

# Dystrybucja wazoaktywnego peptydu jelitowego i neuropeptydu Y w neuronach zwojów lędźwiowo-krzyżowych pnia współczulnego świni

CEZARY SKOBOWIAT, SŁAWOMIR GONKOWSKI, JOANNA WOJTKIEWICZ,  
AGNIESZKA BOSSOWSKA, MARIUSZ MAJEWSKI

Zespół Fizjologii Klinicznej Katedry Morfologii Funkcjonalnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,  
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Skobowiat C., Gonkowski S., Wojtkiewicz J., Bossowska A., Majewski M.

## Distribution patterns of vasoactive intestinal peptide and NPY in the lumbar-sacral sympathetic chain ganglia of pigs

### Summary

The aim of the study was to determine the existence and co-existence patterns of VIP and NPY in neurons and nerve fibers of porcine lumbar-sacral sympathetic chain ganglia. The studied ganglia were fixed with 4% buffered paraformaldehyde (perfusion) and then labeled by means of double-immunofluorescence using a mixture of antibodies cultivated in different species.

The highest number of NPY-positive cells was observed in the lumbar ganglia and diminished in the direction of the caudal, where only single neurons were observed. In contrast, a different pattern of distribution was observed for VIP-positive neurons, whose number was higher in the more caudally located ganglia. Two populations of VIP-positive neurons could be distinguished: single, showing strong immunofluorescence and often with visible processes, located in the central part of the ganglia and a second population, composed of clusters of 4-8 cells and often co-localizing NPY. VIP-positive nerve fibers surrounded both NPY<sup>+</sup> neurons and neurons lacking either NPY and/or VIP. The presence of a small number of NPY-positive neurons exhibiting very weak immunofluorescence in more caudally located SChG could suggest a "switch" of neuromediators produced there. An increase in the percentage of non-noradrenergic sympathetic neurons in more caudally located SChG may thus be implicative for a specific innervation pattern of target tissues of these ganglia.

**Keywords:** neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide

Zwoje pnia współczulnego (SChG), skupiające zwojowe neurony współczulne oraz wewnątrzwojowe włókna nerwowe, posiadają typowy układ metameryczny, odpowiadający budowie rdzenia kręgowego, gdzie w jądrach pośrednio-bocznych odpowiednich neuromerów zlokalizowane są zaopatrujące je neurony przedzwojowe (9). Zdecydowana większość tych komórek wykorzystuje noradrenalinę (NA) jako swój główny neurotransmitter, ponieważ wykazano w nich obecność enzymów warunkujących syntezę katecholamin, tzw. enzymów markerowych – hydroksylazy tyrozyny (TH) oraz  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy – (D $\beta$ H) (7, 11). Dzięki użyciu technik wielokrotnych barwień immunofluorescencyjnych wykazano także, że neurony SChG mogą syntetyzować, w dodatku do NA, także wiele innych substancji biologicznie aktywnych, używanych potem jako komediatory/modulatory w transmisji nerwowej. Wśród nich wspomnieć należy o takich, jak: neuropeptyd Y (NPY; 2, 14), so-

matostatyna (SOM; 2, 13), peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP) i/lub substancja P (SP; 11, 12), wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP; 5, 7, 13), peptyd aktywujący cyklazę adenylową przysadki (PACAP; 17), galanina (GAL; 13), opioidy: Leu<sup>5</sup>-enkefalina (LENK), dynorfina A (DYN A) i  $\alpha$ -neoendorfina ( $\alpha$ -NEO; 6) oraz Met<sup>5</sup>-enkefalina-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (MEAGL; 12, 20). W niektórych komórkach zwojów pnia współczulnego stwierdzono obecność enzymu syntetyzującego acetylocholinę (acetylotransferaza cholinową – ChAT), a także jej transporter pęcherzykowy (VACHT), co świadczy o tym, iż neurony te należą do populacji współczulnych komórek cholinergicznyc (13, 19). Co więcej, niektóre neurony zawierały syntazę tlenu azotu (NOS), enzym będący znakiem populacji komórek nitregicznych, wykorzystujących tlenek azotu jako swój transmitter (1, 8).

Stwierdzenie współwystępowania niektórych z wymienionych powyżej substancji w tym samym neuro-

nie pozwoliło na wyróżnienie, ze względu na charakterystyczne „kodowanie neuronalne”, kilku populacji neuronalnych, którym przypisuje się specyficzne funkcje. Najbardziej liczna i charakterystyczna była populacja komórek wykazujących immunoreaktywność (IR) zarówno w stosunku do TH i  $D\beta H$ , jak i NPY (4, 6, 7, 13, 16) i kontrolująca głównie układ naczyniowy. Obserwowano jednak także inaczej kodowane populacje neuronalne, na przykład komórki VIP- i NPY-immunonegatywne lub VIP-pozytywne, lecz NPY-immunonegatywne, określane mianem populacji nieadrenergicznej i niecholinergiczej (NANC; 7, 11).

Należy podkreślić, że zdecydowana większość prac na temat neurochemicznej organizacji zwojów przykręgowych dotyczy badań wykonanych na zwoju szyjnym doczaszkowym, który głównie ze względu na swą dostępność preparacyjną był chętnie wykorzystywany do badań (2, 10, 13, 19). Niewiele jest natomiast danych na temat kodowania chemicznego neuronów SChG odcinka lędźwiowo-krzyżowego, które dają początek zazwojowym włóknom współczulnym zaopatrującym narządy jamy brzusznej i miednicy. Dostępne wyniki badań sugerują istnienie znacznych różnic w ich kodowaniu zarówno pomiędzy poszczególnymi segmentami pnia współczulnego, jak i gatunkami zwierząt (4, 5). Większość badań nad dystrybucją i współwystępowaniem neuropeptydów w komórkach SChG przeprowadzono u „typowych” zwierząt laboratoryjnych, jak szczur (1, 19, 20) i świnka morska (6, 13, 16), podczas gdy dane dotyczące neurochemicznej organizacji SChG innych gatunków zwierząt są nadal fragmentaryczne.

Celem niniejszej pracy było porównanie wzorów współwystępowania NPY i VIP w komórkach zwojów lędźwiowych i krzyżowych pnia współczulnego. Uzyskane wyniki poszerzą dostępną wiedzę o neurochemicznych właściwościach neuronów SChG świni, uzupełniając jednocześnie ogólną wiedzę o budowie i funkcjach zwojów pnia współczulnego ssaków.

### Materiał i metody

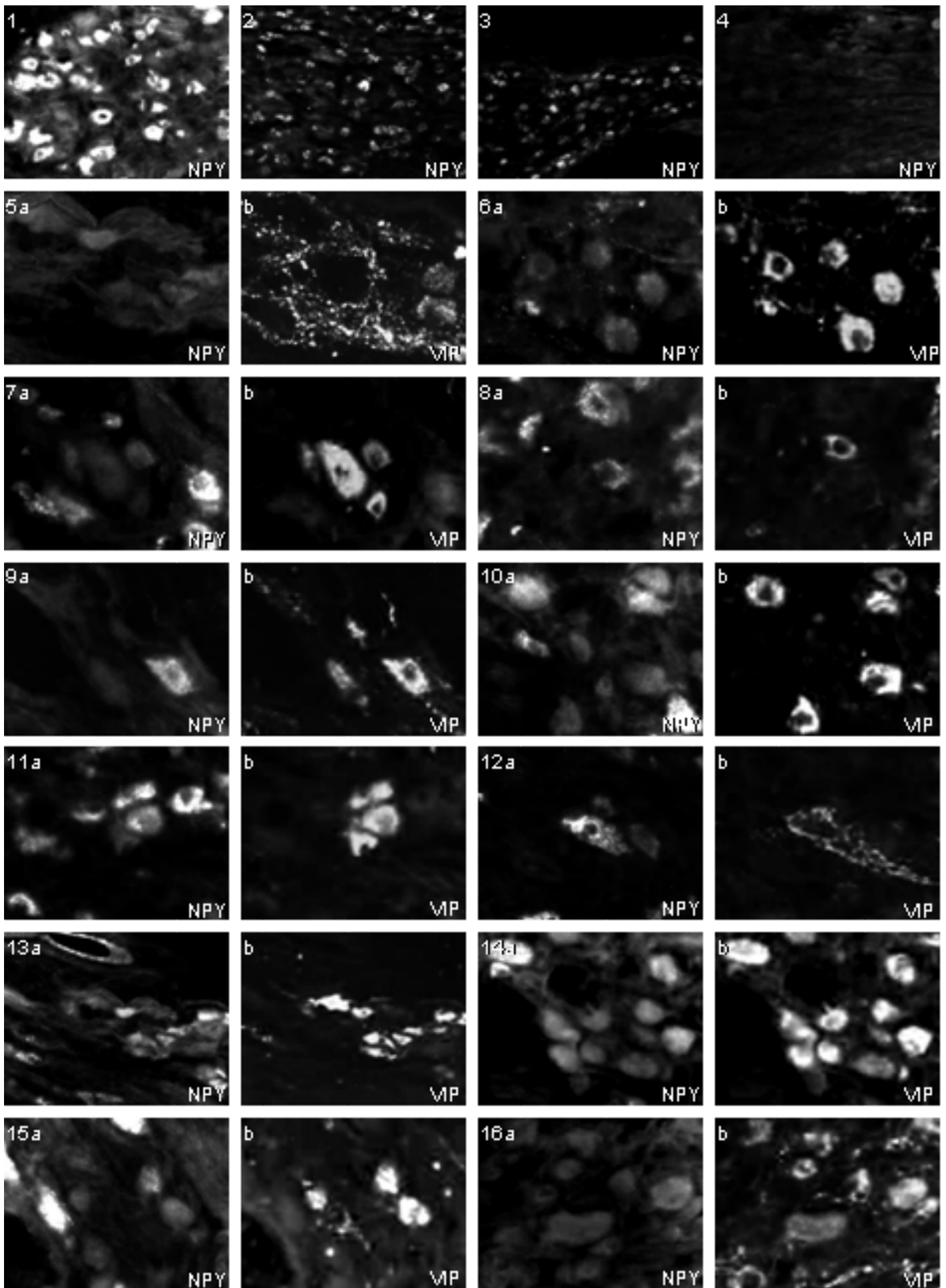
Badania przeprowadzono na trzech niedojrzałych płciowo loszkach rasy wielka biała polska, o masie ciała ok. 20 kg każda. Wszystkie zabiegi zostały wykonane zgodnie ze wskazaniami Lokalnej Komisji Etycznej. Po premedy-

kacji (Atropinum sulphuricum, Polfa, 0,04 mg/kg m.c., s.c.; Azaperone, Janssen, Belgia, 2 mg/kg m.c. i.m.) zwierzęta wprowadzono w stan głębokiej narkozy 2,5% roztworem tiopentalu sodu (Polfa) w iniekcji dożylniej. Bezpośrednio po zatrzymaniu akcji serca zwierzęta poddano transkardialnej perfuzji 4% zbuforowanym (0,1 M, pH = 7,4) roztworem paraformaldehydu. Zwoje pnia współczulnego odcinków lędźwiowych ( $L_5$  i  $L_6$ ) oraz krzyżowych ( $S_{1-3}$ ) zostały pobrane i dotrwalone przez 20 minut w tym samym roztworze utrwalacza. Następnie tkanki były kilkakrotnie płukane w buforze fosforanowym (0,1 M, pH = 7,4) i przełożone na 14 dni do 18% roztworu sacharozy. Ze zwojów wykonano skrawki mrożeniowe o grubości 10  $\mu m$  i poddano standardowym podwójnym barwieniom immunohistochemicznym z użyciem mieszaniny pierwotnych przeciwciał uzyskanych u różnych gatunków zwierząt. Wykorzystano następujące przeciwciała: poliklonalne przeciwciało rozpoznające NPY, uzyskane u szczura (Affiniti, NZ1115, stosowane w rozcieńczeniu 1 : 300) oraz poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko VIP, uzyskane u królika (ICN, 11428, stosowane w rozcieńczeniu 1 : 12 000). Kompleksy antygen-przeciwciało uwidaczniane były za pomocą mieszaniny wtórnych przeciwciał, specyficznie rozpoznających IgG szczura (fragment F(ab) IgG osła, sprzężonej z FITC; Jackson Immunores, USA, 712-006-153, stosowane w rozcieńczeniu 1 : 1000; barwienie na kolor zielony) lub IgG królika (fragment F(ab) IgG osła, sprzężonej z Cy3; Jackson Immunores, USA, 711-166-152, stosowane w rozcieńczeniu 1 : 5000; barwienie na kolor czerwony). Wybarwione skrawki oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym, Olympus BX51, wyposażonym w odpowiednie zestawy filtrów, a następnie fotografowano kamerą cyfrową połączoną z mikroskopem, przy użyciu programu AnalySIS Software (ver. 3.2, Soft Imaging System GmbH, Niemcy).

### Wyniki i omówienie

W badanych zwojach lędźwiowych pnia współczulnego zdecydowanie dominująca była populacja neuronów NPY-IR, jakkolwiek ich udział procentowy w całej populacji komórek zwojowych zmieniał się i malał w kierunku doogonowym. Najwięcej neuronów NPY-IR ok. 85% wszystkich komórek obserwowano w zwoju  $L_5$ , a ich względna liczba malała odpowiednio do 75% w  $L_6$ , 60% w  $S_1$ , 20% w  $S_2$  i 9% w  $S_3$ . W zwojach odcinka lędźwiowego komórki NPY-IR były równomiernie rozproszone w całym przekroju

- Ryc. 1-4. Wzory rozmieszczenia neuronów NPY-IR w zwojach  $L_5$  (ryc. 1),  $S_1$  (ryc. 2),  $S_2$  (ryc. 3) i  $S_3$  (ryc. 4)  
 Ryc. 5. Przykład rozmieszczenia VIP-IR włókien nerwowych wokół NPY- (a) i VIP-immunonegatywnych (b) komórek SChG. Zwój  $L_5$   
 Ryc. 6-9. Wzory kolokalizacji NPY i VIP w komórkach zwojów lędźwiowych pnia współczulnego. Ryc. 6 przedstawia przykład współwystępowania obu peptydów w luźnych skupiskach neuronów zwoju  $L_6$ , podczas gdy ryc. 7 przedstawia przykład braku takiej kolokalizacji. Ryciny 8 i 9 przedstawiają odpowiednio brak kolokalizacji (ryc. 8) i współwystępowanie (ryc. 9) NPY i VIP w leżących pojedynczo, intensywnie wybarwionych komórkach VIP-IR zwojów odcinka lędźwiowego  
 Ryc. 10-11. Wzory współwystępowania NPY (a) i VIP (b) w dogłowej części zwoju  $S_1$  (ryc. 10) i zwoju segmentu  $L_6$  (ryc. 11)  
 Ryc. 12. Przykład wybiórczego unerwienia neuronu NPY-IR (a) przez gęstą sieć włókien VIP-IR (b). Tak unerwiane komórki NPY-IR nigdy jednocześnie nie zawierały VIP. Zwój  $L_6$   
 Ryc. 13-16. Przykłady różnych wzorów współwystępowania NPY (a) i VIP (b) w odpowiednio: zwoju  $S_1$  (część dogłowa – ryc. 13, część doogonowa – ryc. 14), zwoju  $S_2$  (ryc. 15) oraz zwoju  $S_3$  (ryc. 16)



zwojów i cechowała je intensywna immunofluorescencja (ryc. 1). Zwoje odcinka krzyżowego pnia współczulnego (ryc. 2-4) zawierały znacznie mniej komórek NPY-IR w porównaniu do segmentów lędźwiowych (patrz wyżej). Mimo że były one podobnie równomiernie rozmieszczone w obrębie zwojów, to wykazywały różną intensywność fluorescencji. Część populacji komórek NPY-IR wykazywała intensywną immunofluorescencję, a część relatywnie słabszą (ryc. 2, 3). We wszystkich badanych zwojach zaobserwowano także niewielką liczbę komórek NPY- i VIP-immunonegatywnych, ułożonych w grupy, które oplecione były gęstą siecią włókien VIP-IR (ryc. 5).

Podobnie jak w przypadku komórek NPY-IR, także rozmieszczenie oraz liczba neuronów VIP-IR różniła się znacznie w zwojach lędźwiowych i krzyżowych, aczkolwiek obserwowana tendencja była odwrotna w stosunku do odnotowanej dla NPY. Najmniejsza liczba komórek VIP-IR (w stosunku do całkowitej liczby neuronów) obserwowana była odpowiednio w zwojach  $L_5$  (7,5%) i  $L_6$  (11,3%), gdzie tworzyły one grupy komórek (od 4 do 8 neuronów), ułożone w centralnej części zwoju, zwykle otoczone przez gęstą sieć włókien VIP-IR (ryc. 6). Część populacji komórek VIP-IR zlokalizowana była również w obwodowych częściach zwoju (ryc. 8). Niewielka liczba komórek VIP-IR, charakteryzująca się bardzo silną immunofluorescencją, występowała jako samotnie położone neurony (ryc. 7). Na obrzeżach zwojów  $L_5$ ,  $L_6$  i  $S_1$  obserwowano grube pęki włókien NPY-pozytywnych z wtrąconymi pomiędzy nie włóknami VIP-IR; jednak nie stwierdzano tu przypadków kolokalizacji. W obwodowych rejonach zwoju  $S_2$  obserwowano jedynie pojedyncze włókna NPY-IR, natomiast włókien tych nie stwierdzono w zwoju  $S_3$  (ryc. 16). Charakterystyczny wzór rozmieszczenia komórek VIP- i/lub NPY-IR obserwowano w zwoju  $S_1$ . W jego przedniej części stwierdzono zdecydowanie większą liczbę neuronów NPY-IR niż w części doogonowej, a wzrastała natomiast liczba komórek VIP-IR. W obrębie całego zwoju  $S_1$  zdecydowana większość komórek VIP-pozytywnych zawierała jednocześnie NPY, zarówno w części dogłowej (ryc. 10), jak i doogonowej zwoju (ryc. 14).

W zwojach lędźwiowych włókna VIP-IR zaopatrywały wszystkie grupy komórek, jednak największa ich liczba towarzyszyła komórkom VIP pozytywnym, zarówno zawierającym NPY, jak i NPY-immunonegatywnym (ryc. 6, 9). Gęste sieci włókien VIP-IR otaczały głównie komórki przynależące do populacji VIP/NPY-immunonegatywnych oraz NPY-IR, lecz VIP-immunonegatywnych (ryc. 5, 12). Natomiast w zwojach krzyżowych, a zwłaszcza w  $S_2$  i  $S_3$ , tworzyły one gęste sieci o bardzo intensywnej immunofluorescencji, rozciągające się na znaczne obszary zwoju (ryc. 16). W zwojach  $S_2$  i w  $S_3$  stwierdzono dalszy wzrost liczby komórek VIP-IR (do odpowiednio 15% i 40% całej populacji neuronalnej). Komórki

VIP-IR miały większą średnicę, lecz wykazywały mniej intensywną immunofluorescencję niż obserwowano w zwojach lędźwiowych. Były one rozmieszczone głównie w centralnej części zwoju (ryc. 14, 16).

Kolokalizacja NPY i VIP w neuronach SChG była obserwowana we wszystkich badanych zwojach. W zwojach  $L_5$  i  $L_6$  dotyczyła zarówno części komórek tworzących skupiska neuronalne (ryc. 11), jak i neuronów zlokalizowanych na obrzeżach zwoju (ryc. 9). Część komórek VIP-IR, zarówno tworzących grupy neuronalne, jak i leżących samotnie, nie zawierała NPY (ryc. 7, 8). Wzrost częstotliwości współwystępowania badanych substancji odnotowano w zwoju  $S_1$ , zwłaszcza w stosunku do małych, samotnie leżących komórek w doogonowej części zwoju. Z kolei w zwoju  $S_2$  obserwowano już tylko nieliczną populację komórek NPY/VIP-IR (ryc. 15), podczas gdy w zwoju  $S_3$  tylko pojedyncze komórki zawierały równocześnie obie substancje (ryc. 16).

Do chwili obecnej brak było doniesień wykazujących istnienie różnic we wzorze współwystępowania VIP i NPY w neuronach zwojów lędźwiowych i krzyżowych pnia współczulnego. Większość dostępnych wyników dotyczyła jedynie segmentów szyjnych i piersiowych SChG (2, 10, 13, 19). Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają istnienie dwu populacji komórek VIP-IR w badanych odcinkach pnia współczulnego: 1) neurony tworzące kilkunastokomórkowe grupy, skupione w centralnych częściach zwoju oraz 2) pojedyncze, leżące samotnie i rozproszone w obrębie całego zwoju, co zostało wcześniej opisane w odcinku piersiowym u świni (15), szczura (2, 10), świnki morskiej (6) oraz kota (11, 12, 14).

Dostępne dane wskazują na zdecydowanie noradrenergiczny charakter komórek SChG (4, 6, 7, 13, 16) u wielu gatunków zwierząt, co po części tłumaczy wysoki procent komórek NPY-IR opisanych w niniejszej pracy. Istnieją doniesienia sugerujące, iż jedynie około 10% komórek noradrenergicznych SChG odcinka piersiowego i lędźwiowego zawiera jednocześnie NPY (15), co potwierdza obserwowaną w niniejszej pracy tendencję do zmniejszania się liczby komórek NA/NPY-pozytywnych w zwojach położonych coraz bardziej doogonowo.

W SCG kota część populacji nie-noradrenergicznych neuronów VIP-IR, lecz NPY-immunonegatywnych była jednocześnie SP/CGRP-IR. Zakłada się, że komórki te zaopatrują gruczoły potowe lub też, przynajmniej w części, naczynia krwionośne mięśni szkieletowych (11). Część tych komórek ma charakter cholinergicznego (i/lub nitrenergicznego), jako że w zwojach SChG obserwowano niewielki procent VAcHt/VIP-pozytywnych neuronów, które jednocześnie nie zawierały TH (6, 18, 19), a w części były NOS-IR (8). Podobnie jak powyżej, strukturami docelowymi unerwianymi przez tak kodowaną populację neuronalną są gruczoły potowe i/lub naczynia mięśni szkieletowych kończyn (18, 19).

Doświadczenia przeprowadzone z użyciem znaczników retrogradywnych wykazały, że narządami docelowymi neuronów SChG odcinków lędźwiowego i krzyżowego są także jelita grube, układ moczowy oraz rozrodczy (4, 21, 22). Neurony D $\beta$ H/NPY-IR zaopatrują najprawdopodobniej głównie naczynia jamy brzusznej i miednicy (3, 4, 20). Wydaje się, że pozostałe komórki badanych zwojów, drogą nerwów trzewnych lędźwiowych i/lub krzyżowych, zaopatrują także mięśnie gładkie ścian naczyń i narządów jamy brzusznej i miednicy oraz neurony układu jelitowego, a także zwoje miedniczne (9, 21).

Niewielka ilość włókien NPY-IR, zaobserwowana w neuropilu badanych zwojów, może stanowić aksony i/lub dendryty głównych komórek zwojowych (podobnie jak opisano to u świni i kota; 12, 15) lub też być wypustkami komórek SIF, pełniących funkcje parakrynną w badanych SChG (6). W niniejszej pracy, w neuropilu badanych zwojów obserwowano dwa rodzaje włókien VIP-IR: pierwszy typ stanowiły grube pęki wypustek nerwowych, układających się równolegle do długiej osi zwoju, podobnie jak miało to miejsce u świnki morskiej (6), podczas gdy drugi typ wypustek VIP-IR stanowiły włókna nerwowe tworzące struktury koszyczkopodobne wokół neuronów zarówno VIP-IR, jak i – immunonegatywnych, podobnie jak opisane w odcinku piersiowym pnia współczulnego świni (7, 15) i innych gatunków ssaków. Dość częsta kolokalizacja pomiędzy VIP a NPY w komórkach zwojów lędźwiowych, a zwłaszcza w zwoju S<sub>1</sub>, obserwowana była także u świnki morskiej (6). Hill i wsp. wykazali z kolei koegzystencję VIP i D $\beta$ H, jednakże tylko w neuronach SChG odcinka piersiowego (7). Wydaje się prawdopodobne, że podobnie jak przypadku opisanych powyżej komórek zaopatrujących okostną żeber i kręgów (7), także część z obserwowanych przez nas komórek NPY/VIP-IR pełnić może podobną funkcję. Znaczny spadek liczby neuronów NPY-IR w krzyżowych SChG może sugerować, że w odcinku tym zwiększa się procentowy udział nienoradrenergicznych komórek współczulnych, co może odzwierciedlać zmianę ich funkcji i tkanek docelowych. Podobną tendencję obserwowano również w SChG kota, jednak procentowy udział neuronów NPY-IR był znacznie wyższy niż w niniejszych badaniach: w zwoju S<sub>1</sub> obserwowano 70%, w S<sub>2</sub> – 60%, a w S<sub>3</sub> – 45% (4).

Reasumując, należy stwierdzić, że zarówno liczebność populacji komórek NPY- i/lub VIP-IR w badanych zwojach, jak i wzory ich współwystępowania różnią się w zależności od badanego segmentu. Znaczenie czynnościowe tej obserwacji pozostaje niejasne i musi zostać zbadane przy zastosowaniu połączenia technik wstecznego znakowania neuronalnego oraz immunochemii.

### Piśmiennictwo

- Anderson C., Edwards S., Furness J., Bredt D., Snyder S.: The distribution of nitric oxide synthase-containing autonomic preganglionic terminals in the rat. *Brain Res.* 1993, 614, 78-85.
- Chevendra V., Weaver L.: Distribution of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide and somatostatin in populations of postganglionic neurons innervating the rat kidney, spleen and intestine. *Neuroscience* 1992, 50, 727-743.
- Chiba T., Masuko S.: Autonomic neurons and paraneurons (SIF cells) in the sympathetic ganglia regulating guinea pig proximal colon: immunohistochemical studies. *Arch Histol Cytol.* 1989, 52, 343-350.
- Danuser H., Springer J., Katofiasc M., Thor K.: Extrinsic innervation of the cat prostate gland: a combined tracing and immunohistochemical study. *J. Urology* 1997, 157, 1018-1024.
- Heym C., Reinecke M., Weihe E., Forssmann W.: Dopamine-beta-hydroxylase-, neurotensin-, substance P-, vasoactive intestinal polypeptide- and enkephalin-immunohistochemistry of paravertebral and prevertebral ganglia in the cat. *Cell Tissue Res.* 1984, 235, 411-418.
- Heym C., Webber R., Horn M., Kummer W.: Neuronal pathways in the guinea-pig lumbar sympathetic ganglia as revealed by immunohistochemistry. *Histochemistry* 1990, 93, 547-557.
- Hill E., Elde R.: Vasoactive intestinal peptide distribution and colocalization with dopamine-beta-hydroxylase in sympathetic chain ganglia of pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1989, 27, 229-239.
- Höhler B., Olry R., Mayer B., Kummer W.: Nitric oxide synthase in guinea pig sympathetic ganglia: correlation with tyrosine hydroxylase and neuropeptides. *Histochem. Cell Biol.* 1995, 104, 21-28.
- Jänig W., McLachlan E.: Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev.* 1987, 67, 1332-1404.
- Klimaschewski L., Obermüller N., Majewski M., Bachman S., Heym C.: Increased expression of nitric oxide synthase in a subpopulation of rat sympathetic neurons after axotomy – correlation with vasoactive intestinal peptide. *Cell Tissue Res.* 1996, 285, 419-425.
- Kummer W., Heym C.: Neuropeptide distribution in the cervico-thoracic paravertebral ganglia of the cat with particular reference to calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 1988, 252, 463-471.
- Lindh B., Risling M., Remahl S., Terenius L., Hoekfelt T.: Peptide-immunoreactive neurons and nerve fibres in lumbosacral sympathetic ganglia: selective elimination of a pathway-specific expression of immunoreactivities following sciatic nerve resection in kittens. *Neuroscience* 1993, 55, 545-562.
- Lindh B., Staines W., Hoekfelt T., Terenius L., Salvaterra P.: Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Neurobiology* 1986, 83, 5316-5320.
- Lundberg J., Hokfelt T., Schultzberg M., Uvnäs-Wallenstein K., Kohler C., Said S.: Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 1979, 4, 1539-1559.
- Lakomy M., Happpola O., Kaleczyc J., Majewski M.: Immunohistochemical localization of neuropeptides in the porcine thoraco-lumbar paravertebral ganglia. *Anat. Histol. Embryol.* 1994, 23, 12-20.
- McLachlan E., Llewellyn-Smith I.: The immunohistochemical distribution of neuropeptide Y in lumbar pre- and paravertebral sympathetic ganglia of the guinea pig. *J. Auton. Nerv. System* 1986, 17, 313-324.
- Portbury A., McConalogue K., Furness J., Young H.: Distribution of pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) immunoreactivity in neurons of the guinea-pig digestive tract and their projections in the ileum and colon. *Cell Tissue Res.* 1995, 279, 385-392.
- Roudenok V., Kuhnel W., Rogov Y., Nerovnja A.: Developmental changes in vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the human paravertebral ganglia. *Ann. Anat.* 1999, 181, 561-565.
- Schafer M., Eiden L., Weihe E.: Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience* 1998, 84, 361-376.
- Schimosegawa T., Koizumi M., Toyota T., Goto Y., Kobayashi S., Yanai-hara C., Yanai-hara N.: Methionine-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-immunoreactive nerve fibers and cell bodies in lumbar paravertebral ganglia and the celiac-superior mesenteric ganglion complex of the rat: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 1985, 57, 169-174.
- Trudrung P., Furness J., Pompolo S., Messenger J.: Locations and chemistries of sympathetic nerve cells that project to the gastrointestinal tract and spleen. *Arch. Histol. Cytol.* 1994, 57, 139-150.
- Wąsowicz K.: Changes in the expression of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine beta-hydroxylase (DBH), galanin (GAL), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and substance P (SP) in the uterine cervix-projecting neurons located in the lumbar paravertebral ganglia of the pig. *Folia Morphol. (Warsz.)* 2003, 62, 219-221.