บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## สถานที่และสัตว์ทดลอง

ในการทดลอง จะต้องเจาะเลือดโคไม่น้อยกว่า 10 ตัวเป็นระยะ ๆ รวมเป็นเวลาทั้งสิ้น 42 วัน และติดตามผลการผสมพันธุ์ต่อไป ซึ่งเป็นการยากที่จะให้เกษตรกรรายย่อยผู้เลี้ยงโคนมเข้าใจถึงความสำคัญของการศึกษาเพื่อแก้ไขปัญหาการผสมติดยากในโคนมเหล่านั้น และให้ความร่วมมือในระยะยาวตลอดการทดลอง โดยเฉพาะจะต้องมีการเจาะเลือดสัตว์เป็นระยะ ๆ ติดต่อกัน ผู้วิจัยได้รับความกรุณาจากคุณอุดม วังตาล ซึ่งเป็นเจ้าของฟาร์มโคนมขนาดใหญ่ประมาณ 300-400 ตัว ที่อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี คุณอุดม วังตาล เป็นนักวิชาการสัตวบาล ผู้ทรงความรู้ด้านอาหารสัตว์ จึงเข้าใจถึงความสำคัญของการศึกษาในเรื่องนี้ ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นในฟาร์มแห่งนี้เช่นกัน ได้อนุญาตให้ใช้โคกลุ่มหนึ่งเพื่อการวิจัยและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการให้ข้อมูล การเก็บตัวอย่างเลือดและการติดตามผลตลอดการศึกษาเริ่มตั้งแต่วันที่ 20 มีนาคม จนถึงวันที่ 23 พฤษภาคม 2527

กลุ่มโคที่ทำการศึกษา เป็นโคพันธุ์ผสม อายุตั้งแต่ 2-6 ปี มีทั้งโคสาวและแม่โคที่มีปัญหาในการผสมซึ่งมีการผสมเทียมมาแล้ว 1-5 ครั้งติดต่อกัน และยังคงให้น้ำนมอยู่ โคเหล่านี้ขณะทำการศึกษา มีความสมบูรณ์ของร่างกาย และอวัยวะสืบพันธุ์ปกติ (ตารางที่ 3, 4 และ 5) มีนายสัตวแพทย์ดูแลสุขภาพและทำการผสมเทียมให้ทุกครั้ง

ที่อยู่อาศัยของโคเหล่านี้เป็นเรือนโรงที่โปร่ง มีอากาศถ่ายเทสะดวก แม่โคอยู่ในสภาพยืนโรงในเรือนโรงสำหรับโคนม แต่โคสาวอยู่ในคอกที่กว้าง มีบริเวณเดินออกกำลังกายระหว่างการศึกษา อุณหภูมิอากาศที่อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี อยู่ระหว่าง 23.8°-36.5°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 39-97% และมีวันที่ฝนตกเพียง 9 วัน (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2527)

I 16624824

อาหารที่ได้รับเป็นหญ้าขน เสริมด้วยหญ้าเนเปียร์ในปริมาณ 30 กก.ต่อตัว และให้อาหารข้นวันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 กก. อาหารข้นประกอบด้วย กากปาล์ม เมล็ดฝ้าย กระถินสับตากแห้ง มะพร้าวแห้งอัดน้ำมัน ข้าวโพด มันสำปะหลัง รำ กากนุ่น เกลือป่น และโมลาส สำหรับอาหารแร่ธาตุในโคสาวมีแร่ธาตุ ให้กินตลอดเวลาตามที่ต้องการ (free choice) เมื่อโคตั้งท้องจะได้อาหารแร่ธาตุเสริมอีก 30% อาหารแร่ธาตุประกอบด้วย กระดูกป่น เกลือแกง แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมงกานีส เหล็ก ทองแดง สังกะสี โคบอลต์ ไอโอไดด์ เซเลเนียม ซัลเฟอร์ และแมกนีเซียม ให้วิตามินเอดีอีผง 200 กรัม ผสมในอาหารแร่ธาตุ 800 กก. มีสัดส่วนในการให้อาหารแร่ธาตุ 2.5 กก. ต่ออาหารข้น 800 กก. น้ำดื่มมีไว้ให้ตลอดเวลา

## การเก็บตัวอย่างและการวางแผนการทดลอง

ทำการตรวจการเป็นสัดภายหลังจากที่ได้รับแจ้งจากผู้เลี้ยงว่าโคแสดงอาการเป็นสัด โดยล้วงผ่านทวารหนัก เพื่อตรวจสภาพรังไข่และมดลูก เมื่อพบว่ารังไข่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะตกไข่และมดลูกแข็งตัวอยู่ในภาวะของการเป็นสัดเต็มที่ จึงทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบคุณภาพแล้ว (Proven sire) จากนั้นเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำที่คอ (Jugular vein) ด้วยเข็มเบอร์ 18 ซึ่งสะอาดและแห้ง เก็บเลือดในหลอดแก้วแห้งสะอาดและฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 7 มล. ครั้งละ 2 หลอด ปิดจุกด้วยสำลี ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ช.ม. แช่เย็นในกระติกน้ำแข็งประมาณ 1 ช.ม. ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 5 นาที แยกซีรั่มเก็บใส่ขวดแก้วแห้งสะอาดปราศจากเชื้อ แบ่งซีรั่มใส่หลอดเล็ก ๆ (aliquot) ในปริมาณที่พอเพียงสำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนในแต่ละฮอร์โมน เพื่อป้องกันการสลายตัวของฮอร์โมนในการที่ซีรั่มต้องถูกละลายหลายครั้ง เก็บซีรั่มไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ $-20^{\circ}$ซ. เพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนธัยรอกซิน และไตรไอโอโด-ธัยโรนีน เจาะเก็บตัวอย่างเลือดและแยกซีรั่มจากโคแต่ละตัว รวม 8 ครั้ง คือวันแรกซึ่งเป็นวันที่โคมีอาการเป็นสัดและทำการผสมเทียม (วันที่ 0) ต่อมาเก็บทุก 4 วันรวม 5 ครั้ง คือ วันที่ 4, 8, 12, 16 และ 20 จากนั้นเจาะซ้ำอีก 2 ครั้ง คือวันที่ 25 และ 41 ติดตามผลการผสมเทียมในครั้งนั้นภายหลังจากที่ผสมเทียมได้ 2 เดือน ด้วยการล้วงตรวจมดลูกและรังไข่ผ่านทางทวารหนัก

แบ่งโคเหล่านี้เป็น 2 กลุ่มตามผลของการผสมเทียม คือกลุ่มที่ผสมในครั้งนั้น แล้วติดตั้งท้อง และกลุ่มที่ผสมไม่ติดตั้งท้อง สำหรับกลุ่มแรกประกอบด้วยโคสาวที่ยังไม่เคยมีลูก 3 ตัว และแม่โคที่เคยมีลูกแล้ว 2 ตัว กลุ่มที่ผสมไม่ติดตั้งท้องประกอบด้วยโคสาว 2 ตัว และแม่โค 3 ตัว (ตารางที่ 3, 4, 5) การศึกษาระดับฮอร์โมนแต่ละชนิดจะเป็นแบบแฟคทอเรียล 2x8 โดยมีปัจจัย 2 ประการคือ ผลของการผสมพันธุ์ในครั้งนั้น (กลุ่มผสมติด, กลุ่มผสมไม่ติด) และปัจจัย 8 ประการ คือระดับฮอร์โมนในวันต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา 8 ครั้งด้วยกัน

## วิธีการวิเคราะห์ฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์

### การทดสอบคุณภาพของชุดวิเคราะห์ฮอร์โมน

ก่อนที่จะเริ่มทำการวิเคราะห์ฮอร์โมนได้ทำการทดสอบคุณภาพของชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนทั้งสองชนิดให้เป็นที่ยอมรับ และเชื่อถือได้ตามวิธีการของ Reimers และคณะ (1981, 1982 a) ได้แก่

#### การทดสอบความสามารถในการหาปริมาณฮอร์โมนจำนวนน้อยที่สุด

เป็นการทดสอบความไวของชุดวิเคราะห์นี้ เพื่อหาปริมาณของฮอร์โมนจำนวนน้อยที่สุดได้ โดยใช้ค่าเฉลี่ยของ maximum binding ± 2 SD ซึ่งคำนวณจากหลอดทดลองที่มี maximum binding 10 หลอด

#### การหาความแม่นยำในการเอสเสย์

คำนวณความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นในการวิเคราะห์ครั้งนี้จากการหาสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายจากซีรั่มตัวอย่างเดียวกัน 10 ครั้ง ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายในการวิเคราะห์แต่ละครั้งเป็นไปได้ถึง 10% คำนวณความแม่นยำและความแน่นอนระหว่างการทำเอสเสย์แต่ละครั้งโดยหาค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายของซีรั่มตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 2 ระดับ คือต่ำ และสูง ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายระหว่างการเอสเสย์แต่ละครั้งเป็นไปได้ถึง 20%

#### การทดสอบความจำเพาะของเอสเสย์

เป็นการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนที่ต้องการวัดปริมาณได้ โดยไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่น ในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีทำ

ตารางที่ 3 ประวัติโคที่ทำการศึกษา

| หมายเลขโค | อายุ(ปี) | พันธุ์ | จำนวนลูกที่คลอด (ตัว) | สถานภาพของการให้ลูก |
|---|---|---|---|---|
| 3304[ก] | 2 | ขาวดำ | - | โคสาว |
| 527[ก] | 2 | เรดเดน | - | โคสาว |
| 525[ก] | 2 | บราวน์สวิส | - | โคสาว |
| 57[ก] | 3.5 | บราวน์สวิส | 2 | คลอด 18-6-26 |
| 894[ก] | 6 | บราวน์สวิส | 5 | คลอด 4-12-26 |
| 504[ข] | 2 | เรดซินดี | - | โคสาว |
| 505[ข] | 2 | บราวน์สวิส | - | โคสาว |
| 51[ข] | 4 | ขาวดำ | 2 | คลอด 8-11-26 |
| 403[ข] | 3 | ขาวดำ | 1 | คลอด 12-10-26 |
| 909 | 4.5 | ขาวดำ | 3 | คลอด 2-4-26 |

ก = กลุ่มที่ผสมในครั้งนั้นแล้วติดตั้งท้อง

ข = กลุ่มที่ผสมไม่ติด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 สภาพร่างกายของโคที่ทำการศึกษา และประวัติการผสมพันธุ์ย้อนหลัง

| หมายเลขโค | สภาพร่างกาย | รังไข่ | มดลูก | จำนวนครั้งที่ผสมไม่ติดก่อนทำการศึกษา | ช่วงระยะห่างระหว่างการผสมในแต่ละครั้ง (วัน) |
|---|---|---|---|---|---|
| 3304[ก] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 1 | 21 |
| 527[ก] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | - | - |
| 525[ก] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 2 | 15,21 |
| 57[ก] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ* | 5 | 28,29,26,20,41 |
| 894[ก] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | - | - |
| 504[ข] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 2 | 18,66 |
| 505[ข] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 4 | 21,63,18,22 |
| 51[ข] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 3 | 25,18,37 |
| 403[ข] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 1 | 36 |
| 909[ข] | สมบูรณ์ | ปกติ | ปกติ | 1** | 2 รอบการเป็นสัดหลังจากแท้งลูก |

ก = กลุ่มที่ผสมในครั้งนั้นแล้วติดตั้งท้อง

ข = กลุ่มที่ผสมไม่ติด

* = เคยมีประวัติมดลูกอักเสบ

** = แท้งลูกหลังจากตั้งท้องได้ 217 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำนมในแม่โคที่ทำการศึกษา

| หมายเลขโค | ระยะการให้นม (วัน) | ปริมาณน้ำนม (กก.) | |
|---|---|---|---|
| | | รวม | ต่อวัน |
| 57[ก] | 278 | 2068 | 7.4 |
| 894[ก] | 141 | 919 | 6.5 |
| 51[ข] | 258 | 2397 | 9.2 |
| 403[ข] | 315 | 3143 | 9.9 |
| 909[ข] | 235 | 2060 | 8.7 |

ก = กลุ่มที่ผสมในครั้งนั้นแล้วติดตั้งท้อง

ข = กลุ่มที่ผสมไม่ติด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

serial dilution ของซีรั่มที่ต้องการทดสอบด้วยความเข้มข้น 1:1, 1:2 และ 1:4 ทำเอสเสย์ร่วมกันไป นำค่าที่ได้มากำหนดจุดบนกระดาษกราฟ logit-log เปรียบเทียบกับจุดที่ได้จากค่าฮอร์โมนมาตรฐานของชุดวิเคราะห์ฮอร์โมน เมื่อลากเส้นต่อระหว่างจุดเหล่านี้ เส้นที่เกิดจากค่าของ serial dilution ของซีรั่มจะต้องขนานกับเส้นที่เกิดจากค่าฮอร์โมนมาตรฐานของชุดวิเคราะห์ ซึ่งแสดงว่าแอนติเจนหรือฮอร์โมนในซีรั่มและในชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนนี้ มี immunological similarity เอสเสย์เป็นที่เชื่อถือใช้ในการวิเคราะห์ได้

<u>วิธีการวิเคราะห์ฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์</u>

<u>ฮอร์โมนธัยรอกซิน</u>

ใช้ชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนธัยรอกซินสำเร็จรูปชนิด Coat-A-Count Total $T_4$ kit (Diagnostic Product Corporation) ซึ่งเป็น Solid phase ของไอโอดีน 125 เรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ สามารถวัดระดับ total $T_4$ ทั้งในรูปของฟรี และเบานด์ (bound) ธัยรอกซินในซีรั่ม เมื่อเติมไอโอดีน 125 ธัยรอกซิน ผสมกับ blocking agent ลงไปในซีรั่ม blocking agents จะแยกเบานด์ธัยรอกซินออกจาก Carrier protein ไอโอดีน 125 ธัยรอกซินจะแย่งกับธัยรอกซินในซีรั่มทั้งสองรูปเพื่อจับกับแอนติบอดีซึ่งฉาบอยู่กับผนังของหลอดทดลอง เมื่อปฏิกริยาเสร็จสิ้นลงแล้ว ส่วนที่เหลือจากปฏิกิริยาจะถูกเททิ้งไป เหลือแต่ส่วนที่เป็นไอโอดีน 125 ธัยรอกซิน ซึ่งจับแอนติบอดีที่ผนังของหลอดทดลอง นำมาวัดปริมาณรังสีด้วยแกมมาเคาน์เตอร์ในเวลา 1 นาทีทุกหลอด ปริมาณรังสีในแต่ละหลอดจะเป็นปฏิภาคกลับกับปริมาณ total $T_4$ ที่มีในซีรั่ม นำปริมาณรังสีที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์ไบน์ดิง

<u>การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไบน์ดิง</u>

เป็นความสามารถของไอโอดีน 125 ธัยรอกซินที่แย่งกับธัยรอกซินในซีรั่มเพื่อจับกับแอนติบอดีที่ผนังของหลอด โดยเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่มีซีรั่ม (Bo) ซึ่งถือว่ามีความสามารถในการจับกับแอนติบอดีได้สูงสุด (maximum binding, MB) ใช้สูตรในการคำนวณดังนี้คือ

$$\% \text{ binding} = \frac{\text{net count}}{\text{net MB count}} \times 100$$

net count ได้จากผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณรังสี (count per minute, CPM) ในแต่ละตัวอย่างซึ่งทำซ้ำกัน 2 หลอด กับค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีในหลอดที่ไม่มีแอนติบอดีฉาบที่ผนังหลอด (nonspecific binding, NSB)

ดังนั้น net count = average CPM - average NSB CPM

net MB count = average MB CPM - average NSB CPM

<u>การสร้างเส้นมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณระดับของฮอร์โมนในซีรั่ม</u>

ชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนธัยรอกซินที่ใช้ศึกษามีฮอร์โมนที่ใช้เป็นมาตรฐาน 6 ระดับด้วยกันคือ 0, 10, 40, 100, 160 และ 240 นาโนกรัม/มล. แต่เนื่องจากในโคนมมีปริมาณฮอร์โมนธัยรอกซินอยู่ในระหว่าง 10-40 นาโนกรัม/มล. ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่จะเป็นเส้นมาตรฐานในการศึกษาครั้งนี้ 5 ระดับด้วยกันคือ 0, 20, 50, 80 และ 120 นาโนกรัม/มล. ทั้งนี้เพื่อให้ค่าของฮอร์โมนในซีรั่มอยู่ในระยะกลางของเส้นมาตรฐาน คำนวณเปอร์เซ็นต์ไบน์ดิงจากความเข้มข้นมาตรฐานเหล่านี้ นำไปกำหนดจุดลงบนกระดาษกราฟ logit log โดยมีแกนนอนเป็นความเข้มข้นของฮอร์โมน และแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ไบน์ดิง เส้นตรงที่ลากผ่านจุดเหล่านี้จะเป็นเส้นตรงมาตรฐาน (standard curve) ซึ่งนำมาใช้คำนวณระดับฮอร์โมนในซีรั่มตัวอย่างได้

<u>การวิเคราะห์ธัยรอกซินในซีรั่ม</u>

ละลายซีรั่มก่อนนำมาวิเคราะห์ในอุณหภูมิห้อง ทำให้ซีรั่มผสมเป็นเนื้อเดียวกันโดยคว่ำหลอดขึ้นลง 2-3 ครั้ง ในการเอสเสย์แต่ละครั้งหลอดทดลองทั้งหมดจะประกอบด้วย หลอดซึ่งไม่มีแอนติบอดีเพื่อวัด NSB CPM หลอดสำหรับหาค่าฮอร์โมนมาตรฐาน 5 ระดับ หลอดทดสอบความไวของการวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความแม่นยำในและระหว่างเอสเสย์ และซีรั่มตัวอย่างทั้งหมดที่ต้องการหาปริมาณฮอร์โมน ทำการเอสเสย์ไปด้วยกันและทำซ้ำ (duplicate) ทุกหลอด

ใช้ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette) ดูดซีรั่ม หรือสารที่ต้องการเอสเสย์ในปริมาณ 25 ไมโครลิตรลงในหลอดแต่ละหลอด ซึ่งมีแอนติบอดีฉาบอยู่ที่ผนังหลอด เติม 1 มล. ของสารผสมซึ่งมี blocking agent ปนกับไอโอดีน 125 ธัยรอกซิน ลงไป เขย่าด้วย vortex mixer นำไป incubate ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 60 นาที

เทน้ำใสทิ้งทั้งหมด คว่ำหลอดให้น้ำหยดจนหมด 2-3 นาที ก่อนที่จะสะบัดอย่างแรง เพื่อกำจัดน้ำใสที่เหลืออยู่ให้หมด คว่ำไว้บนกระดาษซับให้หลอดแห้ง ก่อนนำไปนับปริมาณรังสีในแกมมาเคาน์เตอร์ 1 นาที

นำค่าปริมาณรังสีที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ไบน์ดิง สร้างเส้นตรงมาตรฐานของฮอร์โมนจากชุดวิเคราะห์ และคำนวณหาค่าฮอร์โมนธัยรอกซินที่มีในซีรั่มแต่ละหลอดจากเส้นตรงมาตรฐาน

<u>ฮอร์โมนไตรไอโอธัยโรนีน</u>

ใช้ชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนไตรไอโอโดธัยโรนีนชนิด Coat-A-Count $T_3$ RIA kit (Diagnostic Product Corporation) ซึ่งเป็น Solid phase ของไอโอดีน 125 เรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ สำหรับหาค่าของไตรไอโอโดธัยโรนีนในซีรั่ม ได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของชุดวิเคราะห์นี้ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่นเดียวกับการตรวจสอบคุณภาพชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนธัยรอกซิน มีวิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์ไบน์ดิง และการสร้างเส้นมาตรฐานคล้ายคลึงกับวิธีการที่ใช้สำหรับฮอร์โมนธัยรอกซิน ต่างกันแต่เพียงความเข้มข้นของฮอร์โมนที่จะใช้เป็นเส้นตรงมาตรฐาน จะมีความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 6.0 นาโนกรัม/มล. ซึ่งจะครอบคลุมพิสัยของระดับฮอร์โมนไตรไอโอโดธัยโรนีนในซีรั่มของโคนมได้ดี

<u>การวิเคราะห์ไตรไอโอโดธัยโรนีนในซีรั่ม</u>

มีวิธีการเตรียมซีรั่มและการเอสเสย์เช่นเดียวกับธัยรอกซิน ต่างกันที่ปริมาณของซีรั่มที่ใช้ในการเอสเสย์เป็น 100 ไมโครลิตร และ incubate เป็นเวลา 120 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ระดับฮอร์โมนแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากเส้นตรงมาตรฐาน นำมาวิเคราะห์โดยใช้ Analysis of variance แบบ Factorial design 2x8 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วย Duncan's New Multiple Range Test (Steel และ Torrie, 1980) การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะบ่งถึงความแตกต่างของระดับฮอร์โมนระหว่างกลุ่มโคที่ผสมติดและกลุ่มโคที่ผสมไม่ติด เปรียบเทียบระดับฮอร์โมนในแต่ละวันที่ทำการศึกษา ตลอดจนความแตกต่างที่อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งเป็นผลของปฏิกิริยาระหว่างภาวะเจริญพันธุ์ หรือผลของการผสมพันธุ์กับระดับฮอร์โมนในแต่ละวันที่ทำการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย