การใช้เอนไซม์เพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า

ศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทในสมองหนูขาว

ราตรี วงศ์ดอกไม้*
จิตร สิทธิอมร**
สุจินต์ พรรธนะแพทย์*
สุทิพย์ พรรธนะแพทย์*

The study of the central neuronal connections by the use peroxidase enzyme extracted from Rathanus sativus compared with standard horseradish peroxidase (HRP, Sigma, Type VI) has been investigated in 28 Wista rats. These two groups of enzymes in varying amounts and concentrations were injected into the visual cortex (area 17) in animals and allowed them to survive 12–72 hours. At the end of the survival time, each animal was perfused with fixative under pressure, serial frozen sections were obtained and stained to demonstrate peroxidase labeled neurons by the use of 3,3' diaminobenzidine and H_2O_2.

Several factors involved in retrograde transport of HRP such as concentration of enzyme and appropriate survival time. In this study, the appropriate survival time for optimal retrograde transport by injection of HRP into the visual cortex is 24-28 hours.

No peroxidase labeled cells could be detected in the sections from animals injected with enzyme extracted from Rathanus sativus. We believed that this is not due to the concentration of the enzyme but due to the structure and purity of the enzyme being used.

* ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ในการศึกษาเกี่ยวกับการส่งเส้นประสาทไปยังส่วนต่าง ๆ ของสมอง ในสมัยก่อนได้ใช้วิธีทำลายเซลล์หรือ axon ซึ่งทำให้เกิดการสลายตัวชนิด antegrade และ/หรือ retrograde แล้วย้อมดูเซลล์[2] หรือเส้นประสาท[3,12] ที่สลายตัว ทำให้สามารถศึกษาการส่งเส้นประสาทในสมองได้ วิธีการทำลายมีข้อเสียหลายประการ เช่น ในกรณีที่เซลล์ประสาทมีแขนงมาก (axon collaterals) การทำลายส่วนใดส่วนหนึ่งของ axon จะไม่ทำให้เซลล์ประสาทดังกล่าวสลายตัวมาพอที่จะศึกษาได้ นอกจากนี้ การศึกษาโดยวิธีทำลายเป็นการทำให้เนื้อเยื่อมีพยาธิสภาพเกิดขึ้น ซึ่งไม่ใช่ภาวะปกติ

La Vail และ La Vail[6] เป็นคณะแรกที่นำ horseradish peroxidase (HRP) มาใช้กับระบบประสาทกลางในลูกไก่ โดยฉีดเข้าทางตาและ optic tectum และพบว่า HRP จะไปสะสมอยู่ที่ตัวเซลล์ประสาท (cell body) ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าเป็นต้นกำเนิดของ axon ซึ่งอยู่บริเวณที่ฉีด ต่อมาได้มีผู้นำมาใช้กับสัตว์อื่นหลายชนิดเช่น ปลา[15] mice[8] rats[5] แมว[18] และลิง[16] และได้ทำการศึกษาในสัตว์ที่มีอายุต่าง ๆ กันด้วย[8] ปรากฏว่าวิธีการนี้อาจจะเป็นวิธีหนึ่งในการศึกษา การติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทในสมอง การศึกษาการติดต่อโดยใช้ HRP กระทำได้โดยไม่ต้องทำลายเนื้อเยื่อให้เกิดพยาธิสภาพ HRP เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เร่งปฏิกริยาระหว่าง H_2O_2 และ 3, 3' diaminobenzidine เกิดเป็นสีจำเพาะ เซลล์ประสาทที่เก็บเอนไซม์นี้จึงถูกย้อมให้เห็นได้[4]

ปัจจุบันหน่วยต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิสม แผนกวิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหน่วยวิจัยฮอร์โมนแผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันทมหิดลได้สกัดเอนไซม์เพอรอคซิเดส (peroxidase) จากเปลือกหัวไชเท้าหรือหัวผักกาดขาว (Rathanus sativus) เพื่อช่วยวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่ม[1] พบว่าสามารถนำไปใช้ในปฏิกริยาเคมีเพื่อวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่มได้ถูกต้องเพียงพอที่จะใช้งานได้ดี ถึงแม้ว่ายังเป็นเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ (RZ < 1) เมื่อเทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน (horseradish peroxidase, HRP, Sigma, Type VI, RZ=3) ขบวนการที่ใช้ในการสกัดมีราคาถูกกว่า HRP ซึ่งต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศมาก

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาว่าเอนไซม์ที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้าที่มีความบริสุทธิ์ต่ำนี้สามารถนำมาใช้ศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาท (central neuronal connection) ได้อย่าง HRP หรือไม่

วัสดุและวิธีการ

1. ทดสอบปฏิกริยาของเอนไซม์ในหลอดแก้วทดลอง เตรียมสารละลายดังนี้ 50 มก. DAB (3,3' diaminobenzidine tetra HCl) 100 มล. Tris buffer pH 7.4 และ 66 μl 30% H_2O_2 แบ่งเป็น 2 หลอดในปริมาณเท่ากัน หลอดหนึ่งใส่ 30% HRP 0.4 μl อีกหลอดใส่เพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า (8–12% W/V) 1 μl ดูปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกัน

2. ศึกษาในสัตว์ทดลอง ใช้หนูขาวพันธุ์ Wista หนักประมาณ 200–300 กรัม ทั้ง 2 เพศ แบ่งหนูเป็น 3 กลุ่มเพื่อศึกษาดังนี้

2.1 ศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์โดยใช้ horseradish peroxidase มาตรฐาน (HRP, Sigma, Type VI) ประกอบด้วยหนู 16 ตัว นำมาทำให้สลบโดยใช้ nembutal (30 มก. ต่อ กก.) ฉีดเข้าทางช่องท้อง ตรึงศีรษะเข้ากับเครื่อง stereotaxic ทำการผ่าตัดโดยพยายามให้ปราศจากเชื้อ ฉีด HRP ปริมาณ 0.5–1 μl ซึ่งมีความเข้มข้น 10–30% โดยใช้ 10 μl Hamilton syringe เข้าไปที่ primary visual cortex (area 17) โดยใช้ตำแหน่งของ Montero และคณะ[10,11] ทิ้ง syringe ให้อยู่บริเวณนั้นประมาณ 1–5 นาทีหลังการฉีดแต่ละครั้ง เพื่อเปิดโอกาสให้เอนไซม์กระจายในเนื้อเยื่อบริเวณปลาย syringe แล้วเย็บบีดกระโหลกศีรษะ ต่อไปทิ้งให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน (survival time) ตั้งแต่ 12–72 ชั่วโมง เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการพาเอนไซม์นี้จากปลายประสาทไปสู่เซลล์ประสาท

หลังจากครบระยะเวลาที่ต้องการแล้ว นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบ ผ่าตัดเปิดช่องอก perfuse ด้วย fixative ซึ่งประกอบด้วย 1% paraformaldehyde และ 1.25% glutaraldehyde ละลายใน 0.1 M. phosphate buffer pH 7.4 ภายใต้ความดันเข้าทางเวนทริเคิลซ้าย เปิดเอเทียมขวาเพื่อให้เลือดและ fixative ไหลออก สมองที่ fix ดี จะแข็งพอสมควร นำสมองมาแช่ใน fixative 1 คืน โดยเก็บในตู้เย็น ต่อมาแช่ใน 30% sucrose ที่ละลายใน phosphate buffer จนกว่าสมองจะจมในน้ำยา นำสมองมาตัด frozen section หนา 50 micra แล้วนำมาย้อมโดยดัดแปลงจากวิธีของ LaVail และคณะ[6,8] โดยนำ sections มาใส่ใน 50 มก. DAB และ 100 มล. Tris HCl buffer และ 66 μl 30% H_2O_2 นาน 15 นาที บางส่วนของเนื้อเยื่อที่จัดเรียงบนสไลด์แล้วจะถูกนำมาย้อมด้วย cresyl violet เพื่อดูลักษณะเซลล์และตำแหน่งสมอง เซลล์ที่มี HRP อยู่ (labeled neurons) จะเห็นมีลักษณะเป็น granules สี

น้ำตาลเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะพบได้ตรงบริเวณที่ฉีด (injection sites) และบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด (projection sites)

2.2 ศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์โดยใช้เพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า ใช้หนูทั้งหมด 10 ตัว ทำการศึกษาแบบเดียวกับข้อ 1.2 แต่ใช้เพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า (8–12%) แทน HRP มาตรฐาน

2.3 ทดสอบปฏิกริยาจาก endogenous peroxidase ประกอบด้วยหนู 2 ตัว เป็นกลุ่มศึกษาเปรียบเทียบ นำมาทำให้สลบแล้ว perfuse สมอง แบบเดียวกับข้อ 2.1 และศึกษาทางวิทยาฮีสโตทำนองเดียวกัน แต่ไม่ได้ฉีดเพอรอคซิเดส

ผล

1. ปฏิกริยาของเอนไซม์ในหลอดแก้วทดลอง เปรียบเทียบปฏิกริยาของ HRP มาตรฐานและเพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า ในการเร่งปฏิกริยาระหว่าง H_2O_2 และ 3,3' diaminobenzidine พบว่า ทั้งสองชนิดจะทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงเหมือนกัน

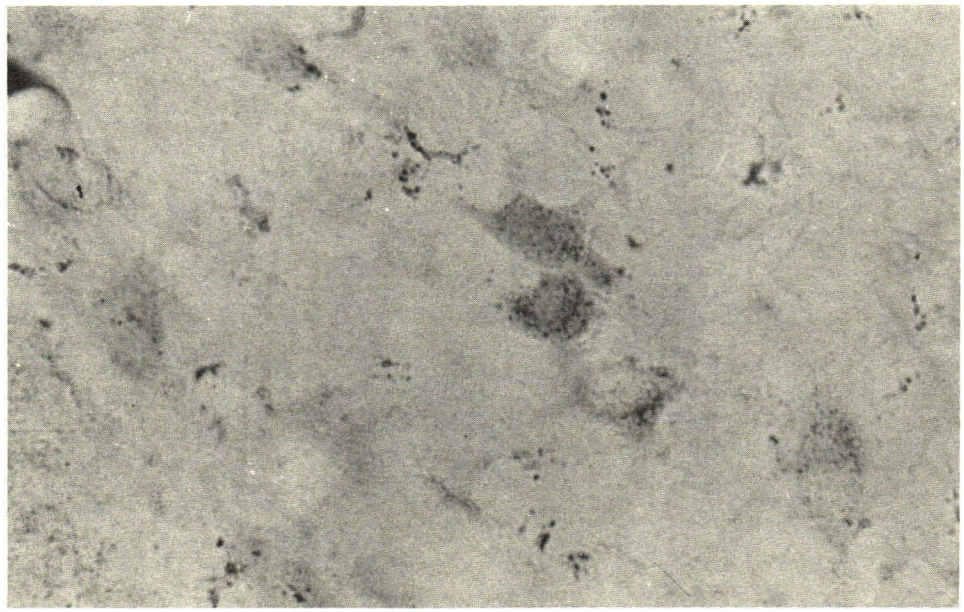
2. การศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์โดยใช้ HRP มาตรฐาน

2.1 เวลาที่เหมาะสมในการพาเอนไซม์จากปลายประสาทไปสู่เซลล์ประสาทในหนู 5 ตัวที่ทิ้งให้มี survival time 12, 48, 50 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ไม่พบ labeled neurons ในบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด (projection sites) พบแต่เฉพาะบริเวณที่ฉีด (injection sites) เท่านั้น (รูปที่ 1)

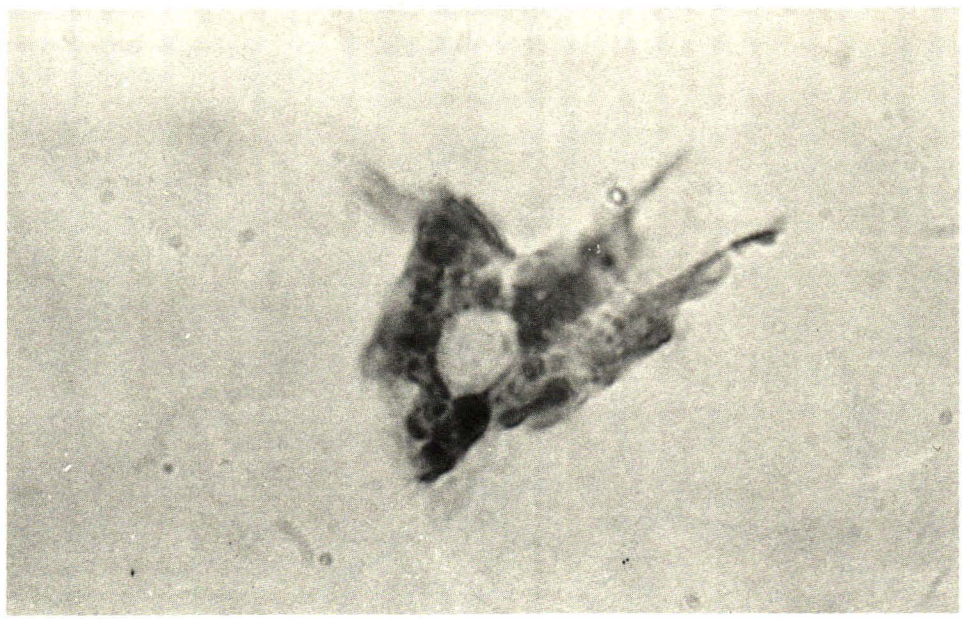
ในหนู 8 ตัว มี survival time 24 ชั่วโมง และอีก 1 ตัว survival time 28 ชั่วโมง สามารถพบ labeled neurons ได้ทั้งบริเวณที่ฉีด และบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด

2.2 ปริมาณและความเข้มข้นของ HRP ที่ใช้ พบว่า HRP ความเข้มข้นตั้งแต่ 10–30% ในปริมาณ 0.3–1.0 μl อาจใช้ศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทได้ ถ้ามี survival time ที่เหมาะสม เนื่องจากพบ labeled neurons ได้ทั้งบริเวณที่ฉีดและบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด ต่างกันตรงที่การกระจายของ HRP ตรงบริเวณที่ฉีดซึ่งถ้าใช้ HRP ที่มีความเข้มข้นสูงจะแผ่กระจายออกไปเป็นบริเวณกว้างเห็นเป็นสีน้ำตาลดำมากกว่า HRP ที่มีความเข้มข้นต่ำ

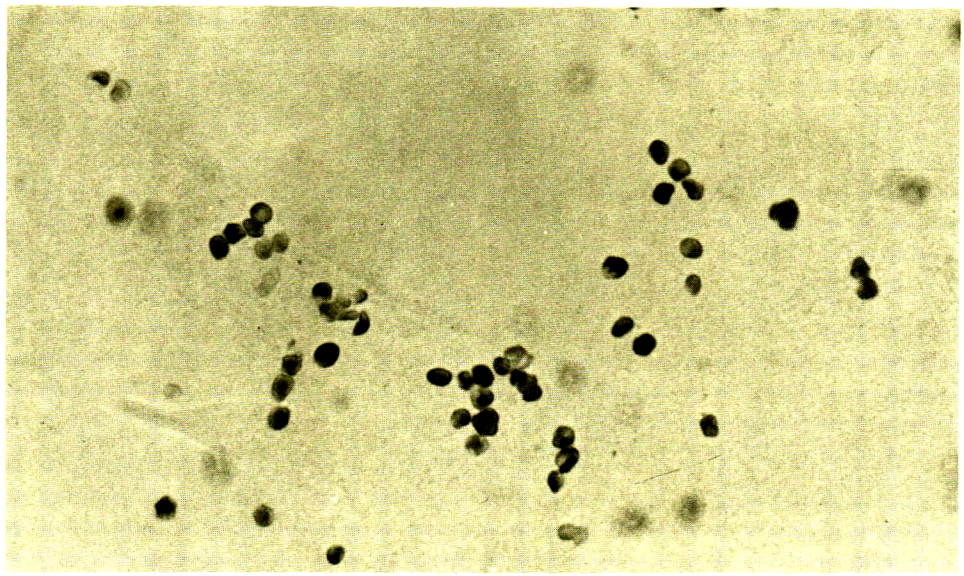
2.3 บริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด ในหนู 9 ตัวที่ฉีด HRP ที่ visual cortex ซึ่งมี survival time 24–28 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ labeled neurons



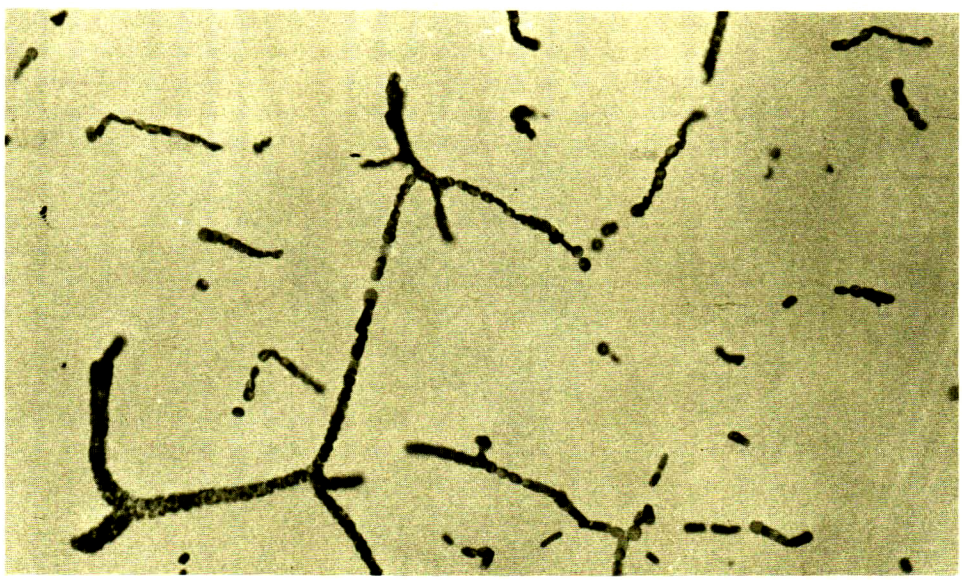
รูปที่ 1 แสดง labeled neurons ที่อยู่บริเวณที่ฉีด HRP ที่ visual cortex ในหนู กำลังขยาย X 450



รูปที่ 2 แสดง labeled neurons ที่ thalamus ซึ่งเป็นบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด จะเห็นมี granules ของ HRP อยู่ กำลังขยาย X 1400



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่มี endogenous peroxidase อยู่ในเนื้อเยื่อของสมองหนูที่ฉีดเพอ-รอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้าเข้าไปที่ visual cortex ไม่พบมี labeled neurons กำลังขยาย X 200



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่มี endogenous peroxidase อยู่ในเนื้อเยื่อของสมองหนูปกติที่ไม่ได้ฉีดเอนไซม์ แต่ perfuse และย้อมทำนองเดียวกัน กำลังขยาย X 100

(รูปที่ 2) อยู่ทั่วไปใน thalamus ในกรณีที่ใช้ HRP ความเข้มข้นแตกต่างกันไม่พบว่ามีความแตกต่างกันในขนาดและจำนวนของ granules ในเซลล์หนึ่ง โดยทั่วไป labeled neurons ที่ projection sites จะมีจำนวนมากขึ้นถ้าใช้ HRP ที่มีความเข้มข้นสูง

ในกลุ่มที่ใช้ HRP มาตรฐานนี้ สามารถพบ endogenous peroxidase ได้ในเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในหลอดเลือดฝอยทั่ว ๆ ไป

3. การศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์โดยใช้เพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า ในหนู 10 ตัว ฉีดเพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้าในขนาด 1.0–10.0 μl เข้าไปบริเวณ visual cortex มี survival time 12 ชั่วโมง (1 ตัว), 24 ชั่วโมง (6 ตัว), 28, 48 และ 72 ชั่วโมง (อย่างละ 1 ตัว) ทุกตัวไม่สามารถตรวจพบ labeled neurons ทั้งบริเวณที่ฉีด และบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด ลักษณะของเนื้อเยื่อเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า มีการติดสีน้ำตาลแดงเข้มที่เซลล์ของเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 3) ลักษณะนี้เหมือนกับเนื้อเยื่อที่ได้จากหนูซึ่งศึกษาดู endogenous peroxidase (รูปที่ 4)

4. ปฏิกริยาจาก endogenous peroxidase (รูปที่ 4) ในหนู 2 ตัวนำมา perfuse และศึกษาทางวิทยาฮีสโตทำนองเดียวกัน พบมีการติดสีน้ำตาลแดงในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อยู่ในหลอดเลือดฝอย เซลล์เม็ดเลือดแดงนี้มี endogenous peroxidase อยู่[7] เมื่อทำปฏิกริยากับ H_2O_2 ให้สีน้ำตาลแดง ซึ่งมีลักษณะเซลล์ต่างกันมากกับ labeled neurons

วิจารณ์

1. ข้อคิดในการแปลผลการศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์โดยใช้ HRP มาตรฐาน

1.1 ความจำเพาะของวิธีการ Wong–Riley[17] รายงานว่าในเซลล์ประสาทของสมองลิงที่ปกติสามารถแสดงปฏิกริยาของเอนไซม์ endogenous peroxidase ทำให้เห็น labeled neurons ได้คล้ายกับการฉีด HRP ในการศึกษาของคณะผู้วิจัยซึ่งทำในหนูปกติที่ไม่ได้ฉีดเอนไซม์ 2 ตัว นำมา perfuse และย้อมโดยวิธีเดียวกัน ไม่พบมี labeled neurons ที่เกิดจาก endogenous preoxidase ในเซลล์ประสาท พบเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น จึงอาจกล่าวได้ว่า HRP มาตรฐานเหมาะที่จะใช้ในการศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทในหนู species ที่ทำการวิจัยนี้

1.2 ปริมาณและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ Kim และ Strick[5] พบว่า HRP ความเข้มข้น 1,5 และ 30% ในปริมาณ 0.4 μl

สามารถใช้ในการศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทได้ โดยทั่ว ๆ ไปบริเวณที่ฉีดด้วย HRP 30% จะพบมีการกระจายตัวของเอนไซม์เป็นบริเวณกว้างกว่าเมื่อฉีดด้วย 5 และ 1% ผลการศึกษาของเราพบว่า HRP ความเข้มข้นตั้งแต่ 10–30 % ในปริมาณ 0.3–1.0 μl สามารถใช้ในการศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทได้ แต่วิธีแปลผลการติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทแตกต่างกัน ถ้าความเข้มข้นสูง ๆ พบว่าบริเวณที่ฉีดแผ่กระจายเป็นบริเวณกว้างการพบ labeled neurons บริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีดก็เป็นบริเวณกว้างด้วย ในการศึกษารายงานต่าง ๆ ที่ใช้ HRP จึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบปริมาณและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ด้วย เพราะฉะนั้นการติดสีย่อมขึ้นอยู่กับปริมาณ และความเข้มข้นเป็นหลัก

นอกจากปริมาณและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้แล้ว วิธีการฉีดก็มีความสำคัญในการควบคุมขนาดของการกระจายตัวของเอนไซม์ในบริเวณที่ฉีดด้วย เช่น อัตราความเร็วของการฉีดในสัตว์ทดลองแต่ละตัวต้องคงที่จึงจะนำมาศึกษาเปรียบเทียบได้[14] อีกประการหนึ่งระยะเวลาของการคาเข็มฉีดยาไว้ตรงบริเวณที่ฉีดก็อาจมีความสำคัญในการกระจายตัวของเอนไซม์เช่นเดียวกัน[15]

1.3 เวลาที่เหมาะสมในการพาเอนไซม์จากปลายประสาทไปสู่เซลล์ประสาท LaVail และ LaVail[6] พบว่า เมื่อฉีด HRP เข้าไปที่ optic tectum ในลูกไก่ที่มีอายุ 21 วัน survivaltime ที่เหมาะสมที่สุดในการพาเอนไซม์จากปลายประสาทไปสู่เซลล์ประสาทคือ 12–24 ชั่วโมง โดยมีอัตราของ retrograde transport 72 มม. ต่อวัน ในแมวหนัก 1–3 กก. อัตราของ retrograde transport ใน olivocerebellar fibers 50–100 มม. ต่อวัน และ survival time ที่เหมาะสมคือ 2–3 วัน[15] ในหนูขาวหนัก 300–500 กรัม survival time ที่เหมาะสมคือ 24–48 ชั่วโมง[5] จากผลการทดลองที่คณะผู้วิจัยรายงานนี้พบว่า หนูขาวพันธุ์ Wista หนัก 200–300 กรัม survival time ที่เหมาะสมสำหรับ retrograde transport เมื่อฉีด HRP เข้าไปที่ visual cortex คือ 24–28 ชั่วโมง ซึ่งอาจสรุปได้ว่า ความเร็วของการนำผ่านของ HRP ขึ้นอยู่กับ species ของสัตว์ทดลองและชนิดของระบบประสาทที่ศึกษา

2. การศึกษาการติดต่อระหว่างเซลล์โดยใช้เพอรอลซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า

2.1 การทดสอบปฏิกริยาของเอนไซม์ในหลอดแก้วทดลอง พบว่าเพอรอลซิเดสที่เตรียมขึ้นนี้ มีปฏิกริยาเหมือนกับ HRP

มาตรฐานแสดงว่าเพอรอคซิเดสจากเปลือกหัวไชเท้าสามารถเร่งปฏิกริยาระหว่าง H_2O_2 และ 3,3' diaminobenzidine ให้เป็นสีน้ำตาลได้

2.2 ผลจากการศึกษาในหนู 10 ตัวที่ฉีดเพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้า ซึ่งมี survival time 12–72 ชั่วโมง ไม่พบ labeled neurons ทั้งที่บริเวณฉีด และบริเวณที่ส่งเส้นประสาทมายังบริเวณที่ฉีด ทั้งๆ ที่ endogenous peroxidase สามารถเร่งปฏิกริยาระหว่าง H_2O_2 และ 3,3' diaminobenzidine ได้ แสดงว่าที่ไม่พบ labeled cells ไม่ได้เกิดจากการเตรียมเนื้อเยื่อไม่ถูกต้อง แต่น่าจะเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าเอนไซม์หายไปจากบริเวณที่ฉีดหรือถูกเปลี่ยนรูปในร่างกายให้เป็น inactive form และไม่ถูกดูดซึมเข้าปลายประสาทในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (12–72 ชั่วโมง)

ความเข้มข้นของเอนไซม์ ไม่น่าจะเป็นปัญหา เพราะเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นมามีความเข้มข้น 8–12 %[1] และมีรายงานว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ขนาด 1%[5] สามารถถูกดูดซึมเข้าเซลล์ประสาทและย้อมติดสีได้ ปัญหาเกี่ยวกับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ น่าจะมีความสำคัญอันหนึ่ง ถ้าความบริสุทธิ์ต่ำ อาจไม่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการดูดซึมผ่านเข้าไปในเส้นประสาท เนื่องจากสารที่ปนอยู่อาจไปยับยั้งการดูดซึม นอกจากนี้โครงสร้างของเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นเองนี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับขบวนการ pinocytosis ซึ่งเป็นขบวนการที่นำเอนไซม์เข้าสู่ปลายประสาท และอาจถูกขจัดได้โดยง่ายโดยระบบไหลเวียนหรือสารเคมีในร่างกาย

ขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิสม ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหน่วยวิจัยฮอร์โมนแผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันทมหิดล ที่ได้เอื้อเฟื้อให้เพอรอคซิเดสที่สกัดจากเปลือกหัวไชเท้าเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนให้ทุนวิจัยไชน่า เมดิคัล บอร์ด ในการทำการศึกษานี้

อ้างอิง

1. ธิดา เศรษฐรัตนพงศ์, วิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล, เจริญศรี วจนมฤธุ, วิศาล เยาวพงศ์ศิริ, ศรีจิตรา บุนนาค : Modified single glucose oxidase-peroxidase reagent for rapid determination of serum glucose, จุฬาลงกรณ์เวชสาร 12 : 185-191, 2521

2. Brodal, A. : Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine, 2nd edition Oxford University Press, 1969.

3. Fink, R.P., Heimer, L. : Two method for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system, Brain Res. 4. : 369-374, 1967.

4. Graham Jr, R.C., Karnovsky, M.J. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique, J. Histochem. Cytochem. 14 : 291-302, 1966.

5. Kim, C.C., Strick, P.L. : Critical factors involved in the demonstration of horseradish peroxidase retrograde transport Brain Res. 103 : 356-361, 1976.

6. LaVail, J.H., LaVail, M.M. Retrograde axonal transport in the central nervous system, Science 176 : 1416-1417, 1972.

7. LaVail, J.H., LaVail, M.M. : The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system : A light and electron microscopic study, J. Comp. Neurol. 157 : 303-358, 1974.

8. LaVail, J.H., Winston, K.R., Tish, A. : A method based on retrograde intraaxonal transport of protein for identification of cell bodies of origin of axons terminating within the CNS, Brain Res. 58 : 470-477, 1973.

9. Luiten, P.G.M. : The horseradish poroxidase technique applied to the teleostean nervous system, Brain Res. 89 : 181-186, 1975.

10. Montero, V.M. : Evoked responses in rat's visual cortex to contralateral, ipsilateral and restricted photic stimulation, Brain Res. 53 : 192-196 1973.

11. Montero, V.M., Rojas, A., Torrealbe, F. : Retinotopic organization of striate and peristriate visual cortex in the albino rat, Brain Res. 53 : 197-201, 1973.

12. Nauta, H.J.W., Gygax, P.A. : Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system : a modified technic, Stain Tech. 29 : 91-93, 1954.

13. Ralston III, H.J., Sharp, P.V. : The identification of thalamocortical relay cells in the adult cat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase, Brain Res. 62 : 273-278, 1973.

14. Sherlock, D.A., and Raisman, G. : A comparison of anterograde and retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the connections of the mammillary nuclei in the rat, Brain Res. 85 : 321–324, 1975.

15. Walberg, F., Brodal, A., Hodevik, G.H. : A note on the method of retrograde transport of horseradish peroxidase as a tool in studies of afferent corebellar connections, particularly those from the inferior olive ; with comments on the orthograde transport in Purkinje cell axons, Expt. Brain Res. 24: 383–401, 1976.

16. Wong–Riley, M.T.T. : Demonstration of geniculo–cortical and callosal projection neurons in the squirrel monkey by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase, Brain Res. 79 : 267–272, 1974.

17. Wong–Riley, M.T.T. : Endogenous peroxidatic activity in brain stem neurons as demonstrated by their staining with diaminobenzidine in normal squirrel monkeys, Brain Res. 108 : 257–277, 1976.