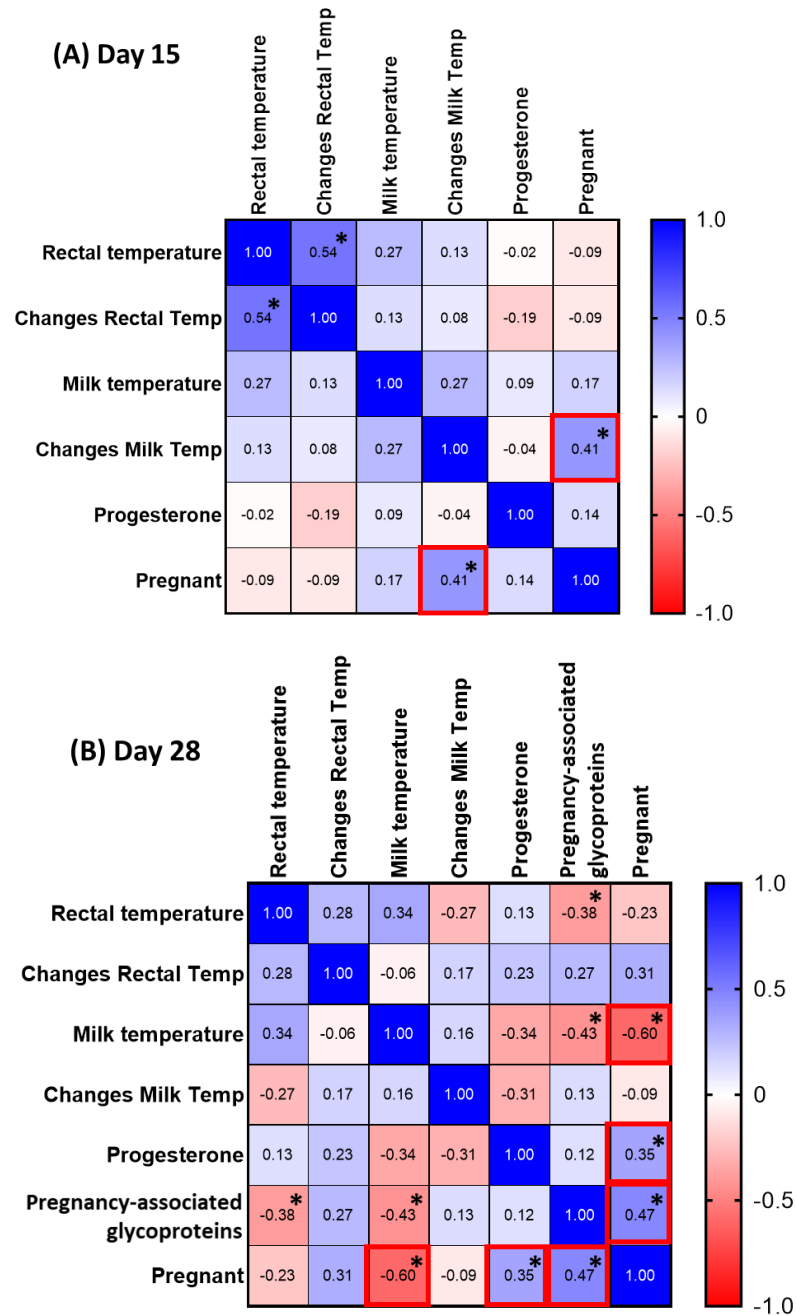


Figure 5 Heat map illustrates the Spearman's correlation coefficient (r) between the rectal temperature, changes in rectal temperature, milk temperature, changes in milk temperature, progesterone level, pregnancy-associated glycoproteins level and the pregnancy result of the cows on (A) day 15 and (B) day 28 post artificial insemination. * indicates correlation values with a p -value < 0.05 , and The level of correlation was categorized as follows: negligible ($r=0-0.3$), low ($r=0.3-0.5$), moderate ($r=0.5-0.7$), high ($r=0.7-0.9$) and very high ($r=0.9-1.0$) correlation.

ในวันที่ 15 พบว่าผลการตั้งท้องมีความสัมพันธ์ระดับต่ำเชิงบวกกับอุณหภูมิน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.41$, $p<0.05$) (Figure 5A) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่แสดงใน Figure 3B การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำนมในวันที่ 15 เมื่อเทียบกับวันก่อนหน้ามีความสัมพันธ์กับผลการตั้งท้องและสามารถใช้เป็นเครื่องมือหนึ่งในการประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคได้ นอกจากนี้ ในวันที่ 28 หลังการผสมเทียมพบว่าผลการตั้งท้องมีความสัมพันธ์ระดับปานกลางเชิงลบกับอุณหภูมิน้ำนม ($r=-0.60$, $p<0.05$) และมีความสัมพันธ์ระดับต่ำเชิงบวกกับระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ($r=0.35$, $p<0.05$) และระดับโปรตีน PAGs ($r=0.47$, $p<0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 5B)

ดังนั้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและโปรตีน PAGs ในวันที่ 28 สามารถใช้ในการประเมินการตั้งท้องได้ นอกจากนี้ การติดตามวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำนมในวันที่ 14 - 16 ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางในวันที่ 26 - 28 สามารถใช้เป็นอีกวิธีหนึ่งในการประเมินการตั้งท้องระยะต้นในโคได้เช่นกัน โดยจากการศึกษาก่อนหน้ากล่าวว่าเมื่อโคได้รับการผสมเทียมแล้วจะมีกลไกของร่างกายเพื่อตอบสนองและรองรับการตั้งท้องเกิดขึ้นในแม่โค โดยมีการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิดพลอสตาแกลนดินชนิดอีทู (prostaglandin E₂; PGE₂) ในกระแสเลือดของแม่เมื่อมีตัวอ่อนปรากฏอยู่ภายในมดลูก (Thatcher et al., 1984; Lemley et al., 2021) ซึ่งสารสื่ออักเสบดังกล่าวมีคุณสมบัติให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิหรือทำให้เกิดอาการไข้ (pyrogen) (Vane, 1971) ส่งผลให้พบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายและอุณหภูมิน้ำนมในกลุ่มโคที่ตั้งท้องได้ นอกจากนี้ PGE₂ ยังมีบทบาทในการกดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแม่โค (immunosuppression) ได้อีกด้วย ซึ่งจะช่วยลดการกระบวนการปฏิเสธตัวอ่อนที่เคลื่อนเข้ามาสู่โพรงมดลูก (embryo rejection) ทำให้ตัวอ่อนเกิดการฝังตัวที่สมบูรณ์ และสามารถตั้งท้องต่อไปได้ (Tomaszewska and Przekop, 1997) อย่างไรก็ตาม การพบการลดลงของอุณหภูมิน้ำนมในวันที่ 28 หลังการผสมเทียมในการศึกษานี้ มีความสอดคล้องกับการลดลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายในโคที่ตั้งท้อง การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาความสัมพันธ์ของการปรากฏของรกในช่วงเวลาดังกล่าวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ จึงมีความน่าสนใจเพื่อช่วยอธิบายกลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น การตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและ/หรือระดับของ PAGs ในตัวอย่างน้ำนมสามารถทำควบคู่กันกับการวัดอุณหภูมิร่างกายที่เปลี่ยนแปลงได้ เพื่อให้การประเมินการตั้งท้องระยะต้นมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลอง

1. การวัดอุณหภูมิพื้นผิวร่ากายที่ตำแหน่งต่างๆไม่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิแกนกลาง โดยอุณหภูมิหน้ามมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิแกนกลางมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งพื้นผิวอื่นๆ โดยเป็นความสัมพันธ์ในระดับต่ำ
 2. ในกลุ่มโคตั้งท้อง จะพบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางที่วัดทางทวารหนักในวันที่ 26-28 และอุณหภูมิหน้ามในวันที่ 14-16 เมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนหน้า โดยในโคที่ไม่ตั้งท้องจะไม่พบรูปแบบการเปลี่ยนของอุณหภูมิดังกล่าว นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโคตั้งท้องและไม่ตั้งท้องจะพบว่าอุณหภูมิร่างกายและหน้ามของโคตั้งท้องจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 27 และ 28 ตามลำดับ
 3. พบความสัมพันธ์ระดับต่ำของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหน้ามในวันที่ 15 และความสัมพันธ์ระดับปานกลางของการลดลงของอุณหภูมิหน้ามในวันที่ 28 หลังการผสมเทียมต่อการตั้งท้อง ซึ่งการตั้งท้องมีความสัมพันธ์ระดับต่ำกับระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและระดับโปรตีน PAGs ในวันที่ 28 เช่นกัน
- ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายรวมกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหน้ามจึงสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีหนึ่งในการประเมินการตั้งท้องช่วงระยะต้นในโคได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการประยุกต์ใช้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแกนกลางร่างกายและอุณหภูมิหน้ามในการบ่งชี้การตั้งท้องในโค อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งสองตำแหน่งต่อการตั้งท้องยังเป็นความสัมพันธ์ในระดับที่ไม่สูงมากนัก ในการใช้ประโยชน์ในพื้นที่จึงยังคงจำเป็นต้องใช้วิธียืนยันการตั้งท้องอื่นๆร่วมด้วย ดังนั้น เพื่อให้ผลการศึกษามีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ควรมีการตรวจวัดระดับฮอร์โมนอื่นๆที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เช่น ฮอร์โมน PGE2 หรือสารสื่ออักเสบต่างๆ นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการลดลงของอุณหภูมิร่างกายและอุณหภูมิหน้ามในช่วงวันที่ 28 หลังการผสมเทียมว่ามีความสอดคล้องกับกระบวนการสร้างรกหรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอื่นๆ ในร่างกายของแม่โคเพื่อตอบสนองต่อการตั้งท้องหรือไม่ ทั้งนี้ ในการศึกษานี้มีจำนวนตัวอย่างขนาดเล็กและโคที่ตั้งท้องมีจำนวนน้อย การศึกษาครั้งต่อไปจึงควรทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีจำนวนมากขึ้น เพื่อให้ผลการทดลองมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อำนวยการ สัตวแพทย์ สัตวบาลและเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี รวมทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ที่ช่วยให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าเก็บตัวอย่างและอำนวยความสะดวกการทำวิจัย ทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2565 จำนวนเกษตรกรและโคนม รายจังหวัด ปี 2565. [Available online]:
https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/yearly/2565/province/T3-1-Dairy.pdf.
- Albaaj, A., J. Durocher, S. J. LeBlanc and S. Dufour. 2022. Meta-analysis of the incidence of pregnancy losses in dairy cows at different stages to 90 days of gestation. *JDS commun*, 4(2): 144–148.
- Barbato, O, L. Menchetti, G. Brecchia and V. L. Barile. 2022. Using pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) to improve reproductive management: from dairy cows to other dairy livestock. *Animals (Basel)*, 12(16): 2033.
- Berry, R. J., A. D. Kennedy, T. Shannon, B. L. Kyle and A. L. Schaefer. 2003. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Can J Anim Sci*, 83: 687–693.
- Bewley, J. M., M. E. Einstein, M. W. Grott and M. M. Schutz. 2008. Comparison of reticular and rectal core body temperatures in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 91(12): 4661-4672.
- Carvalho, C., S. Cordeiro, F. Christian, R. Ribeiro, R. Mendes, C. Dulcinéia, G. Fernandes, D. Felicidade and G. Magalhães. 2019. Using infrared thermography to measure the body surface temperature of crossbred cows and calves in the semi-arid region of Minas Gerais, Brazil. *J Anim Behav Biometeorol*, 7: 132–136.
- Crump, A., K. Jenkins, E. J. Bethell, C. P. Ferris and G. Arnott. 2022. Pasture access and eye temperature in dairy cows. *J Appl Anim Welf Sci*. 13: 1–9.
- Davenport, K. M., M. S. Ortega, G. A. Johnson, H. Seo and T. E. Spencer. 2023. Implantation and placentation in ruminants. *animal*, 17, 100796.
- Ghaidan, M. T., O. I. Dana and H. O. Dyary. 2019. Accuracy of bovine pregnancy-associated glycoproteins (bPAGs) in the diagnosis of pregnancy: A comparative study of three pregnancy diagnostic methods. *Pol J Vet Sci*, 22(4): 769–775.
- Gil, Z., J. Kural, J. Szarek and E. Wierzchoś. 2001. Increase in milk and body temperature of cows as a sign of embryo entry into the uterus. *Theriogenology*, 56(4): 685–697.

- Green, J. A., S. Xie, X. Quan, B. Bao, N. Mathialagan, J. F. Beckers and R. M. Roberts. 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod*, 62: 1624–1631.
- Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, 56(9): 1417–1433.
- Kim, D., J. Ha, W. S. Kwon, J. Moon, G. M. Gim and J. Yi. 2021. Change of ruminoreticular temperature and body activity before and after parturition in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) cows. *Sensors*, 21(23), 7892.
- Lemley, C. O., L. E. Camacho and K. A. Vonnahme. 2021. Maternal Recognition and Physiology of Pregnancy. In *Bovine Reproduction*, RM Hopper (Ed.).
- Mukaka, M. M. 2012. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal*, 24(3): 69-71.
- Murugeswari, S., K. Murugan, S. Rajathi and M. S. Kumar. 2022. Monitoring body temperature of cattle using an innovative infrared photodiode thermometer. *Comput Electron Agric*, 198: 107120.
- Nation, D. P., J. Malmo, G. M. Davis and K. L. Macmillan. 2003. Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Aust Vet J*, 81(1–2): 63–65.
- O'Connor, M. L. 1998. Milk progesterone analysis for determining reproductive status. The Pennsylvania State University Publication DAS
- Omontese, B. O., G. C. Gomes, A. R. Santos, L. G. Silva, V. R. Merenda and R. S. Bisinotto. 2020. Use of on-farm milk progesterone information to predict fertility outcomes in dairy cows subjected to timed artificial insemination. *J Dairy Sci*, 103(7): 6600–6611.
- Pennington, J. A., S. L. Spahr and J. R. Lodge. 1976. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. *J Dairy Sci*, 59(8): 1528–1531.
- Ricci, A., P. D. Carvalho, M. C. Amundson, R. H. Fourdraine, L. Vincenti and P. M. Fricke PM. 2015. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *J Dairy Sci*, 98(4): 2502–2514.

- Romano, J. E., J. A. Thompson, D. W. Forrest, M. E. Westhusin, M. A. Tomaszewski and D. C. Kraemer. 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology*, 66: 1034–1041.
- Romano, J. E. and J. E. Larson. 2010. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology*. 74: 932–939.
- Sánchez, J. M., C. A. Simintiras and P. Lonergan. 2019. Aspects of embryo-maternal communication in establishment of pregnancy in cattle. *Anim Reprod*, 16: 376–385.
- Shu, H., Y. Li, T. Fang, M. Xing, F. Sun, X. Chen, J. Bindelle, W. Wang and L. Guo. 2022. Evaluation of the best region for measuring eye temperature in dairy cows exposed to heat stress. *Front Vet Sci*, 9: 857777.
- Švejsová, K., M. Šoch, A. Šimková, L. Zábranský, P. Novák, J. Brouček, B. Čermák, V. Pálka and K. Šimák-Líbalová. 2013. Measuring the body surface temperature of animals using a thermographic camera. *Acta Univ. Cibiniensis, Ser. E: Food Technol*, 17(2): 99–106.
- Thatcher, W. W., F. F. Bartol, J. J. Knickerbocker, J. S. Curl, D. Wolfenson, F. W. Bazer and R. M. Roberts. 1984. Maternal recognition of pregnancy in cattle¹. *J Dairy Sci*, 67(11): 2797–2811.
- Tomaszewska, D. and F. Przekop. 1997. The immune-neuro-endocrine interactions. *J Physiol Pharmacol*. 48(2): 139–158.
- Touzard, E., P. Reinaud, O. Dubois, C. Guyader-Joly, P. Humblot, C. Ponsart and G. Charpigny. 2013. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction*, 146: 347–362.
- Vane, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231(25): 232–235.
- Venjakob, P. L., S. Borchardt, G. Thiele and W. Heuwieser. 2016. Evaluation of ear skin temperature as a cow-side test to predict postpartum calcium status in dairy cows. *J Dairy Sci*. 99(8): 6542–6549.
- West, J. W., B. G. Mullinix and J. K. Bernard. 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 86(1): 232–242.
- Whitlock, B. K. and H. S. Maxwell. 2008. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle, *Theriogenology*, 70(3): 550–559.

กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2024

JOURNAL
OF
BIOTECHNOLOGY
IN LIVESTOCK PRODUCTION