

## Laminar distribution of NADPH-diaphorase in pheasant's thoracic spinal cord

Kluchova D, Rybarova S, Schmidtova K, Lovasova K, Miklosova M, Dorko F

### Laminárna distribúcia NADPH-diaforázy v hrudníkovej mieche bažanta

#### Abstract

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

Laminar distribution of NADPH-diaphorase in pheasant's thoracic spinal cord

Bratisl Lek Listy 2000; 101 (8): 429–432

**Background:** The distribution of NADPH-diaphorase (NADPH-d) activity was investigated in the spinal cord of pheasants.

**Material and methods:** Histochemical method for visualization of NADPH-d was used in this study. This method is considered to be a good marker for NO synthase.

**Results:** The investigation of NADPH-d activity in laminae of the thoracic spinal cord of pheasants revealed the presence of scattered intensively stained neurons in laminae VIII and IX of the ventral horn. In the location of autonomic preganglionic neurons, no presence of NADPH-d positivity was noticed. The pericentral area (lamina X) and intermediate zone (lamina VII) showed NADPH-d positive neurons located more dorsally with larger distance from the central canal. In superficial layers of the dorsal horn (lamina I and II) marked differences were seen in the distribution of NADPH-d activity through the medio-lateral direction.

**Conclusion:** In summary, it can be suggested that the observed presence of NADPH-d activity may reflect the utilization of NO in the thoracic part of the spinal cord in pheasants. (Fig. 5, Ref. 20.)

**Key words:** pheasant, NADPH-d, spinal cord, distribution.

Objav voľného radikálu oxidu dusíka — NO (nitric oxide) v metabolizme cicavcov mal za následok prudký vzostup záujmu o túto oblasť výskumu. Záujem sa zintenzívnili, keď bola objavená neuronálna funkcia NO, veľmi podobná neurotransmitterom (Dawson a spol., 1992; Snyder, 1992). NO je plyn s polčasom rozpadu 5 sekúnd, a teda metodicky je veľmi problematický priamy dôkaz jeho

#### Abstrakt

Kluchová D., Rybárová S., Schmidtová K., Lovasová K., Miklošová M., Dorko F.:

Laminárna distribúcia NADPH-diaforázy v hrudníkovej mieche bažanta

Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 8, s. 429–432

**Ciel práce:** V predloženej práci sme sledovali distribúciu NADPH-diaforázy (NADPH-d) v hrudníkovej mieche bažanta.

**Materiál a metódy:** Na znázornenie NADPH-d sme použili histochemickú metódu, ktorá sa považuje za vhodný marker prítomnosti syntázy oxidu dusíka (NOS).

**Výsledky:** Pri sledovaní jednotlivých vrstiev miechy sa ukázalo, že v oblasti ventrálnych rohov (lamina VIII a IX) sme zaznamenali výskyt roztrúsených intenzívne sfarbených NADPH-d pozitívnych neurónov. Oblasť autonómnych pregangliových neurónov neukázala u bažanta žiadnu prítomnosť NADPH-d pozitivity. Zona intermedia (lamina VII) a pericentrálna oblasť (lamina X) potvrdili prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov lokalizovaných dorzálnejšie a vo väčšej vzdialenosti od centrálného kanála. Podobne dorzálne rohy ukázali prítomnosť NADPH-d pozitivity, ale jej distribúcia bola odlišná v medio-laterálnom usporiadaní.

**Záver:** Možno konštatovať, že prítomnosť NADPH-d aktivity môže byť odrazom využitia syntázy NO (oxidu dusíka) v hrudníkovej mieche bažanta. (Obr. 5, lit. 20.)

**Kľúčové slová:** bažant, NADPH-d, miecha, distribúcia.

prítomnosti (Kiechle a Malinsky, 1993). Enzým, ktorý syntetizuje NO — NOS (nitric oxide synthase) však možno dokázať nepriamo použitím histochemickej metódy na znázornenie NADPH-d (NADPH-diaforázy) (Hope a spol., 1991). Nervové bunky, ktoré sú NADPH-d pozitívne, majú NOS a sú rovnocenné s bunkami pozitívnymi na NOS imunocytochémiu (Grozdanovic a spol., 1992).

Department of Anatomy, Medical Faculty, Safarikienis University, Kosice. [kluchova@hotmail.com](mailto:kluchova@hotmail.com)

**Address for correspondence:** D. Kluchova, MD, PhD, Dpt of Anatomy, Safarikienis University, Srobarova 2, SK-040 01 Kosice, Slovakia.  
Phone: +421.95.622 8866

Ústav anatómie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach

**Adresa:** Doc. MUDr. D. Kluchová, CSc., Ústav anatómie LF UPJŠ, Šrobarova 2, 040 01 Košice.

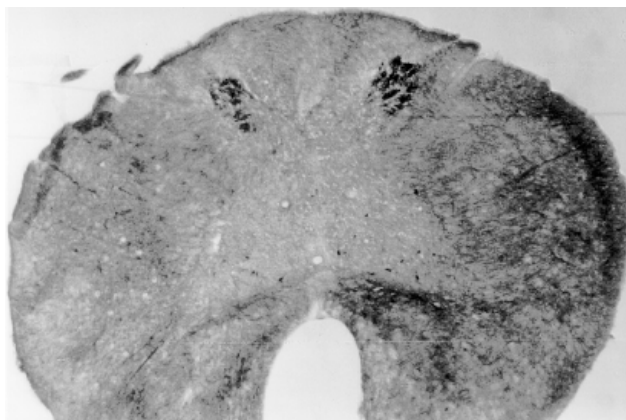


Fig. 1. Transverse section through the thoracic spinal cord revealed unclear border between gray and white matter. No staining was visible in the region of IML column (3,2x4).

Obr. 1. Priečný rez hrudníkovou časťou miechy ukazuje nejasné kontúry medzi sivou a bielou hmotou. V oblasti IML jadra nevidieť NADPH-d pozitívne sfarbenie (3,2x4).

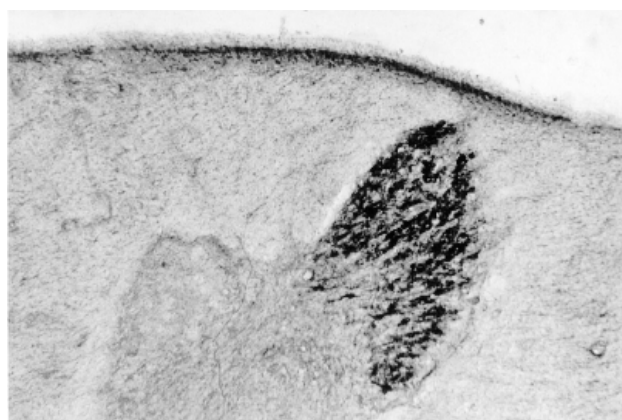


Fig. 2. Superficial layer of the dorsal horn (lamina I and II) showed intensive NADPH-d staining in its lateral part (10x4).

Obr. 2. Povrchová vrstva dorzálnych rohov (lamina I a II) potvrdila intenzívne NADPH-d farbenie v laterálnej časti (10x4).

Prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov sa potvrdila v mieche viacerých experimentálnych zvierat, napr. u mačky (Vizzard a spol., 1994), potkana (Valtschanoff a spol., 1992), kráľika (Kluchová a spol., 1997) a psa (Vizzard a spol., 1997).

V tejto práci sme sa podrobnejšie zamerali na skúmanie miechy bažanta z tohto hľadiska, pretože sme sa doteraz v literatúre nestretli s riešením uvedenej problematiky.

#### Materiál a metódy

Na pokusy sme použili 7 bažantov, pričom sme všetky experimentálne zvieratá anestetizovali pentobarbitalom (35 mg/kg, i.v.). Potom sme zvieratá usmrtili intrakardiálnou perfúziou fyziologickým roztokom a následnou perfúziou 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 sme miechy vyoperovali z vertebrálneho kanála a uložili v rovnakom fixatívne na 3–4 h. Následne sme ich umiestnili v 30 % sacharóze v tom istom fosfátovom tlmivom roztoku cez noc pri 4 °C. Potom sme miechy narezali na zmrzovacom mikrotóme na rezy hrúbky 45 µm. 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 mM fosfátovom tlmivom roztoku, pH 8,0 (Kluchová a spol., 1997, 1998; Maršala a spol., 1997). 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 mM fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4), montovali na sklíčka a nechali

vysušiť na vzduchu cez noc. Nakoniec sme tieto rezy pokrývali Entellanom.

#### Výsledky

Sledovanie distribúcie NADPH-d aktivity v mieche bažanta ukázalo pri malom zväčšení nejasné kontúry medzi jej sivou a bielou hmotou na priečnom reze (obr. 1). Zvláštnosťou bolo, že v oblasti autonómnych pregangliových neurónov sme nezistili žiadne sfarbenie. Detailnejšie pozorovanie jednotlivých vrstiev (laminae) miechy ukázalo veľké odlišnosti v distribúcii NADPH-d pozitivity.

V dorzálnych rohoch, obzvlášť v lamina I a II bolo možné pozorovať úplný presun NADPH-d pozitívnych neurónov z mediálnej, do laterálnej časti miechy (obr. 2).

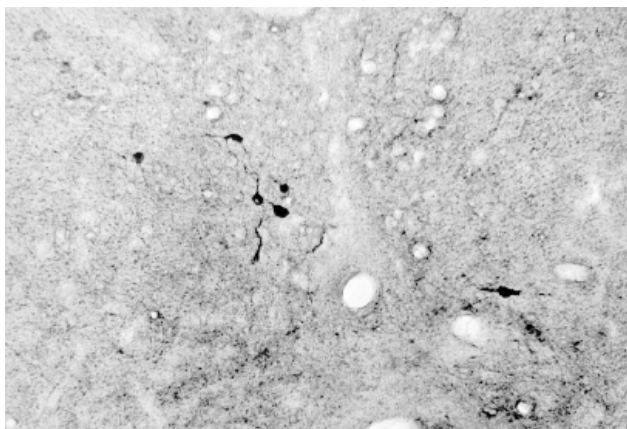
Pericentrálna oblasť (lamina X) miechy potkana ukázala prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov, lokalizovaných pomerne dorzálnie k centrálnemu kanálu, ktorý bol uložený ventrálnejšie (obr. 3). NADPH-d pozitívne neuróny sa nachádzali v nižšom počte, ich tvar bol typický tým, že telá neurónov boli menšie, len s malým počtom krátkych výbežkov (obr. 4).

V oblasti ventrálnych rohov miecha bažanta ukazovala intenzívne sfarbené neuróny s malými výbežkami, ktoré boli roztrúsené po celej ploche ventrálnych rohov (obr. 5).

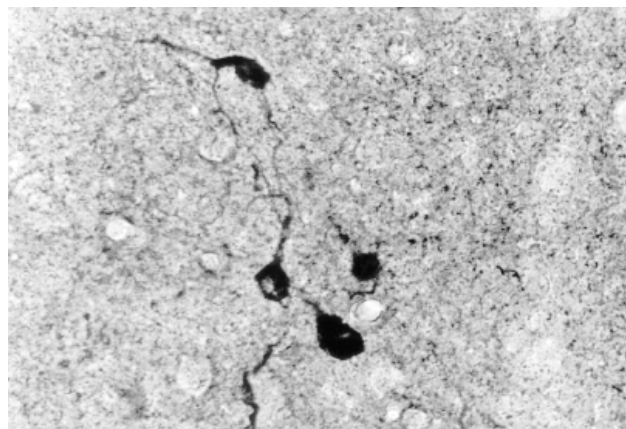
#### Diskusia

V predloženej práci sme mapovali distribúciu NADPH-d aktivity v hrudníkovej mieche bažanta. Pozitívne sfarbenie bolo možné pozorovať v týchto oblastiach:

1. v somatomotorických neurónoch ventrálnych rohov (lamina VIII a IX),
2. v neurónoch zona intermedia (lamina VII),
3. v pericentrálnych neurónoch (lamina X) a v neurónoch hlbokjej vrstvy (lamina IV-VI) a povrchovej vrstvy (lamina I-III) dorzálnych rohov.



**Fig. 3.** View of NADPH-d positive neurons in lamina X, localised dorsally to the central canal (10x4).  
**Obr. 3.** Pohľad na NADPH-d pozitívne neuróny v lamina X, lokalizované dorzálne od centrálného kanála (10x4).

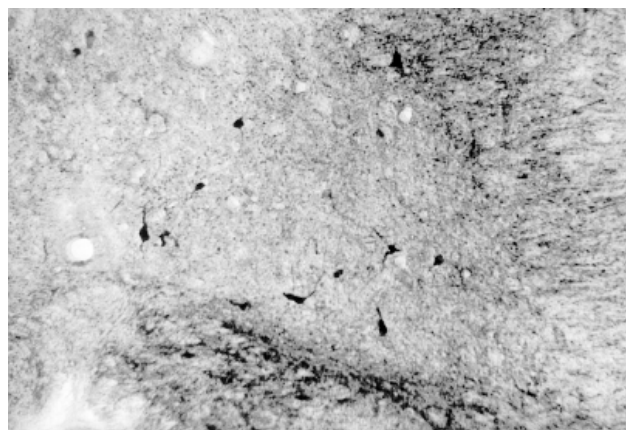


**Fig. 4.** The shape of pericentral neurons was typical in smaller diameter of their bodies possessing only few processes (25x5).  
**Obr. 4.** Tvar pericentrálnych neurónov bol typický tým, že ich telá boli menšie, len s malým počtom krátkych výbežkov (25x5).

NADPH-d pozitivitu sme nezistili v mieche bažanta v oblasti intermediolaterálneho jadra (IML), t.j. v mieste, kde sa bežne nachádzajú autonómne pregangliové neuróny (Anderson a spol., 1993; Kluchová a spol., 1998). Mediálne od IML jadra, medzi ním a centrálnym kanálom, bolo možné vidieť pozitívne sfarbené bunky. Táto oblasť tiež obsahuje autonómne pregangliové neuróny a bola nazvaná nucleus intercalatus (Petras a Cummings, 1972). Podľa tohto možno predpokladať, že NO môže pôsobiť ako neurotransmitter v sympatikových pregangliových neurónoch bažanta.

V protiklade k oblasti IML jadra sme zistili prítomnosť roztrúsených, pozitívne sfarbených neurónov vo ventrálnych rohoch miechy bažanta. Z experimentov na iných druhoch vyplýva, že za fyziologických podmienok sa ani NADPH-d, ani NOS pozitivita vo ventrálnych rohoch nenachádza (Valtschanoff a spol., 1992). Napriek tomu sa v cervikálnej mieche potvrdila ich prítomnosť vo ventrolaterálnej časti, dovoľujúc tak predpoklad, že ide o spinálne jadro n. accessorius (Vizzard a spol., 1994). Malé množstvo neurónov, ktoré sa našli v iných častiach ventrálnych rohov, vysvetľuje, že: 1. ide o populáciu motoneurónov so zvláštnymi neurochemickými vlastnosťami, alebo 2. sú tam prítomné iné typy neurónov (napr. autonómnych, či aferentných) okrem samých motoneurónov (Vizzard a spol., 1994). V práci Pullena a spol. (1997) sa v rezoch hrudníkovej miechy mačky zistila prítomnosť zreteľných mediálnych a laterálnych skupín motoneurónov s NOS pozitivitou. Pokusy s retrográdnym značením potvrdili, že v hrudníkovej mieche mačky sú motoneuróny inervujúce externé interkostálne svalstvo uložené ventrolaterálne, kým motoneuróny pre interné interkostálne svalstvo sú lokalizované skôr dorzomediálne (Johnson, 1986). Z uvedeného logicky vyplýva, že NADPH-d pozitivita v motoneurónoch hrudníkovej miechy bažanta je dôsledkom odlišnej funkcie, pretože uvedený experimentálny druh má krídla. Inou možnosťou je, že vtáky majú viac propriospinálnych spojení v porovnaní s inými druhmi (Maršala, 1999). Na potvrdenie týchto teórií však budú potrebné ďalšie experimenty.

Pri hodnotení distribúcie NADPH-d aktivity v povrchových vrstvách dorzálnych rohov sme nezaznamenali jej laminárne uspo-



**Fig. 5.** Scattered NADPH-d positive neurons in the ventral horn region of the spinal cord (10x4).  
**Obr. 5.** Roztrúsené NADPH-d pozitívne neuróny v oblasti ventrálnych rohov miechy (10x4).

riadenie ako pri iných predtým skúmaných druhoch (Saito a spol., 1994), ale zistili sme rozdielnosť v intenzite NADPH-d sfarbenia hlavne v zmysle mediolaterálnej distribúcie. Silná NADPH-d pozitivita v laterálnej časti povrchovej vrstvy dorzálnych rohov nápadne kontrastovala s nulovým sfarbením v jej mediálnej časti. Vysvetliť tento jav pomôže zistenie, že aferentné vlákna sa ešte pred vstupom do dorzálnych rohov miechy rozdelia na mediálny a laterálny zväzok (Maršala, 1985). Mediálny zväzok pozostáva z hrubých myelinizovaných vlákien, ktoré sú v periférii napojené na receptory, akými sú Golgiho šlachové vretienka, neuromuskulárne vretienka, ako aj Meissnerove a Pacciniho telieska. Laterálna časť aferentných vlákien obsahuje tenšie myelinizované, aj nemylinizované vlákna. Neuróny laterálnej časti teda privádzajú vzruchy z receptorov, ktoré reagujú na mechanické, ako aj teplot-

né a bolestivé podnety. V mediálnej časti sa zakončujú vlákna privádzajúce vzruchy zo špecializovaných senzorických receptorov (Ferčáková, 1997). Neuróny oboch častí dorzálnych rohov majú odlišné chemické substancie, čo môže svedčiť aj o odlišnej funkcii týchto neurónov v ich mediálnej a laterálnej časti (O'Brien a spol., 1989). Z našich výsledkov vyplýva, že u bažanta sa prenos nervových vzruchov zo špecializovaných senzorických receptorov zabezpečuje pravdepodobne inými neurotransmitermi, ale nie prostredníctvom NO. V kontraste s touto skutočnosťou sa zdá NO významným mediátorom pri prenose mechanických, teplotných a bolestivých podnetov v mieche bažanta.

### Záver

Pri hodnotení prítomnosti NADPH-d v hrudníkovej mieche bažanta sme dospeli k záveru, že NO pravdepodobne funguje ako neurotransmitter v autonómnych pregangliových neurónoch a zúčastňuje sa na senzorických procesoch a viscerálnej regulácii v mieche bažanta.

### Literatúra

**Anderson C.R., Edwards S.L., Furnes J.B., Brecht B.S., Snyder S.H.:** The distribution of nitric oxide synthase-containing autonomic preganglionic terminals in the rat. *Brain Res.*, 614, 1993, s. 78–85.

**Ferčáková A.:** Morfológia senzitivných ganglií. Bratislava, Veda 1997, s. 47–52.

**Grozdanovic 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. *Neurosci.*, 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.

**Johnson I.P.:** A quantitative ultrastructural comparison of alpha and gamma motoneurons in the thoracic region of the spinal cord of the adult cat. *J. Anat.*, 147, 1986, s. 55–72.

**Kiechle F.L., Malinski T.:** Nitric oxide biochemistry, pathophysiology, and detection. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 100, 1993, s. 567–573.

**Kluchová D., Rybárová S., Schmidtová K., Dorko F., Miklošová M.:** Topografická distribúcia NADPH-diaforázovej aktivity v cervikálnej mieche kráľika. *Folia Med. Cass.*, 54, 1997, s. 50–60.

**Kluchová D., Schmidtová K., Dorko F., Pomfy M.:** Aktivita NADPH-diaforázy v autonómnych pregangliových jadrách miechy kráľika. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 267–273.

**Maršala J.:** Systematická a funkčná neuroanatómia. Martin, Osveta 1985, 784 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. 165–179.

**O'Brien C., Woolf C.J., Fitzgerald M., Lindsay R.M., Molander C.:** Differences in the chemical expression of rat primary afferent neurons which innervate skin, muscle or joint. *Neurosci.*, 32, 1989, s. 493–502.

**Petrás J.M., Cummings J.F.:** Autonomic neurons in the spinal cord of the rhesus monkey: a correlation of the findings of cytoarchitectonics and sympathectomy with fiber degeneration following dorsal rhizotomy. *J. Comp. Neurol.*, 146, 1972, s. 189–218.

**Pullen A.H., Humphreys P., Baxter R.G.:** Comparative analysis of nitric oxide synthase immunoreactivity in the sacral spinal cord of the macaque and human. *J. Anat.*, 191, 1997, s. 168–175.

**Saito S., Kidd G.J., Trapp B.D., Dawson T.M., Brecht D.S., Wilson D.A., Traystman R.J., Snyder S.H., Haley D.F.:** Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neurosci.*, 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.

**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 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.

**Vizzard M.A., Erickson K., DeGroat W.C.:** Localization of NADPH diaphorase in the thoracolumbar and sacrococcygeal spinal cord of the dog. *J. Auton. Nerv. System*, 64, 1997, s. 128–142.

Received April 2, 2000.

Accepted June 8, 2000.