

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากขั้นตอนการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์เป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะจะทำให้แอนติบอดีมีความเข้มข้นและมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น มีความไว (sensitivity) สูงขึ้นทำให้สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อย ๆ หรือสารที่มีการปนเปื้อนของสารอื่นได้ดี จากกระบวนการผลิตทั้งหมดทำให้ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอสโตรเจนซึ่งเป็นผลผลิตเริ่มต้นที่จะนำไปใช้สร้างกระบวนการวิเคราะห์หาโปรเจสเทอโรนและเอสโตรเจนในพลาสมาแพะเพื่อการตรวจคัดที่แม่นยำ และไม่จำเป็นต้องอาศัยการสังเกตพฤติกรรมเพียงอย่างเดียว โดยใช้วิธี competitive ELISA คือการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ โปรเจสเทอโรน ใช้อัตราส่วนเจือจางที่ 1: 250 และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอสโตรเจนใช้อัตราส่วนเจือจางที่ 1: 64 และอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ P₄-HRP คือ 1: 475,000 และ E₂-HRP คือ 1: 800 เมื่อนำสารละลายโปรเจสเทอโรนและเอสโตรเจนมาตรฐานที่ระดับต่าง ๆ มาทำกราฟมาตรฐาน สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ หาปริมาณโปรเจสเทอโรนและเอสโตรเจนใน พลาสมาแพะ เพื่อศึกษาถึงระยะเวลาในการเป็นสัด การตั้งท้อง ในขั้นตอนการทำให้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน บริสุทธิ์นั้นใช้คอลัมน์คนละชนิดกับฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงทำให้ได้ค่าในการใช้อัตราส่วนเจือจางโมโนโคลนอลแตกต่างกัน

การออกแบบอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในการศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบอุปกรณ์ไว้ 3 แบบ การออกแบบอุปกรณ์นี้เพื่อให้เกิดความแตกต่างจากอุปกรณ์ทางการค้า ที่มีลักษณะรูปตัวที (T-shaped) (Fonseca *et al.*, 2005) คือแบบที่ 1 รูปทรงกระบอกความยาว 6 เซนติเมตรและบรรจุชานอ้อยไว้ภายใน แบบที่ 2 รูปตัววายประกอบด้วยส่วนปีกและลำตัวความยาว 6 เซนติเมตรและบรรจุชานอ้อยไว้ภายในทั้งส่วนปีกและลำตัว และแบบที่ 3 รูปตัววายประกอบด้วยส่วนปีกและลำตัวยาว 6 เซนติเมตร ส่วนปีกทำจากซิลิโคนส่วนลำตัวบรรจุชานอ้อยไว้ภายใน โดยอุปกรณ์ทั้ง 3 แบบนี้ขึ้นรูปด้วยผ้าซับใน (Organza) เมื่อนำอุปกรณ์ทั้ง 3 แบบนี้ไปทดลองการคงอยู่ของอุปกรณ์เมื่อสอดเข้าช่องคลอดแพะ จำนวน 6 ตัว เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าอุปกรณ์แบบที่ 3 สามารถคงอยู่ได้ครบตามจำนวนวันที่ต้องการ คัดเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของอุปกรณ์ได้ 100 % การที่อุปกรณ์แบบที่ 3 สามารถคงอยู่ในช่องคลอดได้ครบตามจำนวนวันที่ต้องการ เนื่องจากว่า

ส่วนปีกของอุปกรณ์แบบที่ 3 นี้ทำจากซิลิโคนจึงมีความสามารถในการคืนตัวโดยปีกสามารถกางออกได้ภายหลังจากคืนอุปกรณ์ออกจากกระบอกส่งแล้วและซิลิโคนยังทำให้ส่วนปีกมีความแข็งแรงจึงทำให้อุปกรณ์แบบที่ 3 ไม่หลุดออกมาจากช่องคลอด อุปกรณ์แบบที่ 2 แม้ว่าจะมีส่วนปีกเช่นเดียวกับอุปกรณ์แบบที่ 3 แต่ส่วนปีกของอุปกรณ์แบบที่ 2 ถูกบรรจุด้วยขานอ้อยเมื่อคืนอุปกรณ์แบบที่ 2 ออกจากกระบอกส่งส่วนปีกไม่สามารถคืนตัวกลับมากางได้และส่วนปีกของแบบที่ 2 นี้ไม่แข็งแรงเพียงพอที่จะต้านแรงบีบตัวของผนังช่องคลอดได้จึงทำให้อุปกรณ์แบบที่ 2 หลุดออกมาจากช่องคลอดภายในวันที่ 2 ของการสอดอุปกรณ์ ส่วนอุปกรณ์แบบที่ 1 ไม่มีส่วนปีกมีแต่ส่วนลำตัวที่บรรจุขานอ้อยไว้ภายในเมื่อไม่มีส่วนที่จะเกาะกับผนังช่องคลอดจึงทำให้อุปกรณ์แบบที่ 1 หลุดออกมาจากช่องคลอดภายในวันที่สอดอุปกรณ์ (สามารถคงอยู่ในช่องคลอดได้เพียง 8 ชั่วโมงหลังการสอดอุปกรณ์)

เมื่อได้แบบอุปกรณ์ที่เหมาะสมคือ แบบที่ 3 แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนแบบอุปกรณ์ในการประดิษฐ์อุปกรณ์นี้ ใช้การขึ้นรูปอุปกรณ์ด้วยผ้า Organza เนื่องจากเนื้อผ้ามีความถี่ และใยผ้ามีความเหนียวสามารถยืดขยายได้โดยที่ตะเข็บรอยเย็บไม่ปริแตกเมื่อทำการอัดบรรจุขานอ้อย ทำการร่างแบบลงบนผ้าและเย็บตามภาพที่ 3-9 ในการประดิษฐ์อุปกรณ์นี้ใช้ขานอ้อยเป็นวัสดุดูดซับฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน (Progesterone, P_4) เนื่องจากขานอ้อยมีท่อแคปิลลารีประกอบขึ้นจากสารประเภทเซลลูโลส, ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ นอกนั้นเป็นส่วนประกอบอื่นๆ ในปริมาณเล็กน้อย (โดยที่ส่วนประกอบเฮมิเซลลูโลสมีอยู่ 30-35 % น้ำหนักของส่วนประกอบทั้งหมด) ลักษณะผนังท่อแคปิลลารีมีความยืดหยุ่น ทำให้มีความสามารถในการดูดซับของเหลวเข้าไปอยู่ภายในได้เป็นอย่างดี และสามารถปล่อยออกเมื่อมีแรงกด บีบหรืออัด เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้นำขานอ้อยที่มีท่อแคปิลลารีนี้มาใช้เป็นวัสดุดูดซับ P_4 ในการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนียวนำการเป็นสัคในครั้งนี้ เมื่อเย็บอุปกรณ์และบรรจุขานอ้อยเรียบร้อยแล้วจึงนำอุปกรณ์นั้นมาบรรจุ P_4 ปริมาณ 300 มิลลิกรัม แห่อุปกรณ์ที่ประดิษฐ์เอง จำนวน 4 ชิ้นกับอุปกรณ์ทางการค้า จำนวน 1 ชิ้นที่มีปริมาณ P_4 เท่ากันคือ 300 มิลลิกรัม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการปล่อย P_4 ในห้องปฏิบัติการ โดยการจำลองสภาวะแวดล้อมให้คล้ายคลึงกับภายในช่องคลอดมากที่สุด โดยแห่อุปกรณ์ทั้งสองลงในสารละลายน้ำเกลือซึ่งให้สารละลายน้ำเกลือเป็นตัวแทนของของเหลวในร่างกายสัตว์ ปรับ pH ในสารละลายน้ำเกลือให้เท่ากับ pH ในช่องคลอดคือ pH 4 เก็บปีกเกอร์ที่แห่อุปกรณ์ไว้ในตู้ฟักไข่ที่ปรับอุณหภูมิไว้ 37 องศาเซลเซียสให้เท่ากับอุณหภูมิร่างกายสัตว์ และปั่นสารละลายให้เข้ากันก่อนเก็บตัวอย่างด้วยเครื่อง Stirrer ที่ความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อจำลองการบีบกดตัวของผนังช่องคลอด (Rathbone *et al.*, 2002) เก็บตัวอย่างสารละลายและนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P_4 พบว่าปริมาณ P_4 ของอุปกรณ์ที่ประดิษฐ์เองมีปริมาณสูงกว่าอุปกรณ์ทางการค้าเล็กน้อย แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้อุปกรณ์ที่ประดิษฐ์เอง 4 ชิ้น ปริมาณ P_4 ของอุปกรณ์แต่ละชิ้นไม่มีความสม่ำเสมอกันจึงได้

การวัดปริมาณ P_4 ในพลาสมาซึ่งระดับของ P_4 สามารถบอกจำนวนวันในวงจรการเป็นสัดได้ คือ 19-26 วัน โดยใช้ระดับของ P_4 เป็นตัวชี้วัด (Menchaca and Rubianes, 2002) ปกติระดับของ P_4 ในช่วงเป็นสัด (วันที่ 0) และวันที่ 1-2 นั้นจะต่ำมาก คือมีค่าตั้งแต่วัดไม่ได้ถึง 0 ขึ้นมาจนถึงประมาณ 1 ng/ml ซึ่งค่าดังกล่าวจะขึ้นลงอยู่ 2-3 วัน จากนั้นจะสูงขึ้นจนได้ peak แรกของ P_4 profile ซึ่งจะพบมากที่สุดในวันที่ 6 แต่ก็มีบ้างที่จะพบตั้งแต่วันที่ 4-วันที่ 8 ค่าของ P_4 ที่วัดได้จาก peak แรกนั้นเปลี่ยนแปลงไปตามรูปแบบของ P_4 profile ของแต่ละวงจรซึ่งมีค่าได้ตั้งแต่ >1 ng/ml ไปจนถึง <7 ng/ml จากนั้นค่า P_4 ที่วัดได้จะขึ้นสูงสุดโดยจะยังคงสูงอยู่เช่นนั้น 7-10 วัน ซึ่งจัดอยู่ในช่วง luteal phase โดยมี peak ของ P_4 profile ในช่วงนี้ 2-5 peak แต่ละ peak มีค่าตั้งแต่ >2 ng/ml ไปจนถึง >16 ng/ml หลังจากนั้นระดับของ P_4 จะลดลงมาจนมีค่าต่ำมากอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 17 ถึงวันที่ 19 ขึ้นกับวงจรการเป็นสัด ค่าของ P_4 ในวันที่ 19 ถึงวันที่ 22 มีค่าต่ำมากคือ <1 ng/ml (Khanum *et al.*, 2006) แต่หากเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอด ปริมาณ P_4 ที่วัดได้จะไม่เท่ากับ ปริมาณ P_4 ในธรรมชาติของตัวสัตว์คือเมื่อสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเองพบว่า มีปริมาณ P_4 ในวันที่ 1 คือ 6.76 ± 0.12 ng/ml ($6.55-7.33$ ng/ml, $n=6$) ซึ่งสูงกว่าอุปกรณ์ทางการค้าเล็กน้อยคือ 6.34 ± 0.08 ng/ml ($6.21-6.63$ ng/ml, $n=5$) ในวันที่ 2 อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเองพบว่า มีปริมาณ P_4 เท่ากับ 5.91 ± 0.06 ng/ml ($5.70-6.13$ ng/ml, $n=6$) ซึ่งสูงกว่าอุปกรณ์ทางการค้าเล็กน้อยคือ 5.49 ± 0.17 ng/ml ($4.92-5.92$ ng/ml, $n=5$) อุปกรณ์ทั้งสองกลุ่มมีระดับ P_4 ลดลงจากวันที่ 2-5 จนมีระดับ P_4 ก่อนข้างคงที่ในวันที่ 6-10 [2.70 ± 0.02 ng/ml ($2.64-2.76$ ng/ml, $n=6$) และ 2.72 ± 0.06 ng/ml ($2.57-2.93$ ng/ml, $n=5$) ตามลำดับ] ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Menchaca and Rubianes (2002) ที่ศึกษาปริมาณ P_4 ในพลาสมาแพะที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เหนี่ยวนำการเป็นสัด พบว่าวันแรกของการสอดอุปกรณ์ ปริมาณ P_4 เท่ากับ 6.0 ± 2.1 ng/ml ($n=6$) และวันที่ 2 มีปริมาณ P_4 เท่ากับ 5.4 ± 0.4 ng/ml ($n=6$) เมื่อเข้าสู่วันที่ 6 มีปริมาณ P_4 เท่ากับ 2.2 ± 0.2 ng/ml ($n=6$) ในขณะที่ Hirsh *et al.* (2007) พบว่าวันแรกที่สอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้ามีปริมาณ P_4 ในพลาสมาเฉลี่ยเพียง 3.85 ng/ml

การเป็นสัดนอกจากสังเกตจากพฤติกรรมที่สัตว์แสดงออกแล้วยังสามารถดูได้จากปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen, E_2) ในพลาสมาซึ่งปริมาณ E_2 ยังเป็นฮอร์โมนที่ทำให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัด ซึ่งทำให้สัตว์เพศเมียมีเมือกใสไหลจากช่องคลอด โดยอาการเป็นสัดจะเด่นชัดขึ้น



อุปกรณ์เหนียวการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเองนี้มีชื่อว่า Intravaginal Sugarcane Bagasse device – Chiang Mai University 1 (ISBD-CMU 1) ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตราคา 78 บาท/ชิ้น มีราคาถูกกว่าอุปกรณ์เหนียวนำการเป็นสัดทางการค้า (CIDR) ที่มีราคา 140 บาท/ชิ้น ซึ่งราคาต้นทุนส่วนใหญ่ของ ISBD-CMU 1 เป็นค่า P_4 คิดเป็น 62 % (47.78 บาท/ชิ้น) ของราคาทั้งหมดและอีกส่วนเป็นค่าไฟฟ้าในการอบและนึ่งฆ่าเชื้อ คิดเป็น 14 % (10.48 บาท/ชิ้น) ของราคาทั้งหมด แนวทางในการลดต้นทุนค่า P_4 ถ้าหากสั่งซื้อ P_4 ในปริมาณที่มากพอจะสามารถซื้อได้ในราคาที่ถูกลงกว่า คือ ถ้าซื้อ 25 กรัมราคาขาย 3,981.14 บาท เมื่อนำมาบรรจุในอุปกรณ์คิดเป็นราคา P_4 47.78 บาท/ชิ้น หากซื้อ P_4 65 กรัมราคาขาย 8,485.6 บาท เมื่อนำมาบรรจุในอุปกรณ์คิดเป็นราคา P_4 39.16 บาท/ชิ้น ทำให้สามารถลดต้นทุนค่า P_4 ลงได้ 8.62 บาท/ชิ้น ในด้านต้นทุนราคาค่าไฟฟ้าหากผลิตอุปกรณ์ในปริมาณที่มากแล้วนำเข้าอบและนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมกันก็สามารถทำให้ต้นทุนราคาค่าไฟฟ้า/ชิ้นอุปกรณ์ลดลงได้เช่นกัน

ในการศึกษาขั้นต่อไปควรได้มีการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบเดียวกันนี้ในโค โดยการเพิ่มขนาดของตัวอุปกรณ์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยการออกแบบอุปกรณ์ให้มีลักษณะเหมือนตัววาย (Y) ส่วนปีกมีความยาว 16 เซนติเมตร และลำตัวมีความยาว 14 เซนติเมตร หน้า 2.5 เซนติเมตร สำหรับการออกแบบปีก โดยการปั้นซิลิโคนให้มีความหนา 1.5 เซนติเมตร และยาว 16 เซนติเมตร เมื่อได้ส่วนปีกแล้วจึงนำมาเย็บประกอบเข้ากับส่วนของลำตัวและนำขานอ้อยมาบรรจุใส่ด้านในของส่วนลำตัวโดยอัดขานอ้อยให้แน่นจนเต็มใช้ขานอ้อยประมาณ 3.2 กรัม เมื่อบรรจุขานอ้อยเต็มแล้วให้เย็บปิดแล้วเ็นตปลาที่มีความยาว 30 เซนติเมตร มาประกอบเข้ากับส่วนท้ายของลำตัว โดยการสอดเส้นเอ็นเข้าไปบริเวณที่เจาะรูไว้และเย็บเส้นเอ็นให้ติดอยู่กับตัวอุปกรณ์ หลังจากนั้นนำอุปกรณ์ที่ได้มาบรรจุสอร์โรมิน โดยการละลายสอร์โรมิน โพรเจสเทอโรน 1.9 กรัม โดยขั้นตอนในการเย็บอุปกรณ์และการบรรจุสอร์โรมินทำเหมือนกับขั้นตอนในการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะทุกประการ

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อผลิต Intravaginal device ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะเพื่อลดมูลค่าการนำเข้าเทคโนโลยี และทำให้เกษตรกรได้เข้าถึงเทคนิคการเหนี่ยวนำการเป็นสัดมากขึ้น จากผลการวิจัยทั้งหมดที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเองสามารถนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้จริง โดยมีผลการวัดปริมาณ P_4 ในพลาสมาเมื่อสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ใกล้เคียงกัน โดยอุปกรณ์ที่ประดิษฐ์เองมีปริมาณ P_4 สูงกว่าอุปกรณ์ทางการค้าเล็กน้อย และตัวอุปกรณ์สามารถคงอยู่ได้จนครบตามจำนวนที่ต้องการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดของกลุ่มอุปกรณ์ที่ประดิษฐ์ขึ้นเองกับอุปกรณ์ทางการค้าให้ผลเปอร์เซ็นต์การเป็นสัด 100% เท่ากันทั้งสองกลุ่ม โดยยืนยันการเป็นสัดด้วยปริมาณ E_2 ในพลาสมาหลังจากถอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดออกและแพะเพศเมียที่แสดงการเป็นสัดยอมรับการผสมพันธุ์จากพ่อพันธุ์ และราคาของอุปกรณ์ที่ประดิษฐ์เองยังมีราคาถูกกว่าอุปกรณ์ทางการค้าอีกด้วย ดังนั้นเกษตรกรที่ประสบปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ของแพะเพศเมีย เช่นการเป็นสัดเงียบ สามารถนำอุปกรณ์นี้ไปใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อแก้ปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ของแพะเพศเมียได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. อุปกรณ์แบบที่ 3 รูปตัววายประกอบด้วยส่วนปีกและลำตัวยาว 6 เซนติเมตร ส่วนปีกทำจากซิลิโคนส่วนลำตัวบรรจุชานอ้อยไว้ภายในและส่วนหางทำจากเอ็นตกลายาว 17 เซนติเมตร เป็นแบบที่สามารถคงอยู่ภายในช่องคลอดได้ครบตามจำนวนวันที่เหนี่ยวนำการเป็นสัด
2. ชานอ้อยสามารถเป็นวัสดุดูดซับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone, P₄) ได้
3. อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเองนี้สามารถใช้เหนี่ยวนำการเป็นสัดได้จริง โดยมีเปอร์เซ็นต์การเป็นสัด 100 %
4. อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเองนี้มีราคาถูกกว่าอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้า 62 บาท/ชิ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ชานอ้อยที่จะนำมาใช้ควรล่อนด้วยตะแกรงก่อนเพื่อให้ได้ขนาดของชานอ้อยที่สม่ำเสมอ เพราะขนาดของชานอ้อยมีผลต่อปริมาณการปล่อย P₄
2. เมื่อบรรจุ P₄ ในแท่งอุปกรณ์แล้วไม่ควรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเพราะจะทำให้น้ำจากการนึ่งจะไปเจือจาง P₄ ที่แท่งอุปกรณ์ทำให้ปริมาณ P₄ ไม่คงเดิม ควรใช้วิธีการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำอุปกรณ์มาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้
3. ควรเพิ่มจำนวนแพะในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อทดสอบความคงที่ของ P₄ ในแท่งอุปกรณ์และการเป็นสัดเมื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด
4. การพัฒนางานต่อไปควรมีการต่อยอดความรู้จากอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ เป็นประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในโคต่อไป