

# Włókna nerwowe SP-immunoreaktywne w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka

STANISŁAW FLIEGER, MARCIN B. ARCISZEWSKI, ANNA ZACHARKO

Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Flieger S., Arciszewski M. B., Zacharko A.

## SP-immunoreactive nerve fibers in the bulbourethral glands of male sheep

### Summary

The aim of the study was to identify nerve fibers immunoreactive to substance P in the bulbourethral glands of male sheep. The occurrence and distribution pattern of substance P-immunoreactive nerve fibers were studied using single immunohistochemical stainings. Co-existence of substance P with calcitonin gene-related peptide in the same nerve fibers was also studied using double immunohistochemical stainings.

Immunohistochemistry reveals that the bulbourethral glands of male sheep are rather poorly supplied with substance P-immunoreactive nerve fibers. Sparse substance P-immunoreactive nerve terminals were evenly distributed throughout the mucosal and muscular layers as well as around the blood vessels of the bulbourethral glands. A co-localization study indicates that immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide can also be found in the vast majority of the substance P-immunoreactive nerve fibers. The presence of substance P cannot be detected in some of the calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve terminals. It is possible that in the bulbourethral glands of male sheep substance P can be involved in several physiological processes including vasoconstriction and transmission of noxious stimuli into the spinal cord but such a hypothesis requires experimental verification.

**Keywords:** substance P, nerve fibers, bulbourethral glands, sheep

Już w latach trzydziestych ubiegłego wieku von Euler (20), a także Gaddum (22) opisywali substancję obecną w mózgu i jelitach koni, powodującą silny skurcz mięśniówki gładkiej wielu narządów i w swoim działaniu niezależną od atropiny. W kolejnych latach związek ten, od angielskiego słowa „powder”, określono jako substancję P (SP). Dopiero w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku po wykonaniu szeregu analiz chemicznych udało się zidentyfikować SP jako undekapeptyd (16) a w dalszej kolejności także laboratoryjnie ją zsyntetyzować (42). Dzisiaj wiemy, że SP razem z neurokininą A (substancją K), neurokininą B oraz neuropeptydem K należy do grupy związków biologicznie aktywnych, określanych mianem tachykinin.

Liczne badania wykorzystujące techniki immunohistochemiczne oraz hybrydyzacji *in situ* wykazały, że SP dość powszechnie występuje zarówno w centralnym (25, 34, 38), jak i obwodowym układzie nerwowym (14, 28, 32). Co więcej, pewne populacje afferentnych neuronów ze zwojów rdzeniowych oprócz obecności SP wykazują także immunoreaktywność na inne neuropeptydy, takie jak: peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP; 14, 21, 23, 32), galanina (32), bombezyna (14), cholecystokinina (23) czy też somatostatyna (14). Liczne zakończenia nerwowe zawierające SP stwierdzano, między innymi, w połączeniach

stawowych (43), kościach (10), skórze (45), gałce ocznej (41), gruczołach ślinowych (31), tarczycy (24), sercu (39), wątrobie (3), trzustce (1), jelitach (48), a także w licznych narządach moczowych i płciowych (4, 7, 8, 17, 26, 27, 40). Pomimo tak intensywnych badań dostępne są tylko nieliczne doniesienia dotyczące peptyderygicznego unerwienia prostaty oraz gruczołów pęcherzykowych samca owcy (6, 46), podczas gdy całkowicie brak badań dotyczących wewnętrznego unerwienia gruczołów opuszkowo-cewkowych.

Celem badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka obecne są zakończenia nerwowe zawierające SP oraz czy włókna te wykazują jednoczesną immunoreaktywność na CGRP? Uzyskane wyniki, oprócz wartości poznawczej stanowiąc będą podstawę do dalszych badań nad fizjologicznym i farmakologicznym wpływem układu nerwowego na czynność gruczołów płciowych dodatkowych.

### Materiał i metody

Do badań użyto czterech dojrzałych płciowo samców owcy rasy polska owca nizinna (masa ciała od 35 do 50 kg). Sposób postępowania ze zwierzętami, od których pobierano do badań gruczoły pozostawał w zgodzie z wytycznymi wydanymi przez Lokalną Komisję Etyczną w Lublinie i pokrywał się z wytycznymi zawartymi w Principles of Laboratory

Animal Care (NIH publication No. 86-23, revised in 1985). Wszystkie zwierzęta poddawano premedykacji przy zastosowaniu ksylazyny (Rometa, Spofa Praha, Republika Czeska, 0,4 mg/kg m.c., i.m.), po której wykonywano znieczulenie ogólne za pomocą ketaminy (Narkamon, Spofa Praha, Republika Czeska 10 mg/kg m.c., i.m.). W następstwie u zwierząt będących w głębokim znieczuleniu ogólnym wykonywano perfuzję przezsercową zbuforowanym 4% roztworem paraformaldehydu (pH = 7,3). Ze zwłok każdego z samców do dalszych badań pobierano gruczoły opuszkowo-cewkowe. Materiał ten dotrwalono przez 1 godzinę (1 h) w identycznym roztworze, jak użyty do perfuzji, następnie umieszczano na noc (około 12 godzin) w buforze fosforanowym (pH = 7,3) po czym ostatecznie przenoszono do 18% roztworu sacharozy (pH = 7,3) z dodatkiem 0,01% azydku sodu. Po wysyceniu sacharozą materiał otaczano medium mrożeniowym (JUNG Tissue Freezing Medium®, Leica Instruments GmbH, Niemcy) i krojono na kriostacie na seryjne skrawki o grubości 12 µm. Co piąty skrawek umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych chrom-alumem. Tak przygotowane preparaty posłużyły do pojedynczych oraz podwójnych barwień immunohistochemicznych.

Skrawki suszono przez 1 h w temperaturze pokojowej (TP), po czym wypłukano (3 × 15 min.) w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS; pH = 7,3). Skrawki wstępnie inkubowano przez 1 h w mieszaninie blokującej zawierającej 10% surowicę kozią, 0,1% albuminę bydlęcą, 1% Triton X-100, 0,05% trimerosal oraz 0,01% azydek sodu. Następnie na skrawki nakraplano rozcieńczone 1 : 250 mysie przeciwciała pierwotne skierowane przeciwko SP (Biogenesis, Wielka Brytania). Do badań kolokalizacyjnych (określających współwystępowanie SP z CGRP w tym samym włóknie nerwowym) używano mieszaniny dwóch gatunkowo odmiennych przeciwciał pierwotnych, tj. mysie anti-SP łączono z rozcieńczonymi 1 : 1400 króliczymi przeciwciałami pierwotnymi skierowanymi przeciwko CGRP (Affinity, Wielka Brytania). Zarówno w barwieniach pojedynczych, jak i podwójnych preparaty pozostawiano w komorze wilgotnej na całą noc (średnio około 12 godzin w TP).

Przy obu rodzajach barwień do wizualizacji przeciwciał pierwotnych anti-SP używano rozcieńczonych 1 : 400, FITC-skoniugowanych anti-mysich IgG (Cappel, Polska). W barwieniach podwójnych wizualizację pierwotnego przeciwciała anti-CGRP uzyskiwano za pomocą rozcieńczonej 1 : 5000, CY3-skoniugowanej streptawidyny (Jackson Immuno, USA) po uprzedniej inkubacji skrawków (1 h, TP) rozcieńczonymi 1 : 400 anti-króliczymi, biotynylowanymi IgG (Dako, Dania). Każdy z etapów barwienia poprzedzony był trzykrotnym płukaniem skrawków w PBS (po 15 minut każde). Ostatecznie wybarwione skrawki przykrywano zbuforowanym glicerolem, do którego dodawano 0,1% parafenylenodiaminy. Tak przygotowane preparaty oglądano pod sprzężonym z kamerą cyfrową (Olympus DP-50, Japonia) mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX-51, Japonia) wyposażonym w zestaw filtrów właściwych dla FITC (MNB2) i CY3 (MWG2). W kontroli przeciwciała pierwotne pominięto bądź też zastępowano nieimmunoreaktywnymi surowicami. Skrawki kontrolne nie wykazywały żadnej immunoreaktywności. Ocena ilościową włókien nerwowych immunoreaktywnych na SP (SP-IR) oraz CGRP (CGRP-IR) oceniano wzrokowo według następującej skali: – brak włókien, + pojedyncze włókna nerwowe, ++ umiarkowanie liczne włókna nerwowe, +++ włókna nerwowe liczne oraz ++++ włókna nerwowe bardzo liczne.

## Wyniki i omówienie

Pojedyncze barwienia immunohistochemiczne wykazały, że zarówno warstwa śluzówkowa, jak i warstwa mięśniowa gruczołów opuszkowo-cewkowych tryka są w różnym stopniu zaopatrywane przez włókna nerwowe zawierające SP. Tylko pojedyncze (+) włókna nerwowe lokalizowały się w warstwie mięśniowej gruczołów opuszkowo-cewkowych (ryc. 2a), podczas gdy nieco więcej (+/++) włókien SP-IR obecnych było w warstwie śluzówkowej gruczołu (ryc. 1a). W warstwie śluzówkowej gruczołów opuszkowo-cewkowych włókna nerwowe SP-IR tworzyły wyraźną zarysowaną sieć, z charakterystycznymi żyłakowatościami (ryc. 1a), biegnącą głównie w pasmach łącznotkankowych, wnikałymi w głąb narządu, zaś tylko pojedyncze zakończenia nerwowe leżały w bliskim sąsiedztwie pęcherzyków gruczołowych (ryc. 2a). Ponadto pewna ilość (++) włókien nerwowych SP-IR lokalizowała się wokół naczyń krwionośnych warstwy śluzówkowej.

Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały, że gruczoły opuszkowo-cewkowe samca owcy są obficie zaopatrywane we włókna CGRP-IR niż we włókna SP-IR. Zasadniczo w większości badanych włókien SP-IR obecny był także CGRP (ryc. 2b). Z drugiej jednak strony, duża część włókien CGRP-pozytywnych nie zawierała SP (ryc. 1b), zaś zdecydowanie najwięcej zakończeń nerwowych tego typu obserwowano w warstwie mięśniowej gruczołów opuszkowo-cewkowych. Liczne włókna CGRP-pozytywne występowały także w warstwie śluzówkowej (+++) oraz wokół naczyń krwionośnych (+++). Wszelkie dane ilościowe dotyczące rozkładu włókien nerwowych SP- i CGRP-IR w gruczołach opuszkowo-cewkowych samca owcy zostały zamieszczone w tabeli 1.

Tab. 1. Rozkład włókien nerwowych SP- oraz CGRP-immunoreaktywnych w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka

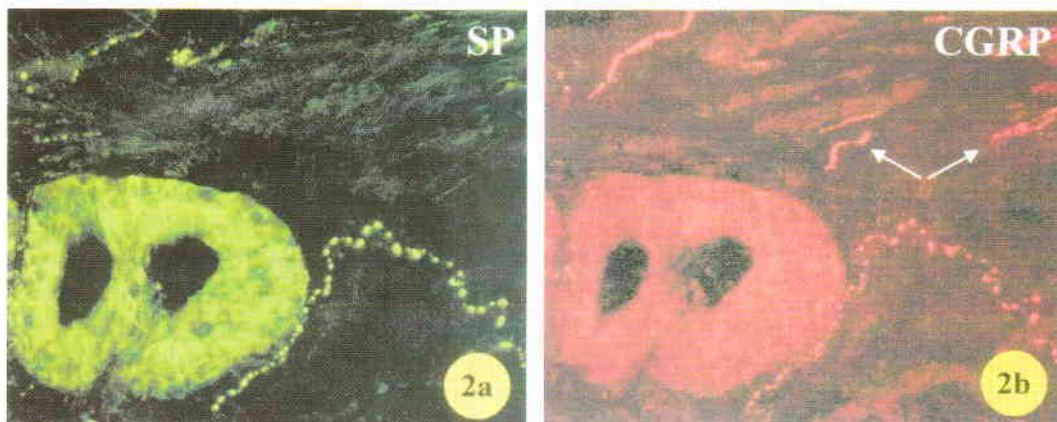
Gruczoły opuszkowo-cewkowe	SP	CGRP
Warstwa śluzówkowa (mucosal layer)	+/++	+++
Warstwa mięśniowa (muscular layer)	+	++/+++
Naczynia krwionośne (blood vessels)	++	+++

Jak wykazały badania immunohistochemiczne, gruczoły opuszkowo-cewkowe tryka są stosunkowo nielicznie zaopatrywane przez włókna nerwowe SP-IR. Przedstawiony powyżej schemat rozmieszczenia tych włókien istotnie przypomina schematy uprzednio opisywane u ogiera (7), buhaja (8) czy też chomika (17). Rezultaty badań kolokalizacyjnych wyraźnie wskazują, że obydwie warstwy (mięśniowa i śluzówkowa) gruczołów opuszkowo-cewkowych tryka są obficie zaopatrywane we włókna CGRP-IR niż SP-IR, co uprzednio opisywano chociażby u samca chomika (17).

Badania doświadczalne wyraźnie wykazują, że w układzie nerwowym SP pełni funkcję neurotransmisyjną (35), ale także neuromodulującą (15). Neuropeptyd ten jest syntetyzowany głównie w małych neuronach zwojów rdzeniowych (21), skąd dalej podlega



Ryc. 1a, b. Włókna nerwowe SP-immunoreaktywne (ryc. 1a) w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka w porównaniu z rozkładem włókien nerwowych CGRP-pozytywnych (ryc. 1b). Po analizie obydwu rycin strzałką zaznaczono włókna nerwowe zawierające wyłącznie CGRP. Pow. około  $\times 400$



Ryc. 2a, b. Podwójne barwienia immunohistochemiczne, przedstawiające zakończenia nerwowe w gruczołach opuszkowo-cewkowych samca owcy, wykazujące obecność SP (ryc. 2a) oraz CGRP (ryc. 2b). We włóknach SP-pozytywnych widoczna jest kolokalizacja z CGRP, jednak część włókien CGRP-pozytywnych nie wykazuje immunoreaktywności na SP. Pow. około  $\times 400$

transportowi w dwu kierunkach: do rdzenia kręgowego oraz do zakończeń nerwowych w narządach (11). O ile wiadomo, że SP w rdzeniu kręgowym odpowiedzialna jest za transmisję bodźców nocycyptywnych ze zwojów rdzeniowych (30), o tyle jej działanie w tkankach narządów jest tylko częściowo poznane. Dotychczas udało się ustalić, że SP posiada silne właściwości naczyniorozkurczające (33), zaś w układzie immunologicznym indukuje produkcję interelukin (37) oraz prawdopodobnie stymuluje proliferację limfocytów (36). W neuronach zwojów rdzeniowych po doświadczalnym wywołaniu stanu zapalnego następuje kilkukrotny wzrost poziomu SP (18). Podobne nasilenie ekspresji SP występuje także w neuronach zwojów współczulnych po doświadczalnym uszkodzeniu (przecięciu) zaopatrujących je nerwów (9). Dodatkowo wiadomo, że SP wykazuje silne działanie obkurczające na mięśniówkę gładką niektórych narządów, takich jak: pęcherzyk moczowy (47), gruczoły pęcherzykowe (40), nasienie (40) czy też gruczoł krokowy (44).

Biorąc pod uwagę rozmieszczenie włókien nerwowych o charakterze czuciowym (zawierających SP) w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka należy przypuszczać, że mogą być one zaangażowane w co

najmniej kilka czynności fizjologicznych. Znaczna ilość włókien SP-IR obecna wokół naczyń krwionośnych warstwy śluzówkowej sugeruje udział tego neuropeptydu w czynności naczyniorozszerzającej. Z kolei zakończenia nerwowe obecne w tkance łącznej i w bliskim sąsiedztwie pęcherzyków gruczołu mogą przewodzić bodźce nocycyptywne (w dużej mierze bólowe) do neuronów zwojów rdzeniowych. Za hipotezę tą przemawiałyby badania doświadczalne u owiec, w których po ekstyrpacji gruczołów opuszkowo-cewkowych znaczną populację zdegenerowanych neuronów wykazywano w krzyżowych zwojach rdzeniowych S1 i S2 (5). Z kolei w innych badaniach u świń (wykorzystujących do znakowania neuronów technikę tracingu retrogradowego) po iniekcji znaczników neuronalnych do gruczołów opuszkowo-cewkowych, wyznakowane neurony

czuciowe obecne były także w zwojach rdzeniowych odcinka krzyżowego rdzenia kręgowego (29).

Za obydwoma sugerowanymi funkcjami SP dodatkowo przemawia fakt, że w dominującej większości gruczołów opuszkowo-cewkowych tryka we włóknach SP-IR współwystępuje CGRP. Obydwa neuropeptydy wzajemnie na siebie oddziałują, co potwierdzono między innymi doświadczalnie, wykazując regulacyjny wpływ SP na naczyniorozszerzającą aktywność CGRP (głównie na drodze aktywacji komórek tłuszcznych) (13) oraz potęgujący wpływ CGRP na lokalne działanie SP i innych czynników prozapalnych (12).

Z kolei biorąc pod uwagę stosunkowo niewielką ilość włókien nerwowych SP-pozytywnych w warstwie mięśniowej gruczołów opuszkowo-cewkowych należy przypuszczać, że neuropeptyd ten tylko w znikomym stopniu (jeśli w ogóle) uczestniczy w czynności skurczowej narządu. Z drugiej jednak strony wiadomo, że CGRP posiada silny, kurczący wpływ na mięśniówkę gładką. Warstwa mięśniowa gruczołów opuszkowo-cewkowych owcy jest dość obficie zaopatrzona we włókna CGRP-pozytywne. Wydaje się więc, że ta substancja może być zaangażowana w czynność skurczową badanego gruczołu. Czynność ta może podlegać

dotkowej regulacji bliżej nieokreślonych czynników, bowiem, jak wykazano doświadczalnie, sam CGRP nie wpływa bezpośrednio na kurczliwość gruczołów opuszkowo-cewkowych chomika (2).

Reasumując, w niniejszych badaniach po raz pierwszy wykazano obecność oraz przedstawiono schemat rozmieszczenia w obrębie gruczołów opuszkowo-cewkowych samca owcy, włókien nerwowych immunoreaktywnych na SP. Neuropeptyd ten może być zaangażowany w pewne fizjologiczne czynności gruczołów płciowych, dodatkowych jednakże hipotezę tę należałoby zweryfikować na drodze doświadczalnej, chociażby z wykorzystaniem antagonistów SP.

## Piśmiennictwo

- Adeghate E.: Distribution of calcitonin-gene-related peptide, neuropeptide-Y, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin-8, substance P and islet peptides in the pancreas of normal and diabetic rats. *Neuropeptides* 1999, 33, 227-235.
- Afonso F., Sebastião A. M., Pinho M. S., Fernandes P., Ribeiro J. A., Mata L. R., Gulbenkian S.: Calcitonin gene-related peptide in hamster seminal vesicle and coagulating gland: An immunohistochemical, autoradiographical, and pharmacological study. *Peptides* 1996, 17, 1189-1195.
- Akiyoshi H., Gonda T., Terada T.: A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. *Liver* 1998, 18, 352-359.
- Alm P., Alumets J., Brodin E., Hakanson R., Nilsson G., Sjöberg N. O., Sundler F.: Peptidergic (substance P) nerves in the genito-urinary tract. *Neurosci.* 1978, 3, 419-425.
- Arciszewski M. B.: Badania nad lokalizacją autonomicznych ośrodków nerwowych gruczołów pęcherzykowych oraz gruczołów opuszkowo-cewkowych u tryka (Ovis aries). *Ann. UMCS sect. DD* 2002, 57, 1-11.
- Arciszewski M. B.: Distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP) and galanin (GAL) immunoreactive nerve fibers in the seminal vesicle and prostate of the male sheep. *Ann. Anat.* 2004, 186, 1-5.
- Arrighi S., Domeneghini C.: Localization of regulatory peptides in the male urogenital apparatus of domestic equidae: a comparative immunohistochemical study in *Equus caballus* and *Equus asinus*. *Histol. Histopathol.* 1997, 12, 297-310.
- Arrighi S., Domeneghini C.: Immunolocalization of regulatory peptides and 5-HT in bovine male urogenital apparatus. *Histol. Histopathol.* 1998, 13, 1049-1059.
- Bergner A. J., Murphy S. M., Anderson C. R.: After axotomy, substance P and vasoactive intestinal peptide expression occurs in pilomotor neurons in the rat superior cervical ganglion. *Neurosci.* 2000, 96, 611-618.
- Björholm A., Reichbergs A., Brodin E., Schultzberg M.: Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 1991, 9, 165-171.
- Brimijoin S., Lundberg J. M., Brodin E., Hökfelt T., Nilsson G.: Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brain Res.* 1980, 191, 443-457.
- Brain S. D., Williams T. J.: Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 1985, 86, 855-860.
- Brain S. D., Williams T. J.: Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1988, 335, 73-75.
- Cameron A. A., Leah J. D., Snow P. J.: The coexistence of neuropeptides in feline sensory neurons. *Neurosci.* 1988, 27, 969-979.
- Cao Y. Q., Mantyh P. W., Carlson E. J., Gillespie A. M., Epstein C. J., Basbaum A. I.: Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 1998, 392, 390-394.
- Chang M. M., Leeman S. E., Niall H. D.: Amino-acid sequence of substance P. *Nature (New Biol.)* 1971, 232, 86-87.
- Chow P. H., Dockery P., Cheung A.: Innervation of accessory sex glands in the adult male golden hamster and quantitative changes of nerve densities with age. *Andrologia* 1997, 29, 331-342.
- Donnerer J., Schuligoi R., Stein C.: Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neurosci.* 1992, 49, 693-698.
- El-Salhy M., Stenling R., Grimelius L.: Peptidergic innervation and endocrine cells in the human liver. *Scand. J. Gastroenterol.* 1993, 28, 809-815.
- Euler U. S. von, Gaddum J. H.: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol. (Lond)* 1931, 72, 74-87.
- Franco-Cereceda A., Henke H., Lundberg J. M., Petermann J. B., Hökfelt T., Fischer J. A.: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides* 1987, 8, 339-410.
- Gaddum J. H., Schild H. O.: Depressor substances in extracts of intestine. *J. Physiol. (Lond)* 1934, 83, 1-14.
- Gibbins I. L., Furnes J. B., Costa M.: Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 1987, 248, 417-437.
- Grunditz T., Håkanson R., Sundler F., Uddman R.: Neurokinin A and Galanin in the thyroid gland: neuronal localization. *Endocrinology* 1987, 121, 575-585.
- Hökfelt T., Kellererth J.-O., Nilsson G., Pernow B.: Substance P localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 1975, 190, 889-890.
- Kaleczyc J., Timmermans J.-P., Majewski M., Łakomy M., Scheuermann D. W.: Immunohistochemical characteristics of nerve fibers supplying the porcine vas deferens. A colocalization study. *Histochem Cell Biol.* 1997, 107, 229-241.
- Kaleczyc J., Scheuermann D. W., Pidsudko Z., Majewski M., Łakomy M., Timmermans J.-P.: Distribution, immunohistochemical characteristics and nerve pathways of primary sensory neurons supplying the porcine vas deferens. *Cell Tissue Res.* 2002, 310, 9-17.
- Kaleczyc J., Sienkiewicz W., Klimczuk M., Czaja K., Łakomy M.: Differences in the chemical coding of nerve fibres supplying major populations of neurons between the caudal mesenteric ganglion and anterior pelvic ganglion in the male pig. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2003, 41, 201-211.
- Klimczuk M., Kaleczyc J.: Lokalizacja i chemiczne kodowanie neuronów oraz drogi dojścia włókien nerwowych zaopatrujących gruczoł opuszkowo-cewkowy samca świni. XXXIX Sympozjum PTHiC, Wrocław, Mat. zjazdowe 2003, s. 22.
- Kuraishi Y., Hirota N., Sato Y., Hino Y., Satoh M., Takagi H.: Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn. *Brain Res.* 1985, 325, 294-298.
- Kusakabe T., Matsuda H., Kawakami T., Syoui N., Kurihara K., Tsukuda M., Takenaka T.: Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the human submandibular gland, with special reference to the difference between serous and mucous acini. *Cell Tissue Res.* 1997, 288, 25-31.
- Landry M., Aman K., Dostrovsky J., Lozano A. M., Carlstedt T., Spenger C., Josephson A., Wiesefeld-Hallin Z., Hökfelt T.: Galanin expression in adult human dorsal root ganglion neurons: initial observations. *Neurosci.* 2003, 117, 795-809.
- Lembeck F., Holzer P.: Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1979, 310, 175-183.
- Nakaya Y., Kaneko T., Shigemoto R., Nakanishi S., Mizuno N.: Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1994, 347, 249-274.
- Otsuka M., Yoshioka K.: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 1993, 73, 229-308.
- Payan D. G.: Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu. Rev. Med.* 1989, 40, 341-352.
- Rameshwar P., Gascon P., Ganea D.: Stimulation of interleukin 2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J. Immunol.* 1993, 151, 2484-2496.
- Schults C. W., Quirion R., Chronwall B., Chase T. N., O'Donohue T. L.: A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* 1984, 5, 1097-1128.
- Steele P. A., Gibbins I. L., Morris J. L., Mayer B.: Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart. *Neurosci.* 1994, 62, 241-250.
- Stjernquist M., Håkanson R., Leander S., Owman C., Sundler F., Uddman R.: Immunocytochemical localization of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin-releasing peptide in vas deferens and seminal vesicle, and the effect of these and eight other neuropeptides on resting tension and neurally evoked contractile activity. *Regul. Pept.* 1983, 7, 67-86.
- Stone R. A.: Substance P-like immunoreactive nerves in the human eye. *Arch. Ophthalmol.* 1985, 103, 1207-1211.
- Tregear G. W., Niall H. D., Potts J. T., Leeman S. E., Chang M. M.: Synthesis of substance P. *Nature (New Biol.)* 1971, 232, 87-89.
- Uddman R., Grunditz T., Kato J., Sundler F.: Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat. Embryol.* 1998, 197, 273-282.
- Ventura S., Lau W. A. K., Buljubasich S., Pennefather J. N.: Species differences in the actions of sensory neuropeptides on contractility of the smooth muscle of the rat and guinea-pig prostate. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000, 27, 917-921.
- Verze L., Parainfo A., Viglietti-Panzica C., Panzica G. C., Ramieri G.: Expression of neuropeptides and growth-associated protein 43 (GAP-43) in cutaneous and mucosal nerve structures of the adult rat lower lip after mental nerve section. *Ann Anat.* 2003, 185, 35-44.
- Vittoria A., la Mura E., Cocca T., Cecio A.: Serotonin-, somatostatin- and chromograin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. *J. Anat.* 1990, 171, 169-178.
- Watts S. W., Cohen M. L.: Effect of bombesin, bradykinin, substance P and CGRP in prostate, bladder body and neck. *Peptides* 1991, 12, 1057-1062.
- Wathuta E. M.: The distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like, substance P-like and bombesin like immunoreactivity in the digestive system of the sheep. *Q. J. Exp. Physiol.* 1986, 71, 615-631.