



znak pisma

Wrocław, 04 grudnia 2025 roku

prof. dr hab. Maciej Janeczek
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Kingi Kras
zatytułowanej:**

„Ekspresja mRNA oraz immunolokalizacja i poziom wybranych peptydów anoreksygennych i oreksygennych oraz ich receptorów w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych osobników bydła domowego (*Bos taurus taurus*)”

Podstawa formalna

Podstawę wykonania niniejszej recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria UP w Lublinie z dnia 30 października 2025 roku o numerze RD wet 14/25.

Praca została wykonana w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Arciszewskiego

Charakterystyka rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kingi Kras pt. „*Ekspresja mRNA oraz immunolokalizacja i poziom wybranych peptydów anoreksygennych i oreksygennych oraz ich receptorów w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych osobników bydła domowego*”

(*Bos taurus taurus*)” ma formę obszernej, starannie przygotowanej monografii liczącej 128 stron. Praca jest przejrzysta pod względem struktury, kompletna pod względem treści i obejmuje zarówno rozbudowaną część teoretyczną, jak i szczegółowo opracowaną część eksperymentalną. Podstawę merytoryczną dysertacji tworzy cykl trzech oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy MNiSW o łącznym Impact Factor 10,28. Wszystkie publikacje są integralnie powiązane tematycznie i metodologicznie, obejmując trzy poziomy analizy biologicznych

Rozprawa składa się z następujących rozdziałów:

Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, obejmujący m.in. charakterystykę budowy przewodu pokarmowego przeżuwaczy i przegląd literatury dotyczącej peptydów regulujących łaknienie, Materiał i metody, zawierający szczegółowy opis badań RT-qPCR, immunohistochemii oraz analiz ELISA, wraz z metodologią statystyczną, Wyniki, w tym prezentację ekspresji mRNA, immunolokalizacji oraz stężeń badanych peptydów w poszczególnych segmentach przewodu pokarmowego cieląt i dorosłych osobników, Dyskusja, stanowiąca obszerne omówienie znaczenia otrzymanych wyników w kontekście literatury, m.in. roli greliny, nesfatyny-1, phoeniksyny-14 oraz receptorów GHSR, LEPR i GPR173 w regulacji metabolizmu przeżuwaczy, Wnioski końcowe, syntetyzujące najważniejsze ustalenia badawcze, Piśmiennictwo, obejmujące kilkadziesiąt stron literatury o wysokiej jakości merytorycznej, zgodnej z zakresem tematycznym pracy

1. Kras, K.; Ropka-Molik, K.; Muszyński, S.; Arciszewski, M.B. *Expression of Genes Encoding Selected Orexigenic and Anorexigenic Peptides and Their Receptors in the Organs of the Gastrointestinal Tract of Calves and Adult Domestic Cattle (Bos taurus taurus)*. International Journal of Molecular Sciences, 2024; IF 5,6.

Artykuł stanowi fundament części molekularnej rozprawy. Zawiera analizę ekspresji mRNA siedmiu kluczowych genów w dziewięciu odcinkach przewodu pokarmowego, co czyni go najbardziej obszerną i najwyżej punktowaną publikacją w cyklu.

2. Kras, K.; [współautorzy]; Arciszewski, M.B. *Immunolocalization and Immunoexpression Levels of Sibling Peptides in the Gastrointestinal Tract of Domestic Cattle*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2025; IF 1,7.

Publikacja przedstawia szczegółową ocenę lokalizacji greliny, receptora GHSR oraz nesfatyny-1 w strukturach ściany przewodu pokarmowego bydła z wykorzystaniem zaawansowanych metod immunohistochemii.

3. Kras, K.; [współautorzy]; Arciszewski, M.B. *Phoenixin and Its Receptor GPR173 in the Gastrointestinal Tract of Calves and Adult Domestic Cattle*. BMC Veterinary Research, 2025; IF 2,98.

Artykuł dostarcza pierwszych w literaturze danych dotyczących obecności phoeniksyny-14 (PNX-14) oraz receptora GPR173 w przewodzie pokarmowym bydła, wykorzystując analizę immunohistochemiczną i oznaczenia stężeń tkankowych metodą ELISA.

Problem naukowy

Współczesna fizjologia przeżuwaczy coraz większy nacisk kładzie na zrozumienie lokalnych i ogólnoustrojowych mechanizmów regulacji pobierania pokarmu, utrzymania homeostazy energetycznej oraz wpływu sygnałów hormonalnych pochodzących z przewodu pokarmowego na funkcjonowanie organizmu. Choć u zwierząt monogastrycznych — szczególnie u gryzoni i ludzi — rola peptydów oreksygennych i anoreksygennych została stosunkowo dobrze scharakteryzowana, to w odniesieniu do przeżuwaczy wiedza ta pozostaje fragmentaryczna i niespójna. Narząd bydła, między innymi ze względu na złożoną, czterokomorową budowę żołądka oraz dominującą rolę fermentacji mikrobiologicznej, różni się istotnie zarówno strukturalnie, jak i czynnościowo od narządu pokarmowego zwierząt monogastrycznych. Tym samym sygnalizacja hormonalna i neuronalna w obrębie osi jelito–mózg może przebiegać odmiennie. Szczególne znaczenie mają tu lokalne peptydy sygnałowe, takie jak grelina, leptyna, nesfatyna-1 czy PNX-14, które modulują zarówno motorykę przewodu pokarmowego, procesy trawienne, jak i regulację łaknienia poprzez złożone mechanizmy sprzężeń zwrotnych. Dotychczasowe badania nad tymi cząsteczkami u przeżuwaczy ograniczały się najczęściej do pojedynczych narządów (najczęściej do trawieńca lub jelita cienkiego), bądź koncentrowały się wyłącznie na jednym poziomie analizy — transkrypcyjnym, białkowym lub funkcjonalnym. Brakowało badań obejmujących całościową ocenę ekspresji tych peptydów oraz ich receptorów wzdłuż całego przewodu pokarmowego, a także porównujących dwa kluczowe etapy rozwoju przeżuwaczy: okres cielęcy i dojrzałość.

W tym kontekście zasadniczy problem naukowy podjęty przez Doktorantkę można sformułować w następujący sposób:

– Czy przewód pokarmowy bydła domowego stanowi miejsce aktywnej ekspresji peptydów sygnałowych regulujących pobieranie pokarmu i metabolizm energetyczny, a jeśli tak, to czy istnieją istotne różnice w ich ekspresji, lokalizacji i stężeniu pomiędzy cielętami a dorosłymi osobnikami?

Odpowiedź na to pytanie wymagała przeprowadzenia badań obejmujących trzy uzupełniające się płaszczyzny analityczne:

1. Poziom transkrypcyjny (RT-qPCR) – umożliwiający identyfikację obecności i siły ekspresji genów kodujących peptydy oraz ich receptory w kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego.
2. Poziom białkowy (IHC) – pozwalający określić lokalizację przestrzenną badanych cząsteczek w ścianie przewodu pokarmowego, w tym w splotach nerwowych, błonie śluzowej i mięśniowej, co jest kluczowe dla zrozumienia ich potencjalnej funkcji parakrynej i neuroendokrynej.
3. Poziom biochemiczny (ELISA) – umożliwiający określenie faktycznego stężenia peptydów w tkankach, a tym samym potwierdzenie ich istotności biologicznej.

Trzeba podkreślić, że przewód pokarmowy przeżuwaczy ulega intensywnym zmianom rozwojowym — zarówno strukturalnym, jak i funkcjonalnym — w okresie przechodzenia z żywienia mlekiem na pasze stałe. Różnice te mogą wpływać na pobieranie pokarmu, motorykę, skład mikrobioty oraz aktywność jelitowego układu nerwowego (ENS). Dlatego porównanie cieląt i osobników dorosłych stanowi nie tylko zabieg metodologiczny, ale biologicznie istotny element badania, pozwalający ocenić dynamikę dojrzewania osi metabolicznych.

Cele podjętej rozprawy doktoranckiej są więc odpowiedzią na jedno z kluczowych pytań współczesnej fizjologii przeżuwaczy a mianowicie czy przewód pokarmowy jest miejscem lokalnej regulacji apetytu i metabolizmu, oraz czy mechanizmy te zmieniają się wraz z wiekiem i dojrzewaniem przewodu pokarmowego?

Sformułowany przez Doktorantkę problem naukowy odpowiada aktualnym potrzebom badań w obszarze neuroendokrynologii przeżuwaczy, ma wyraźny charakter aplikacyjny i

nowatorski. Pozwala również na lepsze zrozumienie mechanizmów decydujących o rozwoju, zdrowiu i efektywności produkcyjnej bydła

Cel rozprawy

Zgodnie z deklaracją Autorki, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie ekspresji mRNA, immunolokalizacji oraz stężenia wybranych peptydów sygnałowych o działaniu oreksygennym (grelina, phoenixin-14) i anoreksygennym (nesfatyna-1, leptyna) oraz ich receptorów (GHSR, GPR173, LEPR) w kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego cieląt i dorosłych osobników bydła domowego *Bos taurus taurus*.

Realizacja celu obejmowała analizę materiału pobranego z dziewięciu odcinków przewodu pokarmowego, a następnie:

1. oznaczenie poziomu transkryptów genów kodujących badane peptydy i receptory metodą RT-qPCR,
2. określenie rozmieszczenia białek w wybranych strukturach ściany przewodu pokarmowego z wykorzystaniem immunohistochemii,
3. oznaczenie stężenia peptydów w homogenatach tkankowych metodą ELISA.

Celem ogólnym pracy było zatem kompleksowe scharakteryzowanie lokalnych mechanizmów regulacji łaknienia w przewodzie pokarmowym bydła, poprzez zestawienie trzech poziomów analizy biologicznej — genowego, komórkowego i białkowego — oraz porównanie ich między dwiema kluczowymi grupami wiekowymi.

Znajomość literatury

Autorka wykorzystała obszerną literaturę, obejmującą klasyczne prace dotyczące fizjologii przewodu pokarmowego, homeostazy energetycznej oraz najnowsze doniesienia z zakresu neuroendokrynologii. Literatura jest nowoczesna, poprawnie cytowana i adekwatna, a Doktorantka sprawnie łączy dane molekularne z fizjologią i anatomią przeżuwaczy.

Metodyka

Metodyka zastosowana w rozprawie doktorskiej mgr Katarzyny Kingi Kras charakteryzuje się wysokim stopniem rzetelności, przejrzystości oraz zgodności z aktualnymi standardami badań

eksperymentalnych w dziedzinie biologii molekularnej, histologii i fizjologii zwierząt. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością metod laboratoryjnych oraz umiejętnością właściwego doboru technik w zależności od typu analizowanych parametrów biologicznych. Poniżej przedstawiam szczegółową ocenę poszczególnych etapów metodologicznych.

Autorka przeprowadziła badania na dwóch grupach zwierząt: cielętach w wieku 7–8 miesięcy oraz dorosłych osobnikach w wieku 20–24 miesięcy, co umożliwia porównanie dwóch kluczowych etapów rozwojowych przewodu pokarmowego przeżuwaczy. Wybór takich grup wiekowych jest zasadny biologicznie, uwzględnia bowiem moment przejścia z żywienia mlekiem na żywienie roślinne oraz pełną dojrzałość fermentacyjną żwacza.

Pobrane próbki pochodziły z dziewięciu odcinków przewodu pokarmowego: żwacza, czepca, ksiąg, trawieńca, dwunastnicy, jelita czczego, jelita biodrowego, okrężnicy i odbytnicy. Pobranie pełnych przekrojów ściany przewodu pokarmowego stanowi szczególnie istotny element metodyki — pozwala bowiem na ocenę lokalizacji białek nie tylko w błonie śluzowej, ale również w warstwach mięśniowych oraz w splotach ENS (splotów Auerbacha i Meissnera), co ma kluczowe znaczenie dla interpretacji wyników w kontekście osi jelito–mózg.

Próbki przeznaczone do badań molekularnych i biochemicznych były mrożone natychmiast po pobraniu w ciekłym azocie, natomiast próbki do badań histologicznych utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie. Utrwalenie to, opisane ze wskazaniem czasu i warunków, zapewniało optymalne odwodnienie i przygotowanie do dalszych etapów obróbki.

Procedura izolacji RNA została przeprowadzona z użyciem komercyjnego zestawu PureLink RNA Mini Kit, zgodnie z protokołem producenta. Autorka prawidłowo zastosowała dodatkowe oczyszczanie próbki za pomocą DNase I, eliminując potencjalne zanieczyszczenia DNA genomowym.

Doktorantka wskazała:

- szczegółowe parametry izolacji,
- ocenę integralności RNA na żelu agarozowym,
- pomiary stężenia i czystości RNA (NanoDrop),
- ilość RNA wykorzystaną do syntezy cDNA.

Synteza cDNA została wykonana z użyciem zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, co jest standardem pozwalającym na uzyskanie wysokiej jakości materiału do dalszych analiz.

W badaniach ekspresji zastosowano:

- startery o znanej sekwencji i pozycji w genie,
- ich weryfikację w bazie GenBank,
- długości ampliconów,
- wydajności reakcji mieszczące się w zakresie optymalnym (1.83–2.02).

Tak precyzyjna dokumentacja świadczy o bardzo wysokim stopniu przejrzystości metodologicznej, rzadko spotykanym na poziomie rozpraw doktorskich.

Reakcje prowadzono na aparacie QuantStudio 7 Flex, przy czym podano wszystkie kluczowe parametry cyklu: temperaturę denaturacji, przyłączania oraz elongacji, liczbę cykli, sposób analizy krzywej topnienia i weryfikacji specyficzności produktu.

Procedura statystyczna $-\Delta\Delta C_t$ (po transformacji $\log_2$) została prawidłowo zastosowana, a wyniki odpowiednio znormalizowane względem dwóch genów referencyjnych (ACTB, RPS9), których stabilność ekspresji potwierdzono.

Badania immunohistochemiczne przeprowadzono na skrawkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Autorka prawidłowo opisała proces:

- odparafinowania i rehydratacji skrawków,
- antygen retrieval (odzyskiwanie antygeny),
- blokowania nieswoistego wiązania przeciwciał,
- zastosowanych przeciwciał i warunków inkubacji,
- barwienia DAB,
- kontrastowania hematoksyliną.

Bardzo istotnym elementem metodyki jest uwzględnienie kontroli negatywnych, tj. preparatów poddanych procedurze barwienia bez użycia przeciwciała pierwotnego. Pozwala to na ocenę specyficzności sygnału i wykluczenie fałszywych pozytywów wynikających np. z endogennej aktywności peroksydazy.

Autorka odróżniała lokalizację immunoreaktywności w poszczególnych warstwach przewodu pokarmowego, co ma fundamentalne znaczenie dla interpretacji funkcjonalnej badanych peptydów. Fakt, że analizowano również struktury ENS, stanowi znaczący atut metodyki.

Ponadto w pracy zastosowano półilościową analizę obrazu (mean gray value, liczba jąder), co świadczy o dążeniu do obiektywizacji wyników histologicznych — element ten istotnie podnosi wartość techniczną badań.

Oznaczenia metodą ELISAc przeprowadzono z homogenatów tkankowych o uprzednio znormalizowanej masie, przy zastosowaniu zestawów komercyjnych o standardowych zakresach czułości. Próbkki były analizowane w duplikatach, a wyniki przeliczono na jednostkę masy białka całkowitego, co umożliwia porównywanie danych między odcinkami i grupami wiekowymi.

Autorka podała:

- temperaturę i czas inkubacji,
- sposób odczytu absorbancji,
- sposób generowania krzywej standardowej,
- parametry walidacji zestawu (m.in. R^2 regresji).

Całość procedury została wykonana zgodnie z powszechnie przyjętymi standardami, a prezentacja wyników jest przejrzysta i poprawna.

Metody statystyczne zostały dobrane prawidłowo do założonego planu eksperymentalnego.

Zastosowano:

- dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA,
- modele GLM z uwzględnieniem interakcji (wiek $\times$ odcinek),
- testy Tukeya dla porównań post hoc,
- ocenę normalności rozkładu testem Shapiro–Wilka,
- analizę reszt modelu (Q-Q plot, reszty vs wartości dopasowane).

Prezentacja wyników w formie map cieplnych, wykresów korelacji i zestawień graficznych wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Autorki również pod względem opracowania danych ilościowych. Jest to szczególnie widoczne, biorąc pod uwagę dużą liczbę analizowanych parametrów.

Ocena ogólna

Metodyka zastosowana w rozprawie:

- jest kompletna i wielopoziomowa,
- obejmuje kluczowe skale analizy (geny $\rightarrow$ białka $\rightarrow$ stężenia),

- jest zgodna z najlepszymi praktykami współczesnych badań w medycynie weterynaryjnej,
- umożliwia pełną replikację wyników,
- została opisana z wyjątkową dbałością o szczegóły.

Pod względem technicznym i organizacyjnym stanowi przykład wzorcowej realizacji projektu badawczego na poziomie rozprawy doktorskiej.

Zastosowane metody badawcze są współczesne, precyzyjne i adekwatne:

- RT-qPCR z pełną dokumentacją starterów, kontroli oraz parametrów reakcji,
- immunohistochemia (IHC) z oceną lokalizacji w warstwach ściany przewodu pokarmowego,
- testy ELISA,
- modele statystyczne GLM, analiza ANOVA, testy Tukeya

Przedstawienie metodyki jest na bardzo wysokim poziomie.

Oryginalność

Rozprawa stanowi pierwsze w Polsce, a w dużej mierze także pierwsze w Europie kompleksowe porównanie ekspresji peptydów sygnałowych u bydła w trzech niezależnych wymiarach:

- transkrypcyjnym,
- histologicznym,
- biochemicznym.

Praca ma charakter pionierski i wnosi znaczący wkład do wiedzy o regulacji łaknienia u przeżuwaczy.

Uwagi krytyczne

Przedłożoną rozprawę doktorską oceniam wysoko, niemniej z obowiązku recenzenckiego pragnę wskazać kilka uwag, które — choć nie podważają wartości pracy — mogą stanowić sugestię do jej dalszego udoskonalenia.

Zakres analizowanych peptydów regulujących łaknienie jest stosunkowo wąski w kontekście złożonej kontroli neuroendokrynej przewodu pokarmowego przeżuwaczy. Uwzględnienie szerszego panelu cząsteczek pozwoliłoby na pełniejsze ujęcie tematu.

Charakterystyka zwierząt użytych w badaniu mogłaby zostać przedstawiona bardziej szczegółowo, zwłaszcza w odniesieniu do protokołu żywieniowego oraz wybranych parametrów metabolicznych, które mogą wpływać na ekspresję badanych peptydów.

części dotyczącej badań molekularnych zabrakło pełniejszej walidacji genów referencyjnych oraz szczegółowego omówienia specyficzności starterów użytych w RT-qPCR. Nie są to braki istotne, ale ich uzupełnienie zwiększyłoby przejrzystość metodyczną pracy.

W procedurze immunohistochemicznej nie zastosowano kontroli pozytywnych. Ponadto wykorzystana półilościowa ocena intensywności barwień, choć poprawna, zawsze niesie pewien element subiektywności.

Wyniki uzyskane na poziomie mRNA, lokalizacji białka oraz jego stężenia nie zostały zestawione ze sobą w formie analiz korelacyjnych. Takie zestawienie mogłoby pogłębić interpretację oraz podkreślić wzajemne zależności między badanymi parametrami.

Aczkolwiek temat pracy posiada potencjał aplikacyjny, w dyskusji zabrakło bardziej wyraźnego odniesienia do praktyki klinicznej i żywieniowej w medycynie przeżuwaczy. Rozszerzenie tego wątku mogłoby zwiększyć użyteczność wyników.

Wnioski końcowe

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kingi Kras stanowi wartościowe, rzetelnie wykonane i metodycznie dobrze zaplanowane opracowanie naukowe. Praca wnosi istotny wkład w poznanie lokalnych mechanizmów regulacji łaknienia u bydła domowego, a jej wyniki — obejmujące trzy komplementarne poziomy analizy: ekspresję mRNA, immunolokalizację oraz oznaczenia stężeń tkankowych — są spójne, logiczne i dobrze udokumentowane. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia badań eksperymentalnych, poprawnego opracowania wyników oraz ich krytycznej interpretacji. Zrealizowane badania świadczą o Jej dojrzałości naukowej oraz bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym w zakresie fizjologii i biologii molekularnej zwierząt. Mając powyższe na uwadze, stwierdzam, że rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca



2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 poz. 1571 z późn. zm.), a przedstawione wyniki i wnioski uzasadniają zakończenie etapu realizacji pracy doktorskiej. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kingi Kras do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponad to wnioskuję do Wysokiej Rady o nagrodzenie przedłożonej pracy stosowną nagrodą.

Kierownik Katedry
Biostruktury i Fizjologii Zwierząt
prof. dr hab. n. wet. Maciej Janeczek
specjalista chirurg