

การสร้างภาพสามมิติของการเจริญบริเวณอุ้งเชิงกราน
ในตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน

Three-dimensional Image Reconstruction of
the Developing Pelvic Region in 9-day-old Chick Embryos

ณัฐดนัย บุญหนุน

สาขาวิชาการจัดการจัดการเทคโนโลยีฟาร์ม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์

ตำบลบางตลาด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

นิชาภา จันทร์ดี

สาขาวิชากายภาพบำบัด สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

ตำบลไทยบุรี อำเภอนครหลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

ณัฐเมธี เครือพุง*

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์และศัลยกรรม คณะสุขภาพ การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ชีวิต

มหาวิทยาลัยมาสทริคท์ ยูนิเวอร์ซิตีซิงเกออร์ 60 6229 ER มาสทริคท์, ประเทศเนเธอร์แลนด์

Nutdanai Boonnoon

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

Nichapha Chandee

Department of Physical Therapy, School of Allied Health Sciences, Walailuk University,
Thaiburi, Thasala, Nakhon Si Thammarat, Thailand 80161

Nutmethee Kruepunga*

Department of Anatomy & Embryology, Faculty of Health, Medicine and Life Sciences,
Maastricht University, Minderbroedersberg 4-6, 6211 LK Maastricht, Netherlands

บทคัดย่อ

การเจริญของอวัยวะในสิ่งมีชีวิตได้มีการศึกษามากมาย โดยการนำตัวอ่อนมาตัดต่อเนื้อเยื่อและการนำตัวอ่อนทั้งตัวมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อแสดงกระบวนการเจริญในรูปของภาพจากกล้องจุลทรรศน์หรือภาพวาด จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า ส่วนใหญ่มักขาดมุมมองเชิงมิติ ปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่เรียกว่าการสร้างภาพ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : nkruepunga@gmail.com

สามมิติเข้ามาช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการศึกษาการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนทั้งการเพิ่มมิติที่สาม (แกน z หรือ ความหนา) และการศึกษาเชิงปริมาตรเพื่อแสดงการเจริญให้ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างภาพสามมิติและการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาเชิงปริมาตรมาประยุกต์ใช้กับการศึกษาบริเวณอวัยวะของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน การศึกษานี้ใช้ภาพเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่ตัดต่อเนื่องมาศึกษาทางจุลกายวิภาคและเชิงปริมาตรด้วยโปรแกรม Amira 3D และการสร้างขึ้นใหม่ด้วยโปรแกรม Cinema 4D เพื่อลดขอบของการตัดเนื้อเยื่อซึ่งบดบังมุมมองของภาพ โดยโครงสร้างสามมิติที่ได้นี้สามารถหมุนเพื่อแสดงรายละเอียดของโครงสร้างในอวัยวะและเปรียบเทียบปริมาตรของโครงสร้างต่าง ๆ ในอวัยวะ ซึ่งผลการวิจัยพบว่าการสร้างภาพสามมิติแสดงโครงสร้างได้ใกล้เคียงกับโครงสร้างจริงในตัวอ่อน และสามารถจำแนกความแตกต่างของโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อ ดังนั้นการศึกษาโดยการสร้างภาพสามมิติสามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน

คำสำคัญ : ภาพสามมิติ; อวัยวะ; ตัวอ่อนไก่

Abstract

Development of organs in organisms has been studied for long time. They have been studied by both serial sections and whole-mount under microscopic investigation to demonstrate the developmental processes in either micrographs or drawings. Although the developmental processes are well defined, they remain ignoring the dimension. Nowadays, the technology called 3D reconstruction increases the capability of embryological studies including the third dimension (z-axis or thickness) and volumetric data to visualize the developmental mechanism in natural environment. This research aims to apply the 3D reconstruction and morphometry to illustrate the normal development of pelvic region in 9-day chick embryo. The serial sections were imported and analyzed histologically and volumetrically in Amira 3D software. The 3D model was further remodelled in Cinema 4D program to decrease sectioning noise which disrupt the perspective. The 3D model from the reconstruction showed that it can rotate to visualize the topography of the pelvic structures and compare the volume of organs in pelvic region. The main results found that a created 3D image reconstruction can visualize the pelvic region structure close to the real embryo structure. Moreover, the differentiation of the pelvic region structure at the tissue level can be illustrated by a created 3D image reconstruction. Thus, this created 3D image reconstruction is able to be used as a tool for demonstrating the morphological changes in embryonic development.

Keywords: three-dimensional image; pelvic region; chick embryo

1. บทนำ

โดยทั่วไปการศึกษากการเจริญของตัวอ่อน (embryo) นิยมใช้สไลด์ตัดต่อเนื่องของตัวอ่อนทั้งตัว

(serial section) และตัวอ่อนทั้งตัว (whole mount) แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ภาพที่นำมาศึกษามีลักษณะเป็นภาพสองมิติ ในการทำ

serial section นั้นภาพที่ได้สามารถนำมาใช้ศึกษาโครงสร้างภายในของแต่ละบริเวณในระดับจุลกายวิภาค แต่วิธีนี้จะไม่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างเชิงสามมิติ (topological anatomy) ทำให้ในบางครั้งไม่สามารถตีความการเจริญของโครงสร้างซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างแวดล้อม ส่วนในกรณีของการทำ whole mount เป็นการศึกษารูปร่างและลักษณะภายนอกของตัวอ่อน โดยภาพที่ได้จะเห็นเฉพาะโครงสร้างรอบตัวอ่อนไม่สามารถเห็นโครงสร้างภายในทั้งในระดับมองด้วยตาเปล่าและระดับจุลกายวิภาค เนื่องจากตัวอ่อนที่ศึกษาด้วยวิธีดังกล่าวนี้ไม่ได้ตัดต่อเนื้อจึงยังคงมีผิวหนังของตัวอ่อนหุ้มโครงสร้างภายใน อีกทั้งยังมีความหนาทั้งตัวของตัวอ่อน จึงต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ดังนั้นการนำข้อดีของวิธีการทั้งสองมาประยุกต์รวมกันจึงเป็นแนวทางที่ดีในการศึกษาทั้งโครงสร้างภายนอกและโครงสร้างระดับจุลกายวิภาค ปัจจุบันเทคโนโลยีทางคอมพิวเตอร์สามารถนำมาประยุกต์เพื่อรวมการศึกษาทั้ง 2 วิธี เข้าด้วยกัน ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยที่ศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ของตัวอ่อนโดยใช้ serial section ในการสร้างภาพสามมิติ โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างต่าง ๆ ในตัวอ่อนมนุษย์ เพื่อระบุชื่อของโครงสร้างก่อนที่โปรแกรมคอมพิวเตอร์จะประมวลผลออกมาเป็นภาพสามมิติ [1,2]

การเจริญของตัวอ่อนไก่โดยทั่วไปจะใช้เป็นตัวแทนเพื่อศึกษาการเจริญของโครงสร้างต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของมนุษย์ ดังนั้นจึงนิยมศึกษากันเฉพาะการเจริญตั้งแต่การปฏิสนธิจนถึงอายุ 4 วัน เป็นส่วนใหญ่ เพราะเป็นช่วงที่การเจริญของตัวอ่อนไก่มีการเจริญของโครงสร้างต่าง ๆ คล้ายคลึงกับการเจริญของตัวอ่อนมนุษย์ เป็นผลทำให้การเจริญหลังจากช่วง 4 วันหลังการปฏิสนธิยังไม่ได้มีการศึกษาเท่าที่ควร เนื่องจากตัวอ่อนที่ใช้นิยมใช้เป็นตัวแทนการ

เจริญของมนุษย์ คือ ตัวอ่อนหนู ทำให้ภาพแสดงโครงสร้างต่าง ๆ ของตัวอ่อนไก่มีข้อมูลไม่เพียงพอ [3]

ปัจจุบันมีงานวิจัยรายงานผลของสารในถั่วเหลือง เช่น genistein มีผลต่อกลไกการเจริญของระบบสืบพันธุ์ในตัวอ่อนไก่ [4] ซึ่งมีการเจริญอยู่ในบริเวณอุ้งเชิงกรานของไก่ โดยโครงสร้างของระบบสืบพันธุ์มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างอื่น ๆ เช่น ท่อทางเดินปัสสาวะ (urinary tract) และท่อทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) ดังนั้นการศึกษากการเจริญของบริเวณอุ้งเชิงกรานในตัวอ่อนไก่ จึงเป็นการศึกษาเพื่อให้เข้าใจโครงสร้างปกติในบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่ เพื่อเป็นต้นแบบเปรียบเทียบกับโครงสร้างเมื่อตัวอ่อนได้รับสารที่มีผลต่อการเจริญต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

ถ่ายภาพแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน ซึ่งเทียบเท่ากับสัปดาห์ที่ 8 ของตัวอ่อนมนุษย์จากชุดสะสมของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (โดยความอนุเคราะห์จาก กลุ่มวิจัยของ รองศาสตราจารย์ ดร.วัฒนา วีระชาติยานุกูล และรองศาสตราจารย์ ดร.สมลักษณ์ อสูวพงษ์พัฒนา) ด้วยเครื่อง slide scanner (Olympus VS120) ที่กำลังขยายใกล้วัตถุ 10 เท่า ซึ่งจะได้ข้อมูลออกมาในประเภท vsi แล้วแปลงไฟล์ข้อมูลให้เป็นประเภทภาพ jpeg ในลักษณะภาพขาวดำ ลดความละเอียดของภาพ และปรับให้ภาพมีขนาดเท่ากัน ตรวจสอบลำดับของเนื้อเยื่อและใส่ตัวเลขลงไปหน้าไฟล์ข้อมูลแต่ละไฟล์ เมื่อตรวจสอบแล้วนำไฟล์ข้อมูลทั้งหมดของเนื้อเยื่อตัวอ่อนเข้าไปในโปรแกรม Amira 3D เมื่อนำเข้าไฟล์แล้วจึงกำหนดค่าขนาดปริมาตรสามมิติ โดยค่า x และ y คือ ขนาดพื้นที่ของกล้องจุลทรรศน์ (microscopic field) ซึ่งมีค่าขึ้นอยู่กับกำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุที่

ใช้ และค่า z คือ ค่าความหนาของเนื้อเยื่อที่นำมาถ่ายภาพ จากนั้นปรับตำแหน่งของภาพเนื้อเยื่อแต่ละภาพให้อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริง โดยเริ่มแรกปรับตำแหน่งอัตโนมัติโดยใช้ชุดคำสั่ง least squares ซึ่งเป็นชุดคำสั่งที่อยู่ภายในโปรแกรม ชุดคำสั่งนี้จะปรับตำแหน่งโดยดูความแตกต่างของระดับสีเทาบนแต่ละภาพ เพื่อให้ใกล้เคียงกับภาพที่อยู่ติดกันมากที่สุด เมื่อปรับตำแหน่งอัตโนมัติเรียบร้อยแล้ว จึงปรับตำแหน่งด้วยมือ เพื่อเพิ่มความถูกต้องของตำแหน่งให้มากที่สุด โดยปรับ พลิก หรือเลื่อนตำแหน่งของแต่ละภาพให้สัมพันธ์กับภาพข้างเคียง โดยใช้เมาส์ ในการควบคุมการปรับตำแหน่ง ตรวจสอบความถูกต้องของความโค้งงอของตัวอ่อนโดยใช้ภาพถ่ายตัวอ่อนก่อนการตัดที่มีอายุเทียบเท่ากับตัวอย่างที่ศึกษา แล้วเลือกโหมด image segmentation เพื่อกำหนดขอบเขตของแต่ละโครงสร้างจากการวิเคราะห์จุดกายวิภาคและเปรียบเทียบเนื้อเยื่อข้างเคียงเพื่อกำหนดขอบเขตโครงสร้างให้ชัดเจน แล้วแสดงผลภาพสามมิติขึ้นมาด้านข้าง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องโดยการเปรียบเทียบจากแหล่งอ้างอิง เมื่อตรวจสอบความถูกต้องเสร็จสิ้น จึงส่งออกข้อมูลสามมิติในนามสกุล vrmf เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการปรับแต่งภาพสามมิติให้มีความเรียบมากขึ้น โดยใช้โปรแกรม Cinema 4D ในส่วนของการวิเคราะห์เชิงปริมาตรจะศึกษาโดยใช้ชุดคำสั่ง Material Statistics ในโปรแกรม Amira 3D และนำมาสร้างกราฟด้วยโปรแกรม Microsoft Excel [5]

3. ผลการวิจัย

3.1 ลักษณะโครงสร้างบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน

บทความนี้นำเสนอผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน โดยการสร้างภาพสามมิติจากภาพเนื้อเยื่อของตัวอ่อน

ไก่ที่ตัดอย่างต่อเนื่องโดยเปรียบเทียบโครงสร้างต่าง ๆ กับการระบุโครงสร้างใน Atlas of Chick Development [6] ดังนี้

3.1.1 ลักษณะโครงสร้างของ cloaca

การศึกษาริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน โดยการสร้างภาพสามมิติจากภาพเนื้อเยื่อของตัวอ่อนไก่ที่ตัดอย่างต่อเนื่องพบว่า cloaca (CL) ในรูปที่ 1-4 มีลักษณะเป็นท่อที่บุด้วยเยื่อบุผิวหลายชั้น (stratified epithelium) ล้อมรอบด้วย mesenchyme ที่มีการกระจายตัวหนาแน่นหรือหลวมขึ้นกับบริเวณที่ศึกษา เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อตัวอ่อนไก่อย่างต่อเนื่องจากด้าน anterior ไปยังด้าน posterior จะพบว่าหน้าตัดของ cloaca มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามแนวการตัดตั้งแต่รูปคล้ายดาว (รูปที่ 1A) ด้าน anterior รูปครึ่งวงรี (รูปที่ 1B) และกลายเป็นรูปหลายแฉก (รูปที่ 1C) ด้าน posterior เมื่อพิจารณาภาพสามมิติของ cloaca (สีม่วง) ในรูปที่ 3 และ 4 พบว่า cloaca มีลักษณะคล้ายกับรูปทรงอานม้า เมื่อพิจารณาภาพสามมิติจากด้านข้าง (รูปที่ 4)

เมื่อพิจารณา cloaca ร่วมกับโครงสร้างโดยรอบ พบว่า cloaca มีโครงสร้างต่าง ๆ มาเปิดเข้าสู่ cloaca ในทิศทางต่าง ๆ ยกเว้นด้าน anterior ซึ่งเป็นด้านที่สัมพันธ์กับบริเวณด้านนอกของตัวอ่อน เมื่อพิจารณาลักษณะทางจุดกายวิภาคและภาพสามมิติ ประกอบกันพบว่าด้าน cranial ของ cloaca จะสัมพันธ์กับ allantois ซึ่งสามารถแยกขอบเขตออกจากกันด้วยการพิจารณาที่เยื่อบุผิว โดย allantois บุด้วยเยื่อบุผิวหนึ่งชั้น (simple epithelium) ซึ่งต่างจาก cloaca ที่เป็น stratified epithelium (A สีฟ้า) ในรูปที่ 1A-1C, 3 และ 4 โครงสร้างที่ 2 ที่มาเปิดเข้าสู่ cloaca คือ ลำไส้ส่วนปลายซึ่งบุด้วยเยื่อบุผิวที่มีความหนามากกว่าและเปิดเข้า cloaca ด้าน posterior (ไม่แสดงภาพสามมิติ) โครงสร้างถัดมาเป็นโครงสร้างที่เป็นท่อของ

ระบบปัสสาวะและเพศ ได้แก่ mesonephric duct (WD), paramesonephric duct (MD) และ ureter (metanephric duct, U) ซึ่งท่อทั้ง 3 คู่ นี้เปิดเข้าสู่

บริเวณด้าน lateral ของ cloaca ประมาณกึ่งกลางของ cloaca (รูปที่ 1-4)

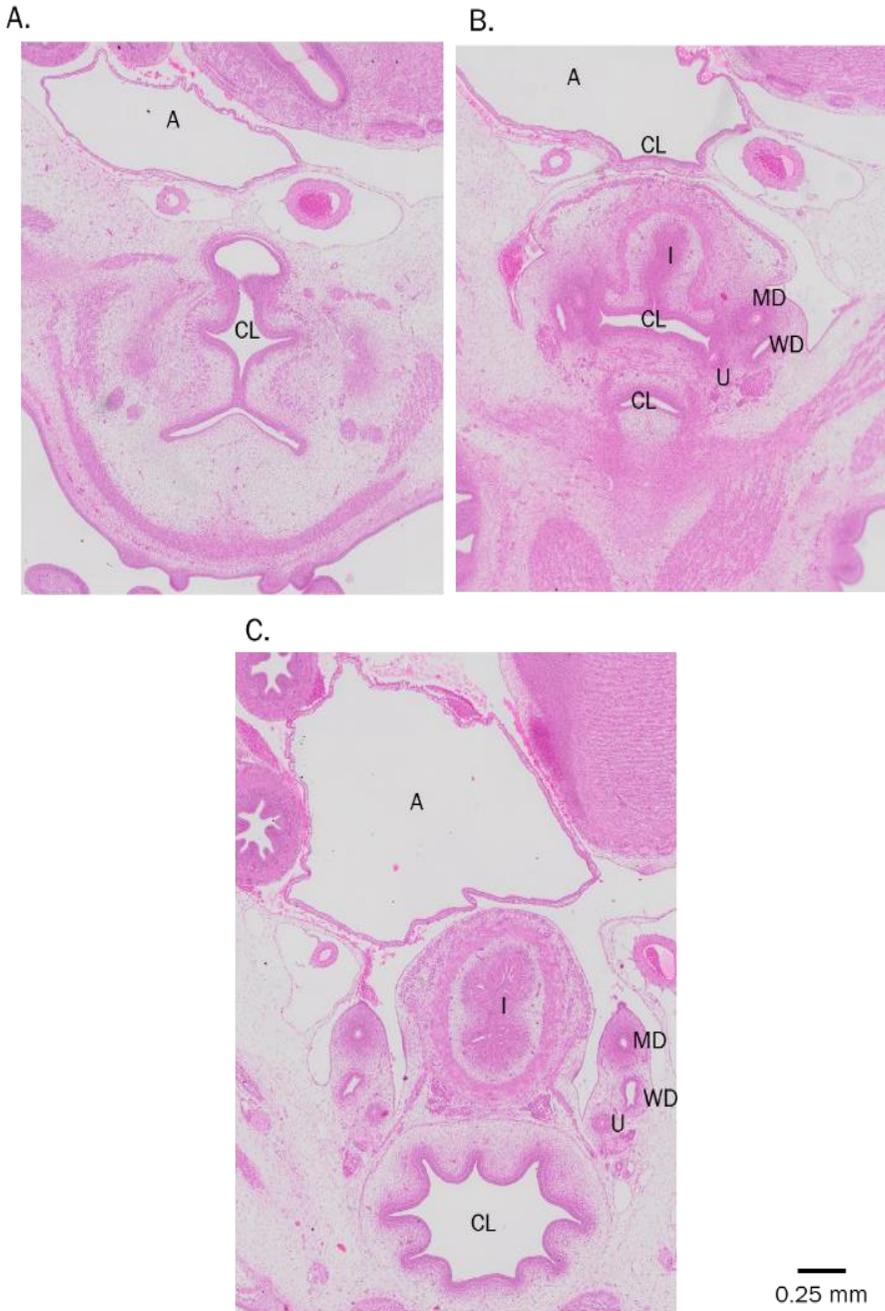


Figure 1 Histological sections of pelvic region in 9-day chick embryo (Abbreviation: A = allantois, CL = cloaca, I = intestine, MD = Mullerian duct, U = ureter and WD = Wolffian duct)

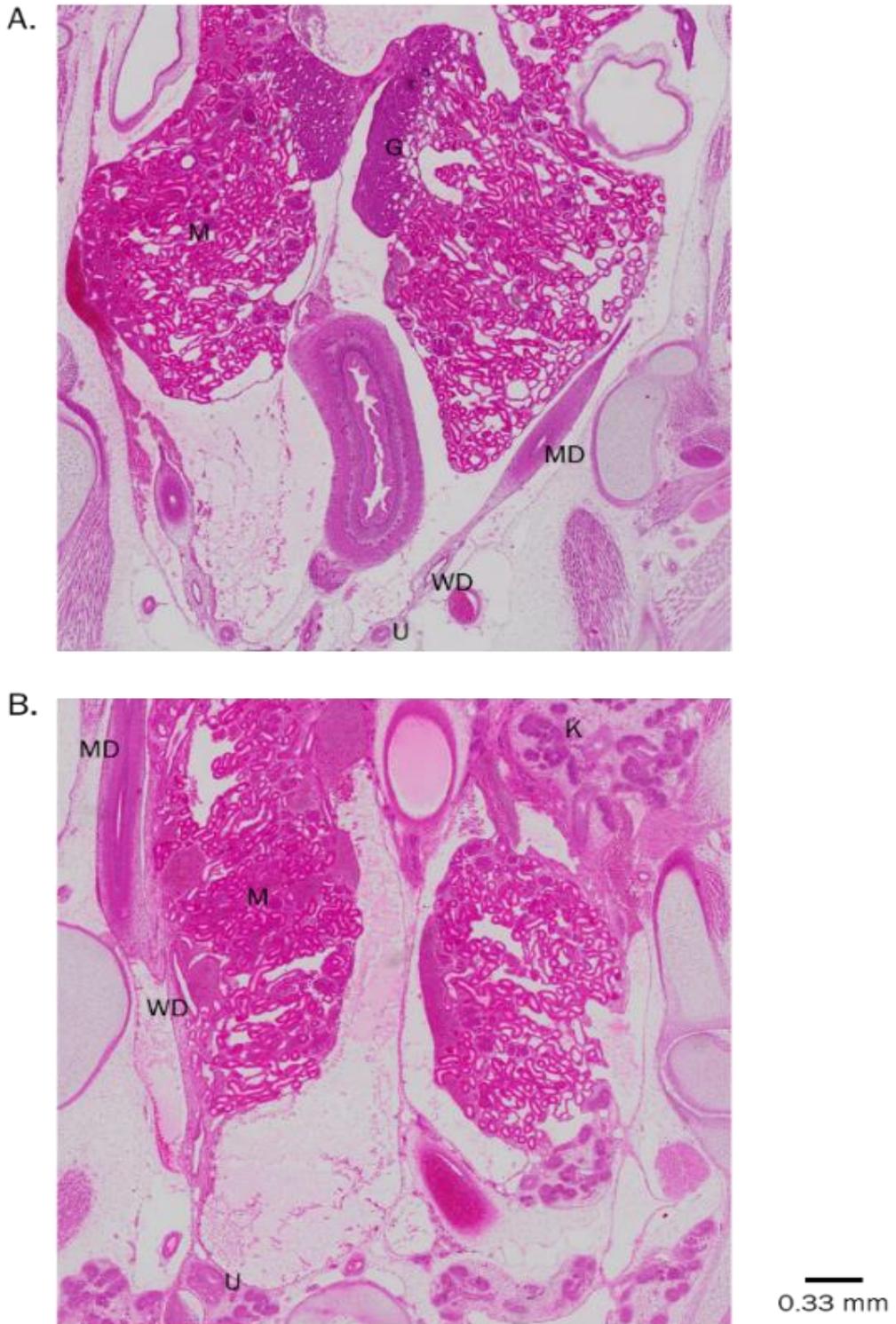
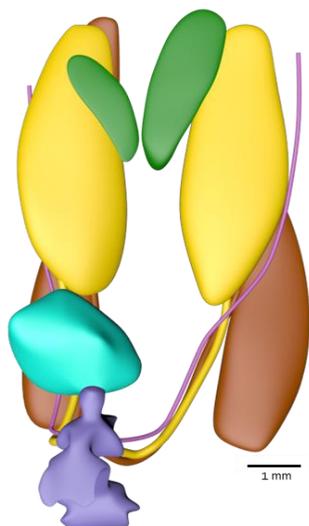
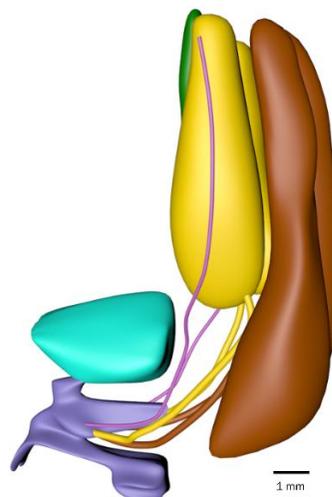


Figure 2 Histological sections of kidneys and their derivatives (Abbreviation: G = gonad, K = kidney, M = mesonephros, MD = Mullerian duct, U = ureter and WD = Wolffian duct)



Color code:		
■ allantois	■ cloaca	■ gonad
■ kidney	■ mesonephros	■ Müllerian duct
■ ureter	■ Wolffian duct	

Figure 3 Three-dimensional model of pelvic region in 9-day chick embryo (frontal view)



Color code:		
■ allantois	■ cloaca	■ gonad
■ kidney	■ mesonephros	■ Müllerian duct
■ ureter	■ Wolffian duct	

Figure 4 Three-dimensional model of pelvic region in 9-day chick embryo (side view)

3.1.2 ลักษณะโครงสร้างของ mesonephros และ gonad

เมื่อพิจารณาลักษณะทางจุลกายวิภาคพบว่า mesonephros (M) ประกอบด้วยท่อขนาดเล็ก (tubule) เป็นจำนวนมาก โดย tubule มีลักษณะเป็นวงกลมหรือวงรีขึ้นกับแนวการตัด รวมทั้งยังสามารถเห็น glomerulus (g) ในเนื้อเยื่อของท่อเป็นโครงสร้างทรงกลมล้อมรอบด้วย simple epithelium ในรูปที่ 2A-2B ซึ่งด้าน medial ของ mesonephros มีท่อ mesonephric duct (Wolffian duct) ที่ท่อออกมาจากตัว mesonephros ไปเปิดสู่บริเวณทาง lateral ของ cloaca ที่อยู่ caudal ต่อ mesonephros โดย mesonephric duct มีลักษณะเป็นท่อที่มีรูขนาดกว้าง बुด้วยเยื่อผิวบาง ๆ (WD สีนํ้าตาล) ในรูปที่ 1-4 ตัว

อ่อนระยะนี้ยังพบว่ามึท่อที่มีรูเล็กกว่า mesonephric duct แต่รอบ ๆ มี mesenchyme ที่เรียงตัวกันแน่นกว่าเรียกว่า paramesonephric duct (Müllerian duct) โดย paramesonephric duct วิ่งขนานกับ mesonephric duct ด้าน medial ในช่วงใกล้กับ cloaca แล้ววิ่งอ้อมมาขนานกับ mesonephric duct ด้าน lateral ในช่วงระดับ mesonephros (สีชมพู) ในรูปที่ 3 และ 4

เมื่อพิจารณาลักษณะทางจุลกายวิภาคพบว่า gonad ติดสีเข้มกว่า mesonephros และมีการกระจายตัวของเซลล์หนาแน่นกว่าใน mesonephros โดย gonad (G) จะวางตัวอยู่ด้าน medial ต่อ mesonephros และ anterior ต่อ aorta (Ao) ในรูปที่ 2A โดยเมื่อพิจารณาภาพสามมิติจะพบว่า gonad

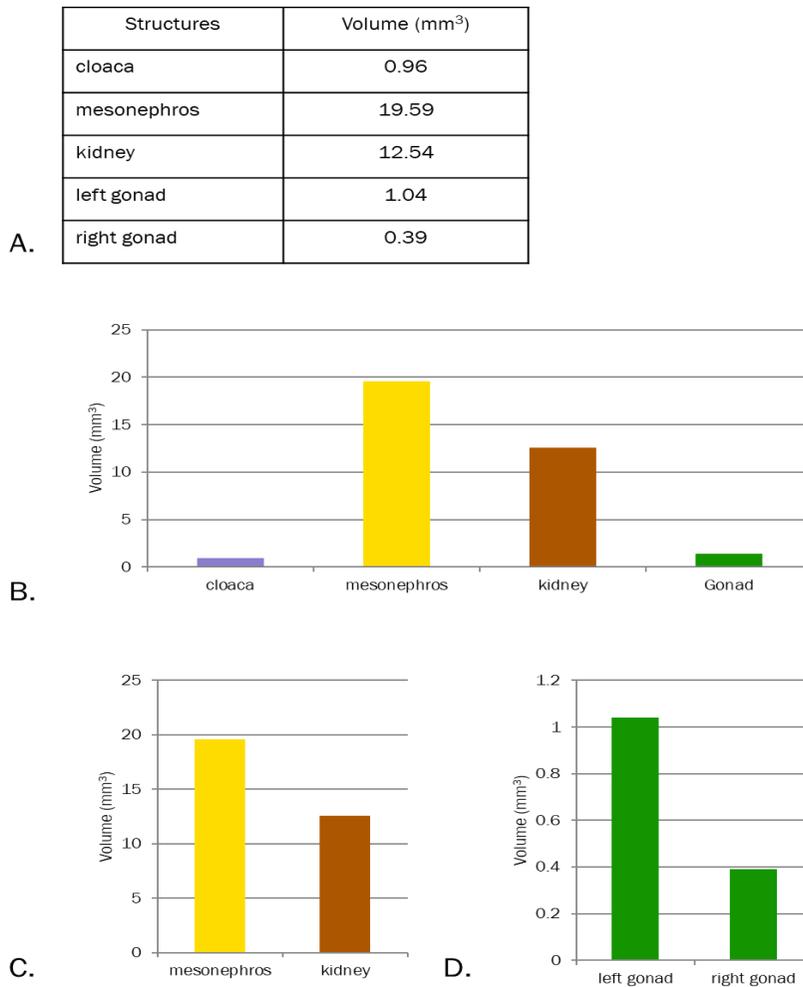


Figure 5 Quantitative analyses of pelvic region in 9-day chick embryo. Panel A shows the raw volumes of the pelvic structures. Panels B-D show comparisons among pelvic structures.

ด้านขวามีขนาดเล็กกว่าด้านซ้าย

3.1.3 ลักษณะโครงสร้างของ kidney (metanephros)

เมื่อพิจารณาลักษณะทางจุลกายวิภาคพบว่า metanephros ประกอบด้วยท่อที่มีหน้าตัดโค้ง เช่น ตัว U ซึ่งมี mesenchyme ที่มีการรวมกันตัวกัน หลวม ๆ ล้อมรอบตัว tubule (K สีน้ำตาล) ในรูปที่ 2B, 3 และ 4 นอกจากนี้ยังพบว่ามี ureter ซึ่งปลายด้านหนึ่งเปิดเข้าสู่ด้าน lateral ของ cloaca และอีก

ด้านสัมพันธ์กับ kidney โดยเข้า kidney ด้าน medial ของ kidney (รูปที่ 3 และ 4) ซึ่งลักษณะทางจุลกายวิภาคของ ureter มีรูขนาดเล็กแต่ล้อมรอบด้วยเยื่อผนังที่หนากว่าท่ออื่น ๆ ที่วิ่งใกล้ ๆ กัน และอยู่ในบริเวณที่เป็น mesenchyme ที่มีการเรียงตัวแบบหลวม (รูปที่ 1 และ 2)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาตรจากภาพสามมิติ

การสร้างภาพสามมิติโดยการระบุขอบเขตของโครงสร้างต่าง ๆ ทำให้สามารถคำนวณปริมาตร

ของโครงสร้างต่าง ๆ จากการคำนวณ ซึ่งการศึกษาพบว่า

3.2.1 โครงสร้างของไตทั้ง mesonephros และ metanephros มีปริมาตรประมาณมากกว่า 10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งปริมาตรของ cloaca และ gonad มีปริมาตรประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (รูปที่ 5A และ 5B)

3.2.2 เมื่อเปรียบเทียบไตชุดที่ 2 (mesonephros) และชุดที่ 3 (metanephros) พบว่า mesonephros มีขนาดใหญ่กว่า metanephros ในตัวอ่อนระยะนี้ (รูปที่ 5C)

เมื่อแยก gonad ออกเป็นข้างซ้ายและขวา พบว่าปริมาตรของ gonad ด้านซ้ายมากกว่าด้านขวา ประมาณ 2 เท่า แสดงว่าด้านซ้ายมีขนาดใหญ่กว่าทางด้านขวาในตัวอ่อนระยะนี้ (รูปที่ 5D)

4. วิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาการเจริญโดยใช้การสร้างภาพสามมิติ

โดยทั่วไปเป็นที่ทราบกันว่าการเจริญของตัวอ่อนมีความเข้าใจที่ไม่ชัดเจน การศึกษาครั้งนี้จึงได้แสดงภาพกระบวนการเจริญพัฒนาที่เป็นสามมิติ เพื่อให้ภาพการเจริญมีความสมจริงมากขึ้น งานวิจัยครั้งนี้ได้นำเทคนิคการสร้างภาพสามมิติมาต่อยอดจากการตัดอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นวิธีการศึกษามาตรฐาน โดยเลือกใช้การสร้างภาพสามมิติที่ได้จากการนำภาพเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่องมาเรียงต่อกัน แทนการสร้างภาพสามมิติจากภาพตัดต่อเนื่องด้วยแสง เนื่องจากต้องการสร้างภาพสามมิติเพื่อขยายองค์ความรู้ด้านการเจริญของตัวอ่อนเชิงโครงสร้างมากกว่าเชิงโมเลกุล เพราะการสร้างภาพสามมิติวิธีนี้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างต่าง ๆ ได้แก่ kidney และ gonad เป็นต้น โดยการใช้การบังชี้และระบุบริเวณต่าง ๆ ด้วยการใช้ลักษณะทาง

จุลกายวิภาคเป็นเกณฑ์ ทำให้สามารถบังชี้ขอบเขตเชิงโครงสร้างได้โดยไม่ต้องใช้ตัวบ่งชี้จำเพาะอื่น ๆ เช่น antibody

นอกจากนี้ในปัจจุบันกระบวนการสร้างภาพสามมิตินอกจากสามารถประกอบภาพสองมิติให้กลับมาเป็นภาพสามมิติแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาตรได้อีกด้วย โดยการวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบการวิเคราะห์เชิงปริมาตรเพื่อแสดงความแตกต่างของปริมาตรในโครงสร้างต่าง ๆ โดยหลักการคำนวณนี้เกิดจากการคำนวณจากพื้นที่ที่ระบุลงในภาพสองมิติแต่ละชิ้นมาแสดงเป็นปริมาตร ซึ่งกระบวนการเช่นนี้สามารถรวมกับภาพเชิงโครงสร้างเพื่อให้ตอบโจทย์การเจริญพัฒนาได้ดีขึ้น เช่น งานวิจัยของ de Bakker ในวารสาร Science [2] ที่ศึกษาโดยใช้ปริมาตรวิเคราะห์ให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างต่าง ๆ ในระยะเวลาต่อเนื่อง หรืองานวิจัยของ Mekonen [7] ที่วิเคราะห์ของโครงสร้างเพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของกระดูกสันหลังบริเวณต่าง ๆ ทำให้เห็นทิศทางการเปลี่ยนแปลงในปริภูมิสามมิติ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงประยุกต์กระบวนการวิเคราะห์ข้างต้นเพื่อศึกษากระบวนการเจริญพัฒนาของทวารร่วมและระบบปัสสาวะสืบพันธุ์ในบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน ซึ่งพบว่าตัวอ่อนไก่มีการเจริญของต่อมสืบพันธุ์แบบอสมมาตร คือ ด้านซ้ายมีปริมาตรที่มากกว่าด้านขวา สอดคล้องกับการศึกษาของ Intarapat [8] ที่แสดงให้เห็นการเจริญพัฒนาแบบอสมมาตรของต่อมสืบพันธุ์ในนกกระทาญี่ปุ่น คำอธิบายข้างต้นพบว่าการสร้างภาพสามมิติสามารถตอบโจทย์การศึกษาการเจริญพัฒนามากขึ้นกว่าเทคนิคการตัดต่อเนื่องเพียงอย่างเดียว

4.2 การสร้างภาพสามมิติโดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

ปัจจุบันการสร้างภาพสามมิติเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในแง่ของการเพิ่มความเข้าใจใน

ลักษณะทางสัณฐานของโครงสร้างต่าง ๆ ซึ่งการศึกษา ด้านนี้มีการนำโปรแกรมมาใช้สร้างภาพสามมิติที่มีความหลากหลายเป็นอย่างมาก โดยภาพรวมการใช้โปรแกรมสร้างภาพสามมิติแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การระบุบริเวณต่าง ๆ เพื่อให้เกิดเป็นภาพสามมิติ (segmentation) และการทำให้ภาพสามมิติมีความเรียบ (smoothing) เพื่อลดสิ่งรบกวน (noise) โดยรอบโครงสร้างที่เราสนใจ ในขั้นตอน segmentation จากภาพตัดต่อเนื่องทั้งแบบเชิงกลและเชิงแสงจะมีโปรแกรมที่นิยมใช้หลัก ๆ อยู่ 2 โปรแกรม คือ Amira 3D และ Imaris ในส่วนของโปรแกรม Amira 3D เป็นโปรแกรมที่สามารถระบุบริเวณที่สนใจแบบอัตโนมัติหรือแบบกำหนดเองขึ้นกับบริเวณที่สนใจและการย้อมสี เนื่องจากการเลือกบริเวณอัตโนมัติเกิดจากการคำนวณค่าความแตกต่างของสี (contrast) เพื่อแบ่งแยกบริเวณที่เลือกและไม่เลือก โดยโปรแกรมนี้นิยมใช้กับภาพที่ได้จากการตัดต่อเนื่องเชิงกล เนื่องจากโปรแกรมนี้ออกแบบมาให้มีความเหมาะสมกับการระบุบริเวณที่สนใจด้วยตัวเอง โดยการระบุบริเวณต่าง ๆ ให้เหมาะสมและแม่นยำเกิดจากการวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคเพื่อระบุขอบเขตบริเวณที่สนใจ ซึ่งในจุดนี้อาจเป็นข้อเสียได้อีกทางหนึ่ง เนื่องจากต้องใช้ความสามารถในการจำแนกเนื้อเยื่อต่าง ๆ และความแม่นยำของผู้วิเคราะห์ อันเป็นปัจจัยนำไปสู่การตีความที่ต่างกันได้ [1,2,5,7] ในส่วนของโปรแกรม Imaris ค่อนข้างมีความเหมาะสมกับการสร้างภาพสามมิติจากภาพที่ตัดต่อเนื่องด้วยแสงมากกว่า เนื่องจากมีคำสั่งที่สะดวกกว่าในการแบ่งบริเวณต่าง ๆ ด้วยสี เช่น เมื่อสร้างภาพตัดต่อเนื่องโดยใช้แสง ซึ่งมีการไปกระตุ้นให้เกิดการเรืองแสงของตัวจับจำเพาะที่ใส่ลงไป ทำให้บริเวณที่สนใจเกิดสีที่ต่างกัน แล้วเมื่อนำเข้าโปรแกรม Imaris สามารถเลือกช่องสีเพื่อสร้างเป็นภาพสามมิติในความเป็นจริงโปรแกรม Imaris ก็ยังสามารถทำภาพ

สามมิติจากการตัดเชิงกล แต่ในแง่คำสั่งที่ใช้เหมาะสมสำหรับแบบที่สร้างภาพสามมิติอัตโนมัติมากกว่าแบบกำหนดเอง ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงเมื่อใช้โปรแกรม Imaris คือ การตัดต่ออย่างต่อเนื่องด้วยแสงจำเป็นต้องทำให้ตัวอย่างใสจนแสงสามารถทะลุได้ และจำเป็นต้องมีตัวจับจำเพาะสำหรับบริเวณที่ต้องการอีก [9] ดังนั้น การศึกษาต้องคำนึงถึงความละเอียดของภาพสามมิติที่ต้องการ เพื่อให้เตรียมตัวอย่างและเลือกโปรแกรมสำหรับสร้างภาพสามมิติได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ เพื่อให้ภาพสามมิติสามารถแสดงโครงสร้างอย่างชัดเจนมากขึ้น จึงมีการใช้โปรแกรมเข้ามาช่วยปรับให้ภาพที่ได้มีสิ่งรบกวนลดลง เช่น Cinema 4D, AutoCAD, 3D coat, Blender และ 3D Studiomax [5,10,11] โดยโปรแกรมที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ คือ Cinema 4D เป็นโปรแกรมที่นิยมใช้ทางการออกแบบกราฟิก จึงมีชุดคำสั่งมากมายสำหรับการสร้างภาพสามมิติขึ้นมาใหม่ โดยมีภาพสามมิติเดิมเป็นต้นแบบ ทำให้มีความหลากหลายในการสร้างภาพสามมิติ แต่มีข้อเสีย คือ การสร้างภาพสามมิติขึ้นมาใหม่ต้องใช้เวลาพอสมควร เพื่อให้มีความสวยงามและยังคงไว้ซึ่งรายละเอียดของโครงสร้างที่ต้องการศึกษา บางโปรแกรม เช่น 3D coat [10,11] ต่างจากโปรแกรมทางกราฟิก คือ สามารถลดทอนสิ่งรบกวนอัตโนมัติ แต่ข้อเสีย คือ บางกรณีมีการลดทอนหรือเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างที่แท้จริงของโครงสร้างสามมิติ ดังนั้นการเลือกใช้โปรแกรมทั้ง 2 ขั้นตอน ต้องพิจารณาลักษณะของโครงสร้างที่จะศึกษา เพื่อให้มีการเลือกใช้ที่เหมาะสมและได้คุณภาพสูงที่สุดสำหรับการสร้างภาพสามมิติ

4.3 การประยุกต์ใช้ภาพสามมิติ

ปัจจุบันเทคโนโลยีเกี่ยวกับภาพสามมิติมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 แนวทางหลัก ๆ คือ การนำภาพสามมิติไปใช้ทางการศึกษาและนำไปใช้ในการรักษา ภาพสามมิติที่ได้ข้างต้นสามารถ

นำไปพิมพ์ให้เป็นโมเดลสามมิติ เพราะปัจจุบันมีการพิมพ์โมเดลสามมิติของโครงสร้างต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายโครงสร้างที่มีความซับซ้อนและยากที่จะเข้าใจ [12,13] การสร้างภาพสามมิตินี้สามารถต่อยอดนำไปพิมพ์เป็นโมเดลให้เป็นโมเดลใช้สอนทางสัตวแพทยศาสตร์ หรือปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ภาพสามมิติในการพิมพ์โมเดลสามมิติเพื่อวางแผนการทำหัตถการต่าง ๆ ซึ่งนิยมทำในมนุษย์ [14-16] โดยความเป็นจริงเทคโนโลยีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์เพื่อให้เข้าใจโครงสร้างปกติในบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่ เพื่อเป็นต้นแบบเปรียบเทียบโครงสร้างเมื่อตัวอ่อนได้รับสารที่มีผลต่อการเจริญ

5. สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเจริญโดยใช้การสร้างภาพสามมิติในบริเวณอุ้งเชิงกรานของตัวอ่อนไก่อายุ 9 วัน พบว่าการสร้างภาพสามมิติจากภาพสองมิติของเนื้อเยื่อตัดต่อเนื่อง มีข้อดี คือ สามารถแสดงลักษณะรูปร่างของโครงสร้างต่าง ๆ ในอุ้งเชิงกราน รวมทั้งความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่าง ๆ ซึ่งไม่สามารถมองเห็นจากภาพสองมิติ และการสร้างภาพสามมิตินี้ยังเป็นการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางจุลกายวิภาคเป็นเกณฑ์ในการระบุโครงสร้าง ทำให้ภาพสามมิติที่ได้มีรายละเอียดมากกว่าการศึกษาด้วยตัวอ่อนทั้งตัว และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วย แต่เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพียงระยะเดียว คือ 9 วัน ดังนั้นเพื่อให้ภาพการเจริญของตัวอ่อนไก่บริเวณอุ้งเชิงกรานมีความสมบูรณ์มากขึ้น ทั้งในเชิงโครงสร้างและเชิงปริมาณ จึงควรที่จะขยายระยะการศึกษาทั้งตัวอ่อนที่อายุมากขึ้นและน้อยลง เนื่องจากการขยายการศึกษาออกไปจะทำให้สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงทั้งเชิงโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา การเปลี่ยนแปลงในเชิง

ปริมาตร และระยะทางจากโครงสร้างต่าง ๆ ตามเวลา ซึ่งสามารถนำไปสู่คำอธิบายกลไกการเจริญในบริเวณอุ้งเชิงกรานอย่างชัดเจนมากขึ้น

6. References

- [1] 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: 113-25.
- [2] de Bakker, B.S., de Jong, K.H., Hagooort, 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: aag0053.
- [3] Arey, L.B., 1974, *Developmental Anatomy: A Textbook and Laboratory Manual of Embryology*, 7th ED., Saunders, Inc., Philadelphia, 695 p.
- [4] Boonnoon, N. , Chotyakul, N. and Kruepunga, N., 2016, Effects of soybean phytoestrogens on the development of avian reproductive system, *Panyapiwat J.* 8: 272-283.
- [5] Kruepunga, N., Hikspoors, J. P., Mekonen, H. K. , Mommen, G. M. , Meemon, K. , Weerachatyanukul, W., Asuvapongpatana, S., Köhler, SE. and Lamer, W.H., 2018, The development of the cloaca in the human embryo, *J. Anat.* 234: 724-739.

- [6] Bellairs, R. and Osmond, M., 2014, *The Atlas of Chick Development*, 3rd Ed., Academic Press, Oxford, 692 p.
- [7] Mekonen, H.K., Hikspoor, 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: 260-274.
- [8] Intarapat, S. and Stern, C.D., 2014, Left-right asymmetry in chicken embryonic gonads, *J. Poult. Sci.* 51: 352-358.
- [9] Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S.A., Collier, F., Giacobini, P. and Chédotal, A., 2017, Tridimensional visualization and analysis of early human development, *Cell* 169: 161-173.
- [10] Lukeneder A., 2012, Computed 3D visualisation of an extinct cephalopod using computer tomographs, *Comput. Geosci.* 45: 68-74.
- [11] Zilverschoon, M., Vincken, K.L. and Bleys, R.L., 2017, The virtual dissecting room: Creating highly detailed anatomy models for educational purposes, *J. Biomed. Inform.* 65: 58-75.
- [12] Javan, R., Herrin, D. and Tangestanipoor, A., 2016, Understanding spatially complex segmental and branch anatomy using 3D printing: Liver, lung, prostate, coronary arteries, and circle of willis, *Acad. Radiol.* 23: 1183-1189.
- [13] Paul, G.M., Rezaenia, A., Wen, P., Condoor, S., Parkar, N., King, W. and Korakianitis, T., 2018, Medical applications for 3D printing: Recent developments, *Missouri Med.* 115: 75-81.
- [14] AlAli, A.B., Griffin, M.F. and Butler, P.E., 2015, Medical applications for 3D printing: Recent developments, *Missouri Med.* 115: 75-81.
- [15] Marro, A., Bandukwala, T. and Mak, W., 2016, Three-dimensional printing and medical imaging: A review of the methods and applications, *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* 45: 2-9.
- [16] Cromeens, B.P., Ray, W.C., Hoehne, B., Abayneh, F., Adler, B. and Besner, G.E., 2017, Facilitating surgeon understanding of complex anatomy using a three-dimensional printed model, *J. Surg. Res.* 216: 18-25.