การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในเชื้อลูกไก่ขนาด 36 Somite โดยการย้อมสีทั้งตัว

(Micro anatomy study of the total mount of 36 somites chick embryo)

วรรณดา เกษตรสุวรรณ, สพ.บ.

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Abstract:

The purpose of this study was to investigate a technique on the total mount of 36 somite chick embryo for details possible microscopic study.

A total number of one hundred fertiled chicken eggs were incubated at 98–103°F for a period of 72 hours in order to obtain a complete growth of the 36 somite chick embryo. After this period, the total chick embryos were fixed in Bouin's fluid and mounted with Mayer's acid carmine stain. The results obtained gavc the very clear fine pictures with full development of 36 somites on the total mount of chick embryocs.

Several advanced microscopic structures occur very attractive. The cephalic flexure of the midbrain is sharp, more gradual cervical flexure has appeared in the neck region. The tail flexure also exists. Somites extend downward to this terminal flexure. Torsion is complete so well posterior to the level of the heart. Pair of wing buds and leg buds can be identified. The brain appears prominently and devides into several parts. The heart shows clear four divisions. Among the sense organs, the eye lies much further caudad than the ear.

คำนำ

การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะในตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่าง ๆ ระยะแรก มีความคล้ายคลึงกันมาก ตัวอ่อนของสัตว์ที่นิยมใช้ศึกษาทางคัพภะวิทยา (Development Anatomy or Embryology) คือ

๑. ตัวอ่อนของไก่ ตั้งแต่ระยะเริ่มกำเนิด จนถึงมีปล้องลำตัว (somite) ๒๗—๓๖ ปล้อง

๒. ตัวอ่อนของสุกร ขนาด ๖ ถึง ๑๕ มิลลิเมตร

การศึกษาการเจริญเติบโตของลูกอ่อน อาจศึกษาจากเอมบรีโอทั้งตัว (Total mount) และจากเอมบรีโอที่ได้ตัดเรียงลำดับอย่างถูกต้อง (Serial section) ตัวอ่อนของไก่ขนาด ๓๖ somite แสดงการเริ่มต้นของอวัยวะต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี การศึกษาครั้งนี้จึงใช้เอมบรีโอไก่ระยะ ๓๖ somite ในการศึกษาขั้นต้นโดยอาศัยการย้อมสีเอมบรีโอ และศึกษาส่วนประกอบต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทัศน์

วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้

ก. ศึกษาวิธีทำสไลด์ และการย้อมสีเอมบรีโอทั้งตัวขึ้นใช้เองเนื่องจากในระยะเริ่มงานสอนอุปกรณ์การศึกษาทางคัพภะวิทยาเหล่านี้ ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศในราคาสูง

ข. ศึกษาสภาพการเจริญเติบโตของเอมบรีโอไก่ระยะ ๓๖ ปล้อง

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

๑. การเตรียมเอมบรีโอ

ใช้ไข่ไก่มีเชื้อฟักในตู้ฟักไข่ อุณหภูมิ ๙๘—๑๐๓ องศาฟาเร็นไฮต์ กลับไข่วันละ ๑—๒ ครั้ง เพื่อไม่ให้เยื่อหุ้มตัวเอมบรีโอ (vitelline membrane) ติดเปลือกไข่ ฟักไข่เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมงจะได้เอมบรีโอไก่ที่มีขนาด ๓๖ ปล้อง

๒. การเปิดเปลือกไข่ เพื่อเอาเอมบรีโอออกมา

๒.๑ วางไข่ที่ฟักครบระยะตามต้องการแล้วลงบนฝ่ามือให้อยู่ในท่าเอนลาด เช่นเดียวกับที่ไข่อยู่ในตู้ฟักเพื่อให้ตัวเอมบรีย์โอลอยอยู่ด้านบนของไข่แดงเสมอ

๒.๒ ใช้กรรไกรปลายแหลมเจาะรูที่เปลือกไข่ด้านช่องอากาศ (air cell) เพื่อให้อากาศภายในไข่ผ่านออกมา ความดันของอากาศภายนอกและภายในไข่จะเท่ากัน ช่วยให้ไข่แดงไม่เคลื่อนในขณะที่จะตัดแยกเอมบรีย์โอออก ปลายกรรไกรเข้าไปขลิบ เลาะตัดเปลือกไข่ออกทีละน้อยโดยรอบตามแนวราบ

๒.๓ ค่อย ๆ ยกฝาส่วนบนของเปลือกไข่ออก จะเห็นตัวเอมบรีย์โอ ลอยอยู่ด้านบนของไข่แดง ใช้กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็กขลิบเยื่อ blastoderm รอบตัวเอมบรีย์โอแล้วใช้ช้อนแบน ๆ (Section lifter) ตักตัวเอมบรีย์โอขึ้นมาโดยให้มีไข่แดงติดมาได้น้อยที่สุด ล้างไข่แดงที่ติดมาออกจากตัวเอมบรีย์โอในน้ำเกลืออุ่นเล็กน้อย ใช้ปากคีบหยิบเยื่อ ammion ที่คลุมบนตัวเอมบรีย์โอออก แล้วใส่ลงแช่ในน้ำยาที่จะทำให้เอมบรีย์โอคงสภาพ (Fixative solution)

๓. การทำให้คงสภาพ (Fixation)

ตักเอมบรีย์โอที่ล้างสะอาดแล้วค่อย ๆ ลอยลงในน้ำยาที่จะทำให้เอมบรีย์โอคงสภาพ (Bouin's fluid) ให้น้ำยาซึมเข้าช้า ๆ ทีละน้อยเพื่อกันการหดตัวของเอมบรีย์โอ ต้องแช่ในน้ำยานี้ ตามกำหนดระยะเวลา ๒๔ ชั่วโมง

น้ำยาที่รักษาสภาพของเอมบรีย์โอ (Bouin's fluid) มีส่วนผสมดังต่อไปนี้

Saturated aqeous pieric acid	๗๕ ซี.ซี.
Formalin	๒๕ ซี.ซี.
Acetic acid	๕ ซี.ซี.

๔. การแยกเอา Picric acid ส่วนที่เกินออก

นำเอมบรีย์โอที่อืมตัวคงที่ (Fix) ดีแล้วแช่ในแอลกอฮอล์ ๗๐ เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนหลายครั้ง เพื่อให้ picric acid ส่วนเกินละลายออกหมดไป จะสังเกตได้จากสีเหลืองของ picric acid จางลงในน้ำยาแอลกอฮอล์ ขบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ ๗ วัน

๕. การทำสมบูรณ์แบบ (Total mount)

๕.๑ การย้อมสีทั้งตัว ด้วยสี Mayer's acid carmine Solution

๕.๑.๑ ก่อนย้อม นำเอมบรีย์โอมาตัดแต่ง (trim) เยื่อรอบตัวให้เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย

๕.๑.๒ สีที่ใช้ เตรียมตามวิธีของ Bensleys และเก็บไว้เป็น stock solution

ใช้สี Carmine ๔ กรัมละลายน้ำกลั่น ๑๕ ซี.ซี. เขย่าให้สีละลายมากที่สุด เติมแอลกอฮอล์ ๘๕ เปอร์เซ็นต์ ลงไป ๙๕ ซี.ซี. อุ่นน้ำยาใน water bath จนสีละลายหมด ยกลง หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ๓๐ หยด เขย่าให้ผสมกันทั่ว อุ่นต่อไปอีก ๓ นาที ยกลงและทิ้งไว้ให้เย็น แล้วหยดแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ๔ หยดเขย่าให้เข้ากัน สีที่เตรียมนี้ควรเตรียมก่อนใช้ ๑ สัปดาห์และกรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้ทุกครั้งเสมอไป

๕.๑.๓ นำเอมบรีย์โอที่เตรียมไว้ย้อมสีนาน ๒—๓ นาที เวลาที่ใช้แล้วแต่จะให้สีติดเข้มหรือจาง และย้ายลงในน้ำยาตามลำดับ ดังต่อไปนี้

แอลกอฮอล์	๗๐ เปอร์เซ็นต์	นาน	๕ วินาที	
แอลกอฮอล์	๘๕ เปอร์เซ็นต์	นาน	๕ วินาที	
แอลกอฮอล์	๙๕ เปอร์เซ็นต์	นาน	๕ วินาที	๒ ครั้ง
แอลกอฮอล์	๑๐๐ เปอร์เซ็นต์	นาน	๕ วินาที	๒ ครั้ง

๕.๑.๔ ย้ายตัวเอมบรีย์โอลงในภาชนะแก้วที่มีส่วนผสมของ Cedar wood oil และ absolute alcohol ๑ : ๑ เมื่อใส่เอมบรีย์โอลงไปตอนแรกเอมบรีย์โอจะไปนอนอยู่ที่แนวระหว่างชั้นทั้ง ๒ ทิ้งไว้จนเอมบรีย์โอจมลงชั้นล่าง จึงใช้ pipette หรือ dropper ดูดแอลกอฮอล์ชั้นบนออกให้หมด ตักเอมบรีย์โอขึ้น ย้ายลงใน Cedar wood oil อีก ๒ ครั้ง ครั้งละ ๒๔ ชั่วโมง หรือจนกว่าเอมบรีย์โอจะใส

๕.๑.๕ ล้าง Cedar wood otl ส่วนเกินออกจากเอมบรีย์โอด้วย chloroform นาน ๑—๒ วินาที ๒ ครั้ง

๕.๒ การจัดวางแอมบรีโอที่สำเร็จรูปแล้วบนสไลด์ (Mounting)

หยด Canada Balsum ที่ละลายค่อนข้างข้นลงบนสไลด์ที่สะอาด ๒—๓ หยด ตักตัวเอมบรีโอที่ย้อมสีแล้วจาก chloroform ค่อย ๆ วางบน Balsum ให้ส่วนหลัง (dorsal) ของเอมบรีโออยู่ด้านบนแล้วหยด Balsum เพิ่มเติมจนคลุมมิดเอมบรีโอ

ก่อนปิด cover slip นำเศษกระจกที่มีขนาดพอ ๆ กัน วางเรียงรอบตัวเอมบรีโอเพื่อรองรับ cover slip ไม่ให้เอียง เนื่องจากเอมบรีโอมีความหนาของส่วนต่าง ๆ ของลำตัวไม่เท่ากัน

๖. การตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์

วางสไลด์ที่ mount แล้วไว้ในที่สะอาดปราศจากฝุ่นละออง หรืออบไว้ในตู้ปรับอุณหภูมิ (oven) จนกว่า Balsum แห้งและแข็งตัว ตรวจดูลักษณะของเอมบรีโอจากกล้องจุลทัศน์ โดยใช้กำลังขยาย ๔ × และ ๑๐ ×

ผลการศึกษา

๑. การทดลองใช้ไข่ฟักทั้งหมด ๑๐๐ ฟอง แบ่งบางส่วนที่เชื้อลูกไก่เจริญดีมาทำการย้อมสีทั้งตัวจำนวน ๓๐ ตัว

ไข่ฟักทั้งหมด (ฟอง)	ไข่ไม่มีเชื้อ	ได้เชื้อลูกไก่ระยะฟัก ๘๒ ชั่วโมง	ย้อมสีทั้งตัว	preserve ในแอลกอฮอล์ ๗๐ เปอร์เซ็นต์
๑๐๐	๓๖	๖๔	๓๐	๓๔

ตารางที่ ๑ จำนวนไข่ที่ทดลอง

๒. การย้อมสีเอมบรีย์โอทั้งตัวติดสีแดงสดใส เมื่อย้อมในระยะเวลา ๒—๓ นาที

ผล / เวลาที่ใช้ในการย้อมสี	มากกว่า ๓ นาที	๓ นาที	๒ นาที	๑ นาที	น้อยกว่า ๑ นาที
	ติดสีแดงเข้ม	ติดสีแดงสดใส ชัดเจนดี	ติดสีแดง ดี	ติดสี จาง	ไม่ติดสี
จำนวนเชื้อลูกไก่ที่ย้อมสีทั้งตัว (๓๐)	๓	๑๓	๙	๓	๒

ตารางที่ ๒ ผลการย้อมสีเชื้อลูกไก่ขนาด ๓๖ ปล้อง ด้วยสี Mayer's acid carmine

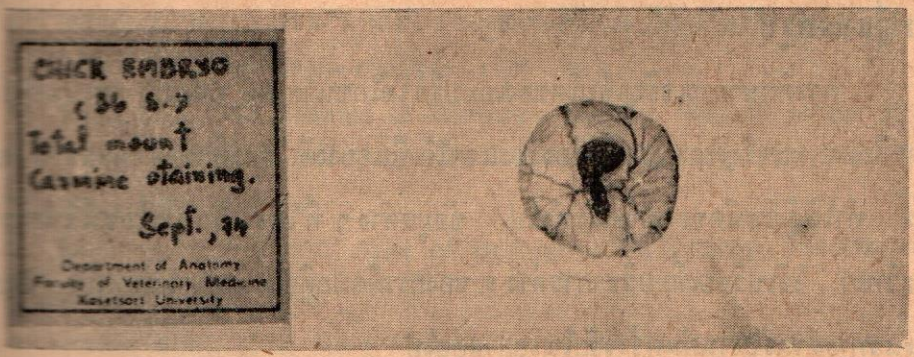
๓. การศึกษาทางกล้องจุลทัศน์ เนื่องจากเอมบีร์โอมีขนาดเล็กมาก การศึกษาลักษณะภายนอกจำเป็นต้องศึกษาโดยกล้องจุลทัศน์ ดังตารางที่ ๓

ตารางที่ ๓ การเจริญเติบโตของเอมบรีย์โอไก่ขนาด ๓๖ somite ย้อมสีทั้งตัวดูจากกล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย ๑๐ × และ ๔ ×

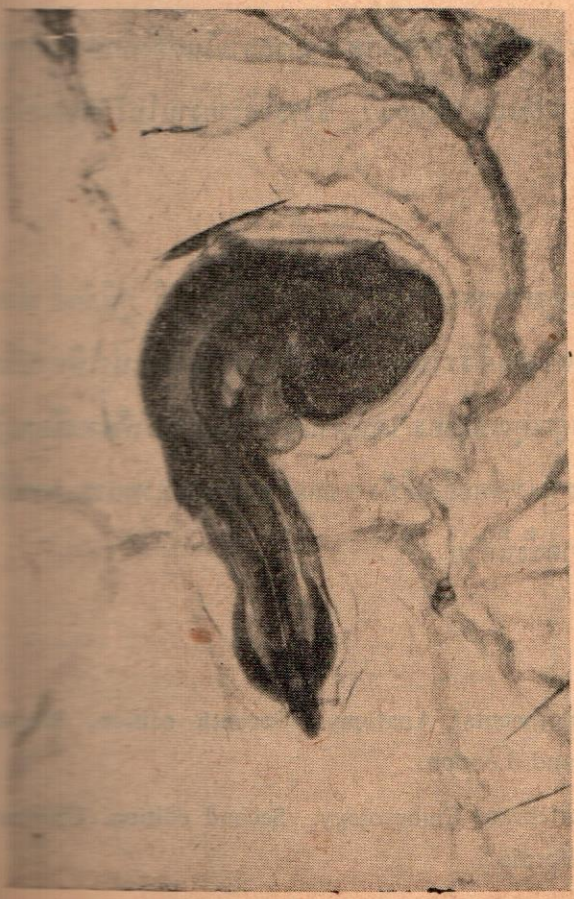
อวัยวะ	ลักษณะทั่วไปจากกล้องจุลทัศน์
๑. ลักษณะภายนอก (External features)	ก. เอมบรีย์โอไก่ระยะนี้จะมีการงอตัว ๒ ครั้ง คือที่ หัวและคอ (cranial and cervical flexure) ทำให้ส่วนหัวและอกมาชิดกัน ไม่เห็นส่วนของปากชัดเจน ขณะที่มีการงอตัว จะมีการบิดของลำตัวด้วย (Torsion) เพื่อให้อวัยวะต่าง ๆ เจริญได้สะดวก

อวัยวะ	ลักษณะทั่วไปจากกล้องจุลทัศน์
	ข. Visceral arches และ clefts เห็นได้ชัดมี ๔ visceral arches โดย cleft ที่ ๑ อยู่ถัดจากปากเป็นอันดับแรกและเมื่อดูจากการย้อมสีเอมบริย์โอไก่อย่างจาง จะพบ aortic arch ที่ผ่าน visceral arch ได้อย่างชัดเจน
	ค. ส่วนของ appendage buds ซึ่งจะเจริญไปเป็นปีกและขาเริ่มเห็นได้ชัด โดยส่วนของขามีขนาดใหญ่กว่าปีก
	ง. หาง อยู่ส่วนปลายสุด จะม้วนตัว ๙๐ องศาเข้าสู่ของแกนของลำตัว
๒. ปล้องของลำตัว (Somite)	เนื้อเยื่อชั้นกลางจัดตัวเป็นปล้องยาวตลอดตัวจนถึงระดับขา นับได้ ๓๖ somite ซึ่งนิยมใช้จำนวนปล้องของลำตัวบอกขนาดและระยะของเอมบริย์โอได้
๓. ระบบประสาท (Nervous System)	ก. สมอง เจริญมากและแบ่งเป็นส่วนต่าง ๆ เห็นได้ชัด ได้แก่ ๑. สมองส่วนหน้ามี ๒ ส่วน คือ Telencephalon และ Diencephalon ๒. สมองส่วนกลาง คือ Mesencephalon ๓. สมองส่วนหลังมี ๒ ส่วน คือ Metencephalon และ Myelencephalon
	ข. ท่อประสาท (Neural tube และ Neural groove) ปิดตลอดลำตัวต่อไปเจริญไปเป็น spinal cord พบ spinal ganglia บางส่วน
	ค. การงอตัวครั้งแรกที่หัวของเอมบริย์โอ (Cranial flesure) พบตรงตำแหน่งของสมองส่วนกลางพอดี

อวัยวะ	ลักษณะทั่วไปจากกล้องจุลทัศน์
๔. ระบบไหลเวียนโลหิต (Circulatory System)	ก. หัวใจแบ่งเป็น ๔ ส่วน คือ Sinus venosus, Atrium, Ventricle และ Bulbus cordis จากกล้องจุลทัศน์ พบหัวใจขนาดใหญ่ชัดเจน ventricle อยู่ส่วนล่างสุดและ atrium ถูก bulbus cordis ทับอยู่ข้างบน
	ข. ระบบไหลเวียนอาหารและออกซิเจน (Vitelline circulation) เนื่องจากเอมบริย์โอระยะนี้ ได้รับอาหารและออกซิเจนจากไข่แดง (Yolk sac) จึงเห็น Vitelline artery และ vein ชัดเจน
	ค. ระบบไหลเวียนโลหิตในตัว (Intraembryonic circulation) มี dorsal aorta เป็นเส้นใหญ่ทอดตลอดตัวมีแขนงไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย
	ง. Allantoic circulation เห็นไม่ชัดเจนเนื่องจากได้ตัด allantois ออกไปแล้วก่อนที่จะนำเอมบริย์โอมาย้อมสี
๕. อวัยวะรับความรู้สึก (Sense organs)	ก. ตา (eye) มีกำเนิดที่สมองส่วนหน้าพบบริเวณ Diencephalon เบ้าตา (optic vesicle) แยกเป็น ๒ ชั้น คือ Sensory layer และ pigment layer of retina มี lens ใหญ่อาจพบ choroid fissure
	ข. หู (ear) เกิดที่สมองส่วนหลังบริเวณ Myelencephalon เนื้อเยื่อชั้นนอกบริเวณนั้นหนาขึ้นเป็น auditory placode และกลายเป็น auditory vesicle และใบหู
๖. อวัยวะภายใน (Internal organs)	ไม่สามารถเห็นได้จากการย้อมสีทั้งตัว แต่จะศึกษาได้จากการตัดขวางลำตัวตามลำดับ และเรียงลำดับอย่างถูกต้อง (Serial section) และตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ดูอวัยวะภายในลำตัวเหล่านี้



ภาพที่ ๑ ตัวอย่างสไลด์ เชื้อลูกไก่ระยะฟัก ๗๒ ชั่วโมง ย้อมสีทั้งตัว ด้วย Mayer's acid Carmine



ภาพที่ ๒ เชื้อลูกไก่ระยะฟัก ๗๒ ชั่วโมง ย้อมสีทั้งตัว จากกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย ๑๐ x

วิจารณ์และสรุป

การศึกษาการเจริญเติบโตของเอมบรีย์โอไก่ขนาด ๓๖ ปล้อง จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการเจริญของเอมบรีย์โอระยะแรกได้เป็นอย่างดี การศึกษาจากเอมบรีย์โอย้อมสีทั้งตัว ทำให้รู้กำเนิดของลักษณะทั่วไป ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาคัพภะวิทยา ใช้เปรียบเทียบวิชาการต่าง ๆ ของการผิดปกติอันเนื่องมาแต่กำเนิด ตลอดจนเป็นแนวทางสำหรับงานค้นคว้าวิจัยในโอกาสต่อไป

การศึกษาเทคนิคของการย้อมสีเอมบรีย์โอไก่ทั้งตัวครั้งนี้ ยังเป็นการศึกษาขั้นต้นในการเตรียมอุปกรณ์ศึกษาทางคัพภะวิทยาขึ้นใช้เอง โดยไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ดังที่เคยปฏิบัติมา เทคนิคที่ศึกษาเป็นวิธีที่สะดวกและปฏิบัติกันทั่วไป

การย้อมสีเอมบรีย์โอไก่ ๓๖ ปล้อง ทั้งตัวสามารถนำวิธีการมาใช้กับเอมบรีย์โอไก่ขนาดอื่น ๆ ได้ เพื่อศึกษาลักษณะภายนอก การศึกษาอวัยวะภายในต้องศึกษาจากการตัดเรียงลำดับอย่างถูกต้องของเอมบรีย์โอ (Serial Section) ซึ่งจะได้รายงานในโอกาสต่อไป

บทขอบพระคุณ

ผู้รายงานขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์แพทย์หญิงถนอมฤดี ภูมิภักดิ์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ได้กรุณาแนะนำให้คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ยิ่ง ขอขอบพระคุณคุณละออง เจนพานิช และเจ้าหน้าที่ฝ่ายห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ตลอดจนหน่วยภาพการแพทย์ที่ได้เอื้อเฟื้อถ่ายภาพแสดงผลของการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Arey, L.B., 1966. Developmental Anatomy. Seventh edition, Saunders Company, Philadelphia and London.
2. Eakin, R.M., 1971. Vertebrate Embryology. Second edition. University of California Press, California.

3. Hamilton, H.L., 1952. Lillie's Development of the Chick. Third edition. Henry Holt and Company, New York.

4. Luna, L.G., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institue of Pathology. Third edition. Mc Graw – Hill Book Company, New York.

5. Mathews, W.W., 1972. Atlas of Descriptive Embryology. The Macmillan Company, New York.

6. Patten, B.M., 1951. Early Embryology of the Chick. Fourth edition. Mc Graw – Hill Book Company, New York.

7. Preece, A., 1965 A Manual for Histologic Technicians. Second edition. Little, Brown and Company, Boston.