

KVANTIFIKÁCIA PERICENTRÁLNYCH NADPH-DIAFORÁZOVÝCH NEURÓNŮV V MIECHE KRÁLIKA

KLUCHOVÁ D., ¹MARŠALA J., KOČIŠOVÁ M., GREGOR A.

DIFFERENT NUMBER OF PERICENTRAL NADPH-DIAPHORASE POSITIVE NEURONS IN THE RABBIT SPINAL CORD

Background: The freely diffusible radical nitric oxide is generated by nitric oxide synthase, and is bioregulatory molecule that functions as a major neurotransmitter. Constitutive nitric oxide synthase exhibits NADPH-diaphorase activity that can be demonstrated histochemically.

Objective: The purpose of the present investigation was to characterize and determine number of NADPH-diaphorase positive neurons around the central canal in all segments of the rabbit spinal cord.

Methods: Rabbits Chinchilla were used in this experiment. After intracardiac perfusion the spinal cords were removed, cut into slices and histochemical analysis of NADPH-diaphorase activity was performed. Sections were evaluated by using light microscope.

Results: NADPH-diaphorase positive pericentral neurons were present in cervical, thoracic, lumbar, sacral and coccygeal segments. They differed in the shape of their bodies and in length and branching of their processes. The main differentiation was observed in their number depending on the place of localisation. The highest number of these NADPH-diaphorase positive neurons was in sacral part (6 in average), the lowest one was noticeable in thoracic spinal cord (1—2 in average).

Conclusion: Thus, our study suggests that pericentral neurons of the rabbit spinal cord which are capable of synthesizing nitric oxide, differs in number amount depending on the place of their localization in each spinal cord segments. (Tab. 2, Fig. 9, Ref. 21.)

Key words: NADPH-d, pericentral, rabbit, spinal cord.

Pozadie problému: Voľný radikál oxid dusíka vzniká pomocou enzýmu syntázy oxidu dusíka a je to bioregulačná molekula, ktorá má funkciu neurotransmitera. Konštitutívna syntáza oxidu dusíka prejavuje NADPH-diaforázovú aktivitu, ktorú možno znázorniť histochemicky.

Cieľ práce: Cieľom predkladanej práce bolo charakterizovať a určiť množstvo NADPH-diaforázovo pozitívnych neurónov z okolia centrálného kanála vo všetkých segmentoch miechy kráľika.

Metódy: V pokuse sme použili králiky typu Činčila. Po vnútroštrbovej perfúzií sme miechy vyoperovali, narezali na mikrotóme a rezy sme histochemicky spracúvali na NADPH-diaforázovú aktivitu. Hodnotenie rezov sme urobili pomocou svetelného mikroskopu.

Výsledky: Pericentrálne NADPH-diaforázovo pozitívne neuróny sa nachádzali v krčných, hrudných, driekových, krížových aj kostrčových segmentoch. Odlišovali sa tvarom svojich tiel a dĺžkou i rozvetvením svojich výbežkov. Najväčšie rozdiely sme zaznamenali v ich počte, ktorý sa menil v závislosti od miesta ich lokalizácie. Najviac týchto NADPH-diaforázovo pozitívnych neurónov sme zistili v krížovej oblasti (priemerne 6 buniek), najmenej v hrudníkovej mieche (priemerne 1—2 bunky).

Záver: Z uvedeného vyplýva, že pericentrálne neuróny miechy kráľika, ktoré produkujú oxid dusíka, sa kvantitatívne odlišujú v závislosti od ich lokalizácie v jednotlivých miechových segmentoch. (Tab. 2, obr. 9, lit. 21.)

Kľúčové slová: NADPH-d, pericentrálny, králik, miecha.

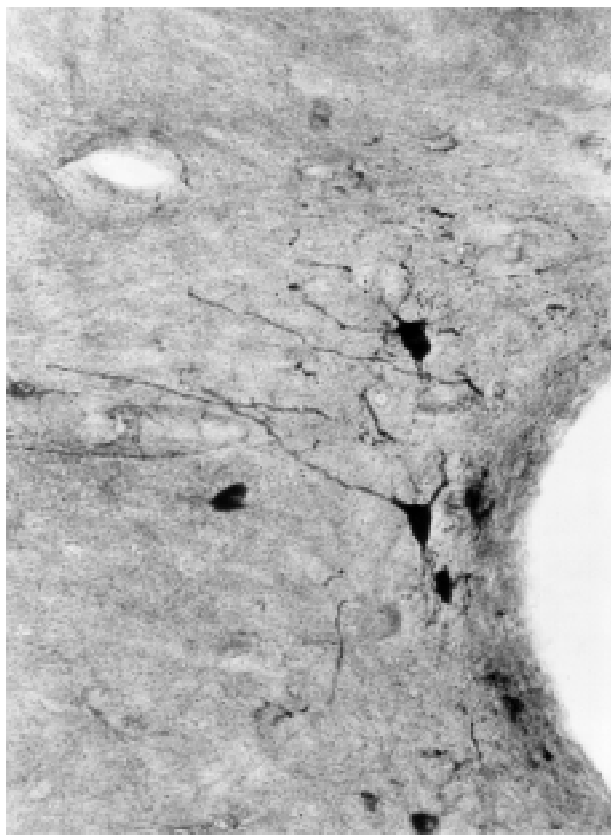
Bratisl Lek Listy 1998; 99: 610–616

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 11, s. 610–616

Úloha oxidu dusíka (NO — nitric oxide) ako nového možného neurotransmitera bola cieľom skúmania mnohých experimentov (Garthwaite, 1991; Vincent a Hope, 1992; Snyder, 1992). Pri-

tomnosť NO možno potvrdiť dôkazom syntázy oxidu dusíka (NOS — nitric oxide synthase). Je známe, že existuje niekoľko odlišných špecifických foriem tohto enzýmu (Bredt a Snyder, 1992). Neuronálna NOS je enzým, ktorý závisí od Ca^{2+} , kalmodulínu a NADPH (nikotínamidadeninindukleotidfosfát) a katalyzuje premenu arginínu na citrúlin za vzniku NO (Hope a spol., 1991; Garthwaite, 1991). Okrem toho sa dokázalo, že NOS je identická s neuronálnou NADPH-diaforázou (Dawson a spol., 1991; Hope a spol., 1991), čo umožňuje lokalizovať NOS pomocou špecifickej histochemickej metódy, v ktorej sa používa β -NADPH ako substrát a tetrazóliové farbivo ako chromogén (Thomas a Pearse,

Ústav anatómie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach a ¹Neurobiologický ústav Slovenskej akadémie vied v Košiciach
Department of Anatomy, Medical Faculty, Safarikians University, Košice,
and ¹Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Košice
Address for correspondence: D. Kluchová, MD, PhD, Ústav anatómie
LF UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice, Slovakia.
Phone: +421.95.622 8866



Obr. 1. Pohľad na NADPH-d pozitívne neuróny v lamina X krčnej časti miechy. Zväčš. 50-krát.
Fig. 1. View of NADPH-d positive neurons in cervical lamina X. x50.

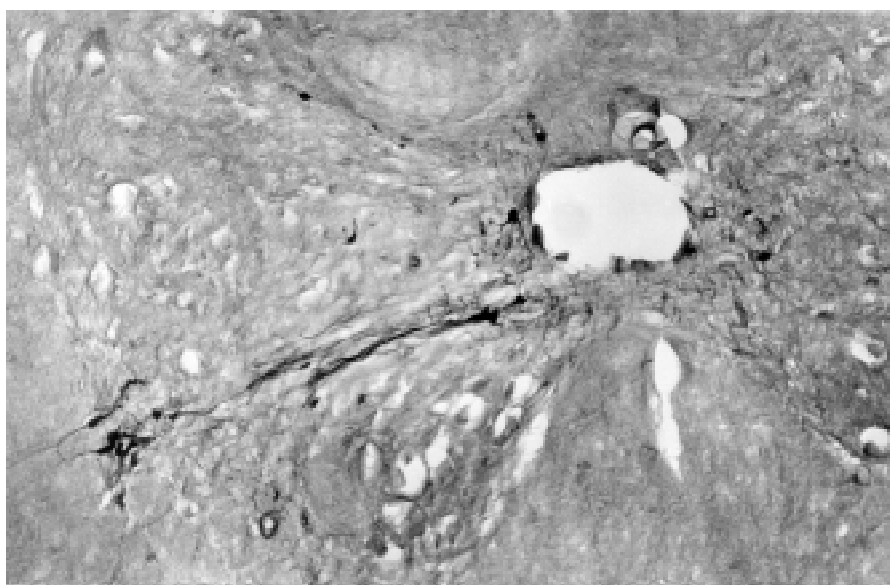
Tab. 1. Priemerný počet NADPH-d pozitívnych neurónov v jednotlivých segmentoch Rexedovej zóny X.
Tab. 1. Number of NADPH-d positive neurons of Rexed's zone X in each spinal cord segments (in average).

C1-6,75	Th1-2,34	L1-2,00	S1-4,94	Co-2,50
C2-5,82	Th2-1,56	L2-2,34	S2-5,89	
C3-5,55	Th3-1,42	L3-3,03	S3-4,59	
C4-4,62	Th4-2,00	L4-3,84	S4-3,77	
C5-3,92	Th5-2,33	L5-4,16		
C6-3,08	Th6-2,00	L6-3,80		
C7-3,00	Th7-1,80	L7-3,80		
C8-2,13	Th8-1,67			
	Th9-2,00			
	Th10-1,87			
	Th11-2,14			
	Th12-1,69			

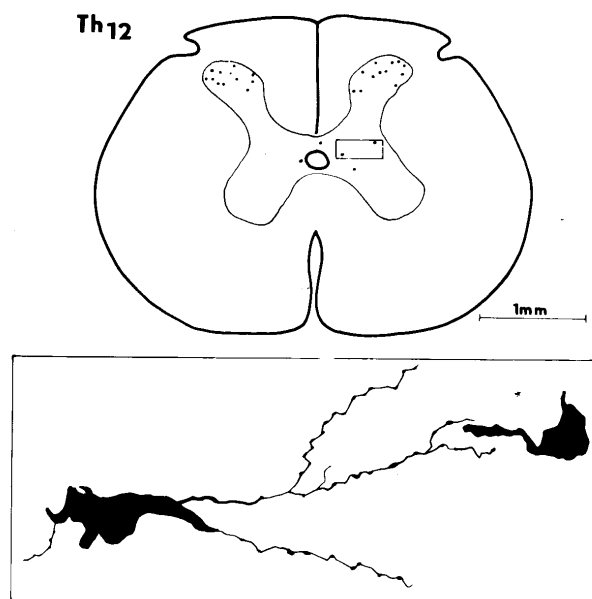
Segmenty: C — krčné, Th — hrudné, L — driekové, S — krížové, C — kostrčové.

1964). Reakčným produktom je nerozpustný tmavomodrý forma-zánový precipitát znázorňujúci neuróny s obsahom NOS, ktoré s veľkou pravdepodobnosťou využívajú NO ako neuronálnu messengerovú molekulu (Dawson a spol., 1991). Touto technikou sa selektívne farbila charakteristické skupiny neurónov v periférnom (Grozdanovic a spol., 1992), aj v centrálnom nervovom systéme (Vincent a Kimura, 1992).

Prítomnosť NOS nie vždy korelovala s NADPH-diaforázovou (NADPH-d) histochemickou reakciou (Vizzard a spol., 1994), aj keď mnoho prác dokazovalo rovnocenný vzťah medzi NADPH-d histochémiou a NOS imunoreaktivitou v tkanivách, ktoré boli fixované formaldehydom (Vincent a Kimura, 1992; Spessert a Laves, 1994). Rozdiel medzi NADPH-d aktivitou a NOS imunore-



Obr. 2. Smerovanie NADPH-d pozitívnych nervových výbežkov z okolia centrálného kanála v hrudníkovej mieche naznačuje spojenie s NADPH-d pozitívnymi neurónmi pravostranného IML jadra. Zväčš. 16-krát.
Fig. 2. The direction of NADPH-d positive nerve fibres around the thoracic central canal indicates the connection with the NADPH-d positive IML neurons on the right side. x16.



Obr. 3. Diagram transverzálneho rezu hrudnou miechou. NADPH-d pozitívne neuróny lamíny X a IML jadra. Zväčš. 120-krát.
Fig. 3. Diagram of transverse section through thoracic spinal cord. NADPH-d positive neurons of lamina X and IML. x120.

aktivitou sa zistil v niektorých oblastiach nervového systému (Vizard a spol., 1994). NADPH-d aktivita môže tiež vyjadrovať prítomnosť iných enzýmov než NOS, a teda ukázať, že nie vždy je špecifickým histochemickým markerom pre neurálne štruktúry, ktoré vlastnia NO. Vo všeobecnosti bol prijatý názor, že NADPH-

d aktivita je široko distribuovaná v centrálnom nervovom systéme a jej zhoda s NOS imunoreaktivitou je zrejme len vo fixovaných tkanivách, kde je veľká časť NADPH-d aktivity zničená fixačným procesom. Potom sa už zachováva len tá aktivita NADPH-d, ktorá sa zhoduje s NOS (Matsumoto a spol., 1993). NADPH-d reakcia teda poskytuje užitočnú metódu na identifikovanie a opis distribúcie NOS v neurónoch.

Pri sledovaní NADPH-d pozitívnych štruktúr v mieche kráľika sa zistila ich lokalizácia v troch hlavných oblastiach: v dorzálnych rohoch, v zona intermedia a v okolí centrálného kanála (Maršala a spol., 1997; Kluchová a spol., 1997). Prítomnosti NADPH-d aktivity v dorzálnych rohoch a v zona intermedia sa v posledných rokoch venovala značná pozornosť (Valtschanoff a spol., 1992; Anderson a spol., 1992), nenašli sme však v literatúre podrobnejšie údaje o lokalizácii takýchto štruktúr v oblasti okolo centrálného kanála. V tejto práci sme sa teda zamerali na štúdium NADPH-d pozitívnych neurónov v pericentrálnej oblasti pozdĺž celej miechy kráľika.

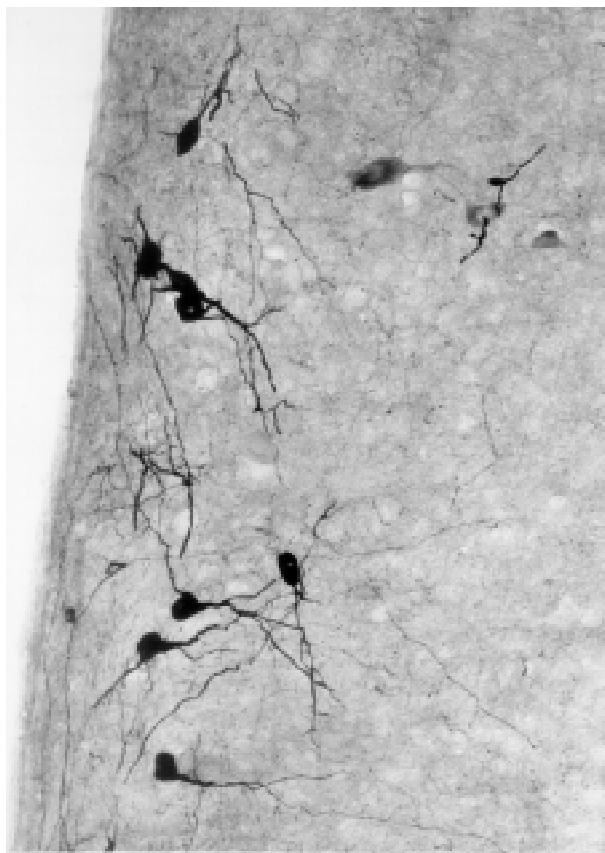
Materiál a metódy

V práci sme použili 9 kráľikov (rod Činčila) oboch pohlaví s hmotnosťou 2,5–3,0 kg. Experimentálne zvieratá sme anestetizovali pentobarbitalom (50 mg/kg, i.v.). Potom boli zvieratá usmrtené intrakardiálnou perfúziou fyziologickým roztokom a následne perfúzne fixované 4 % paraformaldehydom s 0,1 % glutaraldehydom v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Roztoky boli pripravované tesne pred perfúziou.

Po perfúzii boli miechy vyextrahované z vertebrálneho kanála a uložené vo fixatívne paraformaldehydu a glutaraldehydu počas 3–4 h. Nasledovalo ich uloženie v 30 % sacharóze v tom istom fosfátovom tlmivom roztoku cez noc pri 4 °C. Potom sme



Obr. 4. Transverzálny rez NADPH-d pozitívnymi neurónmi pericentrálnej zóny v driekovej oblasti. Zväčš. 25-krát.
Fig. 4. Transverse section through NADPH-d positive neurons of lumbar pericentral zone. x25.



Obr. 5. Longitudinálny rez NADPH-d pozitívnymi neurónmi pericentrálnej zóny v driekovej oblasti. Zväčš. 32-krát.
Fig. 5. Longitudinal section through NADPH-d positive neurons of lumbar pericentral zone. x32.

miechy narezali na zmrazovacom mikrotome priečne i pozdĺžne na rezy s hrúbkou 45 μ m.

Použitú histochemickú reakciu na znázornenie NADPH-d aktivity sme modifikovali podľa Scherera-Singlera a spol. (1993). Podľa nej sme rezy miechy inkubovali 1 h pri 37 °C v roztoku 1,5 mM nitroblue tetrazólia (NBT, Sigma Chemicals, N-6876), 1,0 mM β -nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH, Sigma Chemicals, N-1630), 10,0 mM monosodium malátu (Malic acid, Sigma Chemicals, M-1125), 0,5 % Tritonu X-100 rozpusteného v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 8,0. Kontrolné rezy sme inkubovali takým istým spôsobom, ale bez NADPH v reakčnom roztoku. Takto sme testovali endogénnu redukčnú aktivitu podľa Hopeho a Vincenta (1989).

Po inkubačnej reakcii sme rezy prepierali v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4), montovali na sklíčka a nechali vysušiť na vzduchu cez noc. Nakoniec sme tieto rezy pokrývali entellanom.

Výsledky

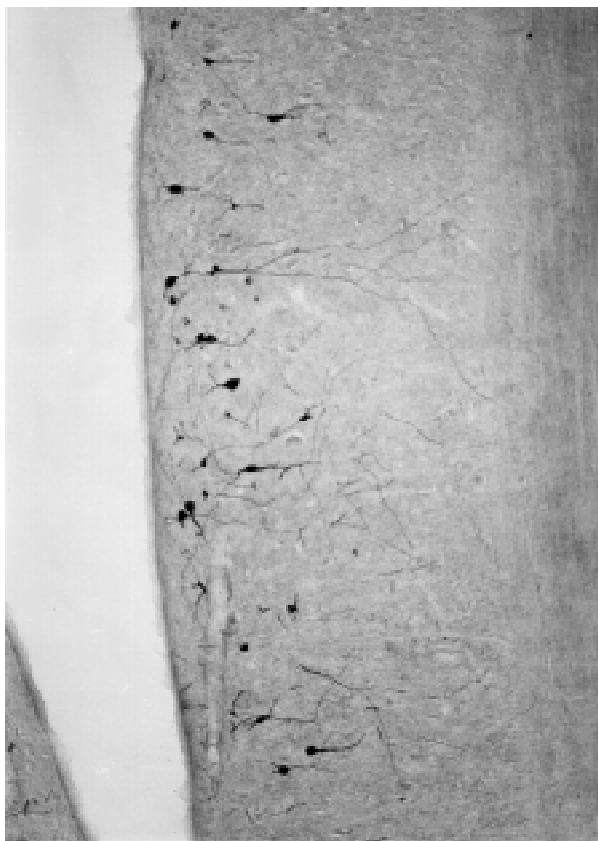
Štúdium NADPH-d pozitívnych neurónov v lamine X Rexedovej zóny ukázalo určité odlišnosti v tvare a počte týchto buniek, v závislosti od ich lokalizácie v jednotlivých miechových segmentoch. Kvôli vyjadreniu týchto rozdielov sme zisťovali priemerný počet neurónov laminy X v horizontálnych rezoch, pričom sme použili 40—47 rezov miechy z každého segmentu.

Krčná miecha

Kraniálna časť krčnej miechy ukázala veľké množstvo NADPH-d pozitívnych neurónov v okolí centrálného kanála. V priečných rezoch to bolo až takmer 7 buniek v priemere. Kaudálnym smerom tento počet klesal až na dva neuróny v jednom reze segmentu v priemere (tab. 1). Tvar týchto buniek bol trojuholníkový, s vý-



Obr. 6. Dlhé, nerozvetvené výbežky pericentrálnych NADPH-d pozitívnych neurónov v krížovej mieche. Zväčš. 25-krát.
Fig. 6. Long, unbranched fibres of pericentral NADPH-d positive neurons in sacral spinal cord. x25.



Obr. 7. Longitudinálny rez okolia centrálneho kanála v krížovej časti miechy. Zväčš. 16-krát.
Fig. 7. Longitudinal section through the sacral central canal zone. x16.

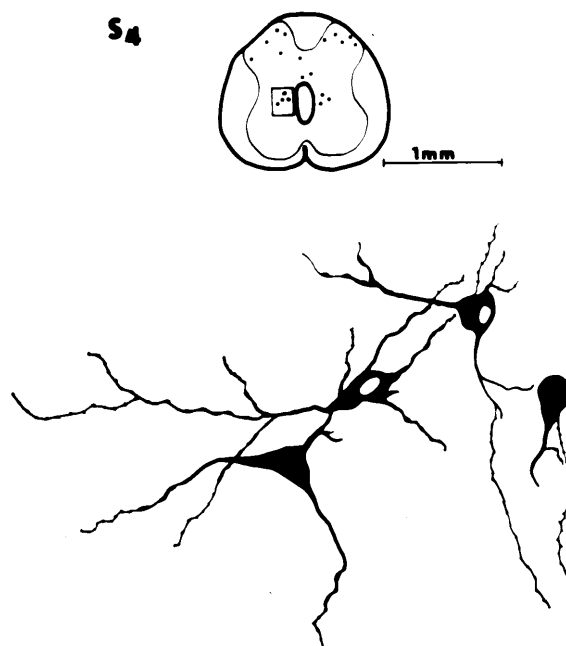
bežkami zasahujúcimi ventrálne, dorzálne i laterálne (obr. 1). Ich telá preukazovali silnú NADPH-d pozitivitu.

Hrudná miecha

Počet pericentrálnych NADPH-d pozitívnych neurónov v hrudnej mieche výrazne klesol až na 1,5–2 bunky v priemere rovnako vo všetkých jej segmentoch (tab. 1). Pozorovali sme väčšiu vzdialenosť týchto neurónov od ependymálnej vrstvy centrálneho kanála (obr. 2). Smerovanie výbežkov bolo prevažne laterálne, pri detailnejšom svetnomikroskopickom sledovaní tieto výbežky zjavne prichádzali do kontaktu s NADPH-d pozitívnymi pregangliovými neurónmi intermediolaterálneho (IML) jadra (obr. 2, 3).

Drieková miecha

NADPH-d pozitívne neuróny v lamine X driekovej miechy preukazovali nepravidelný tvar s bohato vetvenými výbežkami, najviac zreteľnými v oblasti intumescencia lumbalis (obr. 4). Tieto výbežky boli orientované menej laterálne, ale zasahovali hlboko do ventrálnych rohov. Na rozdiel od iných úrovní miechy bolo možné pozorovať v pericentrálnej driekovej oblasti okrem stredne



Obr. 8. Diagram transverzálneho rezu NADPH-d pozitívnymi neurónmi v lamine X krížovej miechy. Zväčš. 120-krát.
Fig. 8. Diagram of transverse section through NADPH-d positive neurons in lamina X of sacral spinal cord. x120.

silne sfarbených neurónov, aj NADPH-d pozitívne zvyšky nervových vlákien, a to v priečných aj v pozdĺžnych rezoch (obr. 4, 5). Počet NADPH-d pozitívnych buniek v lamine X tu narastal kraniokaudálnym smerom (tab. 1).

Krížová a kostrčová miecha

Tvar pericentrálnych NADPH-d pozitívnych neurónov v kaudálnej časti miechy mal iný vzhľad, než to bolo kraniálnejšie. Intenzívne sfarbené okrúhle, alebo oválne bunky boli zreteľne viditeľné na priečných i na pozdĺžnych rezoch (obr. 6, 7). Nerozvetvené výbežky, ktoré väčšinou smerovali laterálne, spôsobovali takmer hruškový tvar neurónov. V druhom krížovom segmente bolo priemerne 6 týchto buniek v priečnom reze. Potom už ich počet kaudálnym smerom prudko klesol (tab. 1). Vzdialenosť NADPH-d pozitívnych neurónov od ependymálnej vrstvy bola zjavne väčšia. V kaudálnej krížovej a v kostrčovej mieche klesol počet pericentrálnych buniek aj intenzita ich sfarbenia (obr. 8).

V okolí centrálneho kanála sa obzvlášť markantne prejavili rozdiely v počte NADPH-d pozitívnych neurónov. Pri zisťovaní priemerného počtu týchto buniek sme použili 40–47 rezov miechy pre každý segment zvlášť. Získané údaje sú v tabuľke 1.

Pri vyjadrení uvedených údajov graficky sme zistili, že v segmentoch krčnej miechy kraniokaudálne prudko klesá počet pericentrálnych NADPH-d pozitívnych neurónov (zo 7 na 2 bunky priemerne). Tento priemer (2 bunky) sa udržiaval na približne rovnakej úrovni v celej hrudnej mieche. V driekovej oblasti kontinuálne stúpala počet neurónov na 4 a vrchol dosia-



Obr. 9. Klesajúci počet pericentrálnych NADPH-d pozitívnych neurónov smerom od krížovej (hore) ku kostrčovej (dole) mieche. Zväčš. 6-krát.

Fig. 9. Decreasing number of pericentral NADPH-d positive neurons in direction from sacral (up) to coccygeal (down) spinal cord. x6.

hol v krížovej mieche (približne 6 buniek) v druhom segmente. Potom už počet pericentrálnych NADPH-d pozitívnych neurónov kaudálnym smerom prudko klesal (obr. 9). Na vysvetlenie možnej závislosti počtu uvedených neurónov od pomeru bielej a sivej hmoty miechy sme planimetricky zhodnotili vybrané segmenty miechy (tab. 2).

Podľa údajov z tabuľky 2 možno odvodiť závislosť počtu NADPH-d pozitívnych neurónov v lamine X od pomeru bielej a sivej hmoty miechy v uvedenom segmente.

Diskusia

NADPH-d pozitívne neuróny pericentrálnej oblasti tvorili významnú konštantnú skupinu buniek v celej mieche kráľika. Ich telá boli intenzívne sfarbené, hľadám len v kaudálnych krížových a v kostrčových segmentoch bola ich intenzita o niečo slabšia. Na transversálnych rezoch smerovali výbežky týchto buniek laterálne (najviac v hrudnej časti), ale aj ventrodorzálne obkružujú centrálny kanál. Ich prevažné kraniokaudálne smerovanie bolo zjavné na longitudinálnych rezoch. Tvar výbežkov bol roz-

Tab. 2. Vyhodnotenie bielej a sivej hmoty miechy a ich vzájomný pomer.

Tab. 2. The evaluation of spinal cord white and gray matter and the relation between each other.

Segmenty	C6	Th7	L6	S2
Biela hmota	74 %	83 %	65 %	54 %
Sivá hmota	26 %	17 %	35 %	46 %
Pomer bielej a sivej hmoty	2,94	4,78	1,87	1,17

vetvený, varikózný hlavne v driekovej časti. Najviac odlišností týchto výbežkov sme zistili v krížovej mieche, kde bolo možné ich pozorovať ako rovné, veľmi dlhé vlákna bez výraznejšieho vetvenia. Podobné výsledky zaznamenali Saito a spol. (1994) v mieche potkana.

Zaujímavé bolo zistenie rôzneho počtu NADPH-d pozitívnych buniek tejto časti miechy v kraniokaudálnom smere. Na vysvetlenie tejto skutočnosti sme určovali vzájomný pomer medzi sivou a bielou hmotou v jednotlivých segmentoch miechy. Z tabuľky 2 vyplýva, že rozsah sivej hmoty je v jednotlivých segmentoch rozdielny. O tom, či je na priečnom reze v určitom miechovom segmente viacej alebo menej sivej hmoty, rozhoduje rozsah príslušnej senzitivnej a motorickej inervačnej oblasti, ktorú zmiešaný spinálny nerv inervuje. Čím je periférna inervácia hojnejšia, tým je rozsah sivej hmoty miechy na priečnom reze väčší a znižuje sa aj počet spočítateľných nervových buniek (Maršala, 1985). Z tohto zdôvodnenia vyplýva, že plošne i objemovo je sivá hmota najväčšia v tých miechových segmentoch, ktoré sa nachádzajú v rozsahu krčnej a driekovej navreliny, čiže v rozsahu tých segmentov, z ktorých vychádza inervácia pre predné a zadné končatiny. Hrudné a kranálne driekové segmenty majú pomerne málo sivej hmoty preto, lebo ich periférna inervačná oblasť je malá.

Počet NADPH-d pozitívnych neurónov v mieche kráľika zodpovedal tomuto zdôvodneniu len v lamine X, teda v okolí centrálného kanála. Takúto závislosť sme nepozorovali u NADPH-d pozitívnych buniek v ostatných Rexedových zónach. Najmenšie množstvo NADPH-d pozitívnych neurónov laminy X v hrudnej a najväčšie v krížovej mieche jasne ukazuje závislosť od množstva sivej hmoty v danej oblasti. Na druhej strane, deficit týchto buniek v hrudnej mieche bol akoby kompenzovaný množstvom NADPH-d pozitívnych neurónov v intermediolaterálnom jadre (Kluchová a spol., 1998). Z funkčného hľadiska sa neuróny pericentrálnej oblasti považujú za interneuróny, ktoré prijímajú viscerálne aferentácie (Saito a spol., 1994) a sú zapojené do autonómnych reflexných dráh (DeGroat a spol., 1996). Lee a spol. (1993) ich identifikovali ako neuróny miechových dráh.

Prítomnosť NADPH-d sfarbenia v bunkách pericentrálnej zóny miechy kráľika svedčí o ich utilizácii NO. Detailnú fyziologickú úlohu NO v týchto NADPH-d pozitívnych neurónoch bude potrebné upresniť v ďalších experimentoch.*

*Autori dakujú R. Weiserovej za precíznu technickú asistenciu pri vzniku tejto práce.

Literatúra

- Anderson C.R.:** NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci. Lett.*, 139, 1992, s. 280–284.
- Bredt D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8, 1992, s. 3–11.
- Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Bredt D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 6368–6371.
- DeGroat W.C., Yoshimura N., Roppold J.R., Erdman S.L., Erickson V.L., Yu Y.-B., Card J.P., Vizzard M.A.:** Identification of bladder preganglionic (PEN) and interneurons (INTs) in the L6-S1 spinal cord of the adult rat using pseudorabies (PRV) and fluorogold (FG) dye tracing techniques. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1996 (v tlači).
- Garthwaite J.:** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 14, 1991, s. 60–67.
- Grozdanic Z., Baumgarten H.G., Bruning G.:** Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. *Neuroscience*, 48, 1992, s. 225–235.
- Hope B.T., Vincent S.R.:** Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 1989, s. 653–661.
- Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R.:** Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 2811–2814.
- Kluchová D., Rybárová S., Schmidtová K., Kočíšová K., Dorko F.:** Aktivita NADPH-diaforázy v mieche kráľika. *Folia Med. Cass.*, 54, 1997, s. 35–44.
- Kluchová D., Schmidtová K., Dorko F., Pomfy M.:** Aktivita NADPH-d v autonómnych pregangliových jadrách miechy kráľika. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 267–273.
- Lee J.H., Price R.H., Williams F.G., Mayer B., Beitz A.J.:** Nitric oxide synthase is found in some spinothalamic neurons and in neuronal processes that appose spinal neurons that express Fos induced by noxious stimulation. *Brain Res.*, 608, 1993, s. 324–333.
- Maršala J.:** Systematická a funkčná neuroanatómia. Martin, Osveta 1985, 782 s.
- Maršala J., Kluchová D., Maršala M.:** Spinal cord gray matter layers rich in NADPH diaphorase positive neurons are refractory to ischemia—reperfusion—induced injury: a histochemical and silver impregnation study in rabbit. *Exp. Neurol.*, 145, 1997, s. 1–16.
- Saito S., Kidd G.J., Trapp B.D., Dawson T.M., Bredt D.S., Wilson D.A., Traystman R.J., Snyder S.H., Haley D.F.:** Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience*, 59, 1994, s. 447–456.
- Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGeer E.G.:** Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods*, 8, 1983, s. 229–234.
- Snyder S.H.:** Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science*, 257, 1992, s. 494–496.
- Spessert R., Layes E.:** Fixation conditions affect the intensity but not the pattern of NADPH-diaphorase staining as a marker for neuronal nitric oxide synthase in rat olfactory bulb. *J. Histochem. Cytochem.*, 42, 1994, s. 1309–1315.
- Thomas E., Pearse A.G.E.:** The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-diaphorase reaction. *Acta Neuropathol.*, 3, 1964, s. 238–249.
- Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Rustioni A.:** NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.*, 321, 1992, s. 209–222.
- Vincent S.H., Hope B.T.:** Neurons that say NO. *Trends Neurosci.*, 46, 1992, s. 755–784.
- Vincent S.R., Kimura H.:** Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46, 1992, s. 755–784.
- Vizzard M.A., Erdman S.L., Roppolo J.R., Forsterman U., DeGroat W.C.:** Differential localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in the cat spinal cord. *Cell Tissue Res.*, 278, 1994, s. 299–309.

Do redakcie došlo 20.8.1997.