เอกสารอ้างอิง

1. Precht, W. and Shimazu, H., "Functional connections of tonic and kinetic vestibular neurons with primary vestibular afferents" J. Neurophysiol. 28(1965) : 1014-1028.

2. Brodal, A. and Pompeiano, O., "The vestibular nuclei in the cat" J. Anat. (Lond.). 91(1957) : 438-454.

3. Fujita, Y., Rosenberg, J. and Segundo, J.P., "Activity of cells in the lateral vestibular nucleus as a function of head position" J. Physiol. (Lond.). 196(1968) : 1-18.

4. Walberg, F., Bowsher, D. and Brodal, A., "The termination of primary vestibular fibers in the vestibular nuclei of the cat. An experimental study with silver methods" J. Comp. Neurol. 110(1958) : 391-419.

5. Brodal, A., Pompeiano, O. and Walberg., F. The Vestibular Nuclei and Their Connections. in Anatomy and Functional Correlations, (Oliver Aud Boyd) pp. VIII - 193, Edinburgh, London, 1962.

6. Brodal, A. and Hoivik, B., "Site and mode of termination of primary vestibulocerebellar fibers in the cat" Arch. ital. Biol. 102(1964) : 1-21.

7. Ito, M., Hongo, T., Yoshida, M., Okada, Y. and Obata, K., "Antidromic and trans-synaptic activation of Deiters' neurones induced from the the spinal cord" Jap. J. Physiol. 14(1964) : 638-658.

8. Angaut, P. and Brodal, A., "The projection of the vestibulo-cerebellum onto the vestibular nuclei in the cats" Arch ital Biol. 105(1967) : 441-479.

9. Gacek, R-R., "The course and central termination of first order neurons supplying vestibular endorgans in the cat" Acta oto-laryng. (Stockh.). 254(1969) : 1-66.

10. Walberg, F. and Mugnaini, E., "Distinction of degenerating fibers and boutons of cerebellar and peripheral origin in the Deiters' nucleus of the same aninal" Brain Res. 14(1969) : 67-75.

11. Ito, M., Udo, M., Mano, N. and Kawai, N., "Synaptic action of the fastigiobulbar impulses upon neurones in the medullary reticular formation and vestibular nuclei" Exp. Brain Res. 11(1970 c) : 29-47.

12. Andersson, G. and Oscarsson, O., "Projections to Lateral Vestibular Nucleus from Cerebellum Climbing Fiber Zones" Exp Brain Res. 32(1978) : 549-564.

13. Kristensscn, K. and Y. Olsson, "Retrograde Axonal Transport of Protein" Brain Res. 29(1971) : 363-365.

14. Kristensson, K., Olsson, Y. and Sjöstrand, J. "Axonal Uptake and Retrograde transpart of Exogenous Proteins in the Hypoglossal Nerve" Brain Res. 32(1971) : 399-406.

15. Kristensson, K. and Olsson, Y. "Retrongrade Transport of Horseradish Peroxidase in Transected Axons. 1. Time Relationships Between Transport and Induction of Chromatolysis" Brain Res. 79(1974) : 101-109.

16. Corvaja, N. et al, "Identification of cerebellar corticovestibular neurons retrogradely labeled with horseradish peroxidase" Neuroscience. 4(4), (1979) : 507-515.

17. Balaban, CD., Kawaguchi, Y. and Watanabe, E. "Evidence of A collateralized Climbing Fiber Projection From The Inferior Olive To The Flocculus and Vestibular Nuclei in Rabbits" Neuroscience Letters. 22(1981) : 23-29.

18. Balaban, CD. et al., "Demonstration of zonals projections from the cerebellar flocculus to vestibular nuclei in monkeys (Macaca fuscata)" Neurosci Lett. 27(2), (1982) : 101-105.

19. Ito, J., Sara, M., Matsuoka, I. and Takaori; S., Afferent projection from reticular nuclei, inferior olive and cerebellum to lateral vestibular nucleus of the cat as demonstrated by horseradish peroxidase" Brain Res. 231 (1982) : 427-432.

20. Wold, J.E., "The Vestibular Nuclei in the domestic hen (Gallus domesticus) : VI. Afferent from the cerebelleum" J. Comp Neurol. 201(3) : 1981) : 319-341.

21. Akaike, T. et al, "Spinal segmental levels innervated by different types of vestibulo-spinal tract neurones in rabbit" Exp Brain Res. 17(1973) : 443-446.

22. Fifkova, E. and Marsala, J. "Stereotaxic atlases for cat, rabbit and rat" in Electrophysiological Methods in Biological Research, pp. 291-302. Edited by Bures, J., Petrom, M. and Zachar, J. New York : Academic press, 1967.

23. Wilson, V.J. "Physiological pathways through the vestibular nuclei" Int. Rev. Neurobiol. 15(1972) : 27-81.

24. Mesulam, M.M., "Tetramethyl Benzidine for Horseradish peroxidase Neurohistochemistry : A Non-Carcinogenic Blue Reaction-Product with Superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents" J. Histochem and cytochem. 26(2), (1978) : 106-117.

25. Pellegrino, L.J. Pellegrino, A.S. and Cushman, A.J. A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. Plenum Press, New York, 1979.

26. Malmgren, L. and Olsson, Y. "A Sensitive Method For Histochemical Demonstration of Horseradish peroxidase in Neurons following Retrograde Axonal Transport" Brain Res. 148(1978) : 279-294.

27. Olsson, Y. and Malmgren, LT. "Histochemical localization of horseradish peroxidase in neurones" TINS. Oct (1978) : 105-107.

28. Mesulam, M.M. and Rosene, DL. "Sensitivity in Horseradish Peroxidase Neurohistochemistry : A Comparative and Quantitative Study of Nine Methods" J. Histochem and cytochem. 27(3), (1979) : 763-773.

29. Lavail, J.H. and Lavail, M.M. "Retrograde axonal transport in the central nervous system" Science. 176(1972) : 1416-1417.

30. Lavail, J.H., Winston, K.R. and Tish, A. "A method based on retrograde intra-axonal transport of protein for identification of cell bodies of origin of axons terminating within the CNS" Brain Res. 58(1973) : 470-477.

31. Ljungdahl, A. "Retrograde peroxidase tracing of neurones combined with transmitter histochemistry" Brain Res. 84(1975) : 313-319.

32. Luitein, P.G.M. "The HRP technique applied to the etleostean nervous system" Brain Res. 89(1975) : 181-186.

33. Oscarsson, O. and Sjölund, B. "The Ventral Spino-olivocerebellar System in the Cat. I. Identification of Five Paths and their Termination in the Cerebellar Anterior Lobe" Brain Res. 69(1977) : 331-335.

34. Oscarsson, O. and Sjölund, B., "The Ventral Spino-Olivocerebellar System in the Cat. III. Functional Characteristics of the Five Paths" Exp Brain Res. 28(1977) : 505-520.

35. Haines, D.E. "Cerebellar Corticonuclear and Corticovestibular Fibers of the Anterior Lobe Vermis in a Prosimian Primate (Galago senegalensis)" J. Comp Neurol. 170(1), (1976) : 67-95.

36. Walberg, F., Pompeiano, O., Brodal, A. and Jansen, J., "The Fastigovestibular Projection in the cat, An Experimental Study with Silver Impregnation Method" J. Comp Neurol. 118(1962) : 49-75.

37. Batton, R.R., Jayaraman, A., Ruggiero, D. and Carpenter, M.B. "Fastigial Efferent Projections in the Monkey : An Autoradio graphic Study" J. Comp Neurol. 174(1975) : 281-306.

38. Voogd, J. and Bigare, F. Topographical Distribution of Olivary and Cortico Nuclear Fibers in the Cerebellum. in The Inferior Olivary Nucleus : Anatony and Physiology, (Courville, J. et al) pp. 207-229. Raven Press, New York, 1980.

39. Groenewegen, H.J. and Voogd, J. "The Parasagittal Zonation within the Olivocerebellar Projection, climbing Fiber Distribution in the Vermis of cat cerebellum" J. Comp Neurol. 174(1978) : 417-488.

40. Anderson, G. and Oscarsson, O. "Climbing Fiber Microzones in Cerebellar Vermis and Their Projection to Different Groups of cells in the Lateral Vestibular Nucleus" Exp Brain Res. 32(1978) : 565-579.

41. Walberg, F. Olivocerebellocortical Projection in the Cat as Determined with the Method of Retrograde Axonal Transport of Horseradish Peroxidase. 1. Topographical Pattern. in The Inferior Olivary Nucleus : Anatomy and Physiology, (Courville, J. et al) pp. 169-186. Raven Press, New York, 1980.

42. Brodal, A. Olivocerebellocortical Projections in the Cat as Determined with the Method of Retrograde Axonal Transport of Horseradish Peroxidase 2. Topgraphical pattern in Relation to the Longitudinal Subdivision of the Cerebellum. in The Inferior Olivary Nucleus : Anatomy and Physiology, (Courville, J. et al) pp. 181-206. Raven Press, New York, 1980.

43. Gacek, RR. "Location of Comissural Neurons in the Vestibular Nuclei of the cat" Exp Neurol. 59(1978) : 479-491.

44. Matsuoka, I. et al. "Neuronal interaction between ipsilateral medial and lateral vestibular nuclei" Ann NY Acad Sci. 374(1981) : 93-101.

45. Graybiel, A.M. and Devor, M., "A microelectrophoretic delivery technique for use with horseradish peroxidase" Brain Res. 68(1974) : 167-173.

46. Jones, E.G. "Possible Determinants of The Degree of Retrograde Neuronal Labelling with Horseradish Peroxidase" Brain Res. 85(1975) : 249-253.

47. Aghajanian, G.K. and Wang, R.Y., "Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique" Brain Res. 122(1977) : 229-242.

48. Cedarbaum, J.M. and Aghajanian, G.K., "Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique" J. Comp Neurol. 178(1978) : 1-16.

49. Graham, RC., J.R. and 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(1966) : 291-302.

50. Kim, C.C. and Strich, P.L. "Critical factors involved in the demonstration of HRP retrograde transport" Brain Res. 103(1976) : 356-361.

51. Mesulam, M.M. "The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry; incubation parameters and visibility" J. Histochem. cytochem. 24(1976) : 1273-1280.

ภาคผนวก

การขนส่งย้อนกลับในใยประสาทของฮอร์ซราดิชเปอร์ออกซิเดส (Retrograde Axonal Transport of Horseradish Peroxidase, HRP)

การขนส่งย้อนกลับในใยประสาทของฮอร์ซราดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) เป็นวิธีที่นิยมนำมาศึกษาเกี่ยวกับการสำรวจวิถีประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง เมื่อปี ค.ศ. 1971 kristensson และ Olsson[14] พบว่าเมื่อฉีด HRP ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์ที่สกัดได้จากรากของต้น horseradish ลงไปในบริเวณประสาทส่วนปลาย ทำให้เซลล์ประสาทจากบริเวณอื่นที่มีแอกซอนมาสิ้นสุดในบริเวณที่ฉีด สามารถขนส่งย้อนกลับ HRP เข้าไปใน perikaryon ได้ และเมื่อนำวิธีการทางฮิสโตเคมีเข้าช่วย จะทำให้เห็นแกรนูนส์ของ HRP โปรดักส์ เหลืออยู่ในเซลล์ ในปีต่อมา Lavail และ Lavail[29] พบว่าวิธีการนำมาใช้ได้ผลดีในระบบประสาทส่วนกลาง อาศัยหลักการดังกล่าว จึงมีผู้นิยมใช้ HRP เป็น tracer protein ในการสำรวจวิถีประสาทในสมองมากขึ้น

วิธีขนส่งย้อนกลับในในประสาทจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่สำคัญ ๆ หลายประการ ได้แก่ประการแรก จำนวนของ HRP ที่ฉีดลงไปในสมอง ถ้ามีจำนวนมากเกินไปโอกาสที่ HRP จะแพร่เข้าไปในบริเวณใกล้เคียงก็มีมาก ทำให้ไม่ได้ขอบเขตของบริเวณที่สนใจจะศึกษาอย่างแน่นอน แต่ถ้าจำนวนของ HRP ที่ฉีดมีปริมาณน้อยเกินไปก็จะทำให้การขนส่งย้อนกลับของ HRP เกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ ดังนั้นรายละเอียดเกี่ยวกับจำนวนของ HRP ที่ฉีดจึงขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในในการฉีด ในระยะต้นของงานวิจัยด้านนี้ นิยมฉีด HRP โดยใช้ pressure injection วิธีการนี้ทำให้โอกาสที่ HRP จะแพร่กระจายไปในบริเวณใกล้เคียงมีมาก จากปัญหาดังกล่าวจึงมีผู้พยายามหาทางแก้ไข ในปี 1974 Graybiel และ Devor[45] ได้นำเทคนิคทาง microelectrophoresis มาใช้ โดยผ่านกระแสไฟฟ้า DC เข้าไปใน glass micropipette ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางตอนปลายไปเปิดขนาดประมาณ 50-100 ไมครอน วิธีการนี้ได้ผลดี มีผู้นิยมนำมาใช้ในการสำรวจวิถีประสาทในสมองส่วนต่าง ๆ เรื่อยมา[46,47,48] ต่อมาในปี

ค.ศ. 1981 Ito และคณะ[19] ได้ให้การสนับสนุนวิธีทาง microelectrophoretic ที่นำมาฉีด HRP โดยกล่าวว่าถ้าปลายไปเปตยิ่งมีขนาดเล็กจะทำให้จำกัดขอบเขตของบริเวณที่ฉีด HRP ได้มากยิ่งขึ้น Ito และคณะ ใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตอนปลายไปเปตประมาณ 30-50 ไมครอน และใช้ความแรงของและของกระแส DC ในขนาดต่ำ ๆ ราว 5-10 μA พบว่าได้ผลดีมาก องค์ประกอบประการที่สองในการทำให้วิธีขนส่งย้อนกลับในใยประสาทได้ผลดีขึ้นอยู่กับการรักษา activity ของเอ็นซัยม์ให้คงที่ ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นว่า HRP เป็นเอ็นซัยม์ ดังนั้นการรักษา activity ของ HRP ให้คงไว้จึงขึ้นกับขบวนการ perfusion-fixation ในระยะแรกของงานทางด้านนี้ ปี ค.ศ. 1966 Graham และ Kanovsky[49] ได้เสนอการใช้ aldehyde 2 ตัวคือ paraformaldehyde และ glutaraldehyde ในขนาดสูง ๆ ในขบวนการ perfusion และ fixation ต่อมาในปี ค.ศ. 1976 Kim และ Strick[50] และ ค.ศ. 1977 Malmgren และ Olsson[26] พบว่า paraformaldehyde ในขนาดสูง ๆ จะทำให้ activity ของ HRP ลดลง ดังนั้นการใช้ paraformaldehyde ในขนาดสูงจึงไม่มีผู้นิยมในเวลาต่อมา องค์ประกอบประการที่สามที่จะทำให้วิธีการขนส่งย้อนกลับในใยประสาทของฮอร์ซราดิชเปอร์ออกซิเดสได้ผลดีหรือไม่คือขบวนการทางฮิสโตเคมีที่นำมาใช้ ในระยะแรก Graham และ Kanovsky[49] นำ brown-reaction โดยใช้ DAB (3', 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)ในสารละลาย H_2O_2 และ Tris-HCl buffer pH 7.6 มาใช้ในการทำให้เห็น HRP แกรนูนส์โปรดักส์ ต่อมา ค.ศ. 1978 Olsson และ Malmgren[27] พบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดของวิธีการทางฮิสโตเคมีสำหรับ HRP ควรต่ำกว่านี้ จึงใช้ brown-reaction เช่นกันแต่ pH ของสารละลายเป็น 5.1 โดยใช้ cacodylate buffer พบว่าได้ผลดีกว่าวิธีของ Graham และ Kanovsky การใช้ DAB เป็น chromogen มีทั้งผลดีและผลเสีย ผลดีคือปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็วใช้เวลาน้อย แต่ผลเสียดังมีผู้พบว่า DAB เป็น carcinogen ดังนั้นจึงมีผู้เสนอวิธีการทางฮิสโตเคมีแบบใหม่โดยใช้ blue-reaction[24,25] มี TMB (3,3'5,5' tetramethyl benzidine) เป็น chromogen พบว่าได้ผลดีกว่าการใช้ DAB ในปี ค.ศ. 1979 Mesulam และ Rosene[28] ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีทางฮิสโตเคมีที่นำมาใช้ในการขนส่งย้อนกลับในใยประสาทของฮอร์ซราดิชเปอร์ออกซิเดสพบว่า blue-reaction ที่มี TMB เป็น chromogen เป็นวิธีการที่ดีที่สุด จำนวน labeled เซลล์พบมากกว่า และ TMB เป็น non-carcinogen ผลเสียของวิธีนี้มีอยู่บางประการคือใช้เวลา

มากและต้องควบคุมอุณหภูมิ pH ของ buffer ให้เหมาะสมและวิธีการนี้มี crystalization เกิดขึ้นค่อนข้างมากซึ่งอาจมองเห็นเป็น artefact

จะเห็นว่าวิธีขนส่งย้อนกลับในใยประสาทของฮอร์ชราดิชเปอร์ออกซิเดสมีประโยชน์มาก และถ้าวิธีการฉีด จำนวน HRP ที่ฉีด ขบวนการทางฮิสโตเคมีที่เหมาะสมยิ่งทำให้การสำรวจวิถีประสาทในสมองได้ผลค่อนข้างแน่นอน เพราะวิธีการนี้แอกซอนของเซลล์ที่ส่งมาในบริเวณที่ฉีด HRP และเนื้อเยื่อรอบ ๆ บริเวณที่ฉีด HRP ไม่ถูกทำลาย ขอบเขตของบริเวณที่ฉีด HRP แน่นอน นับว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในขณะนี้

Fixative

สารละลายที่ใช้ประกอบด้วย 1 % paraformaldehyde, 1.5 % glutaraldehyde และ 4 % sucrose ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.4

การเตรียม 1 % paraformaldehyde :-

เตรียมจาก stock 2 % paraformaldehyde ซึ่งประกอบด้วย

paraformaldehyde	20	ก.
0.05 M phosphate buffer	950	มล.

วิธีการ ปรับ pH ของ 0.05 M phosphate buffer ให้สูงขึ้น 10-11 เพื่อช่วยในการละลาย แล้วค่อย ๆ เติม paraformaldehyde ลงไป คนจนละลายหมดแล้วจึงค่อย ๆ ปรับ pH ของสารละลายลงมาที่ 7.4 ตามเดิม

การเตรียม 1.5 % glutaraldehyde

เตรียมจาก stock 50 % glutaraldehyde (biological grade)

0.05 M phosphate buffer stock solutions ประกอบด้วย :-

Solution A	NaH_2PO_4	13.9	ก.
	น้ำกลั่น	1000	มล.
Solution B	$Na_2HPO_4.7H_2O$	26.825	ก.
หรือ	$Na_2HPO_4.12H_2O$	35.85	ก.
	น้ำกลั่น	1000	มล.

Working phosphate buffer (0.05 M) ประกอบด้วย :-

Solution A	190	มล.
Solution B	810	มล.

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้ว dilute ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 2000 มล.

Tris HCl buffer (pH 8.6) ประกอบด้วย :-

NaCl	7.2	ก.
KCl	0.37	ก.
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	ก.
Tris	4.48	ก.
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับ pH ให้ได้ 8.6 โดยใช้ 0.01 M HCl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 % aqueous neutral red solution ประกอบด้วย :-

neutral red 1 % ใน acetate buffer pH 4.8

stainning protocols :-

1. rinse slide ในน้ำกลั่น
2. ย้อมในสารละลาย 1 % aqueous neutral red นาน 3-5 นาที
3. ล้างน้ำกลั่น 10 วินาที
4. จุ่มใน graded alcohol

50 % alcohol	10	วินาที
70 % alcohol	10	วินาที
90 % alcohol	10	วินาที
95 % alcohol	10	วินาที
100 % alcohol	10	วินาที
100 % alcohol	10	วินาที

5. จุ่มใน xylene I 6 ครั้ง
   xylene II 6 ครั้ง
6. coverslipped ด้วย permount

TMB procedure for the blue-reaction

stock solution for TMB processes

stock A : gelatin buffer solution :-

absolute ethanol	100	มล.
dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มล.
acetate buffer pH 4.3	20	มล.
gelatin	5	ก.
distilled water	870	มล.

store in refrigerator

stock B : TMB solution :-

TMB	0.36	n.
absolute ethanol	270	ml.

stock C : 5 % nickel ammonium sulfate

stock D : 5 % sodium nitroprusside (fresh preparation)

stock E : 0.75 % H_2O_2

Protocols :-

1. rinse section in distilled water (2 changes)
2. soaked in 5 % nicked ammonium sulfate 5 minutes (room temperature)
3. rinse in distilled water 5-10 seconds
4. incubate $0^{o}C$ in the solution 100 ml of A+B+D+E with frequent agitation every 5-10 minutes
5. add 0.75 % H_2O_2 0.5 ml every 20 minutes up to 1 hour
6. rinse in iced cold distilled water
7. mount on to slide
8. blot air dry
9. counterstained
10. dehydration and coverslip with permount

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจันทิมา ขนบดี เกิดเมื่อวันที่ 21 ตุลาคม พ.ศ. 2499 ณ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษาขั้นปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (การพยาบาลและผดุงครรภ์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จากคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2521 ปัจจุบันทำงานที่ภาควิชาพยาบาลศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ตำแหน่งอาจารย์ระดับ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย