



การศึกษาภาพสามมิติของโครงสร้างตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วัน ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ระดับไมโครเมตร

คณิติน ราแพนสุวรรณ¹ และณัฐดนัย บุญหนุน^{2,*}

¹ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

²สาขาวิชาการจัดการจัดการเทคโนโลยีฟาร์ม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์ ตำบลบางตลาด
อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

บทคัดย่อ: ในปัจจุบันการศึกษาการเจริญของอวัยวะในสิ่งมีชีวิตเพื่อแสดงกระบวนการเจริญจะใช้วิธีการศึกษาจากตัวอ่อนทั้งตัวที่ถูกนำมาตัดอย่างต่อเนื่องโดยศึกษาการเจริญของอวัยวะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบว่า ภาพที่ได้จะขาดมุมมองเชิงมิติ ดังนั้น เพื่อให้ได้ภาพที่สะท้อนถึงการเจริญให้ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด เทคโนโลยีการสร้างภาพสามมิติและการวิเคราะห์พื้นฐานวิทยาเชิงปริมาตรสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการศึกษาการเจริญของตัวอ่อนได้ โดยการศึกษาใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) มาศึกษาโครงสร้างและการวิเคราะห์เชิงปริมาตรของตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วัน ในโปรแกรม Amira 3D ซึ่งปรากฏว่าภาพสามมิติที่ได้นี้สามารถแสดงโครงสร้างของตัวอ่อน ค่าเชิงปริมาตรของตัวอ่อน โดยไม่ทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหาย และยังสามารถแสดงการตัดด้วยระนาบต่าง ๆ ได้โดยอัตโนมัติซึ่งทำให้วิเคราะห์ระนาบของตัวอ่อนไก่ได้หลายระนาบแตกต่างจากกระบวนการสร้างภาพสามมิติที่ได้จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน (mechanically serial section-based three dimensional reconstruction) ที่สามารถแสดงการตัดด้วยระนาบใดระนาบหนึ่งเท่านั้น อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ภาพสามมิติที่สามารถแยกแยะความแตกต่างของเนื้อเยื่อได้ชัดเจนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนของการเพิ่มความแตกต่างของสี (colour contrast) ของภาพที่ได้ก่อนนำไปเข้าเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ดังนั้น การศึกษาการสร้างภาพสามมิติด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) สามารถเป็นเครื่องมือที่เป็นทางเลือกสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการพัฒนาการเจริญของตัวอ่อนได้

คำสำคัญ: ภาพสามมิติ ตัวอ่อนไก่ เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2565. 17(1): 113-121.

E-mail address: nutdanaiboo@pim.ac.th

The Study of Three-dimensional Image of the Structure in 7 and 9 Days Old Chick Embryos from Micro-computed Tomography (Micro-CT)

Kanitin Rumpansuwan¹ and Nutdanai Boonnoon^{2,#}

¹Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Thung Phayathai, Ratchathewi, Bangkok 10400

²Department of Farm Technology Management, Faculty of Agro-Industry, Panyapiwat Institute of Management, Bang Talat, Pak Kret, Nonthaburi 11120

Abstract: Currently, the study of organ development in organisms uses both serial sections and whole-mount under microscope examination. Despite the fact that these developmental processes are well defined, the dimension often overlooked in order to obtain the most precise images. Thus, 3D reconstruction and morphometry are applied for illustrating of the embryonic development. In this study, the micro-computed tomography (micro-CT) was applied and analyzed morphometrically and volumetrically in Amira 3D software. The 3D model from the reconstruction showed the structure of the embryo as well as the volume of chick embryos without causing any damage to the samples. It was also possible to automatically display sectioning in different planes, allowing for the analysis of multiple planes of chick embryos, as compared to mechanically serial section-based three dimensional reconstruction, which was only capable of displaying sectioning in particular plane. However, in order to generate a three-dimensional image that clearly distinguishes tissue from micro-computed tomography (micro-CT) analysis, it is necessary to add a step of enhancing the color contrast of the image before it is placed into the micro-computed tomography (micro-CT). Thus, this study of 3D image of the structure of chick embryos from Micro-computed tomography (micro-CT) can be used to demonstrate morphological changes in embryonic development.

Keywords: Three-dimensional image, Chick embryo, Micro-computed tomography

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2022 17(1): 113-121.

E-mail address: nutdanaiboo@pim.ac.th

บทนำ

โดยทั่วไป วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (embryo) ที่เป็นมาตรฐาน จะใช้ตัวอ่อนทั้งตัวตัดต่อเนื่อง ทั้งหมดโดยภาพที่ได้จากการศึกษาจะเป็นภาพสองมิติ ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อศึกษาโครงสร้างภายในของตัวอ่อนได้ในทางในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวนี้ในบางกรณีไม่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างในสามมิติ (topographical anatomy) ซึ่งส่งผลทำให้ไม่สามารถอธิบายการเจริญของโครงสร้างที่สัมพันธ์กับโครงสร้างโดยรอบได้ ส่วนการนำตัวอ่อนทั้งตัวมาศึกษาได้ก็ลองจุลทรรศน์พบว่า เนื่องจากตัวอ่อนนั้นมีความหนา เมื่อ

ไม่ได้ทำการตัดอย่างต่อเนื่องจะทำให้การศึกษาโครงสร้างภายในของตัวอ่อนเป็นไปยาก เพราะโครงสร้างภายในถูกปกคลุมไปด้วยผิวหนัง ดังนั้นการทำ whole mount เพื่อการศึกษารูปร่างและลักษณะของตัวอ่อนภายนอกจึงพบข้อจำกัดในการศึกษา คือ ภาพที่ได้จะมองเห็นได้เฉพาะโครงสร้างด้านนอกของตัวอ่อน และไม่สามารถมองเห็นโครงสร้างภายในด้วยตาเปล่า จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาภายในด้วยการกล้องจุลทรรศน์กำลังต่ำในการศึกษา (Hikspoors et al., 2015; de Bakker et al., 2016; Boonnoon et al., 2020)

ปัจจุบันเทคโนโลยีคอมพิวเตอร์สามารถนำเอาวิธีการศึกษาสองวิธีมาผสมผสานกัน ซึ่งทำให้ได้ข้อดีของการศึกษา โครงสร้างภายนอกและการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ วิธีการศึกษานี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับชีววิทยาของการเจริญของตัวอ่อนในหลายๆ ระบบ (van der Berg and Moorman, 2011; Harikrishnan et al., 2015; Kruepunga et al., 2018) ซึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างของตัวอ่อนใช้ serial section ที่ผ่านการย้อมสีแล้วไปถ่ายภาพเพื่อแปลงเป็นข้อมูลดิจิทัล นำเข้าสู่โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ทำการวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อแต่ละแผ่น โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะทำการประมวลผลสร้างเป็นภาพสามมิติขึ้นมา (Pentecost, Icardo and Thornburg, 1999; van der Berg and Moorman, 2011; Hikspoors et al., 2015; de Bakker et al., 2016; Boonnoon et al., 2020; Kruepunga et al., 2020a; Kruepunga et al., 2020b)

โดยทั่วไปการศึกษากาเจริญของโครงสร้างตัวอ่อนของไก่นิยมใช้เป็นตัวแทนการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโครงสร้างต่าง ๆ ของตัวอ่อนของมนุษย์ แต่ช่วงการศึกษาตัวอ่อนของไก่นิยมศึกษาเฉพาะช่วงการเจริญตั้งแต่การปฏิสนธิจนถึงอายุ 4 วัน เนื่องจากระบวนการเจริญของโครงสร้างตัวอ่อนไก่ในช่วงนี้คล้ายกับการเจริญของโครงสร้างตัวอ่อนในมนุษย์ ส่งผลให้

การศึกษาในระยะอื่น ๆ ยังไม่ได้มีการศึกษาเพียงพอเพื่อที่จะแสดงโครงสร้างต่าง ๆ ของตัวอ่อนได้อย่างสมบูรณ์ (Arey, 1974; Boonnoon et al., 2020)

ในการศึกษาทางพิษวิทยา พบว่ามีงานวิจัยหลายงานที่มีการรายงานผลของสารบางชนิดที่มีผลต่อกลไกเจริญของระบบต่าง ๆ ในตัวอ่อนไก่ เช่น ผลของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองต่อกระบวนการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ในตัวอ่อนสัตว์ปีก (Boonnoon et al., 2016) ดังนั้น การศึกษาเพื่อให้เข้าใจโครงสร้างปกติทั้งภายในและภายนอกของตัวอ่อนไก่ มีความสำคัญเพื่อที่จะนำไปเป็นต้นแบบเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างของตัวอ่อนปกติและโครงสร้างของตัวอ่อนเมื่อได้รับสารที่มีผลต่อการเจริญ (Boonnoon et al., 2020) อย่างไรก็ตาม ด้วยวิธีการสร้างภาพสามมิติที่ได้จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกันและย้อมสีแบบปกติ พบอุปสรรคในการศึกษาผลของสารบางอย่างต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อน เนื่องจากการนำเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลอาจทำให้โครงสร้างที่ต้องการศึกษาเกิดข้อสงสัยว่าเกิดจากการตัดเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อบิดเบี้ยว (tissue distortion) หรือ ผลจากสารนั้นๆ ได้ ดังนั้น การศึกษาโครงสร้างและค่าเชิงปริมาตรของตัวอ่อนไก่ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จึงเป็นการศึกษาเพื่อให้เข้าใจโครงสร้างและเปรียบเทียบโครงสร้างของตัวอ่อนไก่ในอีกทางเลือกหนึ่ง และเพื่อเป็นแนวทางตัวอย่างต่อยอดในการศึกษาพิษวิทยาของสารบางอย่างต่อกระบวนการเจริญของตัวอ่อนด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำไข่ไก่พันธุ์ Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) ที่ได้รับการผสมจากฟาร์มหลวงสุวรรณวาจกกสิกิจ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งนำไปฟักต่อในตู้ฟักเป็นเวลา 7 (2 ฟอง) และ 9 วัน (1 ฟองฟักปกติ และ 1 ฟองมีการทดลองฉีด

สารละลายคาเฟอีนลงไปก่อนฟักเพื่อเป็นตัวช่วยต่อ ยอดการศึกษาพิษวิทยา) เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวน 4 ตัว เมื่อครบระยะเวลาฟักที่ต้องการนำตัวอ่อนไก่ไปคงสภาพ ด้วย 4% paraformaldehyde ก่อนนำไปรักษาสภาพใน 70% เอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้น นำตัวอ่อนไก่เข้าเครื่อง เอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ทำการแปลงไฟล์ที่ได้จากเครื่องเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับ ไมโครเมตร (Micro-CT) จากนามสกุล bmp ไปเป็น นามสกุล dicom จะได้ไฟล์จากตัวอ่อนแต่ละตัวมี ประมาณ 1,000 ภาพ นำเข้าไฟล์ทั้งหมดของตัวอ่อนแต่ละตัวในโปรแกรม Amira 3D รุ่น 2020.3 จากนั้นทำการ เลือกยืนยันการตั้งค่าอัตโนมัติตามคำแนะนำของ โปรแกรม ทำการประมวลผลภาพทั้งภาพในระนาบต่าง ๆ เมื่อเสร็จสิ้น ทำการสร้างภาพสามมิติโดยใช้คำสั่ง multi-thresholding ในส่วนของการวิเคราะห์เชิงปริมาตร ทำการศึกษาโดยใช้คำสั่ง Material Statistics ใน โปรแกรม Amira 3D

ผลการวิจัย

ผู้วิจัยนำเสนอผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของ ตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วันโดยการสร้างภาพสามมิติจาก เครื่องเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่แสดงต้นแบบภาพสามมิติของ ตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วัน ด้วยเครื่องเอ็กซ์เรย์ คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) และ ค่าเชิง ปริมาตรของตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วัน นำภาพมา เปรียบเทียบโครงสร้างต่างๆ กับการระบุโครงสร้างใน Atlas of chick development (Bellairs and Osmond, 2014) และ ส่วนที่แสดงผลการวิเคราะห์ ประสิทธิภาพการทดสอบพิษวิทยา ดังนี้

ภาพสามมิติของตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วันด้วยเครื่อง เอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) และ ค่าเชิงปริมาตรของตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วัน
ภาพโครงสร้างภายในของตัวอ่อนไก่อายุ 7 วัน

ตัวอ่อนไก่อายุ 7 วันก็นำมาศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอ่อนไก่ที่ได้ นำออกมาจากไข่ไก่และผ่านน้ำยาคงสภาพ และนำไปสร้างภาพสามมิติด้วยเครื่องเอ็กซ์เรย์ คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) โดยไม่ได้ผ่าน กระบวนการเพิ่มความแตกต่างของสี ภาพที่ได้จาก กระบวนการสร้างภาพสามมิติจาก เครื่องเอ็กซ์เรย์ คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จะสามารถ แสดงลักษณะโครงสร้างภายในต่าง ๆ ของตัวอ่อนไก่ใน ระนาบ 3 ระนาบ คือ

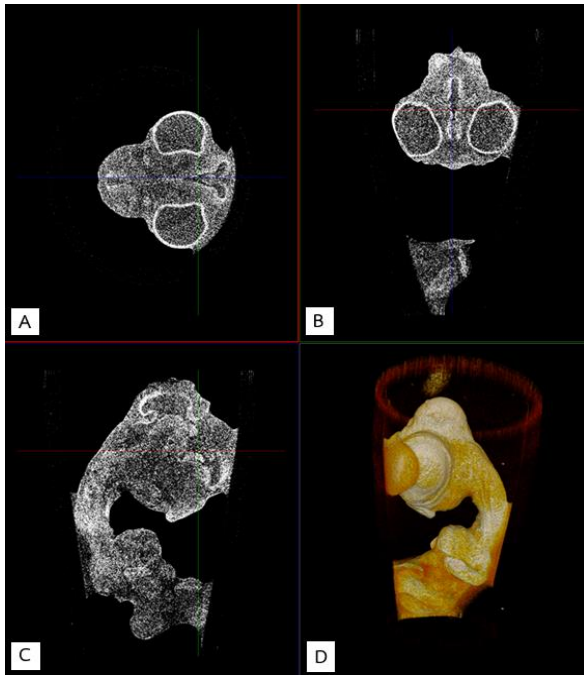
1. ระนาบ xy ซึ่งเป็นภาพแสดงภาพตัดขวาง (transverse section) ของตัวอ่อนไก่ (ภาพที่ 1: A)
2. ระนาบ yz ซึ่งเป็นภาพแสดงภาพตัดด้านหน้า (frontal section) ของตัวอ่อนไก่ (ภาพที่ 1: B)
3. ระนาบ xz ซึ่งเป็นภาพแสดงภาพตัดด้านข้าง (sagittal section) ของตัวอ่อนไก่ (ภาพที่ 1: C)

ภาพโครงสร้างภายนอกของตัวอ่อนไก่อายุ 7 วัน

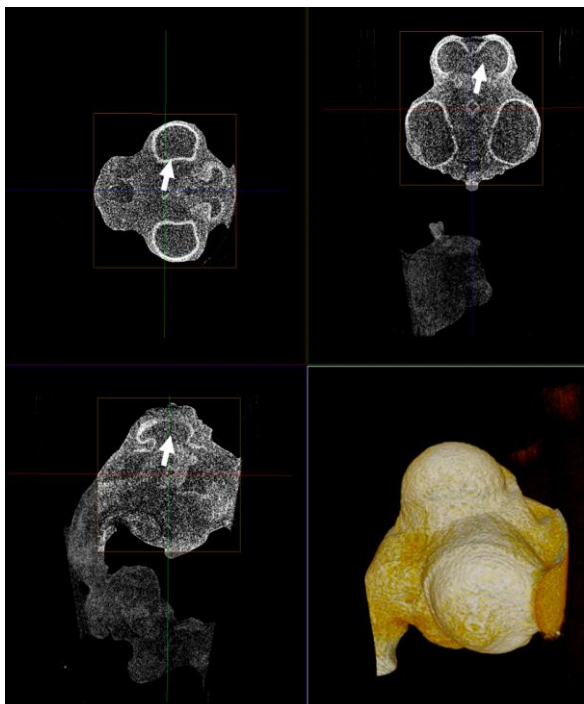
โครงสร้างภายนอกของตัวอ่อนไก่ที่แสดงเป็นภาพ สามมิติ เกิดจากการประมวลผลของภาพตัดในระนาบ ต่างๆ (ภาพที่ 1: D)

จากการติดตามภาพตัดในระนาบต่าง ๆ อย่าง ต่อเนื่องพบว่าโครงสร้างที่สามารถระบุได้จากการตัดด้วย เครื่องเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) อย่างชัดเจน คือ สมอของตัวอ่อนไก่ (ภาพที่ 2: ลูกศร สี ขาว) ซึ่งสามารถเห็นได้จากทั้งสามระนาบ โดยบริเวณผนัง ของสมอส่วนต่าง ๆ จะเป็นสีขาวเข้มแสดงขอบเขต ชัดเจนล้อมรอบบริเวณที่มีสีดำมากกว่า เมื่อศึกษา โครงสร้างภายในซึ่งสะท้อนรูปร่างของสมอได้จากภาพ สามมิติซึ่งมีรูปทรงเหมือนที่แสดงในภาพตัดทางด้านข้าง นูนขึ้นไป และมีการโป่งออกมาทางด้านข้าง 2 ข้าง

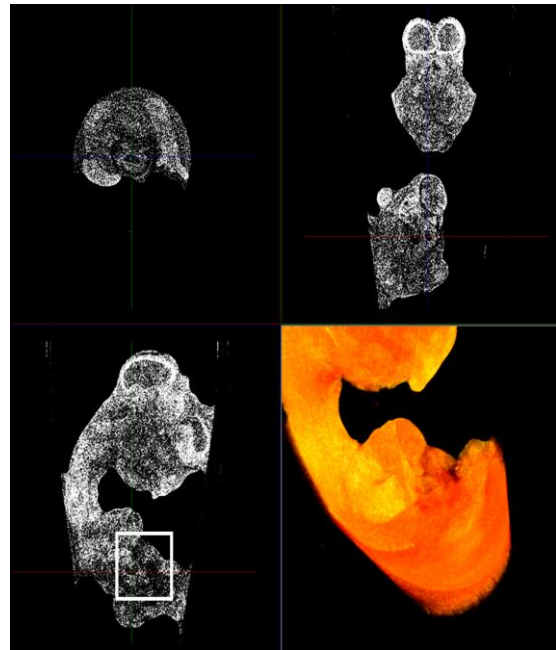
เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถทำการเพิ่ม ความแตกต่างของสี (colour contrast) ก่อนการสร้าง ภาพสามมิติด้วยเครื่องเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับ ไมโครเมตร (Micro-CT) ทำให้การศึกษาโครงสร้างอื่นๆ เป็นไปได้ยากเนื่องจากความละเอียดของภาพค่อนข้างต่ำ



ภาพที่ 1 แสดงภาพที่ได้จากการนำข้อมูลดิบมาประมวลผลด้วยโปรแกรมสร้างภาพสามมิติ: A: แสดงภาพตัดขวาง (transverse section) B: แสดงภาพตัดทางด้านหน้า (frontal section) C: แสดงภาพตัดทางด้านข้าง (sagittal section) และ D: แสดงภาพสามมิติของตัวอ่อนไก่



ภาพที่ 2 แสดงภาพตัดขวางและภาพสามมิติของบริเวณสมองในตัวอ่อนไก่อายุ 7 วัน



ภาพที่ 3 แสดงภาพตัดขวางในระนาบต่าง ๆ และภาพสามมิติบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่อายุ 7 วัน

จึงไม่สามารถแยกโครงสร้างต่างๆ ออกจากกันได้ เช่น การศึกษาโครงสร้างของอุ้งเชิงกรานในตัวอ่อนไก่อายุ 7 วัน (ภาพที่ 3: กรอบสีขาว)

ในการศึกษาครั้งนี้มีการนำตัวอ่อนไก่ที่ฟักเป็นเวลา 7 วันมาสร้างภาพสามมิติจำนวน 2 ตัวเพื่อทำการเปรียบเทียบภาพที่ได้จากเครื่องเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) โดยพบว่าลักษณะโครงสร้างภายนอกของตัวอ่อนไก่ทั้ง 2 มีความใกล้เคียงกัน คือ มีการนูนของสมองและการโป่งออกทั้งสองข้างของตา เริ่มสามารถเห็นจงอยปากได้ รวมทั้งมีการเจริญพัฒนาของระยางค์บนและล่างอีกด้วย (ภาพที่ 4) นอกจากนี้เมื่อทำการคำนวณหาปริมาตรทั้งหมดของตัวอ่อนไก่อีกยังพบว่ามีความใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 0.19 และ 0.20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ

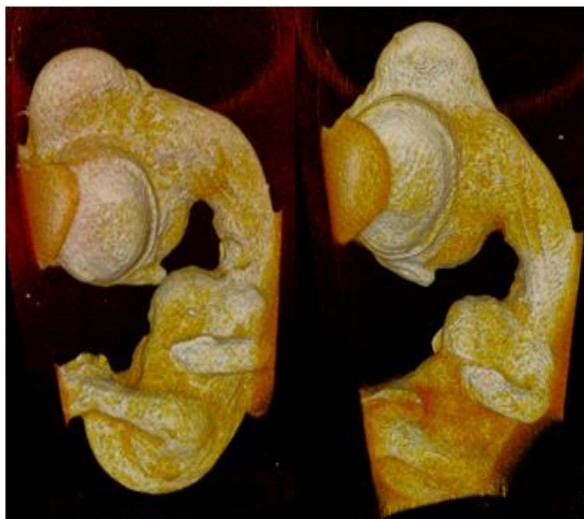
การเปรียบเทียบโครงสร้างภายนอกของตัวอ่อนไก่อายุ 7 และ 9 วัน

ในการศึกษานี้ได้มีการสร้างภาพสามมิติเพื่อเปรียบเทียบตัวอ่อนไก่อายุ 7 วันและ 9 วันเพื่อศึกษาการเจริญพัฒนาที่ต่อเนื่องกัน โดยจากภาพสามารถบ่งชี้

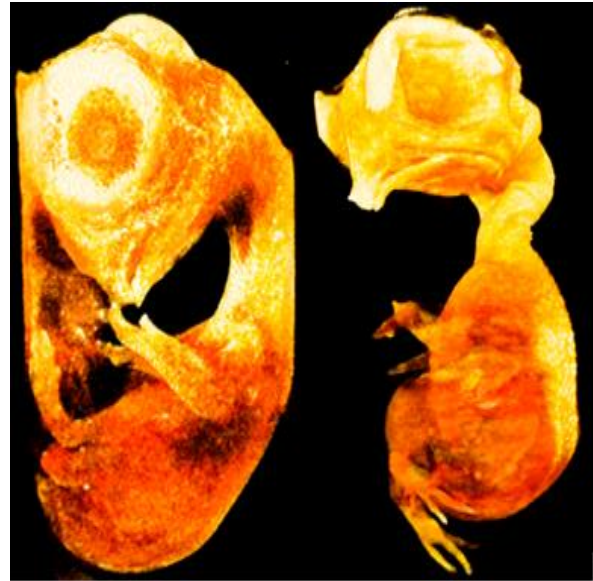
ได้ว่าจงอยปากและรยางค์มีการยืดยาวมากขึ้นในตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน รวมทั้งบริเวณรยางค์เริ่มมีการแยกของนิ้วออกจากกัน (ภาพที่ 5) และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาตรของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วันตัวนี้พบว่าปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็น 0.42 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ประสิทธิภาพของการใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ในการทดสอบพิษวิทยา

นอกจากการเปรียบเทียบตัวอ่อนต่างอายุกันแล้วในการศึกษานี้ต้องการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ในการสร้างภาพสามมิติในตัวอ่อนไก่ เนื่องจากในการศึกษาผลของสารบางอย่างต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนโดยใช้ตัวอ่อนไก่เป็นโมเดลศึกษาโดยวิธีการตัดเนื้อเยื่อต่อเนื่องและย้อมสีแบบปกติอาจทำให้โครงสร้างที่ต้องการศึกษาเกิดข้อสงสัยว่าเกิดจากการตัดเนื้อเยื่อหรือผลจากสารนั้น ๆ ดังนั้นในการศึกษานี้ได้นำตัวอ่อนไก่ที่ทำการศึกษาผลของคาเฟอีน 1 ตัวมาทดสอบการสร้างภาพสามมิติจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จากภาพที่ 6 พบว่า ตัวอ่อนไก่ที่ได้รับคาเฟอีนนี้มีการแฟบของสมองเกิดขึ้น เมื่อดูจากภาพตัดขวางและภาพสามมิติ นอกจากนี้เมื่อทำการวัดปริมาตรของทั้งตัวพบว่าปริมาตรอยู่ที่ 0.39 ลูกบาศก์เซนติเมตร



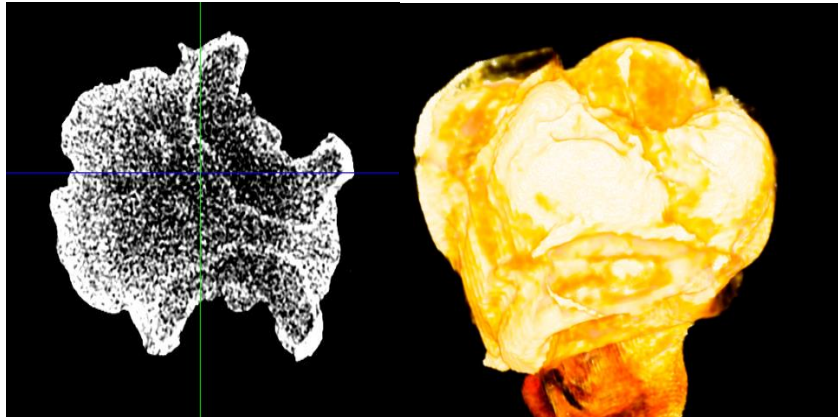
ภาพที่ 4 แสดงภาพเปรียบเทียบตัวอ่อนไก่อายุ 7 วัน (2 ตัว)



ภาพที่ 5 แสดงภาพสามมิติของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน (ซ้าย: ตัวอ่อนไก่อายุ 9 วันปกติ ขวา: ตัวอ่อนไก่อายุ 9 วันที่ทำการศึกษาคาเฟอีนเข้าไป)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การใช้เทคนิคการตัดโดยรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) มาวิเคราะห์ตัวอ่อนไก่ และนำเอาไฟล์ภาพที่ได้มาสร้างภาพสามมิติซึ่งภาพสามมิติที่ได้สามารถมาประกอบเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปวิเคราะห์ระนาบต่างๆของตัวอ่อนไก่ได้ อัตโนมัติและหลากหลายมากขึ้น ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถแทนการสร้างภาพสามมิติที่ได้จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน (mechanically serial section-based three dimensional reconstruction) เนื่องจากในกระบวนการทำ serial section โดยเริ่มจากกระบวนการคงสภาพของตัวอ่อนเพื่อรักษาโครงสร้างของตัวอ่อนให้สามารถนำมาศึกษาได้ จากนั้นตัวอ่อนจะถูกนำไปฝังในพาราฟินซึ่งจะถูกตัดด้วยเครื่อง rotary microtome และ นำไปย้อมสีให้เห็นโครงสร้างต่างๆ (Watterson and Sweeney, 1973) เป็นวิธีการที่ใช้เวลาค่อนข้างมากและต้องการความชำนาญของผู้วิจัยเนื่องจากผู้วิจัยจะต้องเก็บความละเอียดในกระบวนการทำ serial section ที่ให้ได้มาซึ่งเนื้อเยื่อที่มีความสมบูรณ์



ภาพที่ 6 แสดงภาพสามมิติจากตัวอ่อนไก่อายุ 9 วันที่ผิดปกติ (จากการฉีดไข่ไก่ด้วยคาเฟอีน)

เพียงพอต่อการสร้างภาพสามมิติ และในการศึกษาผลของสารบางอย่างต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนเป็นโมเดลศึกษาวิธีการตัดเนื้อเยื่อต่อเนื่องและย้อมสีแบบปกติอาจทำให้โครงสร้างที่ต้องการศึกษาเกิดข้อสงสัยว่าเกิดจากการตัดเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อบิดเบี้ยว (tissue distortion) หรือผลจากสารนั้นๆ ได้ สำหรับเทคนิคการตัดโดยรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จะสามารถยืนยันข้อสงสัยได้ว่าเป็นผลมาจากสารนั้นๆ ต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนได้ โดยผลการวิเคราะห์ภาพสามมิติจากตัวอ่อนไก่อายุ 9 วันที่ผิดปกติจากการฉีดไข่ไก่ด้วยคาเฟอีน ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งใช้เทคนิคการตัดโดยรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ในบริเวณของสมองหรือระบบประสาท (nervous system) โดยเฉพาะตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดไข่ไก่ด้วยสารใดๆ เช่น คาเฟอีน เนื้อเยื่อของตัวอ่อนดังกล่าวจะค่อนข้างเปราะบาง อันเนื่องมาจากผลของสารที่ฉีดเข้าไป ดังนั้นหากผู้วิจัยใช้เทคนิคการสร้างภาพสามมิติที่จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน (mechanically serial section-based three dimensional reconstruction) จะพบว่าเนื้อเยื่อของตัวอ่อนจะมีการบิดเบี้ยวอย่างมาก (tissue distortion) ซึ่งทำให้เกิดความยากลำบากในกระบวนการเรียงภาพ (stacking) เพื่อนำมาประกอบกันเป็นภาพสามมิติ ซึ่งเทคนิคการตัดโดยรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์

ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) นั้นจะไม่ทำให้เนื้อเยื่อกระจายหรือได้รับความเสียหายจากกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ นอกจากนี้สามารถแทนวิธีการสร้างภาพสามมิติจากภาพตัดต่อเนื่องด้วยแสงได้ (optically serial section-based three dimensional reconstruction) เนื่องจากเทคนิคการตัดโดยรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) นี้ จัดเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่เหมาะสมกับการศึกษาตัวอ่อนเชิงโครงสร้าง เช่นเดียวกับเทคนิคการสร้างภาพสามมิติที่จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน (Boonnoon et al., 2020)

ในกระบวนการสร้างภาพสามมิติในปัจจุบันสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาตรของตัวอ่อนทั้งตัวได้อีกด้วย เพื่อแสดงความแตกต่างของปริมาตรของตัวอ่อนทั้งตัวโดยคำนวณจากพื้นที่ที่ระบุในภาพสองมิติเพื่อแสดงปริมาตร (Boonnoon et al., 2020) ดังจะเห็นจากงานวิจัย เช่น การศึกษาเชิงปริมาณเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อเวลาผ่านไป (de Bakker et al., 2016) และ การศึกษาโครงสร้างของกระดูกสันหลังเพื่อสังเกตการทิศทางการเปลี่ยนแปลงโดยการวัดระยะทางในพื้นที่สามมิติ (Mekonen et al., 2017) เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้การสร้างภาพสามมิติจากตัวอ่อนทั้งตัวโดยตรงผ่านการตัดโดยใช้รังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) นอกจากจะทำให้ลดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจาก

กระบวนการเตรียมตัวอ่อนซึ่งแตกต่างจากการตัดแบบเชิงกล อีกทั้งกระบวนการเรียงภาพ (stacking) ยังเป็นแบบอัตโนมัติ จึงทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาตรสามารถสะท้อนค่าที่แม่นยำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสร้างภาพสามมิติที่ได้จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน (mechanically serial section-based three dimensional reconstruction)

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการสร้างภาพสามมิติของตัวอ่อนไก่ อายุ 7 และ 9 วัน พบว่าการสร้างภาพสามมิติโดยใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) มาสแกนตัวอ่อนไก่ และนำเอาไฟล์ภาพที่ได้มาสร้างภาพสามมิติ มีข้อดีคือ ภาพสามมิติที่ได้สามารถแสดงโครงสร้างของตัวอ่อน ค่าเชิงปริมาตรของตัวอ่อน โดยไม่ทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหาย และ ยังสามารถแสดงการตัดด้วยระนาบต่างๆได้โดยอัตโนมัติซึ่งทำให้วิเคราะห์ระนาบของตัวอ่อนไก่ได้หลายระนาบแตกต่างจากกระบวนการสร้างภาพสามมิติที่ได้จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน (mechanically serial section-based three dimensional reconstruction) ที่สามารถแสดงการตัดด้วยระนาบใดระนาบหนึ่งเท่านั้น การสร้างภาพสามมิติโดยใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จึงเป็นวิธีการที่ประหยัดเวลา และ สามารถลดอุปสรรคทางด้านความชำนาญของผู้วิจัยในการให้ได้มาซึ่งเนื้อเยื่อที่มีความสมบูรณ์เพียงพอต่อการสร้างภาพสามมิติ และในการศึกษาผลของสารบางอย่างต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนเป็นโมเดลศึกษาวิธีการตัดเนื้อเยื่อต่อเนื่องเชิงกลมาเรียงต่อกัน และข้อเสียแบบปกติอาจทำให้โครงสร้างที่ต้องการศึกษาเกิดข้อสงสัยว่าเกิดจากการตัดเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อบิดเบี้ยว (tissue distortion) หรือผลจากการสแกนๆ ได้

ในการสร้างภาพสามมิติด้วยการตัดด้วยรังสีหรือการใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) จำเป็นต้องมีการเพิ่มขั้นตอนการเพิ่ม colour contrast ของภาพที่ได้ก่อนนำไปเข้าเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) เนื่องจากว่า ภาพที่ได้จากการนำไปเข้าเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Micro-CT) ทันทีหลังการรักษาภาพของเนื้อเยื่อในตัวอ่อนไก่ ทำให้ได้ภาพที่ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของเนื้อเยื่อออกจากกันเท่าที่ควร ดังภาพที่ได้แสดงในผลการศึกษาซึ่งสามารถแยกแยะออกได้เพียงพอประสาทเท่านั้น และเพื่อให้เห็นถึงการหมุนของภาพสามมิติได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ควรมีการเพิ่มภาพสามมิติในหลายๆ มุม

เอกสารอ้างอิง

- Arey, L.B. 1974. Developmental anatomy: A textbook and laboratory manual of embryology. 7th ed. Saunders, Inc. Philadelphia. 695 p.
- Bellairs, R. and Osmond, M. 2014. The atlas of chick development. 3rd ed. Academic Press. Oxford. 692 p.
- Boonnoon, N., Chotyakul, N., and Kruepunga, N. 2016. Effects of soybean phytoestrogens on the development of avian reproductive system. Panyapiwat J. 8(2): 272-283.
- Boonnoon, N., Chandee, N., and Kruepunga, N. 2020. Three-dimensional Image Reconstruction of the Developing Pelvic Region in 9-day-old Chick Embryos. TSTJ. 28(6): 1087-1097. (in Thai)
- de Bakker, B.S., de Jong, K.H., Hagoort, J., de Bree, K., Besselink, C.T., de Kanter, F.E.C., Veldhuis, T., Bais, B., Schildmeijer, R.,

- Ruijter, J.M., Oostra, R. J., Christoffels, V.M. and Moorman, A.F. 2016. An interactive three-dimensional digital atlas and quantitative database of human development. *Science*. 354. doi: 10.1126/science.aag0053.
- Harikrishnan, K., Cooley, M.A., Sugi, Y., Barth, J.L., Rasmussen, L.M., Kern, C.B., Argraves, K.M. & Argraves, W.S. 2015. Fibulin-1 suppresses endothelial to mesenchymal transition in the proximal outflow tract. *Mechanisms of Development*. 136: 123-132.
- Hikspoors, J.P., Soffers, J.M., Mekonen, H.K., Cornillie, P., Köhler, S.E. and Lamer, W.H. 2015. Development of the human infrahepatic inferior caval and azygos venous systems. *J. Anat*. 226(2): 113-25.
- Kruepunga, N., Hikspoors, J.P., Mekonen, H.K., Mommen, G.M., Meemon, K., Weerachatanukul, W., Asuvapongpatana, S., Köhler SE. and Lamer, W.H. 2018. The development of the cloaca in the human embryo. *J. Anat*. 233(6): 724-739.
- Kruepunga, N., Hikspoors, J. P. J. M., Hülsman, C. J. M., Mommen, G. M. C., Köhler, S. E., & Lamers, W. H. 2020a. Development of extrinsic innervation in the abdominal intestines of human embryos. *J. Anat*. 237(4): 655-671.
- Kruepunga, N., Hikspoors, J. P. J. M., Hülsman, C. J. M., Mommen, G. M. C., Köhler, S. E., & Lamers, W. H. 2020b. Extrinsic innervation of the pelvic organs in the lesser pelvis of human embryos. *J. Anat*. 237(4): 672-688.
- Mekonen, H.K., Hikspoors, J.P., Mommen, G., Kruepunga, N., Köhler, S.E. and Lamers, W.H. 2017. Closure of the vertebral canal in human embryos and fetuses. *J. Anat*. 231(2): 260–274.
- Pentecost, J.O., Icardo, J. & Thornburg, K.L. 1999. 3D Computer modeling of human cardiogenesis. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 23(1): 45-49.
- van den Berg, G. & Moorman, A.F. 2011. Development of the pulmonary vein and the systemic venous sinus: an interactive 3D overview. *PLoS One*.6(7): e22055.
- Watterson, R.L. & Sweeney, R.M. 1973. Laboratory studies of chick, pig and frog embryos. Burgess Pub. Co. Minneapolis. 206 p.

