

## Differences in localization of NADPH-d positive neurons in the gray matter of the spinal cord in some species

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

### Odlišnosti v lokalizácii NADPH-d pozitívnych neurónov v sivej hmote miechy jednotlivých druhov

#### Abstract

**Kluchova D, Pribula J, Rybarova S, Schmidtova K, Miklosova M, Lovasova K, Dorko F:**  
Differences in localization of NADPH-d positive neurons in the gray matter of the spinal cord in some species  
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (10): 558–564

The presence of NADPH-diaphorase (NADPH-d) activity was investigated in the thoracic part of rat, rabbit and pheasant spinal cords. Histochemical method for visualization of NADPH-d was used in this study.

The comparison between all spinal cord regions (laminae) in three experimental species revealed marked differences. Especially in the ventral horn, the presence of NADPH-d activity was different. While the pheasant ventral horn possessed number of scattered intensively stained neurons, the rat and rabbit showed no NADPH-d activity in this region.

Pericentral area (lamina X), intermediate zone (lamina VII) and dorsal horn revealed the presence of NADPH-d positive neurons in all examined species although they differed in the distribution of NADPH-d activity.

In summary, it can be suggested that the observed differences in the presence and distribution of NADPH-d activity among species may reflect their different phylogenetic development. As a consequence, different NO function in spinal cord of various species can be presumed. (*Fig. 10, Ref. 28.*)

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

#### Abstrakt

**Kluchová D., Pribula J., Rybárová S., Schmidtová K., Miklošová M., Lovasová K., Dorko F.:**  
Odlišnosti v lokalizácii NADPH-d pozitívnych neurónov v sivej hmote miechy jednotlivých druhov  
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 10, s. 558–564

V predloženej práci sme porovnávali distribúciu NADPH-diaforázy (NADPH-d) v hrudníkovej mieche potkana, králik a bažanta. Na znázornenie NADPH-d sme použili histochemickú metódu, ktorá sa považuje za vhodný marker prítomnosti syntázy oxidu dusíka (NOS).

Porovnanie jednotlivých vrstiev (lamín) miechy troch experimentálnych druhov zvierat ukázalo značné rozdiely. Vo ventrálnej rohoch potkana a králika sme nezistili žiadne NADPH-d pozitívne sfarbenie, kým u bažanta sme v tejto oblasti zaznamenali roztrúsené intenzívne sfarbené neuróny. V oblasti intermediolaterálneho jadra (IML) sa u potkana potvrdila prítomnosť početných, tesne zoskupených neurónov, ktoré boli jasne tmavomodro sfarbené. Podobné neuróny sme zistili aj v mieche králika, tie však boli menej početné. Táto lokalita neukázala u bažanta žiadnu prítomnosť NADPH-d pozitívity.

Zona intermedia pericentrálna oblasť potvrdili prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov u všetkých troch druhov experimentálnych zvierat, i keď sa líšili tvarom svojich tiel a počtom. Podobne dorzálne rohy ukázali prítomnosť NADPH-d pozitívity, ale jej prítomnosť v miechach jednotlivých zvierat bola odlišná v mediolaterálnom usporiadaní.

Na záver možno konštatovať, že zistené rozdiely v prítomnosti a distribúcii NADPH-d aktivity u jednotlivých druhov experimentálnych zvierat môžu vyjadrovať odlišný fylogenetický vývoj. V dôsledku toho možno predpokladať odlišnú funkciu NO v mieche rôznych druhov zvierat. (*Obr. 10, lit. 28.*)

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

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

**Address for correspondence:** D. Kluchova, MD, PhD, Dpt of Anatomy, LF UPJS, Srobarova 2, SK-040 01 Kosice, Slovakia.  
Phone: +421.95.6334 836, Fax: +421.95.6223 579

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

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

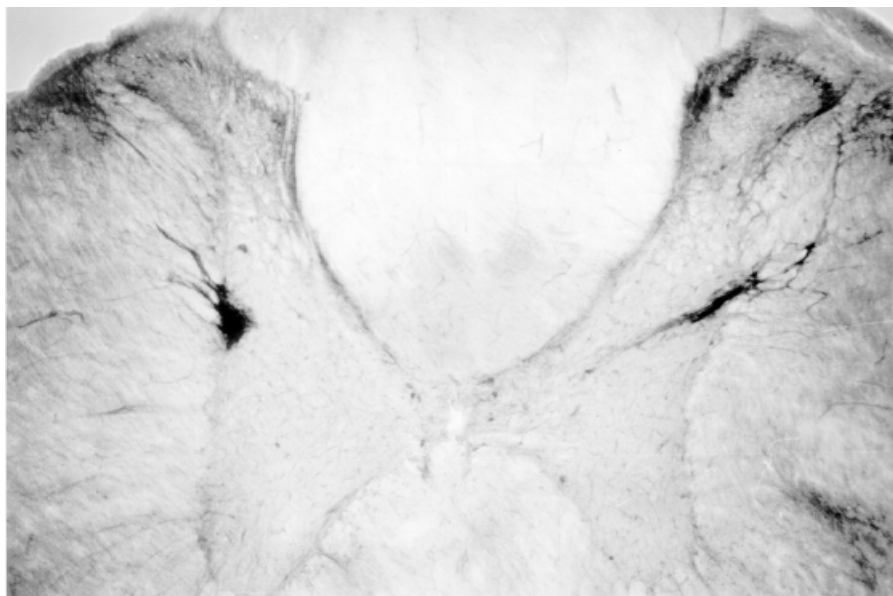


Fig. 1. Transverse section through the thoracic spinal cord of the rat shows an intensively stained area of autonomic preganglionic neurons (3,2x4).

Obr. 1. Priečný rez hrudníkovou miechou potkana. Oblasť autonómnych pregangliových neurónov je výrazne sfarbená (3,2x4).

Neuronálna funkcia oxidu dusíka — NO (nitric oxide) je v poslednom období intenzívne skúmanou problematikou, keďže je veľmi podobná neurotransmitterom (Bredt a Snyder, 1992; Dawson a spol., 1991). NO je plyn s polčasom rozpadu 5 sekúnd, a teda metodicky je veľmi problematický priamy dôkaz jeho prítomnosti (Kelm a spol., 1988). 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).

Prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov sa potvrdila v mieche viacerých experimentálnych zvierat, napr. u mačky (Vizzard a spol., 1994; Mizukawa a spol., 1989), potkana (Valtschanoff a spol., 1992), kráľika (Klučová a spol., 1997), psa (Vizzard a spol., 1997), ale aj u obojživelníkov (Muñoz a spol., 1996), rýb (Funakoshi a spol., 1995) a plazov (Jiang a Terashima, 1996).

V tejto práci sme sa pokúsili objasniť, či existujú nejaké druhové odlišnosti v distribúcii NADPH-d pozitívnych neurónov v mieche kráľika, potkana a bažanta. Ďalej 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

V našich pokusoch sme všetky experimentálne zvieratá anestetizovali pentobarbitalom (35 mg/kg, i.v.). Potom boli zvieratá usmrtené 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 boli miechy vyoperované z vertebrálneho kanála a uložené v rovnakom fixačnom roztoku na 3—4 h. Nasledovalo ich umiestnenie v 30 % sacharóze v tom istom fosfátovom tlmivom roztoku cez noc pri 4 °C. Potom sme miechy narezali na zmrzovacom mikrotóme na rezy s hrúbkou 45 µm.

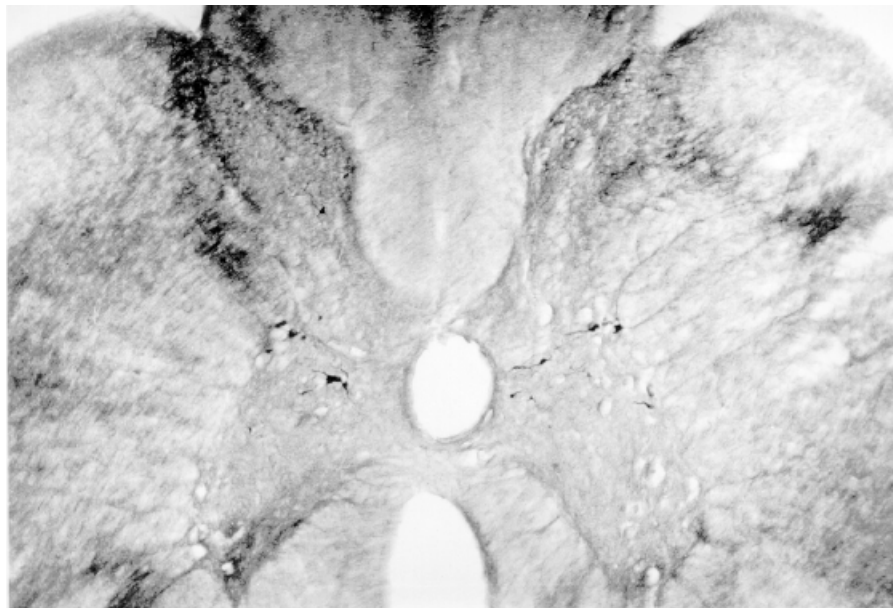
Použitú histochemickú reakciu na znázornenie NADPH-d aktivity sme modifikovali podľa Scherera-Singlera a spol. (1993). Podľa nej sme rezy miechy inkubovali 1 h pri 37 °C v roztoku 1,5 mM nitroblue tetrazólia (NBT, Sigma Chemicals, N-6876), 1,0 mM β-nikotínamidadenindinukleotid fosfátu (NADPH, Sigma Chemicals, 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 (Klučová a spol., 1997, 1998; Maršala a spol., 1997). Kontrolné rezy sme inkubovali tým 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 entelanom.

#### Výsledky

Uvedené výsledky sme získali z miech 4 potkanov, 7 králikov a 3 bažantov.

Pri sledovaní distribúcie NADPH-d aktivity v mieche potkana sme zistili tri základné lokality, ktorých výskyt a kvantita sa menili v jednotlivých segmentoch (obr. 1). Boli to dorzálné rohy (lamina I a II), pericentrálna oblasť (lamina X) a zona intermedia (la-



**Fig. 2.** View of the rabbit spinal cord reveals solitary arranged NADPH-d positive neurons in the IML area (3,2x4).  
**Obr. 2.** Pohľad na rez miechy kráľika ukazuje jednotlivé NADPH-d pozitívne neuróny v IML oblasti (3,2x4).



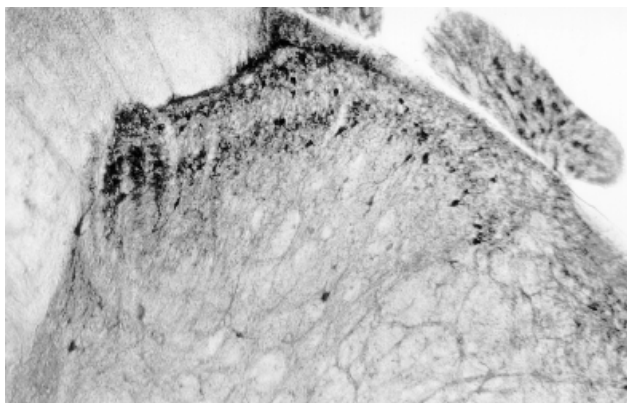
**Fig. 3.** Note the different shape and unclear border of gray matter in the section through the spinal cord of pheasant. No staining can be seen in the area of IML column (3,2x4).  
**Obr. 3.** Odlišný tvar miechy bažanta. Sivá hmota je len neostro ohraničená. Žiadnu NADPH-d aktivitu nevidieť v oblasti IML jadra (3,2x4).

mina VII). Významné bolo zistenie, že žiadnu NADPH-d pozitívitu sme nenašli vo ventrálnych rohoch miechy potkana. Distribúcia týchto štruktúr bola podobná v mieche kráľika (obr. 2). U bažanta sa jeho miecha v priečnom reze odlišovala celkovým tva-

rom a nejasnými kontúrami sivej hmoty, ale aj neprítomnosťou NADPH-d sfarbenia v zona intermedia (obr. 3).

Detailnejšie pozorovanie jednotlivých vrstiev (laminae) miechy ukázalo veľké odlišnosti v distribúcii NADPH-d pozitivity

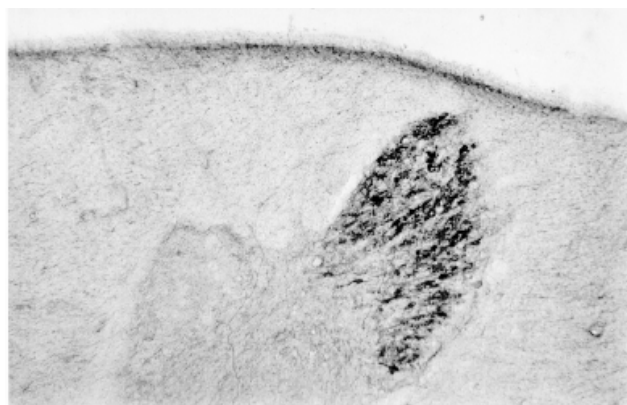




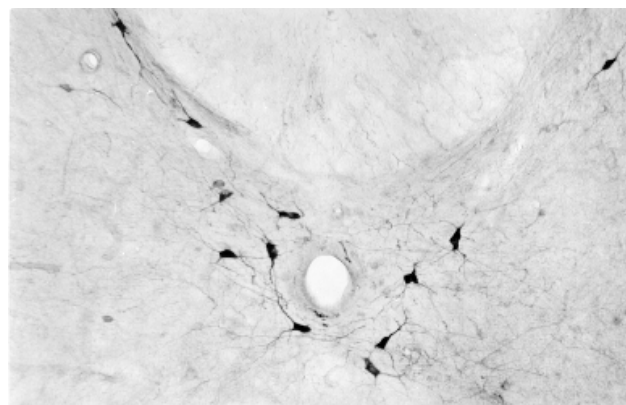
**Fig. 4.** Bilaminar NADPH-d staining in the superficial layers of the rat dorsal horn (10x4).  
**Obr. 4.** Bilaminárne NADPH-d sfarbenie v povrchoých vrstvách dorzálnych rohov potkana (10x4).



**Fig. 5.** NADPH-d positivity in the dorsal horn of the rabbit is interrupted by the afferent nerve fibres (10x4).  
**Obr. 5.** NADPH-d pozitivita v dorzálnych rohoch kráľika je prerušovaná aferentnými nervovými vláknami (10x4).



**Fig. 6.** No staining in the medial part and a positive NADPH-d reaction in the lateral direction were seen in neurons of the pheasant dorsal horn (10x4).  
**Obr. 6.** V mediálnej časti dorzálného rohu bažanta nevidieť žiadnu NADPH-d reakciu. Všetka pozitivita je presunutá do jeho laterálnej časti (10x4).



**Fig. 7.** Numerous NADPH-d positive neurons around the central canal of the rat (10x4).  
**Obr. 7.** Početné NADPH-d neuróny v okolí centrálného kanála potkana (10x4).

v dorzálnych rohoch, zvlášť v lamina I a II. Zreteľné vrstvenie týchto lamín sme zistili u potkana (obr. 4), kým u kráľika bolo laminárne usporiadanie difúzne, ale pozitivita bola jasne prerušovaná vstupujúcimi aferentnými vláknami (obr. 5). Dorzálny roh bažanta preukazoval úplný presun NADPH-d pozitívnych neurónov do laterálnej časti (obr. 6).

Pericentrálna oblasť (lamina X) miechy potkana ukázala prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov s výraznými vzájomne komunikujúcimi výbežkami, často zasahujúcimi až do dorzálny komisúry (obr. 7). Prekvapujúca bola veľkosť centrálného kanála v mieche kráľika (obr. 8). Pericentrálne neuróny boli často lokalizované tesne subependymálne. Značné rozdiely sme zaznamenali v pericentrálnej oblasti miechy bažanta (obr. 9). Malý centrálny kanál bol uložený nepomerne ventrálnejšie, NADPH-d pozitívne neuróny sa nachádzali v nižšom počte, posunuté viac dorzálnym

smerom. Tvar týchto buniek bol tiež odlišný, ich telá boli menšie, s len malým počtom krátkych výbežkov.

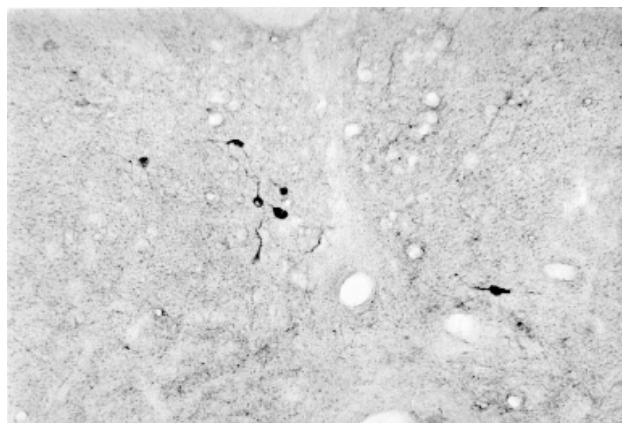
V oblasti ventrálnych rohov sme nezistili u potkana ani u kráľika takmer žiadne NADPH-d pozitívne neuróny. Miecha bažanta bola odlišná aj v tomto smere (obr. 10). Pozitívne sfarbené neuróny s malými výbežkami boli roztrúsené po celej ploche ventrálnych rohov.

#### Diskusia

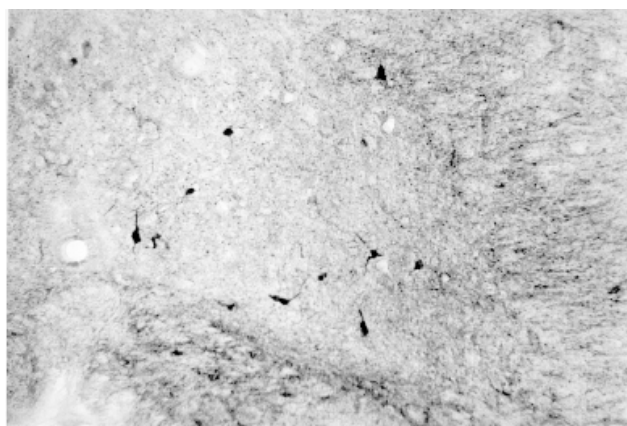
V predloženej práci sme mapovali distribúciu NADPH-d aktivity v mieche potkana, kráľika a bažanta. Výsledky predchádzajúcich prác získané z miechy potkana a kráľika (Valtschanoff a spol., 1992; Kluchová a spol., 1997, 1998) potvrdili päť oblastí, v ktorých sa stabilne nachádza NADPH-d. Ide o tieto lokality: 1.



**Fig. 8.** Note the extensive diameter of the rabbit central canal (10x4).  
**Obr. 8.** Výrazne zväčšený priemer centrálneho kanála v mieche kráľika (10x4).



**Fig. 9.** Pericentral area of the pheasant spinal cord. Neurons were more distant to the central canal (10x4).  
**Obr. 9.** Pericentrálna oblasť v mieche bažanta. Neuróny sú lokalizované vo väčšej vzdialenosti od centrálneho kanála (10x4).



**Fig. 10.** NADPH-d positive neurons were seen scattered throughout the ventral horn of the pheasant (10x4).  
**Obr. 10.** NADPH-d pozitívne neuróny zreteľne vidieť roztrúsené vo ventrálnych rohoch miechy bažanta (10x4).

autonómne pregangliové neuróny (lamina VII), 2. neuróny zona intermedia (lamina VII), 3. pericentrálne neuróny (lamina X), 4. neuróny v hlbokoj (lamina IV—VI) a 5. povrchovej vrstve (lamina I—III) dorzálnych rohov. Veľké množstvo NADPH-d pozitívnych neurónov sa pravdepodobne zúčastňuje na senzorických procesoch v mieche a na viscerálnej regulácii.

Distribúcia NADPH-d aktivity bola odlišná v mieche bažanta. Jej prítomnosť sa zistila v týchto oblastiach: 1. v somatomotorických neurónoch ventrálnych rohov (lamina VIII—IX), 2. neuróny zona intermedia (lamina VII), 3. pericentrálne neuróny (lamina X), 4. neuróny v hlbokoj (lamina IV—VI) a 5. povrchovej vrstve (lamina I—III) dorzálnych rohov. Táto skutočnosť jasne poukazuje na odlišnosti v lokalizácii NADPH-d v mieche potkana a kráľika na jednej strane a v mieche bažanta na druhej strane.

Absencia NADPH-d v autonómnych pregangliových neurónoch a jeho prítomnosť v predných rohoch sa najvýraznejšie odlišnosti pozorovali v mieche bažanta pri porovnaní s miechou potkana a kráľika.

#### *Ventrálne rohy*

Vo ventrálnych rohoch miechy potkana a kráľika sa nezistila prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov. Táto skutočnosť je pri fyziologických podmienkach zrejماً aj u iných druhov (Valtschanoff a spol., 1992; Dun a spol., 1993). Pri patologických podmienkach sa však zistili odlišné výsledky.

Po rhizotómii (Vizzard a spol., 1993) a po axonálnom poškodení (Wu, 1993) ukazovali motoneuróny predných rohov prítomnosť NADPH-d aj NOS aktivity. Napriek všeobecnej absencii NADPH-d sfarbenia v predných rohoch miechy pri fyziologických podmienkach bolo možné potvrdiť prítomnosť NADPH-d aj NOS u mačky v tejto oblasti (Vizzard a spol., 1994). V krčnej mieche mačky boli takto sfarbené neuróny prítomné vo ventrolaterálnej časti predných rohov. Uvedená lokalita svedčí tom, že takéto neuróny môžu byť súčasťou nucleus accessorius. Naše výsledky z miechy bažanta potvrdili prítomnosť NADPH-d pozitívnych neurónov roztrúsených v predných rohoch. Táto skutočnosť ponúka viacero možností vysvetlenia. Buď ide o populáciu motoneurónov so zvláštnymi neurochemickými vlastnosťami, alebo okrem motoneurónov sú tam prítomné aj iné typy neurónov, napr. autonómne alebo aferentné (Vizzard a spol., 1994). V práci Pullena a spol. (1997) sa potvrdzuje, že v niektorých rezoch hrudníkovej miechy mačky sú viditeľné zreteľne odlišné mediálne a laterálne skupiny NOS pozitívnych motoneurónov. Pokusy s retrográdnym značením potvrdili, že motoneuróny, ktoré inervujú mm. intercostales externi a mm. levatores costarum, sú lokalizované ventrolaterálne, kým motoneuróny pre mm. intercostales interni sa nachádzajú skôr dorzomedálne v predných rohoch miechy (Johnson, 1986). Tieto zistenia a naše výsledky potvrdzujúce prítomnosť NADPH-d aktivity v predných rohoch bažanta nám ponúkajú vysvetlenie, podľa

ktorého môžu uvedené motoneuróny takto vyjadrovať svoju odlišnú funkciu u vtákov, pretože tento druh má krídla. Inou možnosťou vysvetlenia tohto sfarbenia je fakt, že u vtákov existuje nepomerne viac propriospinálnych spojení v porovnaní s inými živočíšnymi druhmi. Potvrdenie tejto teórie si však bude vyžadovať v budúcnosti ďalšie pokusy.

#### *IML oblasť*

Práce zamerané na prítomnosť NADPH-d v pregangliových autonómnych neurónoch miechy ukázali, že medzi jednotlivými druhmi môžu existovať odlišnosti. Sfarbenie v IML oblasti sa potvrdilo u potkana (Anderson a spol., 1992; Valtchanoff a spol., 1992; Blottner a Baumgarten, 1992), ale nezistilo sa u mačky (Mizukawa a spol., 1989). V kontraste s uvedeným faktom sa u toho istého druhu — mačky zistila výrazná NADPH-d aktivita v IML oblasti pri skúmaní inými autormi (Vizzard a spol., 1994). Dôvodom pre uvedené odlišnosti môžu byť rozdielne spôsoby fixácie použitej v oboch experimentoch (Mizukawa a spol., 1989). Autonómne neuróny parasimpatikového jadra sa u jednotlivých druhov tiež líšili v tomto smere. Kým v mieche psa a mačky sa NADPH-d pozitivita v tejto oblasti nezistila (Vizzard a spol., 1994, 1997), u potkana (Valtschanoff a spol., 1992) a kráľika (Maršala a spol., 1997) bola táto lokalita výrazne sfarbená.

Výsledky získané v tejto práci potvrdili prítomnosť NADPH-d aktivity v sympatikových pregangliových neurónoch potkana a kráľika, ale nie u bažanta. V mieche bažanta sa však zistilo väčšie množstvo pozitívne sfarbených neurónov lokalizovaných mediálnejšie od oblasti IML, teda v mieste zodpovedajúcom nucleus intercalatus. O tomto jadre je známe, že obsahuje sympatikové pregangliové neuróny. Vizzard a spol. (1994) potvrdili prítomnosť NADPH-d aktivity v tejto oblasti aj u iných živočíšnych druhov. Tieto zistenia dovoľujú predpoklad, že NO môže fungovať ako neurotransmitter v sympatikových pregangliových neurónoch a bažanta a môže tam mať dôležitú úlohu pri viscerálnej regulácii.

#### *Dorzálne rohy*

Pri hodnotení prítomnosti NADPH-d aktivity v dorzálnych rohoch sme zaznamenali veľké rozdiely medzi jednotlivými experimentálnymi zvieratami. Kým u potkana bola pozitivita v povrchových vrstvách usporiadaná laminárne, u kráľika bolo vidieť difúzne rozloženie NADPH-d sfarbenia. Dorzálné rohy bažanta preukazovali v porovnaní s uvedenými druhmi značné odlišnosti, a to 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. K vysvetleniu tohto javu môže napomôcť 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 šľachové vretienka, neuromuskulárne vretienka, ako aj Meissnerove a Pacciniho telieska. Laterálna časť aferentných vlákien obsahuje tenšie myelinizované, aj nemyelinizované vlákna. Neuróny laterálnej časti teda privádzajú vzruchy z receptorov, ktoré reagujú na mechanické, ako aj teplotné a bolestivé podnety. V mediálnej časti sa zakončujú vlákna privádzajúce vzruchy zo špecializovaných senzoričných 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 je prenos nervových vzruchov zo špecializovaných senzoričných receptorov zabezpečovaný 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 výsledkov získaných z miech troch druhov experimentálnych zvierat sme zaznamenali viaceré rozdiely, ktoré sa týkali jednak morfológie celkovej miechy, jednak distribúcie NADPH-d pozitivity v jednotlivých častiach sivej hmoty. Vo všetkých sledovaných lokalitách sme zistili menšie rozdiely medzi králikom a potkanom, v porovnaní s bažantom. Uvedené odlišnosti vyplývajú pravdepodobne z rozdielneho fylogenetického vývoja.

#### **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.
- Blottner D., Baumgarten H.G.:** Nitric oxide synthetase (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: evidence from histochemistry, immunohistochemistry, and retrograde labeling. *J. Comp. Neurol.*, 316, 1992, s. 45—55.
- Brecht D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992, č. 8, s. 3—11.
- Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Brecht D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 6368—6371.
- Dun N.J., Dun S.L., Wu S.Y., Forstermann U., Schmidt H.H.H.W., Tseng L.F.:** Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord. *Neuroscience*, 54, 1993, s. 845—857.
- Ferčáková A.:** Morfológia senzitivných ganglií. Bratislava, Veda 1997, s. 47—52.
- Funakoshi K., Abe T., Kishida R.:** NADPH-diaphorase activity in the sympathetic preganglionic neurons of the filefish, *Stephanolepis cirrhifer*. *Neurosci. Lett.*, 191, 1995, s. 181—184.
- 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.
- Jiang P.J., Terashima S.:** Distribution of NADPH-diaphorase in the central nervous system of an infrared-sensitive snake, *Trimeresurus flavoviridis*. *Brain Res.*, 713, 1996, s. 168—177.



- 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.
- Kelm M., Feilish M., Sphar R.:** Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 1988, s. 3063–3070.
- 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.
- Mikuzawa K., Vincent S.R., McGeer P.L., McGeer E.G.:** Distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase positive cells and fibres in the cat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 279, 1989, s. 281–311.
- Muñoz M., Muñoz A., Marón O., Alonso J.R., Arevalo R., Porteros A., Gonzales A.:** Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezi*. *J. Comp. Neurol.*, 367, 1996, s. 54–69.
- 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. *Neuroscience*, 32, 1989, s. 493–502.
- Pullen A.H., Humphreys P., Baxter R.G.:** Comparative analysis of nitric oxide synthase immunoreactivity in the sacral spinal cord of the cat, macaque and human. *J. Anat.*, 191, 1997, s. 161–175.
- 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*, 1983, č. 8, s. 229–234.
- Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Rustioni A.:** NADPH-diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.*, 321, 1992 a, s. 209–222.
- Vizzard M.A., Erdman S.L., DeGroat W.C.:** The effect of rhizotomy on NADPH diaphorase staining in the lumbar spinal cord of the rat. *Brain Res.*, 607, 1993, s. 349–353.
- 25. 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.
- Wu W.:** Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp. Neurol.*, 120, 1993, s. 153–159.

Received August 29, 2000.  
Accepted October 20, 2000.