

Badania immunocytochemiczne peptydów bombezyno-podobnych w układzie reprodukcyjnym szczura samca w przebiegu rozwoju postnatalnego

BOGDAN MIŚKOWIAK, ANDRZEJ LIMANOWSKI*,
MAŁGORZATA PARTYKA*, ANETA KONWERSKA*

Katedra Optometrii i Biologii Układu Wzrokowego Wydziału II Lekarskiego AM, ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań

*Katedra Histologii i Embriologii Wydziału II Lekarskiego AM, ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań

Miśkowiak B., Limanowski A., Partyka M., Konwerska A.

Immunocytochemical studies on bombesin-like peptides in the male rat reproductive system during postnatal development

Summary

The study aimed at detecting and locating bombesin-like peptides in the male rat reproductive system during postnatal development. Immunocytochemical techniques were used, but no bombesin-like peptides were disclosed in the testes of the studied animals. On the first day of life an immunocytochemical reaction appeared in the epididymis of the stroma area of connective tissue and smooth muscles, and from the 20th day of life the reaction could be detected exclusively in the cells of the glandular epithelium. The reaction did not appear until the 20th day of life in the seminal vesicles, and was manifested exclusively in the stroma of connective tissue and smooth muscles and its intensity decreased as the age of the animals progressed. An immunopositive reaction appeared in the prostate on the 5th day of life – firstly in the stroma. Beginning on day 20, the reaction was localised in the cells of the glandular epithelium and reached peak intensity on the 45th day of life.

Keywords: testes, epididymis, seminal vesicles, prostate, bombesin-like, bombesin

W 1970 r. Erspamer i wsp. (3, 6) wyizolowali ze skóry żaby *Bombina bombina* bombezynę, którą scharakteryzowali jako tetradekapeptyd. W następnych latach zidentyfikowano u ssaków kilka peptydów bombezyno-podobnych, takich jak peptyd uwalniający gastrynę (GRP – gastrin releasing peptide) i neuromedynę B oraz scharakteryzowano wiążące je podtypy receptorów. Peptydy te są wydzielane przez komórki dokrewne układu żołądkowo-jelitowego jako odpowiedź na podanie pokarmu. Mają także wpływać u ludzi na takie stany chorobowe, jak anoreksja, bulimia, otyłość i depresja (15). Panula (19) wykazał, że bombezyna wyizolowana ze skóry żaby nie jest identyczna z peptydami obecnymi w komórkach i tkankach ssaków i dlatego właściwe wydaje się używanie dla tej grupy peptydów określenia – peptydy bombezyno-podobne. Wykazano liczne funkcje regulacyjne, jakie w ustroju spełniają peptydy bombezyno-pochodne. Są to między innymi: udział w neurotransmisji bodźców, udział w procesie termoregulacji, wpływ na sekrecję komórek przysadki mózgowej, żołądka, trzustki i gruczołów przewodu pokarmowego (22). Scharakteryzowano również wpływ bombezyny na oś przysadka-nadnercza oraz na morfologię i funkcję kory

nadnerczy szczura (13, 14). Peptyd ten ma stymulować rozwój i różnicowanie się tkanek, a w warunkach patologicznych działać jako czynnik wzrostu, szczególnie w płucach, stymulując wzrost prawidłowych, a także zmienionych nowotworowo komórek nabłonka. Wykazano także, że przewlekłe podawanie bombezyny dojrziałym samicom szczura, wywołało wzrost poziomu hormonów TSH, T3 i T4 w surowicy krwi poprzez wpływ na przysadkę mózgową (12). W oparciu o metody immunohistochemiczne i chromatograficzne wykazywano obecność peptydów bombezyno-podobnych w licznych narządach, jak np.: w niektórych neuronach centralnego układu nerwowego, w tym w neuronach odpowiedzialnych za wydzielanie w stresie CRH i AVP, oraz w czuciowych neuronach obwodowych, a także w prawidłowych i nowotworowo zmienionych komórkach nabłonkowych płuc (15, 16).

Peptydy bombezyno-podobne występują również w narządach układu płciowego, a zwłaszcza w ludzkiej prostatie i to zarówno w okresie embrionalnym, jak i pozapłodowym (1, 7, 20). Peptydy te zlokalizowane w komórkach neuroendokrynowych nabłonka gruczołowego poprzez działanie auto- i parakrynowe odpowiadają między innymi za rozwój procesu nowotwo-

rowego (10, 21). Informacje te mogą mieć znaczenie w diagnostyce, rokowaniu i leczeniu nowotworów prostaty.

W dostępnym piśmiennictwie mało jest publikacji opisujących zachowanie się peptydów bombezyno-podobnych w innych narządach układu płciowego poza prostatą, zaś ich zachowanie się w przebiegu rozwoju pozapłodowego nie znajduje odbicia w dostępnym piśmiennictwie.

Celem badań było określenie, w oparciu o technikę immunocytochemiczną, lokalizacji peptydów bombezyno-podobnych w narządach układu płciowego szczura samca w przebiegu jego rozwoju postembrionalnego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na szczurach samcach rasy Wistar, które przebywały w stałych warunkach bytowania, w temperaturze $20 \pm 2^\circ\text{C}$ i oświetlenia 10L-14D, otrzymując paszę i wodę *ad libitum*. W 1, 5, 10, 20, 28, 35, 45 i 59 dniu życia szczury uśmiercano w narkozie eterowej przez wykrwawienie. Do badań histologicznych pobierano jądra, najądrza, prostaty i pęcherzyki nasienne, które ważono, a ich wycinki po utrwaleniu w płynie Bouin'a zatapiano w parafinie. W każdym badanym okresie życia było 6 zwierząt.

Na skrawkach wykonywano reakcje immunocytochemiczne na obecność bombezyny/GRP metodą CSA (DAKO). Zastosowano przeciwciała: anti-bombesin/GRP (Amersham), uzyskane przez immunizację królika syntetyczną żabią bombezyną w rozcieńczeniu 1:20 000. Przeciwciała te wykazują całkowitą reakcję krzyżową z bombezyną i GRP i częściową z substancją P. Kontrolę uzyskiwanych reakcji immunohistochemicznych stanowiła procedura, w której zamiast przeciwciała swoistego anti-bombezynowego stosowano królicze IgG. Kontrolę pozytywną stanowiły preparaty płuc ze zmianami raka płaskonabłonkowego, na których we wcześniejszych badaniach uzyskano odczyn dodatni na bombezynę (5). Z każdej grupy wiekowej wybierano 1-2 preparaty, na których reakcja najbardziej kontrastowała z tłem. Wyznaczano na nich 5 do 10 pól o łącznej powierzchni od 0,24 do 0,48 mm², które w postaci obrazów tif (600 × 500 pixeli) zachowywano do dalszych pomiarów.

Wszystkie pomiary przeprowadzono pod powiększeniem około 420 razy (okular 10×, obiektyw 20×, powiększenie obrazu na monitorze – około 2,1 razy), przy użyciu programu komputerowego do automatycznej analizy obrazu Micro Image 4.0 firmy Olympus oraz mikroskopu Nikon Eclipse E600, wyposażonego w kamerę kolorową TV CCD. Obrazy immunocytochemiczne scharakteryzowano przez pomiar ich średniej gęstości optycznej, od której odejmowano średnią gęstość optyczną odpowiedniej kontroli z użyciem IgG, wykonanej na tym samym szkiełku podstawowym, na którym wykonywano także badania immunocytochemiczne.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej (test t-Studenta).

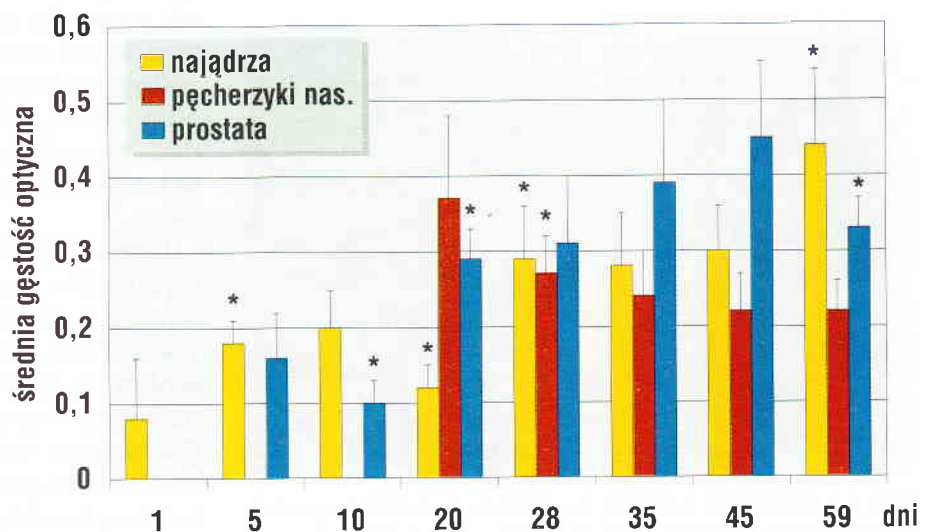
Wyniki i omówienie

Rycina 1 ilustruje zachowanie się gęstości optycznej reakcji immunocytochemicznej na peptydy bombezyno-podobne w najądrzu, pęcherzykach nasiennych i prostatie szczura w przebiegu rozwoju postembrionalnego szczura.

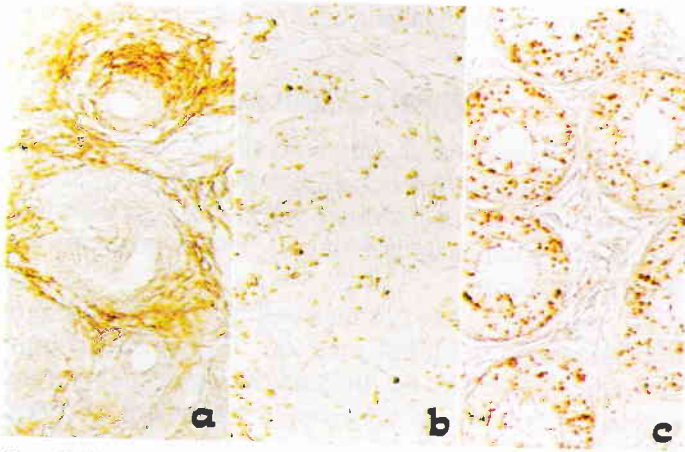
W najądrzu pozytywną reakcję obserwowano w 1 dniu życia, jej lokalizacja do 10 dnia życia obejmowała podścielisko łącznotkankowo-mięśniowe (ryc. 2a). W tym okresie gęstość optyczna reakcji stopniowo zwiększała się. W 20 dniu życia reakcja zmieniła swoją lokalizację z podścieliska do nabłonka gruczołowego (ryc. 2b, 2c). Gęstość optyczna reakcji w nabłonku gruczołowym zwiększała się w kolejnych dniach życia osiągając wartości najwyższe u szczurów dojrzałych 59-dniowych.

Pęcherzyki nasienne wykazywały pozytywną reakcję immunocytochemiczną na peptydy bombezyno-podobne począwszy od 20 dnia życia, przy czym do 35 występowała ona wyłącznie w tkankach podścieliska, a od 45 dnia w komórkach nabłonka gruczołowego (ryc. 3a, 3b i 3c). Wartości gęstości optycznej reakcji wykazywały wraz z wiekiem tendencję malejącą.

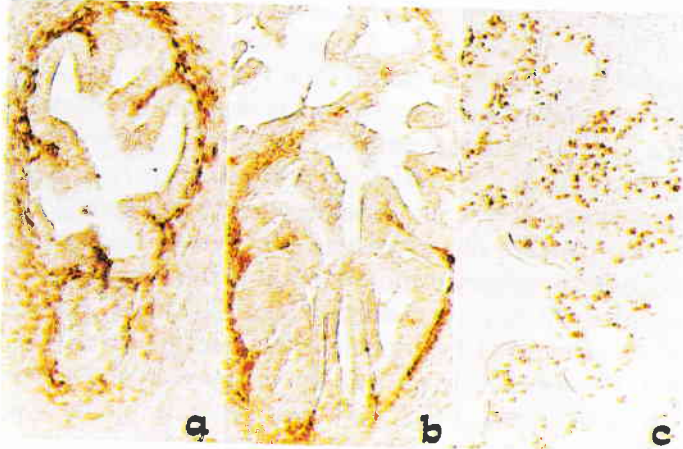
W prostatie obserwowano pozytywny odczyn na peptydy bombezyno-podobne od 5 dnia życia, przy czym do 10 dnia życia odczyn lokalizował się w obrębie podścieliska łącznotkankowo-mięśniowego (ryc. 4a). W tym okresie gęstość optyczna reakcji stopniowo obniżała się. W 20 i 28 dniu życia immunopoztywna reakcja zmieniła swoją lokalizację pojawiając się w strefie nadjądrowej komórek nabłonka gruczołowego, w przedziale komórek odpowiadających obecności aparatu Golgiego (ryc. 4b). Nasilenie odczynu było największe w 45 dniu życia (ryc. 4c). Podobnie



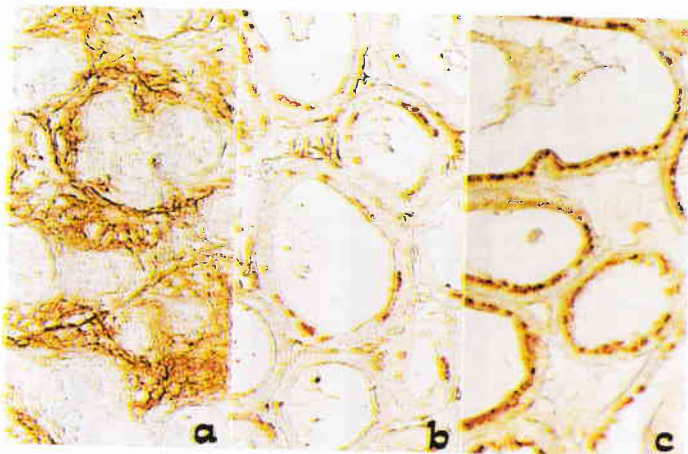
Ryc. 1. Graficzne przedstawienie średniej gęstości optycznej produktu reakcji immunocytochemicznej na bombezynę w najądrzach, pęcherzykach nasiennych i prostatkach szczurów 1-, 5-, 10-, 20-, 28-, 35-, 45- i 59-dniowych. Objasnienia: I – odchylenie standartowe, * $p \leq 0,05$ – różni się statystycznie od grupy młodszego wiekowo



Ryc. 2. Immunocytochemiczny odczyn na peptydy bombezyno-podobne w kanale najądrza szczura: a) 5-dniowego – odczyn zlokalizowany w podścielisku łącznotkankowo-mięśniowym; b) 20-dniowego – odczyn pojawia się w komórkach nabłonka gruczołowego; c) silny odczyn w komórkach nabłonkowych szczura 45-dniowego. Pow. około 400×



Ryc. 3. Odczyn na obecność peptydów bombezyno-podobnych w pęcherzykach nasiennych szczura: a) 20-dniowego – pozytywny odczyn w podścielisku narządu; b) 35-dniowego – silny pozytywny odczyn w podścielisku narządu; c) 45-dniowego – pozytywny odczyn w obrębie komórek nabłonka gruczołowego. Pow. około 400×



Ryc. 4. Lokalizacja odczynu na peptydy bombezyno-podobne w prostacie szczura: a) 10-dniowego – pozytywny odczyn w obrębie podścieliska łącznotkankowo-mięśniowego; b) 28-dniowego – odczyn zlokalizowany w strefie nadjądrowej komórki nabłonka gruczołowego; c) 45-dniowego – silny odczyn zlokalizowany jak na ryc. 4 b). Pow. około 400×

zachowywała się gęstość optyczna reakcji, której wartości rosły od 20 dnia, uzyskując wartość największą w 45 dniu, aby obniżyć się w 59 dniu życia. Zwraca uwagę podobieństwo zachowania się obrazu morfologicznego oraz wartości gęstości optycznej w najądrzu i prostacie.

W przedstawionych wyżej wynikach badań własnych nie udało się nam wykazać obecności odczynu na peptydy bombezyno-podobne w jądrze w żadnym z badanych okresów życia postnatalnego. Nie spotkaliśmy też w dostępnym piśmiennictwie danych na ten temat. Podobnie brak jest danych w piśmiennictwie dotyczących występowania peptydów bombezyno-podobnych w najądrzu. Wykazana przez nas reakcja na badane peptydy pojawiała się w najądrzu już w 1 dniu życia, przy czym początkowo lokalizowała się w podścielisku łącznotkankowo-mięśniowym, aby w 20 dniu pojawić się w przedziale komórek odpowiadających lokalizacji aparatu Golgiego komórek nabłonka gruczołowego, zaś gęstość odczynu wzrastała z wiekiem. Badania licznych autorów wykazały, że neuropeptydy wydzielane przez komórki neuroendokrynowe, w tym również peptydy bombezyno-podobne są odpowiedzialne za wzrost i różnicowanie się w układzie płciowym męskim (2, 7, 20). We wcześniejszych badaniach własnych nad postnatalnym rozwojem najądrza szczura wykazaliśmy, że takie parametry jak masa względna narządu, średnica kanału najądrza i wysokość nabłonka gruczołowego wzrastały stopniowo z wiekiem (11). Potwierdzałoby to sugestię, że peptydy bombezyno-podobne biorą udział we wzroście i różnicowaniu się najądrza.

W pęcherzykach nasiennych odczyn na peptydy bombezyno-podobne pojawiał się najpóźniej, dopiero w 20 dniu życia, zlokalizowany był tylko w podścielisku łącznotkankowo-mięśniowym, a jego gęstość optyczna malała z wiekiem. Opisana lokalizacja koresponduje z danymi Kilgore'a i wsp. (8), którzy w oparciu o metodę autoradiograficzną, wykazali w tkance mięśniowej pęcherzyków nasiennych szczura obecność podtypów receptorów wiążących peptydy bombezyno-podobne, GRP i neuromedynę B. Autorzy ci sugerują, że peptydy te mają regulować czynność układu reprodukcyjnego, a zwłaszcza jego funkcje wydzielnicze.

Bogatsze piśmiennictwo dotyczy występowania i roli peptydów bombezyno-podobnych w ludzkiej prostacie i to zarówno prawidłowej, jak i zmienionej nowotworowo. Aumuller (4) wyróżnił w nabłonku gruczołowym ludzkiej prostaty 4 rodzaje komórek: podstawowe, wydzielnicze, śluzowe i neuroendokrynowe. Prowadzone badania nad zachowaniem się peptydów bombezyno-podobnych w rozwoju embrionalnym ludzkiej prostaty wykazały, że pojawiają się one w 17 tygodniu ciąży, początkowo we włóknach nerwowych, a w 26 tygodniu lokalizują się w tkance mięśniowej gładkiej (7). Xue i wsp. (23) opierając się na obecności chromograniny A i serotoniny, będących wy-

znacznikami komórek neuroendokrynowych wykazały, że w ludzkiej prostatie pojawiają się one w 13 tygodniu ciąży i od tego czasu aż do dojrzałości ilość ich jest stała. Proces dojrzewania komórek neuroendokrynowych jest związany z dojrzewaniem prostaty, a zwłaszcza z rozwojem i różnicowaniem się komórek wydzielniczych nabłonka gruczołowego. Wykazało także stymulujący wpływ bombezyny na wzrost populacji komórek prostaty *in vitro* (9, 10). Badany odczyn na peptydy bombezyno-podobne pojawił się w prostatie w 5 dniu życia i podobnie jak w jądrzu początkowo zlokalizowany był w podścielisku łącznotkankowo-mięśniowym, aby w 20 dniu pojawić się w strefie nadjądrowej komórek nabłonka gruczołowego, utrzymując się w tej okolicy przez wszystkie badane okresy rozwoju. W badaniach własnych nad postembrionalnym rozwojem prostaty szczura (18) wykazaliśmy, że w 20 dniu życia prostata wykazuje największą średnią masę, a obraz morfologiczny jest już zbliżony do normy mimo, że szczur uzyskuje pełną dojrzałość około 60 dnia życia.

Opisane wyniki badań zbliżone są do wyników poprzednich badań własnych nad zachowaniem się innego neuropeptydu, cholecystokininy CCK-8 w układzie płciowym szczura w przebiegu rozwoju postnatalnego (17). Wykazaliśmy, że odczyn na CCK-8 w jądrzu i prostatie odpowiada lokalizacji aparatu Golgiego komórek nabłonka gruczołowego, a jego pojawienie się znacznie wyprzedza ostateczną dojrzałość tych narządów. Dane te sugerowałyby, że zarówno peptydy bombezyno-podobne, jak i CCK-8 są odpowiedzialne między innymi za wzrost i różnicowanie się gruczołów płciowych dodatkowych u szczura.

Piśmiennictwo

1. Abrahamsson P. A.: Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr. Relat. Cancer* 1999, 6, 503-519.
2. Acosta S., Dizely N., Pierzynowski S., Alm P., Abrahamsson P. A.: Neuroendocrine cells and nerves in the prostate of the guinea pig: effects of peripheral denervation and castration. *Prostate* 2001, 46, 191-199.
3. Anastasi A., Erspamer V., Bucci M.: Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 1971, 27, 166-167.
4. Aumuller G.: Postnatal development of the prostate. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)* 1991, 75, 39-42.

5. Dyszkiewicz W., Miśkowiak B., Piwkowski C. T., Kasprzyk M., Gąsiorowski L.: Resectable squamous cell carcinoma of the lung – does neuroendocrine differentiation affect the prognosis? *Współcz. Onkol.* 2001, 5, supl., 49.
6. Erspamer V., Erpamer G. F., Inselvini M. J.: Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1970, 22, 875-876.
7. Jen P. Y., Dixon J. S.: Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. *J. Anat.* 1995, 187, 169-179.
8. Kilgore W. R., Mantyh P. W., Mantyh C. R., McVey D. C., Vigna S. R.: Bombesin/GRP-preferring and neuromedin B-preferring receptors in the rat urogenital system. *Neuropeptides* 1993, 24, 43-52.
9. Lopez L. J., Patino A. J., Poce R. A., Munoz L. A., Troya V. J.: Effect of bombesin on cultured prostatic cells. *Actas Urol. Esp.* 1995, 19, 733-739.
10. Lopez L. J., Patino A. J., Poce R. A., Munoz L. A., Troya V. J.: Effect of the neuropeptides bombesin and calcitonin on the growth of prostate cell lines, PC-3, DU 145, and LNCaP. *Actas Urol. Esp.* 2000, 24, 779-784.
11. Limanowski A., Miśkowiak B., Otulakowski B., Partyka M., Komwerska A.: Morphometric studies on rat epididymis in the course of postnatal development (computerised image analysis). *Folia Histochem. Cytobiol.* 2001, 39, 201-202.
12. Malendowicz L. K., Miśkowiak B.: Effects of prolonged administration of neurotensin, arginine-vasopressin, NPY, and bombesin on blood TSH, T3 and T4 levels in the rat. *In vivo* 1990, 4, 259-261.
13. Malendowicz L. K., Nussdorfer G. G., Miśkowiak B., Majchrzak M.: Effects of bombesin on the morphology and function of the rat adrenal cortex: comparison of the acute and chronic responses. *Histol. Histopathol.* 1995, 10, 11-15.
14. Malendowicz L. K., Macchi C., Nussdorfer G. G., Miśkowiak B., Markowska A., Majchrzak M.: The role of bombesin in regulating rat pituitary-adrenocortical function. *Med. Sci. Res.* 1996, 24, 243-244.
15. Merali Z., McIntosh J., Anisman H.: Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides* 1999, 33, 376-386.
16. Merali Z., Kent P., Anisman H.: Role of bombesin-related peptides in the mediation or integration of the stress response. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59, 272-287.
17. Miśkowiak B., Limanowski A., Partyka M., Komwerska A.: Immunohistochemical studies on cholecystokinin (CCK-8) in male sex ontogeny of the rat in the course of postnatal development. *Urol. Pol. (w druku)*.
18. Otulakowski B., Limanowski A., Miśkowiak B., Partyka M., Komwerska A.: Badania histologiczne i morfometryczne brzusznej prostaty szczura w przebiegu rozwoju postnatalnego (komputerowa analiza obrazu). *Urol. Pol.* 2001, 54, 44-48.
19. Panula P.: Histochemistry and function of bombesin-like peptides. *Med. Biol.* 1986, 64, 177-192.
20. Sant'Agnes P. A. di: Calcitoninlike immunoreactive and bombesinlike immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1986, 110, 412-415.
21. Sun B., Halmos G., Schally A. V., Wang X., Martinez M.: Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate* 2000, 42, 295-303.
22. Wiedermann C. J.: Bombesin-like peptides as growth factors. *Wien. Klin. Wschr.* 1989, 101, 435-440.
23. Xue Y., van der Laak J., Smedts F., Schoots C., Verhofstad A., de la Rosette J., Schalken J.: Neuroendocrine cells during human prostate development: does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life? *Prostate* 2000, 42, 116-123.

Adres autora: prof. dr hab. Bogdan Miśkowiak, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: bmiszkow@mail.am.poznan.pl

ASCHFALK A., VALENTIN-WEIGAND P., MÜLLER W., GOETHE R.: Typy toksyn u *Clostridium perfringens* izolowanych od wolno żyjących częściowo udomowionych reniferów w Norwegii. (Types of toxins of *Clostridium perfringens* isolated from free-ranging, semidomesticated reindeer in Norway). *Vet. Rec.* 151, 210-213, 2002 (7)

Próbki kału pochodzące od 166 zdrowych udomowionych reniferów (*Rangifer tarandus tarandus*) z 3 stad pochodzących z hodowli usytuowanych na terenie Norwegii zbadano na obecność *Clostridium perfringens*. Klostridia wyosobniono z 98 (59%) próbek kału. Stosując test PCR sklasyfikowano wyosobnione szczepy na podstawie obecności genów odpowiedzialnych za produkcję czterech głównych toksyn (α , β , ϵ i τ) oraz β_2 -toksyny i enterotoksyny. Wszystkie szczepy wyosobnione z kału reniferów należały do typu A *C. perfringens*. Ponadto 15 z 98 szczepów posiadało gen odpowiedzialny za wytwarzanie β_2 -toksyny, zaś 2 szczepy posiadały gen kodujący produkcję enterotoksyny. G.

LAVEN R. A., HUNT H.: Ocena kąpieli w siarczanie miedzi, formalinie i w kwasie nadoctowym w leczeniu zapalenia skóry racic krów. (Evaluation of copper sulphate, formalin and paracetic acid in footbaths for the treatment of digital dermatitis in cattle). *Vet. Rec.* 151, 144-146, 2002 (5)

W leczeniu zapaleń skóry racic krów zastosowano kąpiele w różnych środkach odkażających. Racice kąpano codziennie przez 2 kolejne dni w roztworze erytromycyny (210 g erytromycyny/100 l wody), codziennie przez 7 dni w roztworze formaliny (6 kg/100 l), siarczaniu miedzi (2 kg/100 l) lub hiperoksie (1 kg kwasu nadoctowego/100 l). Kąpiele przyczyniły się do wyraźnej redukcji zmian skórnych. Zastosowane preparaty dawały identyczne efekty jak kąpiele w roztworze erytromycyny. G.