



ความหนาของนิวโรเอพิทีเลียมในระยะเวลาเจริญของเอ็มบริโอไก่ไข่พันธุ์สายไลน์บราวน์

พินิดดา ชะอุ่มผล^{1,*} และพรณนิการ ชัยชนะศักดิ์¹

¹สาขาวิชาพรีคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ถนนจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: การศึกษาเอ็มบริโอไก่ไข่มีความสำคัญอย่างมากในการเป็นต้นแบบสำหรับการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะแรก โดยเฉพาะในเรื่องของระบบประสาทที่มีการพัฒนาในระยะแรกสุด การเจริญของเซลล์ Neuroblast ในเนื้อเยื่อ Neuroepithelium จะแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและมีการสร้างตัวเป็น Neural tube ก่อนที่จะพัฒนาเป็นระบบประสาทส่วนกลางต่อไป และด้วยเหตุนี้เองผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาขนาดความหนาของ Neuroepithelium ในระยะของการพัฒนาของเอ็มบริโอไก่ไข่สายพันธุ์ “สายไลน์บราวน์” ในระยะเวลาเจริญที่ 10, 12 และ 18 ของไก่ในประเทศไทย ด้วยการทำสไลด์ตัวเอ็มบริโอไก่ไข่ทั้งสามระยะดังกล่าวพร้อมตรวจสอบโครงสร้างที่ได้ต้องเป็นไปตามอายุกับการพัฒนาที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว จากนั้นจึงใช้ภาพจากการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์วัดขนาดความหนาของเนื้อเยื่อด้วยโปรแกรมจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งได้ผลการวิจัยดังนี้คือ ระยะที่ 10 มีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 37.77 ไมโครเมตร ส่วนระยะ 12 มีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 29.02 ไมโครเมตร และในระยะที่ 18 หรือเอ็มบริโออายุได้ 3 วัน จะมีความหนาของเนื้อเยื่อเฉลี่ยเท่ากับ 27.57 ไมโครเมตร ซึ่งจะตรงกับรายงานวิจัยการศึกษาของเนื้อเยื่อประสาทที่กล่าวว่ามี การยืดขยายตัวในแนวระนาบก่อนเพื่อที่จะพัฒนาส่วนของสมองโดยการปรับเนื้อเยื่อและช่องน้ำสมอง จากการเจริญของหลอดประสาทเป็นเนื้อเยื่อสมองสามส่วนในระยะที่ 10 คือสมองส่วน Prosencephalon Mesencephalon และ Rhombencephalon ตามลำดับ ต่อจากนั้นเมื่อเข้าระยะที่ 12 และระยะที่ 18 จะเจริญพัฒนาให้เป็นเนื้อเยื่อสมองทั้งห้าส่วนคือ Telencephalon Diencephalon Mesencephalon Metencephalon และ Myelencephalon ที่ยังคงอยู่ในพื้นที่จำกัดคือ Area pellucida จึงทำให้เนื้อเยื่อ Neuroepithelium มีความหนาที่ลดลง

คำสำคัญ: ความหนา นิวโรเอพิทีเลียม เอ็มบริโอ ไก่พันธุ์ไข่ สายไลน์บราวน์

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2562. 14(1): 13-22.

E-mail address: nipinidda@gmail.com, pinidida@mut.ac.th

The Thickness of Neuroepithelium in Hy-line Brown Chicks Embryogenesis

Phinidda Cha-umphol^{1,#} and Pannigan Chaichanasak¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, Thailand

Abstract: Studying of the chicken embryo is very important steps to becoming a model of the study of early embryonic development. Especially, the nervous system is one of the earliest systems to begin. During the neuroepithelium development, neuroepithelial cells divide rapidly to form the neural tube before the central nervous system formation. In this study, the thickness of neuroepithelium in Hy-Line Brown layer while chicken embryos were measured at stages of development on Stage 10, Stage 12 and Stage 18. The growing embryos while studying was concerned about normal structures that were formed as described in previous studies. The measurement of the thickness of neuroepithelium was confirmed by a microscopic program. The result of this study showed the thickness at Stage 10, Stage 12 and Stage 18 that were 37.77, 29.02 and 27.57 μm . respectively. Decreasing of the thickness of neuroepithelium is related with a stretch in the horizontal plane in order to develop the part of the brain and their ventricle. At Stage 10, the three primary brain vesicles, Prosencephalon, Mesencephalon and Rhombencephalon, were formed and continuous growing at Stage 12 and Stage 18. Finally, the embryonic brain can be divided into five parts that were Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon and Myelencephalon. Because of chicken embryo developed in a restricted area of Area pellucida, that cause of the decreasing of neuroepithelium.

Keywords: Thickness, Neuroepithelium, Embryo, Layer chick, Hy-line Brown

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2019 14(1): 13-22.

E-mail address: niphinidda@gmail.com, phinidda@mut.ac.th

บทนำ การศึกษาเอ็มบริโอลูกไก่มีความสำคัญอย่างมากในการเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะแรก เนื่องจากเป็นระยะที่มีการ	เปลี่ยนแปลงและเห็นการพัฒนาโครงสร้างของระบบประสาทได้ดี (Psychoyos and Finnell, 2009) ซึ่งในระยะเริ่มต้นของการพัฒนาระบบประสาทจะเกิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดหนึ่งที่มีชื่อเรียกว่า
--	---

Neuroepithelial cells ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์หรือกลุ่มเซลล์หลายชนิดในระบบประสาทอันได้แก่ Neurons, Astrocytes, Glial cells เป็นต้น โดยระยะแรกจะเจริญเป็นเซลล์ที่ชื่อว่า Neuroblast รวมเป็นเนื้อเยื่อ Neuroepithelium ที่จะพัฒนาไปเป็นระบบประสาทส่วนกลาง โดยผ่านการพัฒนาระยะเอ็มบริโอ (Neurogenesis) เป็นส่วนของ Neural tube หรือหลอดประสาทก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อสมองต่อไป

สำหรับการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอ ลูกไก่จะแบ่งการศึกษาออกเป็นหลายระยะ (Stage) ของการพัฒนาเปลี่ยนแปลง โดยการศึกษาของ Hamburger and Hamilton (1951) ได้แบ่งระยะการพัฒนากออกเป็น 46 ระยะ ซึ่งในแต่ละระยะการพัฒนามีการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Witschi (1956) ที่แบ่งระยะการพัฒนากออกเป็น 36 ระยะ ดังแสดงในตารางที่ 1

Hamburger and Hamilton (1951) ได้คิดค้นระยะการเจริญเติบโตของตัวเอ็มบริโอด้วยการศึกษาร่วมกันระหว่างการใช้ภาพถ่ายและการวาดภาพที่มาจากนักวิจัยคนอื่นๆ ซึ่งทำให้สามารถที่จะกำหนดการเจริญพัฒนาออกมาได้เป็น 46 ระยะของการเจริญของตัวเอ็มบริโอไก่ ซึ่งเริ่มตั้งแต่การปฏิสนธิจนพัฒนาเป็นลูกไก่ที่สมบูรณ์โดยการศึกษาลักษณะทางรูปร่างเพียงแบบเดียวเป็นตัวกำหนด (morphological characteristics) และใช้วิธีการนับจำนวน Somite ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อตัวเอ็มบริโอชั้นกลางเป็นคุณลักษณะที่แสดงให้เห็นการเจริญเปลี่ยนแปลงในแต่ละระยะ งานของ Hamburger and Hamilton (1951) ทำการศึกษาในลูกไก่หลายสายพันธุ์เช่น

white leghorns, barred Plymouth Rock และ Rhode Island reds ซึ่งถ้าเป็นระยะการพัฒนาที่ 14-35 จะใช้ลูกไก่สายพันธุ์ white leghorn เป็นหลัก และด้วยเหตุนี้เองผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาขนาดความหนาของ Neuroepithelium ในระยะของการพัฒนาของเอ็มบริโอไก่ไข่สายพันธุ์ “ฮายไลน์บราวน์” ในระยะการเจริญที่ 10, 12 และ 18 ของไก่ในประเทศไทย ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อประสาทที่สำคัญด้วยการใช้ภาพจากการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น Ci-L-Fi3 แล้วใช้โปรแกรมวัดขนาดความหนาของเนื้อเยื่อดังกล่าว เนื่องด้วยระยะการเจริญที่ 10 เอ็มบริโอมีอายุ 33 ชั่วโมงซึ่งมีจำนวน somite 10 คู่และมีการเริ่มแบ่งส่วนของสมองออกเป็นสามโพรงอย่างชัดเจน ส่วนของระยะการเจริญที่ 12 เอ็มบริโอมีอายุที่ 48 ชั่วโมงซึ่งพบส่วนของ somite มีจำนวน 16 คู่และมองเห็นสมองเป็นห้าส่วนแล้วตามรอยหยักรอยงอของเนื้อเยื่อสมอง โดยจะมีสมองส่วนหน้าตอนหน้า (Telencephalon) สมบูรณ์พร้อมทั้งมีส่วนของการเจริญของลูกนัยน์ตาปรากฏให้เห็น และลำดับท้ายสุดระยะการพัฒนาที่ 18 เอ็มบริโอมีอายุ 72 ชั่วโมงพบว่ามีส่วนของ nasal pit เจริญปรากฏให้เห็นในสมองส่วนหน้าตอนหน้า และส่วนของ somite จะมีจำนวนทั้งหมด 33-36 คู่ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hamburger and Hamilton (1951)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวเอ็มบริโอลูกไก่ไข่ฮายไลน์บราวน์ (Hy-line Brown) เพื่อทำสไลด์ที่จะใช้สำหรับการศึกษาวัดจำนวนสไลด์ที่ใช้ในการวิจัย มี 3 ระยะคือ อายุ 33 ชั่วโมง อายุ 48 ชั่วโมง และอายุ 72 ชั่วโมง ใช้จำนวนสไลด์ละ 3 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบระยะการพัฒนากุ้งหัวเอ็มบริโอและลักษณะที่ปรากฏให้เห็น

ลักษณะที่พบเห็นในการพัฒนาเอ็มบริโอ	อายุ เอ็มบริโอ (ชั่วโมง, วัน)	ระยะการพัฒนา (Stage)	
		Hamburger and Hamilton 1951; 1992	Witschi, 1956
เริ่มเห็น Pre-primitive streak	< 6 hr	1	8-9
มี Initial primitive streak ยาว 0.3 - 0.5 มิลลิเมตร	6-7 hr	2	10
มี Intermediate primitive streak	12-13 hr	3	11
มี Definitive primitive streak ยาว $\pm$ 1.88 มิลลิเมตร	18-19 hr	4	12
เห็นส่วนของ Head process ที่มี notochord	19-22 hr	5	13a
มี Head fold	23-25 hr	6	13b
มี somite และ neural folds	23-26 hr	7	14a
มีจำนวนคู่ของ 4 somites เริ่มเห็น blood islands	26-29 hr	8	14c
มีจำนวนคู่ของ 7 somites เริ่มเห็น primary optic vesicles	29-33 hr	9	15a
มีจำนวนคู่ของ 10 somites เห็นแบ่ง 3 primary brain vesicles	33-38 hr*	10*	15c
มีจำนวนคู่ของ 13 somites ปรากฏ 5 neuromeres of hindbrain	40-45 hr	11	16a
มีจำนวนคู่ของ 16 somites สมองส่วน telencephalon ชัดเจน	45-49 hr*	12*	16b
มีจำนวนคู่ของ 19 somites ปรากฏส่วน atrioventricular canal	48-52 hr	13	16c
มีจำนวนคู่ของ 22 somites เห็นส่วนของ trunk flexure; visceral arches I and II, clefts 1 and 2	50-53 hr	14	17b
มีจำนวนคู่ของ 24-27 somites เห็นส่วน visceral arch III, cleft 3	50-55 hr	15	17d
มีจำนวนคู่ของ 26-28 somites เริ่มเห็น wing bud และ posterior amniotic fold	51-56 hr	16	18
มีจำนวนคู่ของ 29-32 somites เห็นส่วน leg bud พร้อม epiphysis	52-64 hr	17	19
มีจำนวนคู่ของ 33-36 somites เห็นส่วน nasal pit และ extending beyond level of leg bud พร้อมกับ allantois	3 day*	18*	20
มีจำนวนคู่ของ 37- 40 somites มีการเจริญของ extending into tail และ maxillary process	3.0-3.5 day	19	21
มีจำนวนคู่ของ 40-43 somites เห็น rotation completed และ eye pigment	3.0-3.5 day	20	22
มีจำนวนคู่ของ 43-44 somites เห็น visceral arch IV และ cleft 4	3.5 day	21	23
ลักษณะของ Somites ยาวไปที่ tip of tail	3.5-4.0 day	22	24
เห็น Dorsal contour from hindbrain to tail is a curved line	4 day	23	25
มี Toe plate	4.5 day	24	26
มี Elbow และ knee joints	4.5-5.0 day	25	27
มี 1 st 3 toes	5 day	26	28

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบระยะการพัฒนาวัวเอ็มบริโอและลักษณะที่ปรากฏให้เห็น (ต่อ)

ลักษณะที่พบเห็นในการพัฒนาเอ็มบริโอ	อายุ เอ็มบริโอ (ชั่วโมง, วัน)	ระยะการพัฒนา (Stage)	
		Hamburger and Hamilton 1951; 1992	Witschi, 1956
มี Beak	5.0-5.5 day	27	29
มี 3 digits และ 4 toes	5.5-6.0 day	28	30
มี Rudiment of 5 th toe	6.0-6.5 day	29	31
มี Feather germs พร้อม scleral papillae และ egg tooth	6.5-7.0 day	30	32
มี Web between 1 st และ 2 nd digits	7.0-7.5 day	31	33a
มี Anterior tip of mandible has reached beak	7.5 day	32	33b
มี Web on radial margin of wing และ 1 st digit	7.5-8.0 day	33	34a
มี Nictitating membrane	8 day	34	34b
มี Phalanges in toes	8.5-9.0 day	35	34c
มี Length of 3 rd toe from tip to middle of metatarsal joint = 5 .4 ± 0.3 มิลลิเมตร และ length of beak from anterior angle of nostril to tip of bill = 2.5 มิลลิเมตร และมีส่วนของ primordium of comb, labial groove, uropygial gland	10 day	36	34d
มี Length of 3 rd toe = 7.4 ± 0.3 mm length of beak = 3.0 mm	11 day	37	34e
มี Length of 3 rd toe = 8.4 ± 0.3 mm length of beak = 3.1 mm	12 day	38	34f
มี Length of 3 rd toe = 9.8 ± 0.3 mm length of beak = 3.5 mm	13 day	39	35a
มี Length of beak = 4.0 มิลลิเมตร และ length of 3 rd toe = 12.7 ± 0.5 มิลลิเมตร	14 day	40	35b
มี Length of beak from anterior angle of nostril to tip of upper bill = 4.5 มิลลิเมตร และ length of 3 rd toe = 14.9 ± 0.8 มิลลิเมตร	15 day	41	35c
มี Length of beak = 4.8 มิลลิเมตร และ length of 3 rd toe = 16.7 ± 0.8 มิลลิเมตร	16 day	42	35d
มี Length of beak = 5.0 มิลลิเมตร และ length of 3 rd toe = 18.6 ± 0.8 มิลลิเมตร	17 day	43	35e
มี Length of beak = 5.7 มิลลิเมตร และ length of 3 rd toe = 20.4 ± 0.8 มิลลิเมตร	18 day	44	35f
มี Yolk sac half enclosed in body cavity และ chorio-allantoic membrane contains less blood and is "sticky" in living embryo	19-20 day	45	36a
ได้ Newly-hatched chick	20-21 day	46	36b

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hamburger and Hamilton (1951)

1.1 ตอกไขไก่ฟักที่ทราบอายุแล้วลงในจานใส สังเกตสิ่งที่เห็นและบันทึกลักษณะของสิ่งที่เห็น

1.2 ใช้กรรไกรปลายแหลมจุ่มและตัดลงไปรอบๆ บลาสโตเดิร์ม เก็บบริเวณที่เป็นหลอดเลือดด้วย แล้วนำไปวางไว้บนน้ำยาล้างเอ็มบริโอสตอร์ปิก (Avian ringer solution หรือ Normal saline 0.9%) ที่เตรียมไว้แล้ว วิธีการล้างจะใช้วิธีการดูดน้ำทิ้งหรือ ร่อนก็ได้ แต่ต้องระวังตัวเอ็มบริโอฉีกขาด จากนั้นใช้ กรรไกรและตัวคีบหลอดเลือด (Artery forceps) เป็น ตัวจับวางบนกระดาษกรอง

1.3 รอให้เอ็มบริโอหมาดๆ จวนแห้งจึงตัดส่วน นอกบางส่วนออกพร้อมกับกระดาษกรองเพื่อให้เป็น ลักษณะกลม สามารถจัดลงสไลด์แก้วใสได้โดยมี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ 1.0-1.2 มิลลิเมตร

1.4 นำตัวเอ็มบริโอที่ตัดแต่งขนาดแล้ววางบน กระดาษกรอง ต้องทดสอบว่าติดอยู่บนกระดาษกรอง ด้วย จากนั้นนำมาแช่ลงในสารละลายบูแอง (Bouin's solution = picric acid + formalin + acetic acid) โดยใช้เวลา 24-36 ชั่วโมงเพื่อตรึงเนื้อเยื่อตัวเอ็มบริโอ ให้แบนราบ

1.5 จากนั้นนำมาล้างเอา picric acid ออกด้วย การใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างทุกๆ 8 ชั่วโมง ขณะล้างให้หยดสาร ลิเทียมคาร์บอเนต (Lithium carbonate) ไปพร้อมๆ กัน 2-3 หยด จนกระทั่ง มองเห็นตัวเอ็มบริโอเป็นสีขาวใสหรือจนกระทั่งสี เหลืองออกหมดและตัวเอ็มบริโอยึดสภาพเป็นตัวที่ เหยียดกางออก ใช้เวลาประมาณ 15 วัน หรือแช่ใน แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อไปเรื่อยๆ ได้ โดยตัว เอ็มบริโอไม่มีการเสียสภาพ

1.6 เมื่อพร้อมทำสไลด์ ให้นำตัวเอ็มบริโอที่ เตรียมแล้ว (แช่อยู่ใน 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์) มา ย้อมสีเมเยอร์เอซิคาร์มิน (Mayer's acid carmine =

carmine 4 กรัม + น้ำกลั่น 5 ซีซี + แอลกอฮอล์ 85% จำนวน 95 ซีซี และอุ่นไว้ 3 นาทีหยด NH₄OH 4 หยดเพื่อให้สีละลายได้ดีและบ่มอีก 1 สัปดาห์ กรอง ก่อนนำมาใช้งาน) ประมาณ 5-7 นาที จากนั้นล้าง ด้วยน้ำกลั่น 30 นาที และนำไปทำให้ตัวเอ็มบริโอใส ด้วยขบวนการ Maceration โดยแช่ลงในสารละลาย 3 % KOH ประมาณ 1-2 ชั่วโมงขึ้นกับความหนาของ ตัวเอ็มบริโอ เมื่อตัวเอ็มบริโอใสแล้ว นำไปล้างด้วย น้ำกลั่นอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเข้าขั้นตอน การดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นจาก 70, 85, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เวลาใน แต่ละความเข้มข้นประมาณ 24 ชั่วโมง รวมเป็น 4 วัน

1.7 ต่อจากนั้นนำตัวเอ็มบริโอมาแช่ลงในน้ำยาซี ดาร์วูดออยล์ (Cedar wood oil) ต่อแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วน 1:1) แช่ทิ้งไว้จนตัว เอ็มบริโอจมลงใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที แล้วย้าย ตัวเอ็มบริโอลงในน้ำยาซีดาร์วูดออยล์อย่างเดียว แช่ อีกสองครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง รวมเป็น 2 วัน

1.8 ตักตัวเอ็มบริโอขึ้นจากน้ำยาซีดาร์วูดออยล์ แล้วล้างด้วยน้ำยา คลอโรฟอর্ম 1-2 วินาที 2 ครั้ง ระวังอย่าล้างนานจะทำให้เนื้อเยื่อกรอบและแตก

1.9 นำตัวเอ็มบริโอที่ได้ไปวางบนแผ่นสไลด์ที่ หยดน้ำยา คาร์นาดา บัลซัม (Canada Balsam) ไว้ แล้ว 1 หยดแล้ววางตัวเอ็มบริโอจนทาบตรงกรณีอายุ 33 ชั่วโมง และนอนทาบตะแคงด้านซ้ายลง กรณี เอ็มบริโอ อายุ 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเติมน้ำยา คาร์นาดา บัลซัม ให้เต็มตัวเอ็มบริโอแล้วครอบ สไลด์ด้วยตัวปิดสไลด์ใสให้เรียบร้อย นำเข้าตู้อบ อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 30 วันหรือ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องใช้เวลาประมาณ 60 วัน รอจนสไลด์ใช้งานได้

2. นำไปตรวจสอบคุณลักษณะตัวเอ็มบริโอที่ได้ มีคุณลักษณะตามที่กำหนดหรือมีข้อแตกต่างใดๆ ที่ยังไม่มียางานมาด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. ถ่ายภาพพร้อมกับวัดความหนา Neuroepithelium ในระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอไก่ไข่พันธุ์สายไลน์บราวน์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น Ci-L-Fi3 ที่มีคุณสมบัติพิเศษในการถ่ายภาพที่มีความหนาละเอียดได้ดีและมีโปรแกรมสำหรับการวัดขนาดความหนาซึ่งกำหนดให้วัดความหนาของเนื้อเยื่อบริเวณส่วนบนสุดของการพัฒนาของระบบประสาท ได้แก่บริเวณด้าน

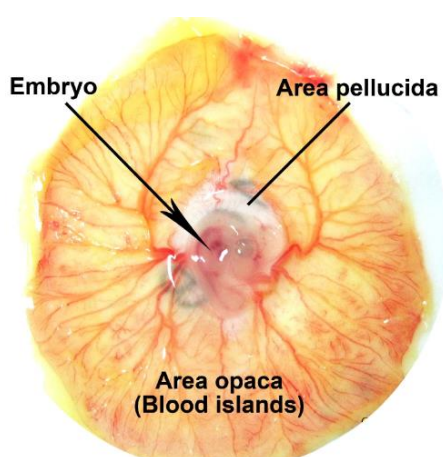
บนสุดของสมองส่วน Prosencephalon และ Telencephalon ตามระยะของการพัฒนา

ผลการทดลอง

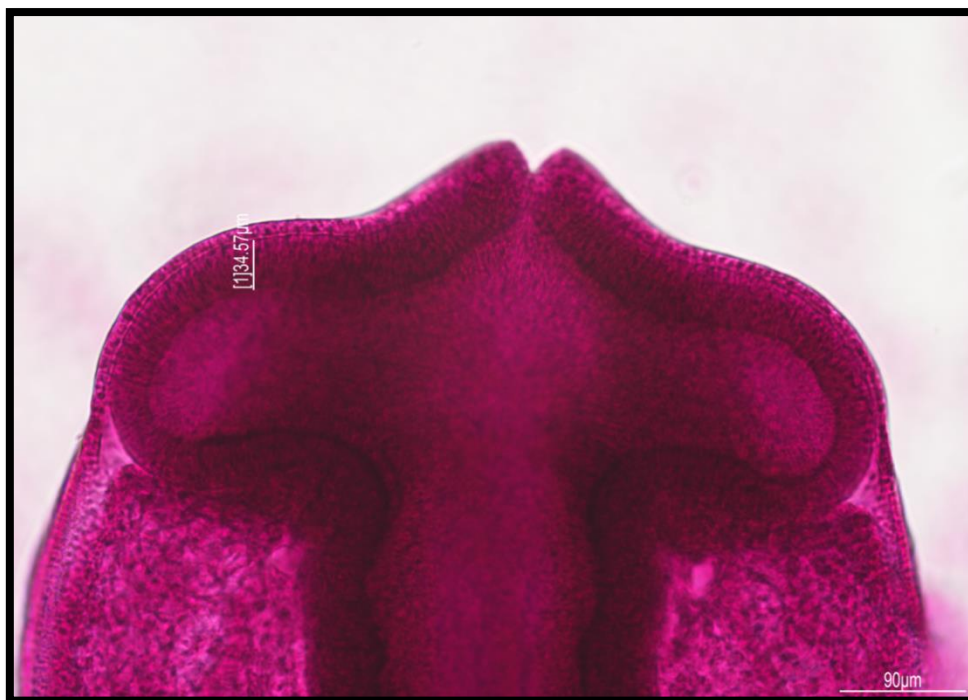
หลังจากตรวจสอบสไลด์เอ็มบริโอ และได้สไลด์เอ็มบริโอครบตามจำนวนที่กำหนดคือใช้สไลด์ที่ระยะการศึกษา จำนวน 3 ตัวอย่างจึงเริ่มนำสไลด์ไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์และใช้โปรแกรมในการวัดค่าความหนาของเนื้อเยื่อ neuroepithelium ตามกำลังขยายเพื่อหาค่าเฉลี่ยที่แม่นยำที่สุดได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความหนาของเนื้อเยื่อ Neuroepithelium ที่วัดได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์

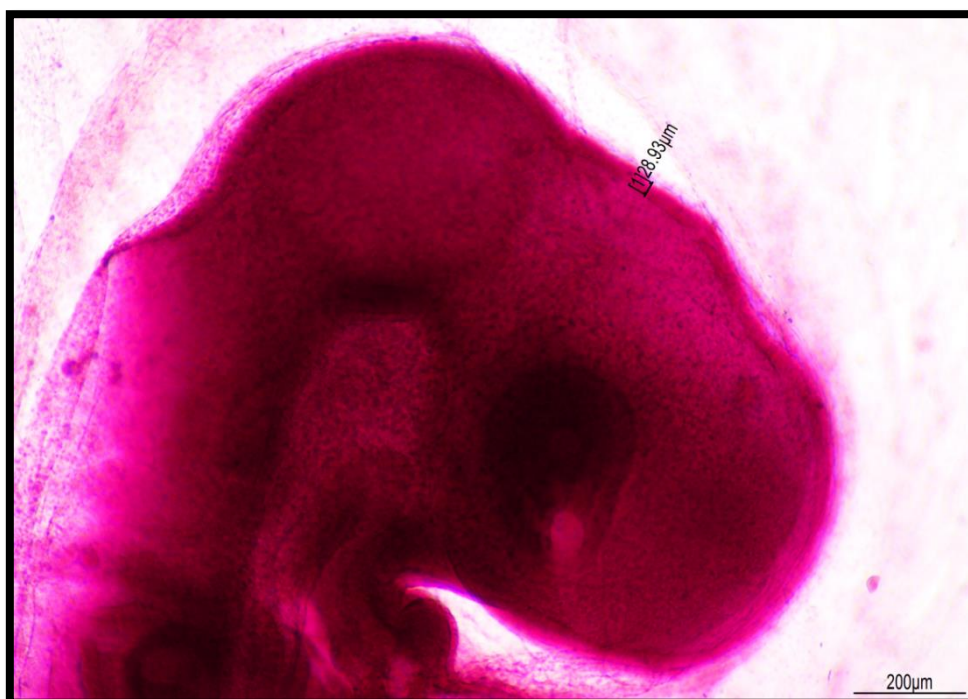
ระยะการพัฒนา (Stage)	ความหนาเฉลี่ยของ Neuroepithelium (N=3) (ไมโครเมตร)			ค่าเฉลี่ยสุทธิ (N=9) (ไมโครเมตร)
	กำลังขยาย 4X	กำลังขยาย 10X	กำลังขยาย 20X	
10	40.63	34.57	38.11	37.77
12	28.93	28.75	29.37	29.02
18	27.08	27.91	27.72	27.57



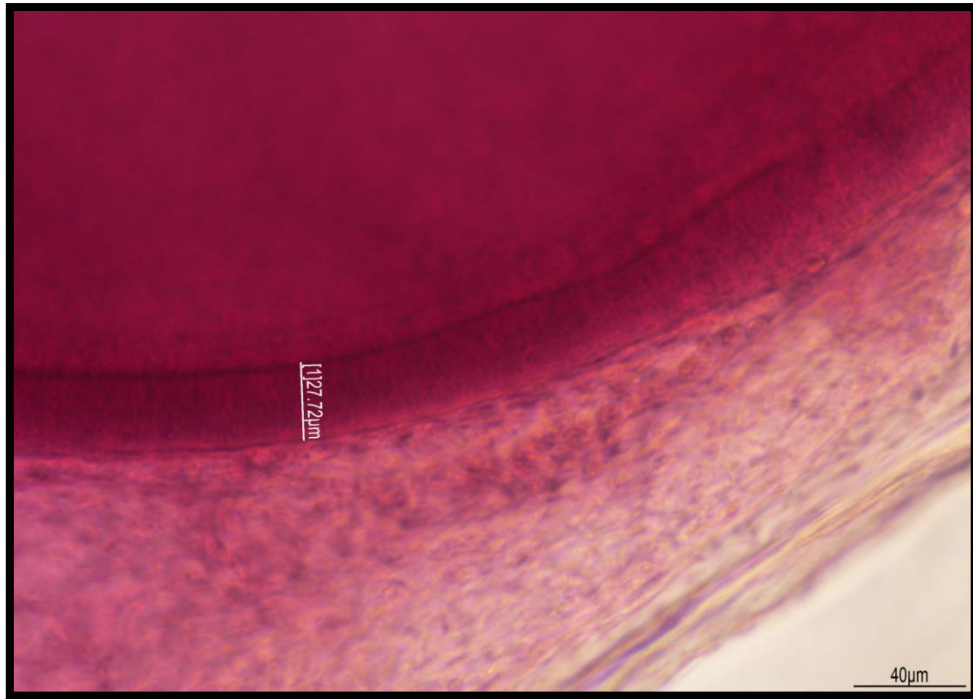
ภาพที่ 1 เอ็มบริโอไก่สายไลน์บราวน์อายุ 72 ชั่วโมง วางบนกระดาษกรอง (ภาพซ้าย) และแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (ภาพขวา)



ภาพที่ 2 เอ็มบริโอลูกไถ่ฮายไลน์บราวน์ อายุ 33 ชั่วโมง (Stage 10) ที่ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์และใช้โปรแกรมวัดขนาดความหนาที่กำลังขยาย 10X



ภาพที่ 3 เอ็มบริโอลูกไถ่ฮายไลน์บราวน์ อายุ 48 ชั่วโมง (Stage 12) ที่ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์และใช้โปรแกรมวัดขนาดความหนาที่กำลังขยาย 4X



ภาพที่ 4 เอ็มบริโอลูกไก่ฮายไลน์บราวน์ อายุ 72 ชั่วโมง (Stage 18) ที่ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์และใช้โปรแกรมวัดขนาดความหนาที่กำลังขยาย 20X

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่าความหนาของเนื้อเยื่อ Neuroepithelium ในระยะที่ 10 มีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 37.77 ไมโครเมตร ส่วนระยะ 12 มีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 29.02 ไมโครเมตร และในระยะที่ 18 หรือเอ็มบริโออายุได้ 3 วันจะมีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 27.57 ไมโครเมตรตามลำดับ ซึ่งจะตรงกับส่วนที่มีการศึกษาว่าเนื้อเยื่อประสาทจะมีการยืดขยายตัวในแนวระนาบก่อนเพื่อที่จะพัฒนาส่วนของสมองโดยการปรับเนื้อเยื่อและช่องน้ำสมอง จากการเจริญของหลอดประสาทเป็นสมองสามส่วนในระยะที่ 10 หรืออายุเอ็มบริโอที่ 33 ชั่วโมงคือสมองส่วน Prosencephalon Mesencephalon และ Rhombencephalon ตามลำดับ ต่อจากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะที่ 12 และระยะที่ 18 จะเจริญพัฒนาให้เป็นสมองห้าส่วนคือ Telencephalon Diencephalon

Mesencephalon Metencephalon และ Myelencephalon ที่ยังอยู่ในพื้นที่จำกัดคือพัฒนาในบริเวณที่วางตัวเอ็มบริโอ (Area pellucida) ซึ่งในรายงานฉบับนี้ใช้ตัวเอ็มบริโอจากไก่ไข่พันธุ์ฮายไลน์บราวน์ที่ศึกษาในระยะที่ต่ำกว่า 3 วันซึ่งต้องใช้ความชำนาญในการเตรียมสไลด์ตัวเอ็มบริโอ แตกต่างจากรายงานทั่วไปของ Zhou et al. (2015) ที่มีการศึกษาเอ็มบริโอในไก่ไข่สายพันธุ์เดียวกันแต่เป็นไก่สีขาว (Hy-line White eggs) และศึกษาการพัฒนาสมองที่อายุ 5 วันหรือระยะที่ 26 ขึ้นไปโดยใช้เครื่อง MRI และผลการทดลองจะการใช้การวัดปริมาตรของการเจริญพัฒนาของสมองเช่นเดียวกันแต่ผลที่ได้จะได้ปริมาตรทั้งหมดของสมองรวมเนื้อเยื่อและน้ำสมอง อย่างไรก็ตาม Lawson and England (1992) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการหายของบาดแผลในตัวเอ็มบริโอโดยศึกษาโดยตรงที่เนื้อเยื่อ Neuroepithelium เช่นเดียวกันซึ่ง

สรุปว่าถ้าเกิดบาดแผลในเอ็มบริโอที่มีอายุน้อยกว่าจะมีการซ่อมแซมของบาดแผลได้เร็วกว่าเอ็มบริโอที่มีอายุมากกว่า แต่ไม่กล่าวถึงการพัฒนาหรือการเจริญของเนื้อเยื่อแต่อย่างไร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท ฮอลลิวูดอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด เขตราชเทวี ประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์การเข้าใช้กล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น Ci-L-Fi3 ที่มีคุณสมบัติพิเศษในการถ่ายภาพเพื่อใช้วัดความหนาของเนื้อเยื่อ Neuroepithelium ที่ถูกต้องแม่นยำ และขอขอบคุณ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) (โรงฟักไข่หนองจอก) ที่อนุเคราะห์ให้ไข่ไก่ฟักเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Hamburger, V. and H. L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. 88(1): 49-92.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. Dev. Dyn. 195: 231-272.
- Lawson, A., and M. A. 1992. England. Studies on wound healing in the neuro epithelium of the chick embryo. Anat. Rec. 233(2): 291-300.
- Nagele, R. G., K. T. Bush, F. J. Lynch, and H. Y. Lee. 1991. A morphometric and computer-assisted three-dimensional reconstruction study of neural tube

formation in chick embryos. Anat. Rec. 231(4): 425-436.

Psychoyos, D, and R. Finnell. 2009. Assay for neural induction in the chick embryo. J. Vis. Exp. 13(24): pii: 1027.

Witschi, E. 1956. Development of Vertebrates. Saunders, Philadelphia.

Zhou, Z., Z. Chen, J., Shan, W. Ma, L. Li, J. Zu, and J. Xu. 2015. Monitoring brain development of chick embryos in vivo using 3.0 T MRI: subdivision volume change and preliminary structural quantification using DTI. BMC. Dev. Biol. 15: 29.

