

NITRERGIC AND CHOLINERGIC CO-EXPRESSION IN THE RABBIT SPINAL CORD

KLUCHOVA D, SCHMIDTOVA K, MIKLOSOVA M, LOVASOVA K, RYBAROVA S

KOEXISTENCIA CHOLÍNERGICKÉHO A NITRERGICKÉHO NEUROTRANSMITERA V MIECHE KRÁLIKA

Abstract

Kluchova D, Schmidtova K, Miklosova M, Lovasova K, Rybarova S:

Nitric and cholinergic co-expression in the rabbit spinal cord

Bratisl Lek Listy 2000; 101 (1): 18–23

Nitric oxide (NO) plays a major role as a neuronal messenger molecule. NO has been assumed to act as a retrograde signalling molecule that modulates transmitter release. Acetylcholine (ACh) is known to function as a typical neurotransmitter. In the present work the presence of both transmitters (NO and ACh) and their possible relations in the rabbit spinal cord were examined.

In our experiments histochemical methods for the visualisation of acetylcholinesterase (AChE) and NADPH diaphorase (NADPH-d) were used. Both histochemical methods were performed separately and together on the same sections of the thoracic spinal cord.

NADPH-d positive dark blue stained neurons were mainly detected in superficial and deep layers of dorsal horn, preganglionic autonomic neurons and pericentral area (1). The presence of AChE positive amber yellow neurons was confirmed mostly in motoneurons located in ventral horns and then in neurons of the intermediate zone. Except for the above mentioned also double-labeled neurons containing both yellow and dark blue histochemical product were noticed. Their presence was confirmed in the intermediate zone and in the pericentral area. Thus, the coexistence of NADPH-d and AChE was confirmed in the area of interneurons.

These observations suggest that NO may play a role in the control of cholinergic neuronal activity and that NO can be involved in the modulation of synaptic transmission. (*Fig. 9, Ref. 21.*)

Key words: NADPH-d, AChE, coexistence, spinal cord.

Abstrakt

Kluchová D., Schmidtová K., Miklosová M., Lovasová K., Rybářová S.:

Koexistencia cholínergického a nitrergického neurotransmitera v mieche kráľíka

Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 1, s. 18–23

Úloha oxidu dusnatého (NO) vo funkcii neurónovej messengerovej molekuly sa v posledných rokoch študovala veľmi intenzívne. Predpokladá sa, že NO účinkuje ako retrográdna signálna molekula, ktorá ovplyvňuje uvoľňovanie transmitera. O acetylcholíne (ACh) je známe, že je typickým neurotransmitterom. V predloženej práci sme zisťovali prítomnosť oboch transmiterov (NO a ACh) a ich možné vzájomné spolupôsobenie v mieche kráľíka.

Pri pokusoch sme použili histochemické metódy vizualizácie acetylcholinesterázy (AChE) a NADPH diaforázy (NADPH-d), ktorá znázorňuje neuróny s obsahom syntázy NO (NOS). Obe histochemické metódy sme použili oddelene, aj spolu na jednotlivých rezoch hrudníkovej miechy.

NADPH-d pozitívne tmavomodro sfarbené neuróny bolo možné vidieť hlavne v dorzálnych rohoch, v autonómnych pregangliových neurónoch a v pericentrálnej oblasti. Prítomnosť AChE pozitívnych jantárovožltých neurónov sa potvrdila hlavne v motoneurónoch predných rohov, v autonómnych pregangliových neurónoch a potom v neurónoch zona intermedia. Okrem toho sme tiež zaznamenali dvojito sfarbené neuróny s obsahom tmavomodrého i jantárovožltého histochemického produktu. Ich prítomnosť sa potvrdila v zona intermedia a v pericentrálnej oblasti. Táto koexistencia AChE a NADPH-d sa teda vyskytovala v oblasti, kde sú prítomné interneuróny.

Koexistencia NADPH-d a AChE sa potvrdila v lokalitách výskytu interneurónov. Z uvedených výsledkov možno dospieť k záveru, že NO má pravdepodobne významnú úlohu pri kontrole cholínergickej neurónovej aktivity a že sa teda môže zúčastňovať na modulácii synaptickej transmisie. (*Obr. 9, lit. 21.*)

Kľúčové slová: NADPH-d, AChE, koexistencia, miecha.



Fig. 1. Preview of the rabbit thoracic spinal cord stained for AChE and NADPH-d (3,2x3,2).

Obr. 1. Celkový pohľad na priečny rez hrudníkovou miechou kráľika sfarbenou na AChE a NADPH-d (3,2x3,2).

S prudkým rozvojom poznatkov o nových molekulách slúžiacich na prenos informácií v nervovom systéme sa vynára otázka, v akom vzťahu sú tieto nové neurotransmitery ku klasickým mediátorom. Z doterajších výskumov bolo známe, že jeden neurón môže produkovať iba jeden druh mediátora. Práce z posledných rokov však potvrdzujú, že neurocyt môže tvoriť aj niekoľko mediátorov, to znamená, že pri neurotransmisii bude v bunke prebiehať oveľa komplexnejší proces (Panzica a Garzino, 1997; Crespo a spol., 1998).

Acetylcholin (ACh) je dobre známym neurotransmitterom, ktorý má dôležitú úlohu pri prenose vzruchov v mieche. Cholinergické neuróny možno identifikovať v mieche použitím acetylcholinesterázovej (AChE) histochemie (Malátová a Maršala, 1993). Aj keď AChE nie výlučným markerom pre cholinergické neuróny, potvrdilo sa, že tieto bunky sú svojím charakterom cholinocéptívne a poskytujú vhodnú informáciu o nervovom systéme využívajúcom ACh (Butcher a Wolf, 1984). V mieche sa zistilo najmenej päť odlišných typov cholinergických neurónov (Sheriff a Henderson, 1994). Patria sem: 1. somatické motorické neuróny (lamina VIII a IX), 2. autonómne pregangliové neuróny v hrudníkovej

(sympatikové) a driekovej (parasympatikové) časti miechy, 3. neuróny zona intermedia (lamina VII), 4. pericentrálne neuróny (lamina X) a 5. neuróny v hlbokoj vrstve dorzálnych rohov (lamina III-V). Posledné tri skupiny tvoria len malú časť celkovej populácie neurónov v mieche. Funkčná úloha ACh sa potvrdila v modulácii primárnych sensorických prenosov v mieche, obzvlášť prenosov spojených s nocicepciou (Gordh a spol., 1989).

Ďalší messenger je oxid dusíka (nitric oxide — NO), voľný radikál, ktorý ako plyn môže bez prekážok difundovať z bunky, v ktorej vznikol, do bezprostredného okolia a takto pôsobiť na všetky susedné bunky (Bredt a Snyder, 1992). Táto vlastnosť umožňuje NO spĺňať rozličné úlohy v centrálnom nervovom systéme. NO tvorený v nitrergických neurónoch môže byť určený použitím NADPH-diaforázovej (NADPH-d) histochemie (Dawson a spol., 1991; Hope a spol., 1991). V mieche sa vyskytuje päť oblastí, v ktorých možno nájsť NADPH-d pozitívne neuróny. Sú to: 1. autonómne pregangliové neuróny, 2. neuróny zona intermedia (lamina VII), 3. pericentrálne neuróny (lamina X), 4. neuróny v hlbokoj vrstve (lamina III-V) a 5. povrchovej vrstve (lamina I-II) dorzálnych rohov (Kluchová a spol., 1997, 1998; Maršala a spol., 1997). Veľká časť NADPH-d pozitívnych štruktúr je zapojená do sensorických procesov a viscerálnej regulácie, čím sa naznačuje úloha NO ako neurotransmitera v mieche (Valtschanoff a spol., 1992).

V tejto práci sme sa pokúsili zistiť, či existuje nejaká skupina neurónov, ktoré by poukazovali na prítomnosť oboch transmiterov, a teda boli dvojito sfarbené, alebo či všetky neuróny sú v tomto zmysle heterogénne. Pri hodnotení týchto dvoch možností sme použili NADPH-d aj AChE histochemiu na tých istých rezoch hrudníkovej miechy.

Materiál a metódy

Ako experimentálny materiál pre štúdium danej problematiky sme si zvolili miechu kráľika so zameraním na jej hrudníkovú časť. V pokusoch boli všetky experimentálne zvieratá anestetizované pentobarbitalom (50 mg/kg i.v.). Potom boli zvieratá usmrtené intrakardiálnou perfúziou fyziologickým roztokom. Po perfúzii boli miechy vyoperované z vertebrálneho kanála. Pre vizualizáciu AChE sme použili histochemickú metódu podľa El Badawihho a Schenka (1967).

Pri spracovaní na znázornenie NADPH-diaforázy (NADPH-d) sme po úvodnej perfúzii fyziologickým roztokom použili následnú perfúziu 4 % paraformaldehydom s 0,1 % glutaraldehydom v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Roztoky boli čerstvé, pripravované tesne pred perfúziou. Po perfúzii a vyoperovaní miech z vertebrálneho kanála sme ich uložili v rovnakom fixačnom roztoku počas 3—4 h. Nasledovalo ich umiestnenie v 30 % sacharóze v tom istom fosfátovom pufrí cez noc pri 4 °C. Potom sme miechy narezali na zmrazovacom mikrotóme na rezy s hrúbkou 45 µm. Histochemické spracovanie na NADPH-d sme urobili, ako bolo opísané v predošlých prácach (Kluchová a spol., 1997, 1998; Maršala a spol., 1997). Táto metóda sa osvedčila ako vhodný marker syntázy NO (NOS), t.j. enzýmu, ktorý syntetizuje NO v neurónoch.

Kontrolu NADPH-d aktivity sme urobili tak, že pri histochemickom spracovaní sme vynechali z reakcie b-NADPH, pre kontrolu AChE sme vynechali substrát acetylcholinjodid (Alonso



Fig. 2. Three types of neurons with different staining in the deep part of dorsal horn (25x4).
Obr. 2. Tri typy neurónov s odlišným sfarbením v hlokej vrstve dorzálneho rohu (25x4).



Fig. 3. Longitudinal section through the lamina VII shows the presence of single AChE and NADPH-d positive neurons, and double stained colocalized neurons (25x2).
Obr. 3. Pozdĺžny rez laminou VII ukazuje prítomnosť jednotlivých AChE a NADPH-d pozitívnych neurónov, ale tiež dvojito sfarbené kolokalizované neuróny (25x2).

a spol., 1995). Pri týchto experimentoch sme nezistili žiadnu reziduálnu aktivitu.

Po skončení reakcie sme rezy preplachovali v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4) a montovali na sklíčka. Rezy, vysušené cez noc, sme potom pokrývali Entellanom.

Výsledky

Pozorovanie rezov miechy farbených na NADPH-d a AChE potvrdilo, že veľká časť neurónov preukazovala prítomnosť oboch enzýmov buď samostatne, alebo súčasne v jednej bunke (obr. 1).

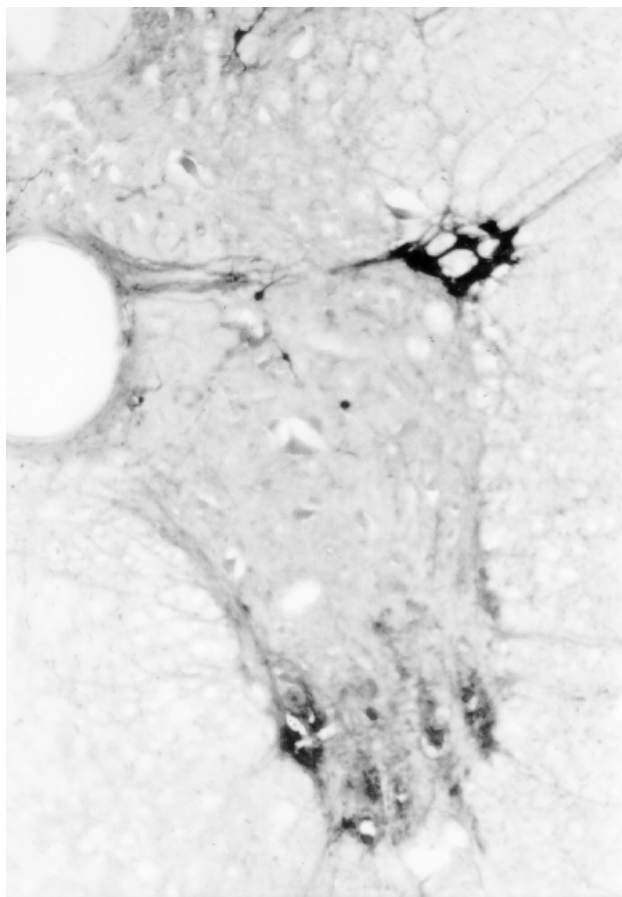


Fig. 4. Ventral horn showed the presence of only AChE positive neurons with no NADPH-d staining (10x2,5).
Obr. 4. Vo ventrálnych rohoch sa zistila výlučná prítomnosť AChE pozitívnych neurónov bez NADPH-d sfarbenia tejto lokality (10x2,5).

Dvojité farbenie rezov miechy ukázalo pri pozdĺžnom reze cez laminu VII 3 rôzne sfarbenia neurónov (obr. 2):

1. neuróny značené NADPH-diaforázou ukázali tmavomodrý reakčný produkt,
2. AChE-pozitívne neuróny sa znázorňovali ako jantárovo žlté štruktúry,
3. dvojito sfarbené neuróny poukazujúce na kolokalizáciu oboch predošlých enzýmov sa javili ako sivofialové útvary.

Teda každý z troch typov neurónov bolo možné rozpoznať podľa ich typického sfarbenia (obr. 3). Pri priečnom reze cez hrudníkovú miechu sme zistili všetky tri druhy sfarbenia, ale ich prítomnosť bola odlišná v jednotlivých Rexedových zónach (obr. 1).

Pri vyššom zväčšení ventrálneho rohu bolo zrejmé, že jednotlivé skupiny motoneurónov sa znázorňovali iba jantárovožlto, t.j. na AChE, iné sfarbenie sme tam nenašli (obr. 4). V oblasti IML jadier sme pozorovali zhluky pregangliových neurónov s rôznym farbením (obr. 4). Kvôli prehľadnosti sme skontrolovali aj pozdĺžne rezy (obr. 5), kde sme potvrdili aj samostatné farbenie na NADPH-diaforázu, aj na AChE. Zistili sme aj prítomnosť dvojitého sfarbenia, ktoré svedčí o kolokalizácii oboch enzýmov.

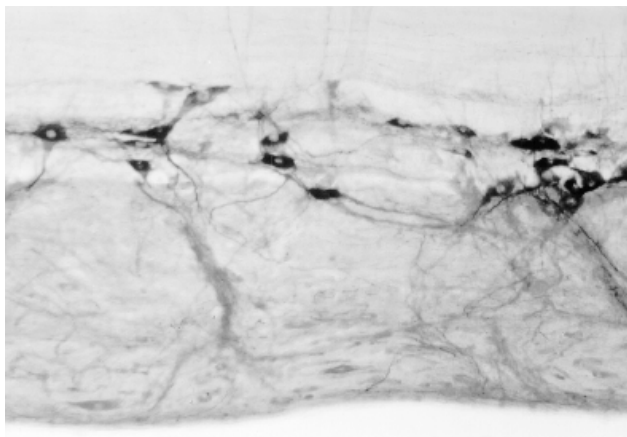


Fig. 5. In the area of autonomic preganglionic neurons both NADPH-d and AChE enzymes were confirmed in separately and colocalized neurons (10x4).

Obr. 5. V oblasti autonómnych pregangliových neurónov sa potvrdila prítomnosť aj NADPH-d aj AChE enzýmov, a to v jednotlivých aj v kolokalizovaných neurónoch (10x4).

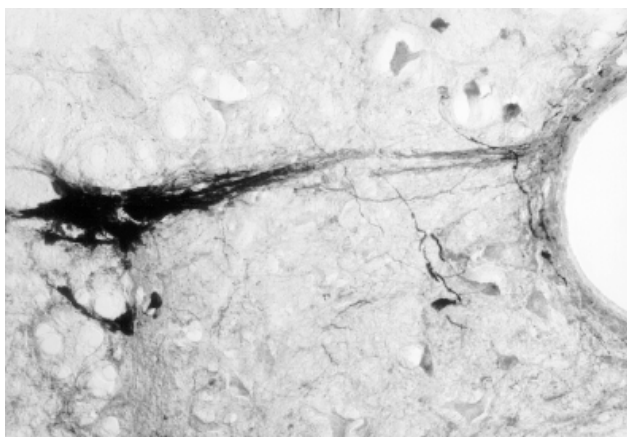


Fig. 6. The investigation of pericentral area revealed the presence of single AChE positive yellow neurons, single NADPH-d positive dark blue neurons and a number of cells expressing both colocalized enzymes (25x2).
Obr. 6. Skúmanie pericentrálnej oblasti ukázalo prítomnosť samostatných AChE pozitívnych žltých neurónov, samostatných NADPH-d pozitívnych tmavomodrých neurónov a tiež bunky vykazujúce prítomnosť oboch kolokalizovaných enzýmov (25x2).

V poslednej skúmanej lokalite sme sa zamerali na okolie centrálného kanála a príslušnú Rexedovu zónu VII, kde sme zistili všetky 3 typy sfarbení v jednotlivých neurónoch (obr. 6, 7).

Oblasť dorzálnych rohov (obr. 8) ukázala v povrchových vrstvách výlučne NADPH-diaforázové tmavomodré sfarbenie. Štruktúry pozitívne na AChE sme zistili hlavne v hlbokých vrstvách dorzálnych rohov, pričom ojedinele tu bolo možné pozorovať aj výskyt dvojito sfarbených kolokalizovaných neurónov. Nezistili sme žiadnu kolokalizáciu v povrchových vrstvách dorzálnych rohov (obr. 8).

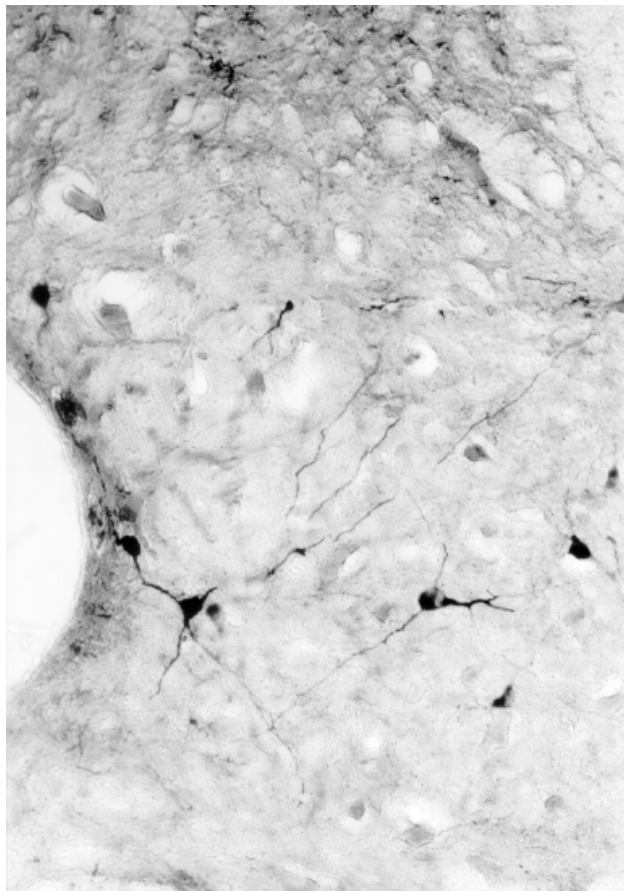


Fig. 7. In the intermediate zone (lamina VII) all three types of neurons were detected (25x2).

Obr. 7. V zona intermedia (lamina VII) sa nachádzali všetky tri typy neurónov (25x2).

Diskusia

Použitím NADPH-d a AChE histochemie sme potvrdili koexistenciu medzi NADPH-d a AChE neurónmi v mieche kráľika. Táto kolokalizácia je však len čiastočná. Počet kolokalizovaných neurónov varíoval v jednotlivých Rexedových zónach miechy, a to od nulovej kolokalizácie vo ventrálnych rohoch a v povrchových vrstvách dorzálnych rohov, až po maximálny výskyt takýchto neurónov v zona intermedia (lamina VII) a v pericentrálnej oblasti (lamina X).

V centrálnom nervovom systéme sa študovali rozmanité interakcie medzi produkciou NO a ACh (Crespo a spol., 1998). NO môže ovplyvňovať cholinergickú transmisiu v presynaptickej alebo postsynaptickej časti na úrovni periférnych nervov v svalstve (Baccari a spol., 1994). Zdá sa, že NO má značný inhibičný účinok na uvoľňovanie ACh v rôznych lokalitách, ako napr. trachea (Belvisi a spol., 1991) a tenia coli (Knudsen a Tottrup, 1992).

Najnovšie štúdie potvrdzujú, že transmisia v nervovom systéme je nesmierne zložitý, komplexný proces a chemické procesy



Fig. 8. View on the dorsal horn confirmed single AChE and NADPH-d positive structures, but double labelled neurons were seen only rarely in its deep parts. In the superficial layers no coexistence of enzymes was found.

Obr. 8. Pohľad na dorzálné rohy potvrdil prítomnosť jednotlivých AChE a NADPH-d pozitívnych štruktúr, ale dvojito sfarbené neuróny bolo možné vidieť len zriedkavo v jeho hlbokých častiach. V povrchových vrstvách sa nezistila žiadna koexistencia.

v senzorických i motorických prenosoch zahrňujú širokú škálu látok — transmiterov s rozličnými vlastnosťami, ako je syntéza, uskladnenie, vylúčenie, receptory a inaktivácia. Tieto procesy prejavujú do určitej miery druhové a tkanivové odlišnosti, no najpravdepodobnejšie je, že rozličné kombinácie transmiterov odrážajú ich špecifické funkcie.

Pri hodnotení uvedených výsledkov sa vynorila otázka: k akému mechanizmu dochádza pri transmisii v takom neuróne, ktorý prejavuje obojaké sfarbenie? Pôsobenie ACh je známe už dlhšie, účinok plynného NO bol objavený len v poslednom desaťročí (Bredt a Snyder, 1992; Kluchová 1999). Doteraz však nie je známy mechanizmus spolupôsobenia takýchto dvoch neurotransmiterov v mieche. Preto sme sa pokúsili vytvoriť hypotézu, podľa ktorej by bolo možné vysvetliť vzájomné vzťahy ACh a NO (obr. 9).

Zvláštnosťou NO ako plynného mediátora je jeho schopnosť difundovať z miesta svojho vzniku z postsynaptickej časti na pre-

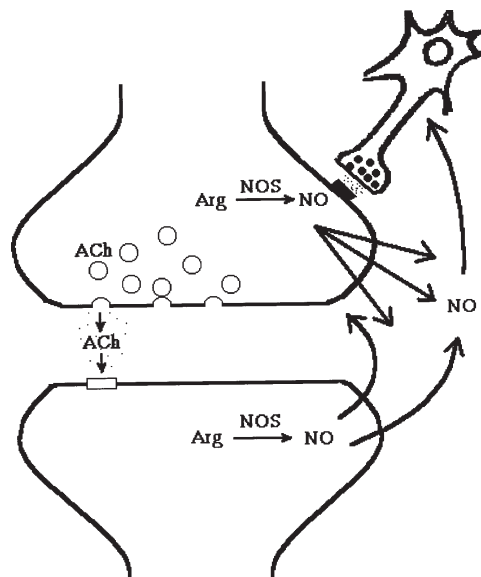


Fig. 9. Diagram of NO influence on ACh release in complex mechanism of presynaptic inhibition.

Obr. 9. Schéma vplyvu NO na uvoľňovanie ACh v komplexnom mechanizme presynaptickej inhibície.

synaptické časti príľahlých štruktúr, teda jeho pôsobenie sa uskutočňuje formou retrográdneho mediátora, pričom jeho účinok na tieto štruktúry je inhibičný (Garthwaite, 1995). NO môže fungovať ako inhibičný neurotransmitter na interneurónoch predstavujúcich presynaptickú časť podieľajúcu sa na tvorbe tohto komplexu. NO pôsobí priamo na K^+ -kanály, čím spôsobí hyperpolarizáciu s následným poklesom až zastavením vyplavovania mediátora tohto interneurónu. Týmto spôsobom dokáže NO ovplyvňovať uvoľňovanie mediátora, ktorý môže byť úplne inej chemickej podstaty ako ACh a NO v kolokalizovanom neuróne. Tento fakt poukazuje na vysoký stupeň komplexnosti tohto systému. Inhibičné pôsobenie NO na interneurón sa teda následne prejaví poklesom vyplavovania ACh. Receptory pre mediátor interneurónu sa nachádzajú na kolokalizovanom neuróne, inhibičné pôsobenie NO na interneurón sa však následne prejaví poklesom vyplavovania ACh. NO sa teda takýmto mechanizmom môže podieľať na modulácii účinku ACh, a to reguláciou množstva jeho vylučovania.

Túto hypotézu podporuje aj fakt, že prítomnosť kolokalizovaných neurónov sme najčastejšie zaznamenali v okolí centrálného kanála a v Rexedovej zóne VII, ktoré sú známe ako oblasti najväčšieho výskytu interneurónov. Potvrdenie tejto hypotézy však bude vyžadovať ďalšie komplexnejšie štúdie. Uvedený systém transmisie by bolo možné využiť v klinickej praxi pri takých patologických stavoch, kde nie je transmitterská odpoveď organizmu zrejma, resp. nie je v súlade s očakávanou reakciou.

Veľký význam tohto poznania vidíme aj pri opise farmakologických procesov prebiehajúcich na bunkovej úrovni po aplikácii liekov. V takom prípade je potrebné zohľadniť všetky transmitterské systémy zahrnuté v nervovom prenose.

Uvedená práca teda môže byť odrazovým mostíkom pri klinicky významných štúdiách NO a jeho úlohy v patogenéze rozličných nervových ochorení.

Záver

Použitím histochemických metód na znázornenie NADPH-d a AChE na tých istých rezoch sme zistili prítomnosť jednotlivo i dvojito sfarbených neurónov. Táto odlišnosť sfarbenia môže byť odrazom využitia rôznych intercelulárnych transmittorov, ktoré môžu plniť rozdielne funkcie v centrálnom nervovom systéme.

Literatúra

- Alonso J.R., Arevalo R., Brinon J.G., Garcia-Ojeda E., Porteros A., Aijon J.:** NADPH-diaphorase staining in the central nervous system. S. 1—11. In: Wouterlood F.G. (Ed.): Neuroscience protocols, 0509-04. Amsterdam, Elsevier 1995.
- Baccari M.C., Calamai F., Staderini G.:** Modulation of cholinergic transmission by nitric oxide, VIP and ATP in the gastric muscle. *Neuroreport*, 5, 1994, s. 905—908.
- Belvisi M.G., Stretton D., Barnes P.J.:** Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, 198, 1991, s. 219—221.
- Bredt D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8, 1992, s. 3—11.
- Butcher L.L., Wolf N.J.:** Histochemical distribution of acetylcholinesterase in the central nervous system: clues to the localization of cholinergic neurons. S. 1—50. In: Bjorklund A., Hokfelt T., Kuhar M.J. (Eds.): Handbook of Chemical Neuroanatomy. Amsterdam, Elsevier 1984.
- Crespo C., Sanchez F., Alonso J.R., Arevalo R., Carretero J., Aijon J., Vazquez R.:** Partial co-existence of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase in the hypothalamic magnocellular secretory nuclei of the rat. *J. Chem. Neuroanat.*, 14, 1998, s. 71—78.
- Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H.:** Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 7797—7801.
- El Badawi A., Schenk E.A.:** Histochemical methods for separate, consecutive and simultaneous demonstration acetylcholinesterase and norepinephrine in cryostat sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 1967, s. 580—588.
- Garthwaite J.:** Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.*, 18, 1995, s. 51—52.
- Gordh T., Jansson I., Hartvig P., Gillberg P.-G., Post P.:** Interactions between noradrenergic and cholinergic mechanisms involved in spinal nociceptive processing. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 33, 1989, s. 39—47.
- 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 M., Dorko F.:** The activity of NADPH-diaphorase in the rabbit spinal cord. *Folia Med. Cass.*, 54, 1997, s. 35—44.
- Kluchová D., Schmidtová K., Dorko F., Pomfy M.:** The activity of NADPH-diaphorase in autonomic preganglionic neurons of rabbits. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 267—273.
- Kluchová D.:** Neurodegeneration and NO. *Bratisl. lek. Listy*, 100, 1999, s. 144—149.
- Knudsen M.A., Tottrup A.:** A possible role of the L-arginine nitric oxide pathway in the modulation of cholinergic transmission in the guinea pig tenia coli. *Brit. J. Pharmacol.*, 107, 1992, s. 837—841.
- Malatova Z., Marsala J.:** Cholinergic enzymes in spinal cord infarction — biochemical and histochemical changes. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 19, 1993, s. 283—296.
- 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. 165—179.
- Panzica G.C., Garzino A.:** Anatomically specific colocalization of NADPH-diaphorase and choline acetyltransferase in the quail brainstem. *Neurosci. Lett.*, 231, 1997, s. 151—154.
- Sherriff F.E., Henderson Z.:** A cholinergic propriospinal innervation of the rat spinal cord. *Brain Res.*, 634, 1994, s. 150—154.
- Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Rustioni A.:** NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.*, 321, 1992, s. 209—222.
- Vizzard A.M., Erickson K., DeGroat W.C.:** Localization of NADPH diaphorase in the thoracolumbar and sacrococcygeal spinal cord of the dog. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 64, 1997, s. 128—142.

Received June 19, 1999.

Accepted December 17, 1999.