

บทที่ 3: วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของสุกรสาวพันธุ์ผสมแลนด์เรซ x ยอร์กเชียร์ (LY) ที่ถูกคัดเลือกจากฟาร์มสุกร 5 แห่งในประเทศไทย จำนวน 45 ตัว จากโรงฆ่าสัตว์ พร้อมข้อมูลพันธุ์ประวัติของสุกรสาว ได้แก่ เบอร์หู อายุ น้ำหนัก และสาเหตุการคัดเลือก นำอวัยวะสืบพันธุ์เมียที่ได้ส่งเข้าห้องปฏิบัติการชันสูตรที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใน 24 ชั่วโมง โดยบรรจุในกล่องน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ตรวจชันสูตรซากโดยแยกอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เพศเมียออกเป็น รังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูก

ข้อมูลทางระบบสืบพันธุ์

ข้อมูลสมรรถภาพทางระบบสืบพันธุ์ของสุกรสาว คำนวณจากประวัติของสุกรสาวแต่ละตัว อัตราการเจริญเติบโตตั้งแต่เกิดถึงคัดเลือกคำนวณจาก Average daily gain (ADG) (กรัม/วัน) = [(น้ำหนักตัว - 1.5) / อายุ] x 1000 จำนวนวันสูญเสีย (nonproductive days, NPD) ของสุกรสาวแต่ละตัวคำนวณจาก [วันที่คัดเลือก - วันที่สุกรเข้าฝูง] สาเหตุการคัดเลือกสุกรสาวแบ่งเป็น

ไม่เป็นสัด ได้แก่สุกรสาวที่ถูกคัดเลือกเนื่องจากไม่สามารถตรวจพบพฤติกรรมการเป็นสัด

หนองไหล ได้แก่ สุกรสาวที่ถูกคัดเลือกเนื่องจากพบหนองไหลออกจากช่องคลอด

ผสมซ้ำ ได้แก่ สุกรสาวที่ถูกคัดเลือกเนื่องจากกลับสัดหลังการผสมเทียมต่อเนื่องกันมากกว่าหรือเท่ากับ 2 ครั้ง

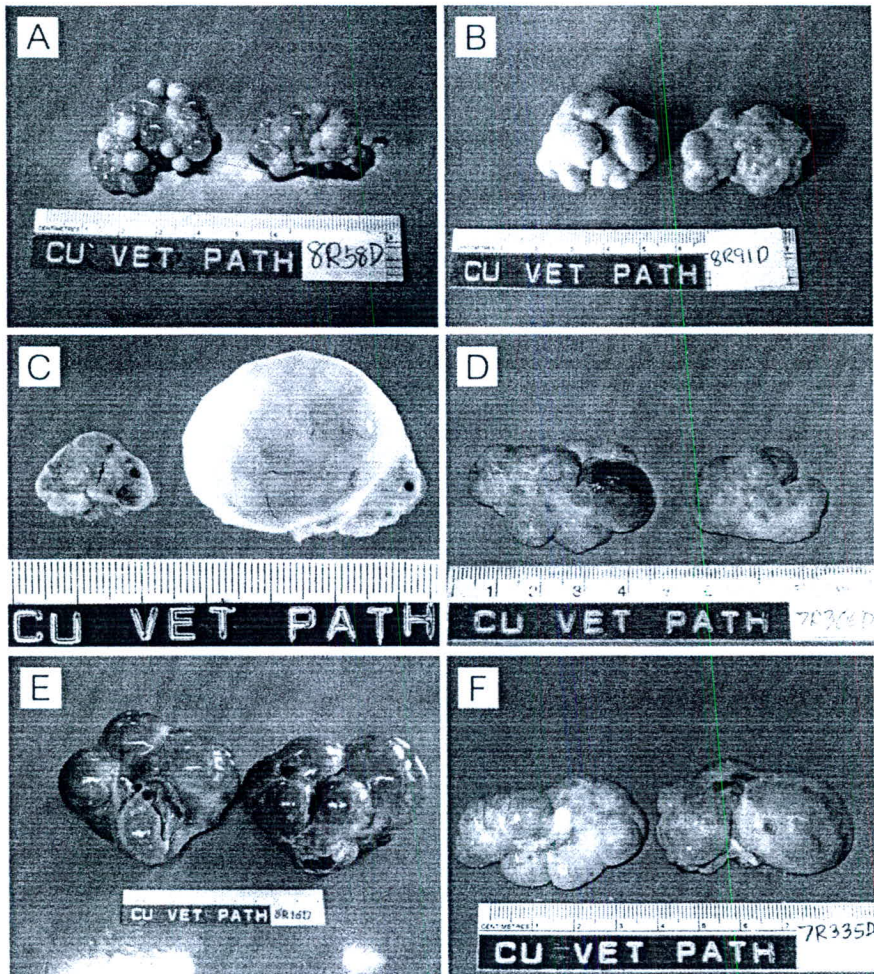
แท้ง ได้แก่ สุกรสาวที่ถูกคัดเลือกออกจากฟาร์มเนื่องจากการแท้ง

สาเหตุอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ สุกรสาวที่ถูกคัดเลือกเนื่องจากสาเหตุอื่น ๆ ได้แก่ คอมดลูกหลวม แสดงการเป็นสัดไม่สม่ำเสมอ และผสมเทียมแล้วไม่ตั้งท้อง

สาเหตุที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ (กลุ่มควบคุม) ได้แก่ สุกรที่ถูกคัดเลือกซึ่งมีปัญหาก็เกี่ยวข้องกับขาหรือการเคลื่อนไหว

การตรวจทางมหภาคของรังไข่

ชั่งน้ำหนักของรังไข่ทั้งสองข้างด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักระบบดิจิตอล (BJ 210C, Precisa Instrument Ltd., Switzerland) ตรวจลักษณะที่ปรากฏบนรังไข่ทั้งสองข้างของสุกรสาวคัดเลือก ซึ่งประกอบด้วยฟอลลิเคิล (follicle) หมายถึง เนื้อเยื่อที่มีลักษณะโปร่งแสง (transparent) ภายในมีของเหลว คอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum, CL) หมายถึง โครงสร้างบนผิวของรังไข่ที่มีลักษณะเป็นก้อนเนื้อแน่นสีชมพู สีเนื้อ หรือสีเหลือง โดยระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) หมายถึงรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≥ 7 มิลลิเมตร (รูปที่ 1A) และระยะลูเทียล (luteal phase) หมายถึงรังไข่ที่มีคอร์ปัสลูเทียมปรากฏชัดเจนบนรังไข่ (รูปที่ 1B) ตรวจนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียมบนรังไข่ทั้งสองข้าง และกำหนดให้จำนวนคอร์ปัสลูเทียมที่นับได้เป็นอัตราการตกไข่ ถุงน้ำรังไข่ หมายถึง การปรากฏของถุงน้ำ 1 ใบ (single cyst) (รูปที่ 1C-D) หรือมากกว่า 1 ใบ (multiple cysts) (รูปที่ 1E-F) บนรังไข่ของสุกรสาว ซึ่งแยกออกจากคอร์ปัสลูเทียมและฟอลลิเคิลได้จากการสังเกตขนาดที่พบบนรังไข่ข้างเดียวกัน โดยอาจพบร่วมกับโครงสร้างปกติอื่น ๆ ด้วยหรือไม่ก็ได้ (Tummaruk et al., 2009a)



รูปที่ 1 ลักษณะของรังไข่ปกติและรังไข่ที่มีถุงน้ำที่พบในสุกรสาวคัดทิ้ง; รังไข่ปกติในระยะฟอลลิคูลาร์ (A), รังไข่ปกติในระยะลูทีล (B), ถุงน้ำรังไข่ชนิดโบเดี่ยว (C-D) และถุงน้ำรังไข่ชนิดหลายใบ (E-F)

การตรวจทางซีรัมวิทยา

เจาะเลือดและเก็บซีรัมของสุกรสาวคัดทิ้ง แข็งแข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจหาระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี solid-phase ¹²⁵I-radioimmunoassay โดยใช้ชุดตรวจ Coat-A-Count (Diagnostic Product Corporation, CA, USA) ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลของสุกรกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบระดับความผิดปกติของฮอร์โมน ที่อาจเกิดขึ้นกับสุกรสาวคัดทิ้งเนื่องจากพบถุงน้ำรังไข่ชนิดโบเดี่ยว และชนิดหลายใบ

การเตรียมชิ้นเนื้อมดลูกและท่อนำไข่

ตัดแยกมดลูกออกจากเยื่อยึดโดยรอบ (mesometrium) ตรวจสอบลักษณะความผิดปกติภายนอก ชั่งน้ำหนักตัวมดลูก (uterine body) และปีกมดลูก (uterine horn) ทั้งสองข้างด้วยเครื่องชั่งแบบดิจิตอล (KD300, TANITA Ltd., Tokyo, Japan) ผ่านมดลูกออกตามแนวยาวศึกษาลักษณะของเยื่อบุมดลูก มดลูกอักเสบ (endometritis) หมายถึง การพบลักษณะการอักเสบที่ชัดเจน เช่น สีแดงเข้ม บวมน้ำ และส่วนใหญ่พบหนอง (Tummaruk et al., 2009a) มดลูกที่มีรูปร่างผิดปกติ เจริญไม่สมบูรณ์ถูกจัดเป็นความผิดปกติแต่กำเนิด โดยมดลูกที่ตรวจไม่พบความผิดปกติ ใดๆ จัดเป็นมดลูกปกติ จากนั้น ตัดปีกมดลูกแต่ละข้างให้มีความยาวประมาณ 2 ซม.

สำหรับท่อนำไข่ จะเก็บท่อนำไข่มาทั้งหมดและแยกออกจากเยื่อยึดโดยรอบ (mesosalpinx) ตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพภายนอก จากนั้น จะตัดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ประกอบด้วย ส่วนรอยต่อระหว่างมดลูกกับท่อนำไข่ (utero-tubal junction, UTJ) อีสมีนัส (isthmus) แอมพูลลา (ampulla) และอินฟันดิบูลัม (infundibulum) โดยให้แต่ละส่วนยาวประมาณ 2 ซม. เช่นกัน เก็บรักษาสภาพของชิ้นเนื้อปึกมดลูกและท่อนำไข่ใน 10% neutral buffer formalin สำหรับการตรวจลักษณะต่าง ๆ ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา และเก็บชิ้นเนื้ออีกส่วนเก็บไว้ใน 4% paraformaldehyde สำหรับการตรวจหาการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและโปรเจสเทอโรนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

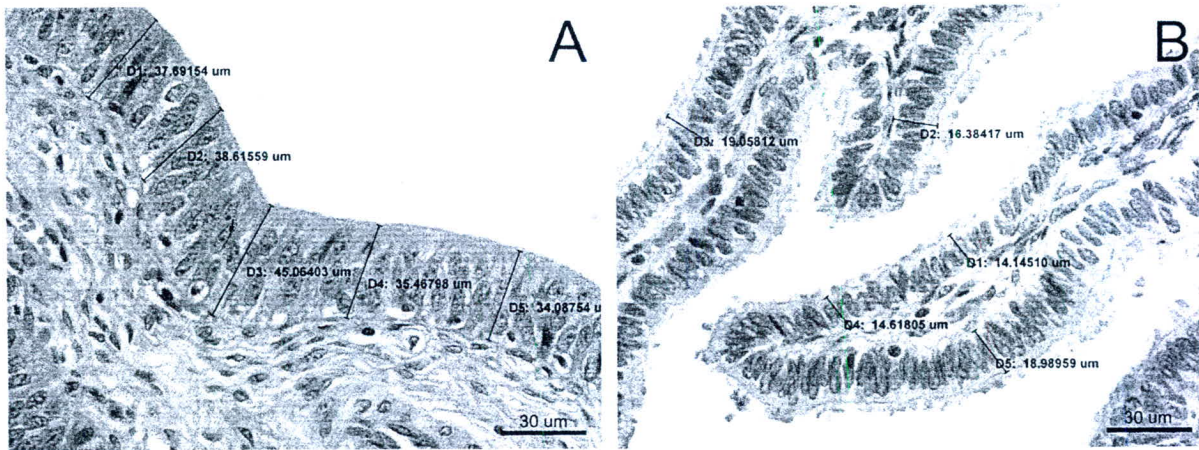
การตรวจลักษณะทางจุลกายวิภาค

นำชิ้นเนื้อตัวอย่างของมดลูกและท่อนำไข่ที่ผ่านการตรึงสภาพใน 10% neutral buffer formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ไปผ่านกระบวนการล้าง (washing) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) การเคลียร์ (clearing) การแทรกซึมของพาราฟิน (paraffin infiltration) กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ดังกล่าวนี้จะทำโดยใช้เครื่อง automatic tissue processor (REICHERT JUNG HISTOKINETTE, Cambridge Instruments company, UK) จากนั้น จะฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (embedding) และตัดชิ้นเนื้อ (sectioning) โดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome; SHANDON AS 325 RETRACTION, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) โดยให้ชิ้นเนื้อมีความหนาประมาณ 4-5 ไมครอน (μm) นำชิ้นเนื้อมาติดบนสไลด์ (affixing) เมื่อชิ้นเนื้อแห้งสนิท จึงนำชิ้นเนื้อเข้าสู่กระบวนการย้อมสี (staining) ด้วยสีย้อมฮีมาทอกซิลิน และอีโอซิน (hematoxylin & eosin, H&E)

ศึกษาลักษณะของมดลูกและท่อนำไข่ของสุกรสาวทางจุลกายวิภาค ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (light microscope, BX50, Olympus, Japan) โดยใช้กำลังขยายต่าง ๆ กัน และยังมี การตรวจสอบตัวแปรอื่น ๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างรวมกับการใช้ ocular micrometer ชนิดตาราง 5 X 5 ช่อง ซึ่งยึดติดกับเลนส์ตา ที่กำลังขยายที่เหมาะสม บันทึกลักษณะที่พบของเยื่อบุมดลูก และท่อนำไข่ของสุกรสาวตามตัวแปรที่กำหนดซึ่งได้รายงานไว้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Teamsuwan et al., 2010) ดังนี้

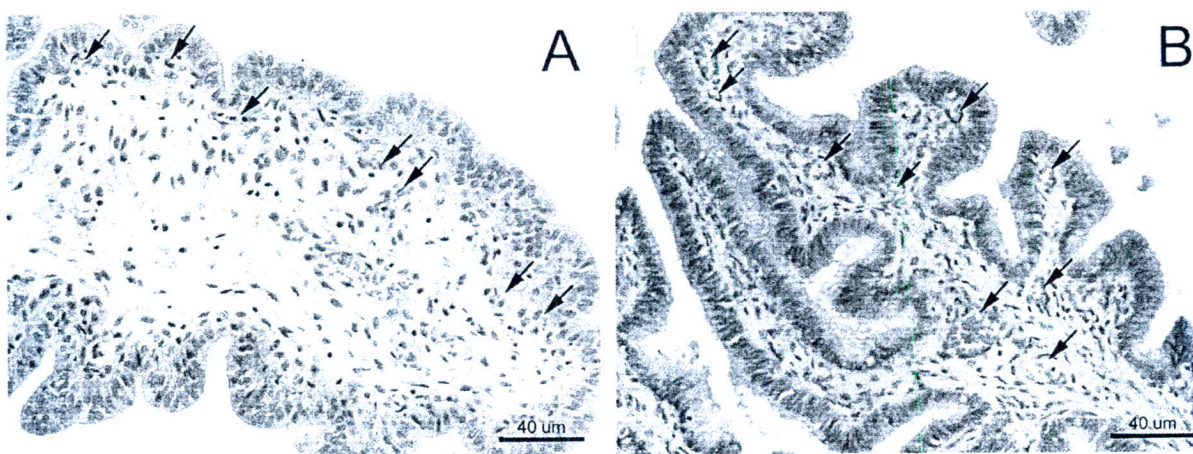
- ลักษณะของชั้นเยื่อบุผิว (epithelial surface) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิดตามที่สามารถปรากฏได้ในมดลูกและท่อนำไข่ของสุกร ได้แก่ เยื่อบุผิวชนิด pseudostratified columnar epithelium ชนิด simple columnar epithelium และชนิด simple cuboidal epithelium ศึกษาที่กำลังขยาย 400x
- ลักษณะความผิดปกติโดยทั่วไปที่อาจเกิดขึ้นกับชั้นเยื่อบุผิวและชั้นใต้เยื่อบุผิว รวมทั้งโครงสร้างต่าง ๆ ของมดลูกและท่อนำไข่ ศึกษาที่กำลังขยาย 400x
- ความสูงของชั้นเยื่อบุผิว (ไมโครเมตร, μm) โดยวัดตั้งแต่ basement membrane ถึงขอบบนสุดของเยื่อบุผิว ซึ่งไม่รวมส่วนที่ยื่นออกมาจากเซลล์คัดหลังได้แก่ สารคัดหลัง (secretory droplets) และซีเลีย (cilia) ที่กำลังขยาย 400x (รูปที่ 2) วัดความสูงของชั้นเยื่อบุผิวโดยการถ่ายภาพชั้นเยื่อบุผิวผ่านกล้องดิจิทัล Micropublisher 5.0 (Qimage, Surrey, BC, Canada) ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง แล้วนำภาพ

มาวัดความสูงผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image-PRO[®] PLUS 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA) โดยถ่ายภาพจำนวน 5 ภาพต่อชิ้นเนื้อ และวัดความสูงจำนวน 5 ตำแหน่งต่อภาพ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ตัวอย่างการวัดความสูงของชั้นเยื่อบุผิว (luminal epithelium) ของมดลูก (A) และเยื่อบุผิวที่หน้าไข่ ส่วนแอมพลลา (B) ของสุกรสาวโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งมีหน่วยเป็นไมโครเมตร

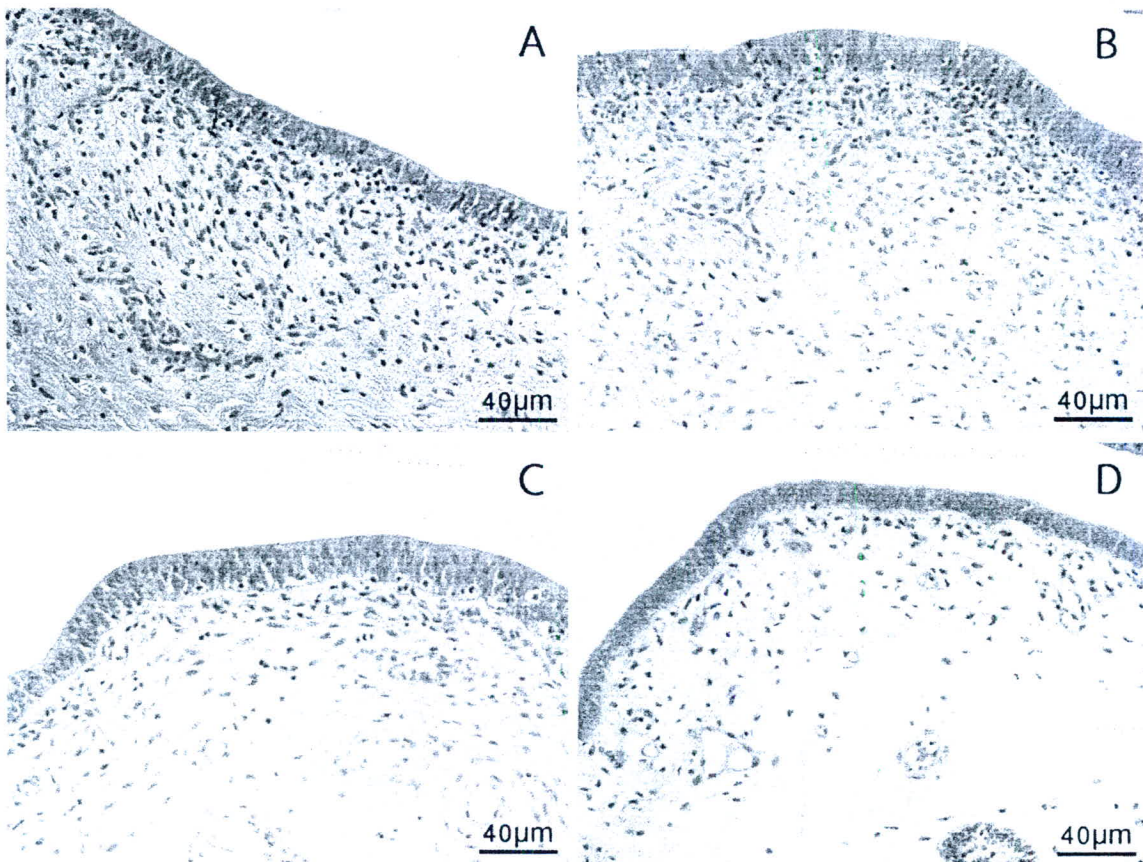
- จำนวนของหลอดเลือดชนิดต่าง ๆ (arteriole, vein, capillary) ซึ่งนับรวมกันภายในชั้นใต้เยื่อบุผิว (subepithelial connective tissue) ของมดลูกและที่หน้าไข่สุกรสาว (รูปที่ 3) โดยตรวจนับ 20 พื้นที่ ภายใต้กำลังขยาย 200x ร่วมกับการใช้ ocular micrometer ชนิดตาราง 5x5 ช่อง พร้อมกันนี้จะตรวจสอบลักษณะการคั่งของเลือด (blood congestion) ในชั้นใต้เยื่อบุผิวของมดลูกและที่หน้าไข่ร่วมด้วย



รูปที่ 3 ลักษณะของหลอดเลือดชนิดต่าง ๆ (ลูกศรชี้) ในชั้นใต้เยื่อบุผิวของมดลูก (A) และชั้นใต้เยื่อบุผิวของที่หน้าไข่ ส่วนแอมพลลา (B) ของสุกรสาว

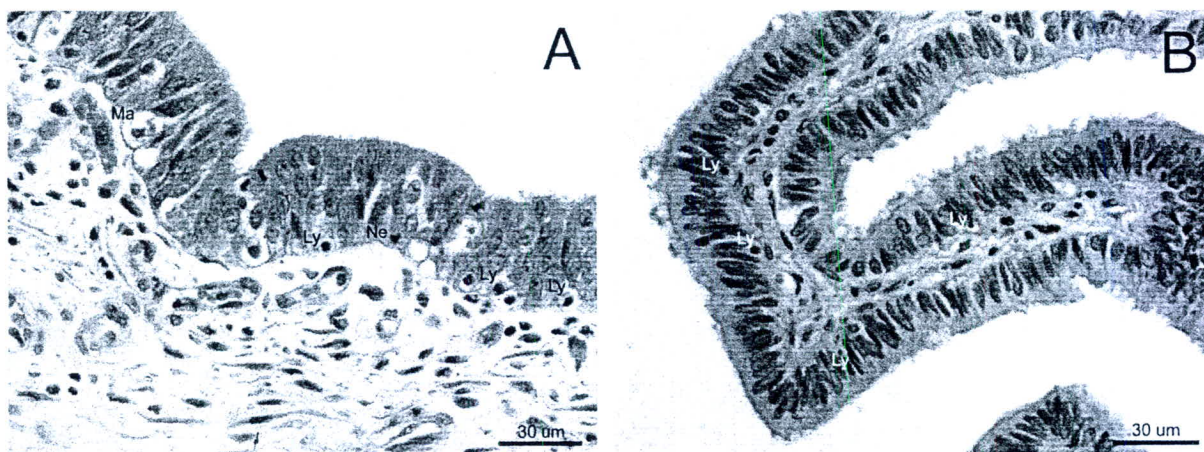
- ลักษณะการบวมน้ำ (edematous score) ที่ปรากฏในชั้นใต้เยื่อบุผิวของมดลูก โดยกำหนดให้ คะแนน 0 = ไม่พบ; 1 = พบน้อย; 2 = พบปานกลาง; 3 = พบมาก ตามรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Teamsuwan และคณะ (2010) โดยศึกษาที่กำลังขยาย

200X (รูปที่ 4) ในการศึกษาลักษณะการบวมน้ำครั้งนี้จะตรวจสอบเฉพาะในเยื่อบุมดลูกเท่านั้น เนื่องจากพื้นที่ของชั้นใต้เยื่อบุมดลูกของท่อนำไข่ในแต่ละส่วนไม่สม่ำเสมอ เช่น ในท่อนำไข่ส่วนอิสร์มีสจะมีพื้นที่น้อยมากสังเกตการบวมน้ำได้ไม่ชัดเจน ขณะที่ในส่วนรอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ (UTJ) มีพื้นที่กว้าง ตัวแปรนี้จึงไม่สมควรนำมาใช้ตรวจสอบเปรียบเทียบในท่อนำไข่สุกรสาว



รูปที่ 4 ลักษณะของการบวมน้ำ (edematous score) ระดับต่าง ๆ ภายในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุมดลูกสุกรสาว; คะแนน 0 (A), คะแนน 1 (B), คะแนน 2 (C), และคะแนน 3 (D)

- จำนวนต่อมมดลูกชั้นผิว (superficial endometrial gland) โดยใช้ ocular micrometer ชนิด 5x5 (25 ช่อง) ติดไว้ที่ eyepiece ของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยาย 100x ทำให้พื้นที่ของ ocular micrometer มีขนาดเท่ากับ 250,000 ตารางไมโครเมตร สุ่มนับต่อมมดลูกจำนวน 20 พื้นที่ ผลที่ได้มีหน่วยเป็น จำนวนต่อม/พื้นที่
- จำนวนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ประกอบด้วย เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ ที่สามารถปรากฏได้เฉพาะภายในชั้นเยื่อบุมดลูกและท่อนำไข่แต่ละส่วน (รูปที่ 5) โดยใช้ ocular micrometer ชนิด 5x5 (25 ช่อง) ติดไว้ที่ eyepiece ของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ตรวจสอบที่กำลังขยาย 400x ซึ่งทำให้พื้นที่ของ ocular micrometer มีขนาดเท่ากับ 15,625 ตารางไมโครเมตร โดยสุ่มนับตามแนวของเยื่อบุมดลูก จำนวน 20 พื้นที่ ซึ่งจะได้ผลการตรวจสอบเป็น จำนวนเซลล์/พื้นที่ (15,625 ตารางไมโครเมตร)



รูปที่ 5 การปรากฏของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันภายในชั้นเยื่อหุ้มของปีกมดลูก (A) ภายในชั้นเยื่อหุ้มของท่อนำไข่ ส่วนแอมพลลา (B) ของสุกรสาว; Lymphocyte (Ly), Macrophage (Ma), Neutrophil (Ne)

การศึกษาและประเมินผลการปรากฏของตัวรับสเตียรอยด์ฮอร์โมนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ในการศึกษาการปรากฏของตัวรับสเตียรอยด์ฮอร์โมน จะใช้ตัวอย่างของสุกรสาวทั้งหมด 22 ตัวอย่าง แบ่งเป็น สุกรสาวที่มีรังไข่ในระยะฟอลลิคูลาร์จำนวน 5 ตัว (control group) สุกรสาวที่มีภาวะของถุงน้ำรังไข่ชนิดใบเดียวจำนวน 7 ตัว และสุกรสาวที่มีภาวะถุงน้ำรังไข่ชนิดหลายใบจำนวน 10 ตัว โดยวิธีในการตรวจสอบทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในการศึกษานี้จะใช้เทคนิค Avidin-Biotin-Peroxidase (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) ซึ่งเป็นเทคนิคในการศึกษาการปรากฏของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนตามวิธีของ Sukjumlong และคณะ (2003) เพื่อตรวจหาความผิดปกติหรือการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นได้ในโครงสร้างชั้นต่าง ๆ ของมดลูกและท่อนำไข่ของสุกรสาวที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากภาวะถุงน้ำรังไข่ โดยมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้ นำชิ้นเนื้อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ที่ตัดแล้ว มาวางลงบนสไลด์แก้วชนิด Super-Frost (Menzel-Graser, Freiburg, Germany) ออบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 40°C ประมาณ 12 ชั่วโมง นำสไลด์ใส่ลงใน 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) แล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (750 วัตต์) 5 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้แอนติเจนที่ต้องการแสดงออกมากขึ้น (antigen retrieval) ปลอ่ยทิ้งไว้ให้ชิ้นเนื้อเย็นลง แล้วจึงนำสไลด์ใส่ลงใน 3% hydrogen peroxide ที่ผสมในเมธานอล ประมาณ 20 นาที เพื่อสกัดกั้นปฏิกิริยา endogenous peroxidase activity

จากนั้น จึงเข้าสู่ขั้นตอนทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยการเติม normal horse serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame) ที่ความเข้มข้น 1:10 ลงบนชิ้นเนื้อ แล้งจึงใช้ primary antibody ที่แตกต่างกันไป โดยการตรวจหาตัวรับเอสโตรเจน จะใช้ monoclonal mouse ER-alpha antibody (C-311; sc-787, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) ที่ความเข้มข้น 1:50 ขณะที่ การตรวจหาตัวรับโปรเจสเตอโรน จะใช้ monoclonal mouse PR antibody (PR-2C5, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) ที่ความเข้มข้น 1:200 โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาประมาณ 18-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีสไลด์ควบคุมลบ (negative control) เป็นสไลด์ชิ้นเนื้อที่เติม normal mouse IgG (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology Inc.) แทนที่ primary antibody ขั้นตอนต่อมา จะใช้ secondary antibody คือ biotinylated horse anti-mouse IgG (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories Inc., Burlingame) ที่ความเข้มข้น 1:200 เป็นเวลา 30

นาที่ และ Avidin-Biotin complex Vectastain (ABC-Elite standard; Vector Laboratories Inc., Burlingame) แล้วจึงใช้ 3,3'-diaminobenzidine (DAB, DAKO, Glostrup, Denmark) ใน 3% hydrogen peroxide เพื่อทำให้เกิดสีน้ำตาลบริเวณที่มีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ขั้นตอนสุดท้ายคือ ย้อมสีชั้นเนื้อด้วย Mayer's hematoxylin และปิดทับชั้นเนื้อด้วย gelatin-glycerin สไลด์ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมด นำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) และบันทึกภาพทั้งหมดด้วยกล้องดิจิทัลชนิดที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (MicroPublisher RTV camera, QImaging, BC, Canada)

การวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง จะสังเกตและประเมินผลของการติดสีบวก (positive staining) ในส่วนต่าง ๆ ของมดลูกและท่อนำไข่ โดยไม่ระบุหมายเลขหรือสัญลักษณ์ใด ๆ ให้ผู้ที่ประเมินทราบ โดยชั้นต่าง ๆ ของมดลูกที่จะต้องวิเคราะห์ ประกอบด้วย surface epithelium, glandular epithelium, subepithelial connective tissue และ myometrium ในขณะที่การประเมินในท่อนำไข่ ประกอบด้วย surface epithelium, subepithelial connective tissue และ myosalpinx โดยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image-Pro® PLUS 6.0 Programming software (Media Cybernetics, Inc., MD, U.S.A.) ตามการศึกษาของ Roongsitthichai et al. (2011)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.0 (SAS Inst Cary NC USA, 2002) วิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้ General linear model procedure โมเดลทางสถิติศึกษาตัวแปรตาม (dependent variable) ได้แก่ อายุ น้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโต จำนวนวันสูญเสีย อัตราการตกไข่ น้ำหนักรังไข่ น้ำหนักมดลูก ความยาวของมดลูก ความสูงของเยื่อหุ้มของมดลูก และจำนวนหลอดเลือด ตัวแปรอิสระ ได้แก่ กลุ่มของสุกรสาว แบ่งแยกตามความผิดปกติของรังไข่ได้แก่ รังไข่ปกติ รังไข่มีถุงน้ำชนิดใบเดี่ยว และรังไข่มีถุงน้ำชนิดหลายใบ คำนวณค่าเฉลี่ย Least square means จากโมเดลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Least significant different test (LSD) ตัวแปรตามที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ วิเคราะห์ด้วยวิธี Chi-square ลักษณะการบวมน้ำของชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อหุ้มวิเคราะห์ด้วยวิธี Kruskal Wallis และ Wilcoxon rank-sum test โดยใช้ NPAR1WAY procedure ค่า $p < 0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ