

การใช้เทคโนโลยีอัลตราซาวด์ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ฟอโค

วิชณ ไพศาลรุ่งพนา^{1/} จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์^{1/} จุฬฉัตร ชาปัญญา^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคนมเพศผู้ด้วยการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะและคุณลักษณะน้ำเชื้อ โดยใช้ฟอโฟพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 2-7 ปี จำนวน 25 ตัว ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งฟอโฟพันธุ์ลำพูนกลาง จังหวัดลพบุรี ริดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 6 สัปดาห์ ทำการวัดขนาดเส้นรอบวงอันทะ ตรวจอันทะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์ และตรวจคุณลักษณะน้ำเชื้อสด ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้นอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตรวจร้อยละความผิดปกติของอสุจิ ร้อยละอสุจิมีชีวิต วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของฟอโฟพันธุ์ ได้แก่ อายุของฟอโฟพันธุ์ ณ วันที่เก็บตัวอย่าง และเส้นรอบวงอันทะ กับคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ และค่าที่ได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ รวมทั้งสร้างสมการเพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อด้วยสมการถดถอยพหุคูณ (multiple linear regression models) ผลการศึกษาพบว่าอายุมีความสัมพันธ์ปานกลางกับเส้นรอบวงอันทะของฟอโฟโค ($r = 0.50$; $p < 0.05$) อายุและเส้นรอบวงอันทะมีความสัมพันธ์ต่ำกับคุณภาพน้ำเชื้อหลายลักษณะ ($r = -0.35$ ถึง 0.21 ; $p < 0.05$) คะแนนรอยโรค (focal point) ซึ่งประเมินจากการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะ มีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำถึงปานกลางกับคุณภาพน้ำเชื้อหลายลักษณะ ทั้งความเข้มข้นของอสุจิ อสุจิที่ผลิตได้ ร้อยละอสุจิมีชีวิต ร้อยละอสุจิผิดปกติ และอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ($r = -0.19$ ถึง -0.52 ; $p < 0.05$) และมีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำกับความผิดปกติของอสุจิ ($r = 0.21$; $p < 0.05$) ในขณะที่ค่าความเข้มของภาพถ่ายอัลตราซาวด์อันทะ (pixel intensity) มีค่าความสัมพันธ์กับอายุเท่านั้น ($r = 0.18$; $p < 0.05$) จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณพบว่าคะแนนรอยโรคในอันทะที่เพิ่มขึ้นมีผลทำคุณภาพน้ำเชื้อต่ำลงเกือบทุกลักษณะ นอกจากนี้ พบว่า focal point อายุ และเส้นรอบวงอันทะ มีศักยภาพสำหรับใช้ในการสร้างสมการเพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อในบางลักษณะ ได้แก่ ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อย่างไรก็ตาม ความแม่นยำในการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวยังมีจำกัด (R squared, $R^2 \approx 0.28$ ถึง 0.35) ดังนั้น การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะฟอโคมีประโยชน์ในการประเมินรอยโรคและสามารถบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดขึ้นได้เบื้องต้น เพื่อเพิ่มความแม่นยำของการพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อ จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในส่วนของการเพิ่มขนาดตัวอย่าง รวมถึงเลือกใช้ตัวแปรทำนายอื่นๆ เพื่อสร้างสมการทำนายที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถนำไปใช้ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ รวมถึงใช้ในการคัดโคฟอโฟพันธุ์ออกจากฝูงได้

คำสำคัญ: การประเมินระบบสืบพันธุ์เพศผู้, การทำนาย, ฟอโค, เทคนิคอัลตราซาวด์

เลขทะเบียนวิจัย: 63(1)-0208-099

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

^{2/}ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งฟอโฟพันธุ์ลำพูนกลาง ตำบลหนองรี อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี

Ultrasonic technology for bull breeding soundness evaluation (BBSE)

Witsanu Paisanrunghana^{1/} Janyaporn Rungruangsak^{1/} Jullachat Chapanya^{2/}

Abstract

The aim of the study was to assess the correlation between breeding soundness using ultrasonography of the testes and semen quality in dairy bulls. Twenty-five Tropical Holstein sires at the age of 2 - 7 years from Lumphayaklang frozen semen production research center in Lopburi province, were used in this study. Semen was regularly collected weekly for six successive weeks, one-week interval. All bulls were measured for scrotal circumference, scrotal ultrasonography, and fresh semen quality such as volume, sperm concentration, sperm motility using computer-assisted sperm analysis (CASA), percentage of sperm abnormal morphology, and percentage of sperm viability. The correlation analysis was performed to analyze the correlation between scrotal circumference, age at measuring, semen quantity and quality as well as ultrasound evaluations. Moreover, multiple regression analysis was used to predict semen quality characteristics. The results showed that focal point, as a measure of fibrotic lesion in testis, had low to moderate negative correlations with semen quality including sperm concentration, percentage of sperm viability, percentage of sperm abnormal morphology, and sperm motility ($r = -0.19$ to -0.52 ; $p < 0.05$), but it had a low positive correlation with sperm abnormal morphology ($r = 0.21$; $p < 0.05$). Results from multiple regression analysis revealed significant negative impacts of focal point on most of semen quality characteristics. Focal point, combined with age of bulls and scrotal circumference were potentially useful in predicting some characteristics of semen including viability, motility, progressive motility, and integrity of plasma membrane. However, predictive ability of the regression models was limited ($R^2 \approx 0.28$ to 0.35). In conclusion, ultrasonography technology is a useful technique for bull breeding soundness evaluation (BBSE) due to its ability to detect and characterize testicular pathology, particularly testicular fibrosis. To increase prediction accuracy of models for predicting semen quality, further studies with larger sample size and other candidates for predictor variables are required, which would be eventually used for breeding soundness evaluation and culling decisions of bulls.

Keywords: Breeding soundness evaluation (BBSE), Prediction, Bull, Ultrasound technique

Registered No: 63(1)-0208-099

^{1/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

^{2/}Lumphayaklang Frozen Semen Production and Research Center Lamsonthi Lopburi

คำนำ

ในแต่ละปี กรมปศุสัตว์ ต้องผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อให้บริการแก่เกษตรกรมากกว่า 500,000 โด๊ส (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2563) โดยเฉพาะโคนม ที่ได้พัฒนาปรับปรุงขึ้นมาภายใต้ชื่อพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ ซึ่งผ่านการทดสอบและคัดเลือกในหลายขั้นตอนกว่าจะมาเป็นพ่อพันธุ์ผสมเทียมที่ผ่านมาพ่อพันธุ์ส่วนใหญ่มีคุณภาพน้ำเชื้อดีสามารถรีดเก็บและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ตามเกณฑ์ แต่ในบางครั้งมีการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง ที่ส่งผลกระทบต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์และการให้ผลผลิตน้ำเชื้อ โดยการเกิดสภาวะสูญเสียสภาพเหมาะสมต่อการสร้างอสุจิ โดยที่โคไม่แสดงอาการป่วย ดังนั้นการประเมินความรุนแรงของผลกระทบที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ของโคได้ว่าสภาวะการณั้เกิดขึ้นเป็นการชั่วคราวหรือถาวร จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถปรับใช้ในการจัดการพ่อพันธุ์ผสมเทียมที่ดี การประเมินระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ (bull breeding soundness evaluation, BBSE) เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ของพ่อโคในการให้ผลผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพ เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและใช้เป็นแนวทางการแก้ไขปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ได้ ซึ่งโคที่ได้รับการประเมินระบบสืบพันธุ์เพศผู้จะพบปัญหาความไม่สมบูรณ์พันธุ์แบบไม่แสดงอาการ (subfertility) ประมาณร้อยละ 20-40 (Kastelic and Brito, 2012) ซึ่งการเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีการกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) เพื่อทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งบอกถึงความไม่สมบูรณ์พันธุ์แบบไม่แสดงอาการได้ (Parkinson, 2004) การประเมินน้ำหนักรองอั้นตะ โดยการวัดขนาดเส้นศูนย์กลางของอั้นตะ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ BBSE (Barth et al., 2008) เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการทำนายปริมาณอสุจิ (sperm output) (Gibson et al., 1985) แต่อย่างไรก็ตามการวัดเส้นรอบวงเพื่อประเมินขนาดอั้นตะนั้น ไม่สามารถใช้ทำนายรอยโรคที่เกิดขึ้นภายในอั้นตะ (pathology) หรือทำนายผลของรอยโรคภายในอั้นตะต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของโคเพศผู้ (Kastelic and Brito, 2012)

โคเพศผู้ที่มีปัญหาด้านความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ การผลิตและคุณภาพน้ำเชื้อ มักพบจากการทำ BBSE โดยสัตวแพทย์ ซึ่งหากยังพบเร็วก็สามารถทำการรักษาได้ไว โดยสัตวแพทย์จะดูจากประวัติการตรวจพื้นฐานทั่วไป และการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์เป็นวิธีการที่ไม่เป็นอันตรายต่อตัวสัตว์ (noninvasive) และสามารถใช้ในการวิเคราะห์เนื้อเยื่อที่อั้นตะและบริเวณอึพิดิไดมิส (epididymis) รวมถึงสามารถบอกรอยโรคที่จำเพาะบริเวณเนื้อเยื่ออั้นตะของโคเพศผู้ได้ (Eilts and Pechman, 1988; Cartee et al., 1989; Yimer et al., 2001; Gloria et al., 2018) ซึ่งการพบรอยโรค (fibrosis lesion) ที่บริเวณอั้นตะมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อโดยตรง (Arteaga et al., 2005) นอกจากนี้ Kastelic and Brito (2012) รายงานการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์เนื้อเยื่อบริเวณอั้นตะในโคพบว่าความเข้มของภาพ (parenchymal pixel intensity, PI) มีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อ การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์จึงเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพสูงในการบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เนื้อเยื่อบริเวณอั้นตะหรือระบบสืบพันธุ์และยังมีความ

ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและตัวสัตว์ (Coulter and Bailey, 1988) ดังนั้น เทคนิคอัลตราซาวด์จึงเป็นวิธีที่มีศักยภาพสำหรับใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณอัณฑะและการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ด้วยการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อัณฑะและคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนม

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 2-7 ปี จำนวน 25 ตัว ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์สุภาพกลาง จังหวัดลพบุรี ทำการประเมินอัณฑะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์และรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียม เพื่อประเมินคุณลักษณะของน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ติดต่อกัน

การตรวจประเมินอัณฑะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์

นำพ่อพันธุ์เข้าของบังคับเพื่ออาบน้ำและทำความสะอาดบริเวณอัณฑะและเช็ดให้แห้ง ใช้เจลอัลตราซาวด์ทาบริเวณอัณฑะ ตั้งค่าเครื่องอัลตราซาวด์เป็นโหมด B (B-mode) ความถี่ 7.5 MHz (Honda electronic; HS1600V) วางโพรบให้แนบกับอัณฑะ บันทึกภาพถ่ายทั้งทิศทางแนวยาว (longitudinal plane) และทิศทางแนวนอน (horizontal plane) โดยบันทึกภาพตำแหน่งละ 3 ภาพ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มของภาพ (PI) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ความเข้มของภาพ (Image J, U. S. National Institutes of Health, MD, USA) ตามวิธีการของ Tomlinson et al. (2017) โดย PI บริเวณอัณฑะจะถูกวัดโดยการวาดวงกลมหกจุด เส้นผ่านศูนย์กลางจุดละ 10 มิลลิเมตร วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย PI (PI total) ของภาพแต่ละตำแหน่ง จากภาพถ่ายทิศทางแนวยาว (PI vertical) และแนวนอน (PI horizontal)

คำนวณค่าคะแนนรอยโรค (focal point) ซึ่งเป็นค่าคะแนนรอยโรคจากการวัดขนาดของรอยโรคบริเวณอัณฑะจากภาพถ่ายอัลตราซาวด์ (fibrosis lesion) ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยโรคในภาพและกำหนดเป็นคะแนนตามขนาดของรอยโรค (Table 1) ค่า focal point คำนวณได้จากผลรวมของคะแนนจากจุดรอยโรคที่ปรากฏทั้งหมดในภาพ

Table 1 Scoring of testicular fibrosis lesion (modified from Barth et al., 2008)

Point	Criteria
1	fibrosis lesion size ≤ 2 mm
2	fibrosis lesion size $>2 - 5$ mm
3	fibrosis lesion size $>5 - 10$ mm
4	fibrosis lesion size >10 mm

การบันทึกข้อมูล

1) เส้นรอบวงอวัยวะ (scrotal circumference, cm.) วัดด้วยสายเทปวัดเส้นรอบวงลูกอวัยวะ โดยวัดรอบอวัยวะทั้งข้างซ้ายและขวาบริเวณส่วนรอบที่กว้างที่สุด ขณะที่โคนนิ้วเท้าที่อวัยวะอยู่ในแนวตั้งฉากกับพื้นราบ

2) ปริมาตร (volume, ml.) วัดปริมาณน้ำเชื้อจากระดับที่ระบุปริมาตรบนหลอดทดลอง ด้วยสายตา

3) ความเข้มข้นของอสุจิ (sperm concentration, $\times 10^6$ cell/ml.) วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (Accucell photometer, IMV technologies, France)

4) จำนวนอสุจิที่รีดเก็บได้ทั้งหมด (total sperm, $\times 10^6$ cell) คำนวณจากผลคูณของปริมาตรและความเข้มข้นของอสุจิ

5) อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (motility and progressive motility, %) วัดด้วยเครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (computer-assisted sperm analysis: CASA) (The IVOS II CASA system driven by software version 14: Hamilton Thorne Inc., Beverly, USA.)

6) อสุจิมีชีวิต (sperm viability, %) ประเมินจากการย้อมสี eosin-nigrosin (Dott and Foster, 1972) โดยการนำน้ำเชื้อสดปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม eosin-nigrosin จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผสมกับสีย้อมแล้ว ปริมาณ 7 μ l สเมียร์ลงบนกระจกสไลด์และทิ้งให้แห้ง อสุจิมีชีวิตจะถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบไม่ตัดแสง (Nikon, Japan) นับอสุจิจำนวน 200 ตัว ที่กำลังขยาย 400 เท่า (400X) โดยอสุจิที่ไม่ติดสี นับเป็นอสุจิมีชีวิต และอสุจิที่ติดสีม่วงแดงนับเป็นอสุจิที่ตายแล้ว คำนวณร้อยละอสุจิมีชีวิตโดยนำจำนวนอสุจิที่ไม่ติดสีที่นับได้ คูณด้วย 100 แล้วหารด้วย 200

$$\text{ร้อยละอสุจิมีชีวิต (\% sperm viability)} = \frac{\text{อสุจิที่ไม่ติดสี} \times 100}{200}$$

7) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (functional integrity of sperm plasma membrane) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิวัดโดยใช้ Hypo-osmotic swelling test (HOS test) ตามวิธีของ Rota et al. (2000) ทำโดยการผสมน้ำเชื้อปริมาณ 0.1 ml. กับน้ำยา HOS solution ปริมาณ 1 ml. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 40 นาที จากนั้นนำส่วนผสม 0.5 ml. ผสมกับ HOS solution ที่ใส่ 5% formalin เข้มข้น จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมา 7 μ l. หยดลงบนกระจกสไลด์ ปิดทับด้วยแผ่นกระจกบาง และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง กำลังขยาย 1000 เท่า (1000X) นับจำนวนอสุจิ 200 ตัว ตัวอสุจิที่ให้ผลบวกทางจะม้วนงอ ตัวอสุจิที่นับเป็นอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ คำนวณร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ โดยนำจำนวนอสุจิทางจะม้วนงอที่นับได้ คูณด้วย 100 แล้วหารด้วย 200

$$\text{ร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (\% sperm plasma membrane integrity)} = \frac{\text{อสุจิที่ม้วนงอ} \times 100}{200}$$

8) อสุจิผิดปกติ (sperm defects) ใช้วิธีการย้อมสีแบบ William's staining ตามวิธีการของ Williams และดัดแปลงด้วยวิธีของ Lagerlof (Kavak et al., 2004). ทำโดยการหยดน้ำเชื้อปริมาณ 20 μ l. ลงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วเสมีร์ บางๆ ทิ้งให้แห้ง และนำไปปลนด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์จากนั้นแช่สไลด์ใน absolute ethyl alcohol 3-4 นาที และแช่ใน 0.5% chloramines solution 1-2 นาที จนกว่าฝ้าหรือ mucus บนสไลด์หมดไป ล้างในน้ำสะอาดและใน 96% ethyl alcohol จากนั้นย้อมด้วยสี Carbon fuchsin-eosin 2-10 นาที ล้างในน้ำสะอาดและซับให้แห้ง จากนั้นตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ light microscope กำลังขยาย 1000 เท่า (1000X) และทำการตรวจรูปร่างของอสุจิในส่วนหัวที่มีการย้อมสี โดยนับอสุจิจำนวน 200 ตัว คำนวณร้อยละอสุจิผิดปกติ โดยนำจำนวนอสุจิที่ผิดปกติที่ส่วนหัวที่นับได้ คูณด้วย 100 แล้วหารด้วย 200

$$\text{ร้อยละอสุจิผิดปกติ (\% sperm defects)} = \frac{\text{อสุจิที่ผิดปกติที่ส่วนหัว} \times 100}{200}$$

ข้อมูลที่บันทึกถูกตรวจสอบความถูกต้อง และตัดข้อมูลที่มีค่าผิดปกติ (outliers) ออกจากไฟล์ข้อมูล ก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของพ่อพันธุ์ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ ณ วันที่เก็บตัวอย่าง เส้นรอบวงอذنทะ และคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ และสร้างแบบจำลองสมการถดถอยพหุคูณ (Multiple Regression Model) เพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้ลักษณะทางกายภาพของพ่อพันธุ์ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ เส้นรอบวงอذنทะ และค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ (focal point และ PI) การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระหลายตัวกับตัวแปรตาม เพื่อศึกษาว่ามีตัวแปรอิสระตัวใดบ้างที่ร่วมกันทำนายหรือพยากรณ์ หรืออธิบายการผันแปรของตัวแปรตามได้ โดยเขียนความสัมพันธ์ในรูปแบบของสมการได้ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon,$$

เมื่อ

Y คือ ค่าของตัวแปรตาม

X_i คือ ค่าของตัวแปรอิสระที่ i ($i = 1, \dots, k$), โดย k คือ จำนวนตัวแปรอิสระ

β_0 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของจุดตัดแกน Y (intercept)

β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระ X_i

ε คือ ค่าความคลาดเคลื่อน (error or residual)

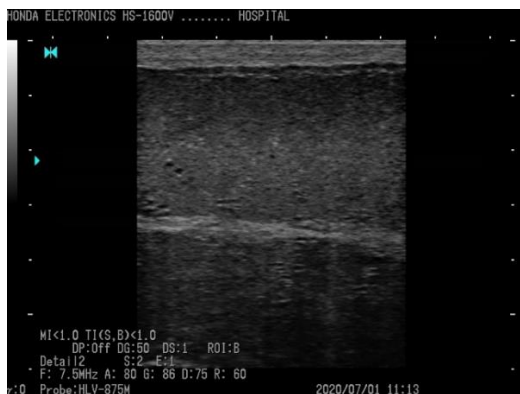
ใช้เทคนิค Stepwise ในการเลือกตัวแปรอิสระในการสร้างสมการถดถอย สำหรับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อแต่ละลักษณะ รายงานโมเดลของสมการถดถอยที่ให้ประสิทธิภาพโมเดลสูงที่สุด

(model performance) โดยพิจารณาจากค่า overall p-value, overall F statistics, R squared (R^2), adjusted R squared (adj. R^2) และ Bayesian information criteria (BIC) นอกจากนี้ ได้ใช้การประเมินภาวะร่วมเส้นตรงหลายตัวแปรของแบบจำลอง (multicollinearity) โดยดูจากค่า Tolerance (Tolerance = $1 - R^2$) ซึ่งบ่งบอกถึงระดับความสัมพันธ์กันของตัวแปรอิสระ หากค่า Tolerance มีค่าน้อยกว่า 0.1 บ่งบอกว่ามีปัญหา multicollinearity ขั้นรุนแรง หากค่า Tolerance มีค่าน้อยกว่า 0.2 แสดงว่ามีปัญหาระดับมาก (Brace et al., 2012; Weisburd and Britt, 2014) การวิเคราะห์ทางสถิติกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ใช้โปรแกรม R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018) ในการวิเคราะห์สหสัมพันธ์และการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจประเมินอวัยวะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์

การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ที่บริเวณอวัยวะ เพื่อประเมินความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ที่ส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะของน้ำเชื้อ ด้วยอัลตราซาวด์โหมด B (B-mode) ความถี่ 7.5 MHz บันทึกภาพถ่ายทั้งทิศทางแนวนอนและขวาง ทำการวิเคราะห์ความเข้มของภาพออกมาเป็นค่า PI vertical และ PI horizontal ร่วมกับการวัดขนาดของจุดที่เกิดขึ้นบริเวณรอยโรคและแปลงค่าเป็นคะแนน focal point เพื่อจำแนกลักษณะการเกิด fibrosis lesion ตามวิธีของ Barth et al. (2008) ซึ่งแบ่งลักษณะการเกิดรอยโรคออกเป็น 5 กลุ่ม ผลจากการประเมินพ่อพันธุ์โคทั้งหมด 25 ตัว พบลักษณะการเกิดรอยโรค 3 แบบ คือรอยโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 18 ตัว ปานกลาง (moderate) จำนวน 6 ตัว และรุนแรง (severe) จำนวน 1 ตัว (Figure 1) แต่ไม่พบโคที่อวัยวะปกติไม่มีรอยโรค (normal) และรอยโรคที่มีลักษณะรุนแรงมาก (very severe) การศึกษาเกี่ยวกับการอัลตราซาวด์อวัยวะในสัตว์หลายชนิด รวมถึงสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก เช่น แกะ พบว่าค่า PI มีความสัมพันธ์กับลักษณะของเซลล์ของ seminiferous tubules (Powe et al., 1988 ; Evans et al., 1996) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสร้างอสุจิโดยตรง (Arteaga et al., 2005)



Mild fibrotic changes (score 2)



Moderate fibrotic change (score 3)



Severe fibrotic change (score 4)

Figure 1 Fibrosis score of bulls evaluated based on Barth et al. (2008)'s method

การศึกษาในครั้งนี้ใช้การประเมินอณูหะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์ต่อเนื่อง 6 สัปดาห์ติดต่อกัน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะการเกิด fibrosis ในอณูหะ และแบ่งลักษณะรอยโรคตามความรุนแรงของการเกิด fibrosis ซึ่งการประเมินจาก grey scale จากภาพอัลตราซาวด์นั้นสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่างๆ ในอณูหะได้อย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว (Chandolia et al., 1997) พ้อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นพ้อพันธุ์ที่ยังใช้งานผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในปัจจุบัน (active sires) ซึ่งสามารถผลิตน้ำเชื้อได้ตามปกติทั้งคุณภาพและปริมาณ อย่างไรก็ตาม การตรวจพบลักษณะรอยโรคที่บริเวณอณูหะ ในระดับน้อยถึงรุนแรง (mild to severe fibrosis) บ่งบอกว่า การประเมินอณูหะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์สามารถใช้สำหรับประเมินความสมบูรณ์ของพ้อพันธุ์โคเพื่อนำไปสู่การรักษาและป้องกันปัญหาด้านความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของพ้อพันธุ์โคที่ใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้อย่างทันท่วงที

แม้ว่าการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ในการประเมินอณูหะโคจะมีประโยชน์ในการตรวจหารอยโรคที่เนื้อเยื่ออณูหะของพ้อพันธุ์โคที่ยังสามารถให้ผลผลิตน้ำเชื้อได้ตามปกติ อย่างไรก็ตาม การแบ่งคะแนนของรอยโรคไม่ได้มีการวัดหรือการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจน เป็นการตัดสินคะแนนโดยใช้เกณฑ์จากผู้ประเมิน ซึ่งอาจทำให้ผู้ที่ไม่มีความชำนาญ ไม่สามารถแบ่งลักษณะรอยโรคได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีการคำนวณคะแนนรอยโรคอย่างละเอียด (focal point) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barth et al. (2008) ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวัดรอยโรคจากการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ และสามารถนำไปใช้ในการหาความสัมพันธ์กับคุณภาพของน้ำเชื้อต่อไป

2. ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา

Table 2 แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาของลักษณะทางกายภาพพ้อโค ปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อ และค่า pixel intensity และ focal point จากภาพถ่ายด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์บริเวณอณูหะของพ้อโคนม โดยพ้อโคที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีค่าเฉลี่ยของอายุ ประมาณ 4.3 ปี (2.4 – 7.6 ปี) ส่วนเส้นรอบวงอณูหะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38.4 cm. (32 ถึง 48.5 cm.) โดยพบว่าพ้อพันธุ์ที่อายุน้อย จะมีเส้นรอบวงอณูหะน้อยกว่าพ้อพันธุ์อายุมากกว่า สำหรับคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดในด้านปริมาณ (ปริมาตร ความเข้มข้นของอสุจิ และจำนวนอสุจิที่รีดเก็บได้ทั้งหมด) และด้านคุณภาพ (ร้อยละของอสุจิมิชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อสุจิผิดปกติ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า) โดยภาพรวมพบว่ามีความอยู่ในช่วงมาตรฐาน

ของพ่อพันธุ์ที่สามารถนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ (รพีพรรณ, 2552) ซึ่งเป็นสิ่งที่คาดการณ์ไว้แล้ว เนื่องจากพ่อพันธุ์โคที่เหล่านี้นี้เป็นพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการรีดน้ำเชื้อเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในปัจจุบัน

สำหรับค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์บริเวณอัณฑะ พบว่าค่าความเข้มของภาพที่ได้จากค่าเฉลี่ยของภาพถ่ายทิศทางแนวตั้งและแนวขวาง (PI total) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 414.5 intensity/mm² (294.6 ถึง 537.7 intensity/mm²) ส่วนคะแนนรอยโรค (focal point) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 97.8 (70 ถึง 132) (Table 2) ทั้งนี้ไม่พบการศึกษารอยโรคที่อัณฑะ แบบที่มีการทดแทนรอยโรคด้วยคะแนน (focal point) โดยการศึกษาส่วนมากจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า PI และ ลักษณะเชิงกายภาพ เช่น อายุ หรือ คุณภาพน้ำเชื้อเท่านั้น

Table 2 Summary descriptions of range of bull physical characteristics, semen quality and quality, and testicular ultrasound evaluation of bulls (n = 25)

Parameter ¹	Mean ± SD	Min	Max
Physical characteristics			
Age of bull (years)	4.32 ± 1.56	2.43	7.60
Scrotal circumference (cm.)	38.41 ± 5.09	32.00	48.50
Semen quantity			
Volume (ml.)	5.13 ± 2.31	1.50	13.00
Concentrations (x10 ⁶ /ml.)	1057.23 ± 523.48	60.00	2533.00
Total sperm (cell/ml)	5030.44 ± 2914.06	496.00	14880.00
Semen quality			
Viability (%)	74.47 ± 16.76	8.00	93.50
Plasma membrane integrity (%)	75.93 ± 17.17	4.5	96.00
Sperm defects (%)	10.19 ± 9.63	2.50	57.50
Total motility (%)	69.28 ± 18.17	6.00	91.00
Progressive motility (%)	43.74 ± 13.88	3.00	68.00
Ultrasound evaluation			
PI vertical (intensity/mm ²)	419.89 ± 53.49	266.67	589.33
PI horizontal (intensity/mm ²)	409.01 ± 58.98	289.75	611.75
PI total (intensity/mm ²) ²	414.45 ± 47.76	294.58	537.66
Focal point	97.81 ± 13.29	70.00	132.00

¹ Each bull was evaluated for their semen quantity and quality as well as ultrasound observations for 6 times, 6 weeks in a row

² PI total = average of pixel intensities assessed from vertical and horizontal planes of testis

3. สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพ และคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโค

จาก Table 3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง PI และ focal point ต่อคุณลักษณะของพ่อพันธุ์ ปริมาณน้ำเชื้อ และคุณภาพน้ำเชื้อ โดยพบว่า อายุของพ่อพันธุ์และเส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวก แต่อยู่ในระดับปานกลาง ($r = 0.501$, $p < 0.0001$) โดยจากข้อมูลพบว่าเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นมีแนวโน้มที่เส้นรอบวงอณฑะจะเพิ่มขึ้นตาม (คล้ายกันกับกรณีอายุน้อยลง เส้นรอบวงอณฑะจะลดลง) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเส้นรอบวงอณฑะและค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ (PI และ focal point) อย่างไรก็ตาม พบว่าเส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำกับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อทั้งเชิงปริมาณ (ปริมาตร $r = 0.21$, ความเข้มข้นของอสุจิ $r = -0.22$) และเชิงคุณภาพทุกลักษณะยกเว้นร้อยละอสุจิผิดปกติ ($r \approx -0.20$ ถึง -0.21 ; $p < 0.05$)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพ และคุณภาพน้ำเชื้อในโค มีความผันแปรแตกต่างกันบ้างแล้วแต่การศึกษา โดยส่วนใหญ่แล้ว เส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาตรและความเข้มข้นของอสุจิ (Bhuminand et al., 2008; Ahmad et al., 2011) และอายุโค (Ahmad et al., 2011) ยกตัวอย่างเช่น Latif et al. (2011) รายงานว่าเส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในระดับสูงกับปริมาตร ($r = 0.72$) และความเข้มข้นของอสุจิ ($r = 0.72$) ในโคเนื้อพันธุ์พื้นเมือง อายุ 15-20 เดือน Bhuminand et al. (2008) ศึกษาในโคนมและพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างเส้นรอบวงอณฑะ กับปริมาตร ความเข้มข้นของอสุจิ รวมถึงปริมาณฮอร์โมน testosterone นอกจากนี้ การศึกษาในโคพันธุ์ชาฮิวาลจำนวน 128 ตัว โดย Ahmad et al. (2011) พบว่า น้ำหนักตัว เส้นรอบวงอณฑะ ค่า PI รวมถึงปริมาตร และความเข้มข้นของอสุจิเพิ่มขึ้นตามอายุ แต่คุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่มีความสัมพันธ์กับอายุของโค สำหรับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบความสัมพันธ์ในเชิงลบในระดับต่ำระหว่างเส้นรอบวงอณฑะโคกับคุณภาพน้ำเชื้อ (ความเข้มข้นของอสุจिर้อยละอสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ) (Table 3) อาจมีเหตุผลมาจากการที่พ่อโคมีอายุมากขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มที่ความยาวเส้นรอบวงอณฑะจะมากขึ้นและอาจถูกใช้งานเพื่อผลิตน้ำเชื้อมาก่อนช้านาน ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลงได้ ส่วนพ่อพันธุ์โคที่อายุน้อย (ความยาวเส้นรอบวงอณฑะน้อยกว่า) อาจถูกใช้งานมาไม่นาน น้ำเชื้อที่ผลิตได้จึงยังคงคุณภาพดีกว่าโคที่ถูกใช้งานมานานกว่า (อายุมากกว่า) อย่างไรก็ตาม ข้อคิดเห็นนี้มีข้อยกเว้นในกรณีโคได้รับความเสียหายที่บริเวณอณฑะจากสาเหตุทางกายภาพหรือโรคในระบบสืบพันธุ์ โดยไม่คำนึงถึงอายุของโค ซึ่งจะทำให้ไม่พบ

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุและคุณภาพน้ำเชื้อ หรืออาจมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ ดังเช่นที่พบจากการศึกษาใน ครั้งนี้ ทั้งนี้ อาจทำการเก็บข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมเพื่อค้นหาสาเหตุที่เกี่ยวข้องในประเด็นนี้ เช่น ปริมาณฮอร์โมน เทสโทสเตอโรน หรือ ข้อมูลอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการรีดน้ำเชื้อ รวมทั้งเพิ่มขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาด้วย

ในส่วนของค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์บริเวณอัณฑะ พบว่า PI มีความสัมพันธ์เชิงบวกใน ระดับต่ำกับอายุของพ่อพันธุ์ ($r = 0.18$; $p < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับคุณลักษณะของพ่อพันธุ์ และ ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Arteaga et al. (2005) พบว่า PI ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะภาพที่ได้จากอัลตราซาวด์ (normal testicular ultrasonogram appearance) และคุณภาพน้ำเชื้อในโคเนื้อจำนวน 16 ตัว Tomlinson et al. (2017) รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า PI กับ คุณภาพน้ำเชื้อโค อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้ แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ที่พบความสัมพันธ์ระหว่าง PI กับคุณภาพน้ำเชื้อ (Arteaga et al., 2005; Brito et al., 2012; Kastelic et al., 2012) การศึกษาในโคเนื้อจำนวน 152 ตัวโดย Brito et al. (2012) ได้รายงานว่าค่า echogenicity (ค่า PI) มีความสัมพันธ์กับการสร้างอสุจิ (sperm production) และรูปร่างของอสุจิ (sperm morphology) ในโคเนื้อจำนวน 152 ตัว ทั้งนี้พบความสัมพันธ์ที่ไม่ค่อยสม่ำเสมอในแต่ละกลุ่มทดลอง

Brito et al. (2012) ได้อธิบายว่า การศึกษาอื่นที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า PI กับ คุณภาพน้ำเชื้อโค อาจเนื่องมาจากใช้การเปรียบเทียบข้อมูลเพียงช่วงเวลาเดียวกันกับการเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เก็บข้อมูลต่อเนื่อง ทั้งนี้ เนื้อเยื่อของ seminiferous มักมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากมีการเก็บภาพอัลตราซาวด์ 4-6 สัปดาห์จึงจะ ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อได้ เช่นเดียวกับการทดลองโดยใช้ฉนวนหุ้มบริเวณอัณฑะ จะพบความสัมพันธ์ระหว่าง ระหว่างค่า PI และคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากนั้น 2-4 สัปดาห์ (Arteaga et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา ของ Brito et al. (2012) ที่หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า PI และคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากนั้น 4-8 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ที่ได้ค่อนข้างต่ำ แต่พบว่า PI เป็นตัวบ่งบอกระยะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ดีกว่าการใช้เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของค่า testicular echogenicity หรือค่า PI มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ Sertoli cells และการเพิ่มขึ้นของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule

การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุและ PI ซึ่งแตกต่างจากผลจากการศึกษาในสัตว์ ชนิดอื่นๆ เช่น การศึกษาในแกะที่พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างค่า PI ของอัณฑะกับอายุ (Juca et al., 2011) ส่วนการศึกษาของ Andrade et al. (2011), Cartee et al. (1990) และ Moura et al. (2008) ซึ่งใช้ เทคนิคอัลตราซาวด์ในแกะพบว่า echogenicity ของอัณฑะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอายุของแกะที่ เพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยปกติแล้ว สัตว์พ่อพันธุ์ที่มีอายุมากขึ้นจะพบความเสื่อมที่บริเวณอัณฑะ ซึ่งอาจ เนื่องมาจากเนื้ออัณฑะ (testicular parenchyma) ของพ่อพันธุ์มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นตามอายุ เป็นที่น่า สงเกตว่า แม้ว่าผลการศึกษาในครั้งนี้จะไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง PI ลักษณะทางกายภาพ (อายุ

และเส้นรอบวงอณฑะ) และคุณภาพน้ำเชื้อ ($p>0.05$) แต่พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีแนวโน้มที่จะมีทิศทางเดียวกันกับการศึกษาอื่นๆ การเพิ่มขนาดตัวอย่างในการศึกษาอาจจะช่วยให้สามารถตรวจสอบพบความสัมพันธ์ในระดับที่มีนัยสำคัญได้ ในทางตรงกันข้ามกับค่า PI พบว่าค่า focal point มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อหลายลักษณะ (Table 3) โดย focal point มีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำกับความเข้มข้นของอสุจิ และอสุจิที่ผลิตได้ ($r \approx -0.19$; $p<0.05$) แต่พบว่า ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ (ร้อยละอสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ) ส่วนใหญ่แล้ว มีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับปานกลางกับ focal point ($r = -0.43$ ถึง -0.51 ; $p<0.0001$) ส่วนร้อยละอสุจิผิดปกติ นั้น มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำกับค่า focal point ($r = 0.21$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์โดยใช้คะแนนรอยโรคกับคุณภาพน้ำเชื้อของ Barth et al. (2008) จากผลการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่าหากค่า focal point เพิ่มสูงขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อโดยรวมแยลง แต่ความสัมพันธ์ที่พบอยู่ในระดับต่ำ ถึง ระดับกลาง ดังนั้น จะเห็นได้ว่าค่าคะแนนรอยโรค หรือ focal point สามารถใช้เป็นตัวแทนลักษณะการเกิด fibrosis ที่บริเวณอณฑะ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดรอยโรคและคุณภาพน้ำเชื้อ รวมถึงมีศักยภาพในการเป็นตัวแปรทำนาย (predictor) เพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป

Table 3 Correlation coefficients (r) between bull's physical characteristics, ultrasound evaluation and semen characteristics

Item	Age		SC ¹		Pixel intensity ²		Focal point	
	R	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Physical characteristics								
Age (years)	-	-	0.501	<0.0001	0.178	0.031	0.116	0.163
Scrotal circumference (cm)	0.501	<0.0001	-	-	0.118	0.155	0.003	0.975
Semen quantity								
Volume (ml.)	0.208	0.011	0.205	0.013	0.137	0.099	0.057	0.490
Concentration (sperm $\times 10^6$ cells)	-0.164	0.047	-0.224	0.006	-0.265	0.791	-0.193	0.019
Total sperm (cells/ml)	0.003	0.972	-0.051	0.538	0.135	0.103	-0.185	0.024
Semen quality								
Viability (%)	-0.346	<0.0001	-0.201	0.015	-0.048	0.562	-0.516	<0.0001
Plasma membrane integrity (%)	-0.309	<0.001	-0.199	0.016	-0.004	0.964	-0.483	<0.0001
Sperm defect (%)	0.055	0.507	0.002	0.975	-0.051	0.537	0.209	0.01087

Total motility (%)	-0.317	<0.0001	-0.214	0.009	-0.041	0.624	-0.489	<0.0001
Progressive Motility (%)	-0.353	<0.0001	-0.211	0.011	-0.130	0.115	-0.433	<0.0001

¹ Scrotal circumference (cm.)

² Pixel intensity (PI) based on the average of PI assessed from vertical and horizontal planes of testis

4. สมการทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิจากรอยโรคของอัณฑะ

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยพหุคูณ เพื่อสร้างสมการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้ลักษณะทางกายภาพพ่อโค ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ และ เส้นรอบวงอัณฑะพ่อโค และค่าที่ได้จากการวัดโดยใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ ได้แก่ คะแนนรอยโรค (focal point) และ pixel intensity สมการทำนายสำหรับทุกลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อที่นำเสนอ เป็นสมการที่ให้ค่าประสิทธิภาพของโมเดลที่ดีที่สุด ไม่พบปัญหา multicollinearity ระหว่างตัวแปรอิสระในโมเดล (ค่า Tolerance มากกว่า 0.65) และทุกสมการทำนายมีนัยสำคัญทางสถิติ (overall model p-value <0.05) (Tables 4 – 11)

นอกจากการรายงานผลสมการทำนายในรูปแบบปกติ (รายงานค่า regression coefficients) ยังได้รายงานสมการทำนายในรูปแบบของสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐาน (Standardized coefficients or Beta) ซึ่งการทำ Standardized coefficients ของแต่ละตัวแปร เป็นหนึ่งในวิธีการที่ช่วยสำหรับการเปรียบเทียบความสำคัญหรือระดับของอิทธิพลของตัวแปรในการทำนายตัวแปรตามในการวิเคราะห์การถดถอย (importance of independent variables or X's in determining Y) โดยมีการปรับหน่วยของตัวแปรทำนายให้มีหน่วยเดียวกัน คือ standard deviation (SD) ช่วยในการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยระหว่างตัวแปรต้นในสมการได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยที่ไม่ทำให้ระดับนัยสำคัญทางสถิติของตัวแปรทำนายเปลี่ยนแปลง (Bring, 1994) ค่า Standardized coefficients บ่งบอกถึง การเปลี่ยนแปลงตัวแปรตาม (Y) ในหน่วย SD เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรทำนาย (X) 1 SD ซึ่งแตกต่างจากการแปรผลค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยตามปกติซึ่งใช้หน่วยจริงของตัวแปรนั้นๆ

การทำนายปริมาณน้ำเชื้อ

สมการทำนายปริมาณน้ำเชื้อที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise มีเพียงอายุของพ่อพันธุ์ (Age) เท่านั้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (Table 4) โดยอายุของพ่อโคที่เพิ่มขึ้น 1 ปี ส่งผลให้ปริมาณน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.317 ml. สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำเชื้อ} = 3.748 + (0.317 \times \text{Age})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐาน (Standardized coefficients หรือ Beta) ได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{ปริมาณน้ำเชื้อ}} = 0.213 \times (Z_{\text{Age of Bull}})$$

พบว่าสมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ ($R^2 \approx 0.045$) แสดงให้เห็นว่าสมการทำนายดังกล่าวสามารถอธิบายความผันแปร หรือการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำเชื้อได้ค่อนข้างต่ำ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง สมการมีความแม่นยำไม่มากเพียงพอในการทำนาย ซึ่งโดยปกติแล้วค่า R^2 (มีค่า 0 ถึง 1) ของโมเดลที่สูงบ่งบอกถึงความแม่นยำในการทำนายที่สูง โดยทั่วไป ค่า R^2 มากกว่า 0.70 ถือว่าอยู่ในระดับสูง ค่า R^2 ระหว่าง 0.5 และ 0.7 ค่า ถือว่าอยู่ในระดับปานกลาง ค่า R^2 ระหว่าง 0.3 และ 0.5 ถือว่าอยู่ในระดับต่ำ ส่วนค่า R^2 น้อยกว่า 0.30 จัดว่าอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ (Henseler et al., 2009; Moore et al., 2013) โดยค่า R^2 ที่ยอมรับได้ไม่ควรต่ำกว่า 0.25 แต่ทั้งนี้ ก็ยังขึ้นอยู่กับศาสตร์ หรือสาขาวิชาแต่ละแขนงด้วย (Garson, 2016)

Table 4 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์ปริมาณน้ำเชื้อ

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	3.748	-	6.74	<0.0001
Age of bull	0.314	0.213	2.61	0.010
R=0.213; R ² =0.045; F=6.81; p-value = 0.010				

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายความเข้มข้นอสุจิ

สมการทำนายความเข้มข้นอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่าขนาดเส้นรอบวงอวัยวะและ focal point มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นอสุจิ ($p < 0.05$) (Table 5) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้ความเข้มข้นอสุจิลดลงโดยเฉลี่ย 7.3×10^6 เซลล์ ในขณะที่เมื่อเส้นรอบวงอวัยวะเพิ่มขึ้น 1 cm. ให้ความเข้มข้นอสุจิลดลง 37.74×10^6 เซลล์ สมการทำนายความเข้มข้นอสุจิที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของความเข้มข้นอสุจิได้เพียงร้อยละ 9 ($R^2 \approx 0.09$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นอสุจิ} = 3235.11 - (37.735 \times \text{Scrotal circumference}) - (7.312 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{ความเข้มข้นอสุจิ}} = -0.224 \times (Z_{\text{circumference}}) - 0.187 \times (Z_{\text{focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่าเส้นรอบวงอวัยวะมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นอสุจิสูงกว่า focal point เล็กน้อย (Beta = -0.224 และ -0.187 ตามลำดับ)

Table 5 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์ความเข้มข้นอสุจิ

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	3235.11	-	5.31	<0.0001
Scrotal circumference	-37.735	-0.224	-2.79	0.006
Focal point	-7.312	-0.187	-2.33	0.021

R= 0.292; R²= 0.085; F= 6.63; p-value < 0.01

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายอสุจิทั้งหมด

สมการทำนายอสุจิทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่ามีเพียง focal point ที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นอสุจิ (p<0.05) (Table 6) โดยค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อสุจิทั้งหมดลดลงโดยเฉลี่ย 37 เซลล์/ml. สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้เพียงร้อยละ 3 (R² ≈ 0.03) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อสุจิทั้งหมด} = 8589.19 - (37.037 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อสุจิทั้งหมด}} = -0.176 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

Table 6 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์อสุจิทั้งหมด

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	8589.19	-	5.02	<0.0001
Focal point	-37.037	-0.176	-2.13	0.035

R=0.176; R²=0.031; F=4.55; p-value <0.05

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

สมการทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่า อายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (p<0.001) (Table 7) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.63 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะ

ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงลงประมาณร้อยละ 3.1 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ร้อยละ 31 ($R^2 \approx 0.31$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (\%)} = 144.07 - (3.142 \times \text{Age}) - (0.626 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ}} = -0.268 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.457 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่าอายุโคอย่างชัดเจน (Beta = -0.467 และ -0.268 ตามลำดับ)

Table 7 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	144.07	-	14.78	<0.0001
Age of bull	-3.142	-0.268	-3.81	<0.001
Focal point	-0.626	-0.457	-6.51	<0.0001

R=0.556; R²=0.309; F=31.80; p-value <0.0001

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

สมการทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่า อายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ($p < 0.001$) (Table 8) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.41 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงลงประมาณร้อยละ 2.8 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิได้ร้อยละ 28 ($R^2 \approx 0.28$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (\%)} = 96.80 - (2.809 \times \text{Age}) - (0.410 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ}} = -0.315 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.393 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ มากกว่าอายุโคเล็กน้อย (Beta = -0.39 และ -0.32 ตามลำดับ)

Table 8 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

ของอสุจิ

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	95.80	-	12.68	<0.0001
Age of bull	-2.809	-0.315	-4.40	<0.0001
Focal point	-0.410	-0.393	-5.50	<0.0001

R= 0.532; R²= 0.283; F=27.97; p-value <0.0001

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายร้อยละของอสุจิมีชีวิต

สมการทำนายร้อยละของอสุจิมีชีวิตที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่า อายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่อสุจิ (p<0.0001) (Table 9) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อสุจิมีชีวิตลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.61 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อสุจิมีชีวิตลดลงประมาณร้อยละ 3.1 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอสุจิมีชีวิตได้ร้อยละ 35 (R² ≈ 0.35) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อสุจิมีชีวิต (\%)} = 147.42 - (3.106 \times \text{Age}) - (0.609 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อสุจิมีชีวิต}} = -0.287 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.428 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่ออสุจิมีชีวิตมากกว่าอายุโคอย่างชัดเจน (Beta = -0.428 และ -0.287 ตามลำดับ)

Table 9 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์ร้อยละของอสุจิมีชีวิต

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	147.42	-	16.90	<0.0001
Age of bull	-3.106	-0.287	-4.2872	<0.0001
Focal point	-0.609	-0.482	-7.1418	<0.0001

R=0.652; R²= 0.348; F=38.85; p-value <0.0001

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายร้อยละของอสุจิผิดปกติ

สมการทำนายร้อยละของอสุจิผิดปกติที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่ามีเพียง focal point ที่มีอิทธิพลต่อร้อยละของอสุจิผิดปกติ ($p < 0.05$) (Table 10) โดยค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้มียอสุจิผิดปกติเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.16 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของร้อยละของอสุจิผิดปกติได้เพียงร้อยละ 4 ($R^2 \approx 0.04$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อสุจิผิดปกติ (\%)} = (0.161 \times \text{focal point}) - 6.142$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อสุจิผิดปกติ}} = 0.210 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

Table 10 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์ร้อยละของอสุจิผิดปกติ

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	-6.142	-	-0.990	0.323
Focal point	0.161	0.210	2.572	<0.05

R=0.210; R²=0.044; F=6.62; p-value=0.011

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายร้อยละของความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ

สมการทำนายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่าอายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ($p < 0.001$) (Table 11) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.59 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อสุจิมีชีวิตลดลงประมาณร้อยละ 2.9 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอสุจิมีชีวิตได้ร้อยละ 30 ($R^2 \approx 0.30$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (\%)} = 145.97 - (2.891 \times \text{Age}) - (0.589 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ}} = -0.259 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.452 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิมากกว่าอายุโค (Beta = -0.462 และ -0.259 ตามลำดับ)

Table 11 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise ในการพยากรณ์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	145.97	-	15.643	<0.0001
Age of bull	-2.891	-0.259	-3.664	<0.001
Focal point	-0.589	-0.452	-6.400	<0.0001

R=0.547; R²= 0.299; F=30.35; p-value <0.0001

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยพหุคูณเพื่อพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าค่า focal point มีอิทธิพลต่อคุณภาพน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทั้งคุณภาพเชิงปริมาณ (ปริมาตรน้ำเชื้อ และความเข้มข้นอสุจิ) และเชิงคุณภาพ (อสุจิทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อสุจิมีชีวิต อสุจิผิดปกติ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ) เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยมาตรฐาน จะเห็นได้ว่าเมื่อค่าคะแนนรอยโรคหรือ focal point สูงขึ้น (บ่งบอกว่ารอยโรคในอันทะมีมากขึ้น) มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อโดยรวมแย่ลง คิดเป็นประมาณ 0.18 ถึง 0.48 SD ต่อค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 SD (SD of focal point = 13.3) (Tables 5-12) ซึ่งพบว่า focal point มีผลกระทบมากที่สุดต่อ ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (พิจารณาจากค่า standardized coefficients ซึ่งมีค่าระหว่าง -0.40 และ -0.48)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการทำนายของสมการที่ประกอบด้วย focal point และอายุโคเป็นตัวแปรทำนาย สำหรับคุณภาพน้ำเชื้อ 4 ลักษณะ ได้แก่ ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ พบว่าโมเดลมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรือ R² ที่ต่ำ โดยมีค่าระหว่าง 0.28 (อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า) และ 0.35 (ร้อยละของอสุจิมีชีวิต) ซึ่งถือว่าสมการทำนายดังกล่าวสามารถอธิบายความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อได้ในระดับต่ำ (ร้อยละ 28 ถึง 35) (Henseler et al., 2009; Moore et al., 2013) ดังนั้น จึงแสดงให้เห็นว่า การใช้ค่า focal point ร่วมกับ อายุโค ยังให้ความแม่นยำในการพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวได้ไม่มากนัก เนื่องจากโมเดลที่มีค่า R² ต่ำ จะมีความคลาดเคลื่อน (error) สูงกว่า ซึ่งจะส่งผลให้การทำนายค่าสังเกตมีความแม่นยำ (precision) ต่ำลง อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาว่าค่า R² ที่ยอมรับได้ไม่ควรต่ำกว่า 0.25 (Garson, 2016) สมการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อทั้ง 4 ลักษณะดังกล่าว อาจมีศักยภาพในการใช้ในการพยากรณ์ ซึ่งผู้วิจัยประเมินว่า หากต้องการให้การทำนายคุณภาพน้ำเชื้อมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น อาจต้องเพิ่มจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งอาจต้องศึกษาตัวแปรอิสระอื่นๆ ที่อาจใช้ในการทำนาย เพื่อให้มีความแม่นยำในการพยากรณ์เพิ่มมากขึ้นในระดับที่ยอมรับได้

สำหรับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้ออื่นๆ ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้นอสุจิ อสุจิทั้งหมด และอสุจิผิดปกติ มีแนวโน้มว่าไม่สามารถใช้สมการที่สร้างขึ้นในการทำนายได้เนื่องจากสามารถอธิบายความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อได้ต่ำกว่าร้อยละ 10 ($R^2 \approx 0.03$ ถึง 0.09) ทั้งนี้ไม่พบการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อด้วยค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลที่ได้กับการศึกษาอื่นได้

สรุปผลการทดลอง

1. การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์เพื่อประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์สามารถใช้ตรวจรอยโรคที่อัณฑะ สามารถระบุระดับความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดขึ้นได้เบื้องต้น ซึ่งการเกิดรอยโรคเพิ่มขึ้นจะส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นอสุจิ อสุจิทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่อสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ร้อยละอสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ รวมถึงร้อยละความผิดปกติของอสุจิ

2. การใช้ค่าคะแนนรอยโรค หรือ focal point ที่ได้จากการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ เป็นตัวแทนของการเกิดรอยโรค ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์และขนาดเส้นรอบอัณฑะ สามารถใช้ในการสร้างสมการเพื่อพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อได้ แต่ค่าที่ได้จากการพยากรณ์ยังมีความแม่นยำไม่มากเพียงพอ แต่ถือว่ามีศักยภาพในการทำนายสำหรับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อบางลักษณะ (ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ) ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อสร้างโมเดลที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีอัลตราซาวด์เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ไม่เกิดอันตรายต่อสัตว์ (non-invasive) สามารถประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังปัญหาด้านการผลิตน้ำเชื้อได้ทั้งโคเพศผู้ที่ใช้ในการคุมฝูง และพ่อพันธุ์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในสัตว์พ่อพันธุ์ชนิดอื่นได้อีกด้วย ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในส่วนของการเพิ่มจำนวนประชากรให้มากขึ้น รวมถึงโคสายพันธุ์อื่น โดยอาจสามารถประยุกต์ใช้ในสัตว์ชนิดอื่นได้อีกด้วย นอกจากนี้ ยังควรเพิ่มตัวแปรอิสระอื่นๆ ที่อาจสามารถเป็นตัวแปรทำนาย (predictors) เพื่อให้ได้สมการที่มีความแม่นยำในการพยากรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยให้สามารถใช้ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ และใช้ในการคัดโคพ่อพันธุ์ออกจากฝูงได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลาพญากลาง ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล. 2551. คู่มือการปฏิบัติงานการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ผสมเทียม (Quality control of livestock semen for artificial insemination). ม.ป.ท. ปทุมธานี.
- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2563. สมุดพ่อพันธุ์โคนม 2563 (DLD dairy sire summary 2020). ม.ป.ท. ปทุมธานี.
- Ahmad, E., N. Ahmad, Z. Naseer, M. Aleem, M.S. Khan, M. Ashiq and M. Younis. 2011. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. *Tropical Animal Health and Production*. 43(1):159-164.
- Andrade A.K.G., A.T. Soares, F.F. Freitas, S.V. Silva, C.E. Peña-Alfaro, A.M. Batista and M.M.P. Guerra. 2014. Testicular and epididymal ultrasonography in Santa Inês lambs raised in Brazil. *Anim. Reprod*. 11(2):110-118.
- Arteaga, A.A., A.D. Barth and L.F.C. Brito. 2005. Relationship between semen quality and pixel intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology*. 64:408-415.
- Barth, A.D., L. Alisio, M. Avilés, A.A. Arteaga, J.R. Campbell and S.H. Hendrick. 2008. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Anim Reprod Sci*. 106(3-4):274-288.
- Bhuminand, D., T. Koseki, M. Matsui, M. Sasaki, E. Kaneko, A. Miyamoto and Y.I. Miyake. 2008. Relationships among age, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and post-pubertal Holstein bulls. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(1):119-121.
- Brace, N., R.S. Snelgar and R. Kemp. 2012. *SPSS for psychologists*. 5th edition. London Palgrave Macmillan.
- Bring, J. 1994. How to standardize regression coefficients. *The American Statistician*. 48(3):209-213.
- Brito, L.F.C., A.D. Barth, R.E. Wilde and J.P. Kastelic. 2012. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production and quantitative testicular histology in beef bulls *Theriogenology*. 78:69-76.
- Cartee, R.E., B.W. Gray, T.A. Powe, R.S. Hudson and J. Whitesides. 1989. Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. *Theriogenology*. 31:1149-1157.
- Cartee, R.E., P.F. Rumph, S. Abuzaid and R. Carson. 1990. Ultrasonographic examination and measurement of ram testicles. *Theriogenology*. 33:867-875.

- Chandolia, R.K., A. Honaramooz, B.C. Omeke, R. Pierson, A.P. Beard and N.C. Rawlings. 1997. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*. 48:119–132.
- Coulter, G.H. and D.R.C. Bailey. 1988. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology*. 30(4):743-749.
- Coulter, G.H. and G.C. Kozub. 1989. Efficacy of methods used to test fertility of beef bulls used for multiple-sire breeding under range conditions. *J Anim Sci*. 67:1757-1766.
- Dott, H.M. and G.C. Foster. 1972. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. *J. Reprod. Fert.* 29:443–445.
- Eilts, B.E. and R.D. Pechman. 1988. B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology*. 30(6):1169-1175.
- Evans, A.C.O., R.A. Pierson, A. Garcia, L.M. McDougall, F. Hrudka and N.C. Rawlings. 1996. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*. 46:345–357.
- Garson, G.D. 2016. *Partial Least Squares: Regression and Structural Equation Models*. Asheboro. NC: Statistical Associates Publishers.
- Gipsona, T.A., D.W. Vogtl and J.W. Massey. 1985. Associations of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls. *Theriogenology*. 24:217-225.
- Gloria, A., A. Carluccio, L. Wegher, D. Robbe, C. Valorz and A. Contri. 2018. Pulse wave Doppler ultrasound of testicular arteries and their relationship with semen characteristics in healthy bulls. *Journal of animal science and biotechnology*. 9(1):1-7.
- Henseler, J., C. Ringle and R. Sinkovics. 2009. The use of partial least squares path modeling in international marketing. *Advances in International Marketing (AIM)*. 20:277-320.
- Juca, A.F., L.F.B. Pinto, A.K.F. Moita, R.J.F. Oliveira, G.M.F. Melo, L.B. Santos, M.S. Fiuza and H.C. Azevedo. 2011. Testicular echotexture by ultrasonography in Santa Inês rams. *Maceió*, 23:1-3.
- Kastelic J.P. and L.F.C. Brito. 2012. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod Domest Anim*. 47:45-51.
- Kavak, A, N. Lundeheim, M. Aidnik and S. Einarsson. 2004. Sperm morphology in Estonian and Tori breed stallions. *Act.Vet*. 45:11-18.

- Latif, M.A., J.U. Ahmed, M.M.U. Bhuiyan and M. Shamsuddin. 2009. Relationship between scrotal circumference and semen parameters in crossbred bulls. *Bangladesh Veterinarian*. 26(2):61-67.
- Kupferschmied, H., U. Kihm, P. Bachmann, K. Muller and M. Ackerman. 1986. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*. 25:439-443.
- McClurkin, A., M. Coria and R. Cutlip. 1979. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174:1116-1119.
- McEntee, K. 1990. *Reproductive Pathology of Domestic Animals*. Academic Press Inc., San Diego. pp 263.
- Moore, D.S., W.I. Notz and M.A. Flinger. 2013. *The basic practice of statistics (6th ed.)*. New York. NY: Freeman and Company.
- Moura, J.C.A., A.F. Juca, A.L. Gusmão, T. Bittencourt, T.G. Pinho and C.M.P. Barbosa. 2008. Testicular echotexture of the Santa ins rams. *A Hora Veterinaria*, 27:9-22.
- Nagaraja, T., M. Galyean and N. Cole. 1998. Nutrition and disease. In: Hunt, E. (Ed.), *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 257-277.
- Parkinson, T.J. 2004. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet J.* 168:215-229.
- Pinho R.O., D.S. Costa, J.B. Siqueira, L.F. Martins, L.A. Teixeira, S.E. Guimarães and J.D. Guimarães. 2013. Lack of relationship between testicular echotexture and breeding soundness evaluation in adult Nelore bulls. *Livestock Science*. 154(1-3):246-249.
- Powe, T.A., R.E. Cartee, R. Carson, D. Wolfe and R. Hudson. 1988. B-mode ultrasonography of testicular pathology in the bull. *Agri-Practice*. 9:43-45.
- R Core Team. 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Rota, A., N. Penzo, L. Vincenti and R. Mantovani. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 53(7):1415-1420.
- Tomlinson, M., A. Jennings, A. Macrae and I. Truysers. 2017. The value of trans-scrotal Ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality.

Theriogenology. 89:169-177.

Weisburd, D. and C. Britt. 2014. Statistics in criminal justice. Springer.

Yimer, N., Y. Rosina, H. Wahid, A.A. Saharee, K.C. Yap and P. Ganesamurthi. 2001. Trans-scrotal ultrasonography and breeding soundness evaluation of bulls in a herd of dairy and beef cattle with poor reproductive performance. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 34:217-228.