

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Dyscyplina naukowa: Weterynaria

Mgr Katarzyna Kinga Kras

Rozprawa doktorska

**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*)**

***mRNA Expression, Immunolocalization, and Levels of Selected Anorexigenic and
Orexigenic Peptides and Their Receptors in the Gastrointestinal Tract of Calves and
Adult Domestic Cattle (*Bos taurus taurus*)***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w
Lublinie

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Marcin Arciszewski

Lublin, 2025

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi

prof. dr hab. Marcinowi Arciszewskiemu

za nieocenioną pomoc, życzliwość, motywację i wsparcie okazywane mi na każdym etapie realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję moim Współautorom

dr hab. Siemowitowi Muszyńskiemu, prof. Uczelni,

prof. dr hab. Katarzynie Ropka-Molik,

lek. wet. Cezaremu Osiak-Wicha

za cenne uwagi, inspirujące dyskusje oraz wkład w interpretację uzyskanych wyników.

Dziękuję

prof. dr hab. Ewie Tomaszewskiej

za okazaną życzliwość i wsparcie w trakcie realizacji badań.

Dziękuję

pracownikom Katedry Anatomii i Histologii Zwierząt

za wsparcie, życzliwość i przyjazną atmosferę pracy w trakcie realizacji badań.

Dziękuję

moim Najbliższym

za wsparcie, cierpliwość oraz motywację.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

17.10.25

Podpis promotora

[Podpis promotora]

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów/Promotora pomocniczego*~~ i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data

17.10.25

Podpis autora

Katarzyna Kras

*niepotrzebne skreślić

W skład niniejszej rozprawy doktorskiej wchodzi trzy publikacje z listy czasopism punktowanych MNiSW:

1. Kras, K.; Ropka-Molik, K.; Muszyński, S.; Arciszewski, M.B. **2024** 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*). *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 533. DOI: 10.3390/ijms25010533
Punkty MNiSW: 140, Impact Factor: 4,900
2. Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. **2025** Immunolocalization and quantification of the phoenixin and GPR173 in the gastrointestinal tract of Holstein–Friesian bulls. *BMC Vet Res* 21, 76. DOI: 10.1186/s12917-025-04545-x
Punkty MNiSW: 140, Impact Factor 2024: 2,300
3. Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. **2025** Immunolocalization and immunoexpression levels of sibling peptides nesfatin-1 and ghrelin, and their potentially shared receptor in Holstein–Friesian bulls. *PJVS* 28(3), 389-402. DOI: 10.24425/pjvs.2025.156064
Punkty MNiSW: 100, Impact Factor 2024: 1,000

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MNiSW obowiązującego w roku wydania pracy: 380 punktów

IF (zgodnie z 2024 rokiem): 8,100

Spis treści

1. Streszczenie	6
2. Abstract.....	7
3. Wykaz skrótów	8
4. Wstęp	10
4.1. Budowa przewodu pokarmowego przeżuwaczy.....	10
4.2. Homeostaza energetyczna.....	12
4.3. Peptydy sygnałowe	13
4.3.1. Grelina	14
4.3.2. Leptyna.....	15
4.3.3. Nesfatyna.....	16
4.3.4. PNX-14.....	17
4.3.5. Znaczenie peptydów w medycynie weterynaryjnej	19
5. Hipotezy i cele badawcze	21
6. Materiały i metody	23
6.1. Zwierzęta.....	23
6.2. RT-qPCR.....	23
6.2.1. Izolacja RNA i oznaczenie ekspresji genów metodą RT-qPCR	23
6.2.2. Analizy statystyczne qPCR	25
6.3. Immunoekspresja	26
6.3.1. Przygotowanie materiału	26
6.3.2. Analiza IHC.....	26
6.3.3. ELISA.....	29
6.3.4. Analiza statystyczna immunoekspresji	29
7. Wyniki	31
7.1 Ekspresja genów (RT-qPCR).....	31
7.1.1. Korelacje między poziomami ekspresji	34
7.1.2. Analiza mapy cieplnej	36
7.2. Immunoekspresja	36
7.2.1. Grelina.....	36
7.2.2. GHSR	44
7.2.3. Nesfatyna-1	47
7.2.4. PNX-14.....	50
7.2.5. GPR173	54
8. Dyskusja	59

9. Wnioski.....	68
10. Bibliografia.....	69

1. Streszczenie

Przewód pokarmowy przeżuwaczy cechuje się złożoną organizacją, a jego rozwój i aktywność są kontrolowane przez liczne czynniki nerwowe, hormonalne i metaboliczne. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się roli endogennych peptydów sygnałowych w integracji procesów trawienia, pobierania pokarmu i utrzymania homeostazy energetycznej. Dotychczas większość badań dotyczących peptydów oreksygennych (stymulujących apetyt) i anoreksygennych (hamujących apetyt) przeprowadzono u zwierząt monogastrycznych, podczas gdy u przeżuwaczy mechanizmy ich działania pozostają słabo poznane. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie ekspresji mRNA, immunolokalizacji oraz stężenia wybranych peptydów sygnałowych o działaniu oreksygennym (grelina, feniksyna-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*). Materiał badawczy pochodził od dwunastu zdrowych samców rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, z podziałem na cielęta ($n = 6$) i osobniki dorosłe ($n = 6$). Z dziewięciu kolejnych odcinków przewodu pokarmowego pobrano próbki do oznaczenia ekspresji mRNA metodą RT-qPCR, oceny rozmieszczenia białek metodą immunohistochemiczną (IHC) oraz oznaczenia ich stężenia za pomocą testu ELISA. Analizy statystyczne prowadzono z wykorzystaniem modeli liniowych i testów *post hoc* Tukeya, z uwzględnieniem interakcji między wiekiem a odcinkiem przewodu pokarmowego. W wyniku badań stwierdzono obecność transkryptów wszystkich analizowanych genów we wszystkich badanych odcinkach przewodu pokarmowego (od żwacza po odbytnicę) u cieląt oraz osobników dorosłych. Badania IHC potwierdziły obecność wszystkich badanych związków w ścianie przewodu pokarmowego u obu grup wiekowych od żwacza do okrężnicy, z wyjątkiem GHSR, którego nie stwierdzono w żwaczu. Poziomy immunoreakcji różniły się pomiędzy grupami wiekowymi i narządami. Uzyskane wyniki dostarczają całościowych danych dotyczących dystrybucji kluczowych peptydów regulujących łaknienie w przewodzie pokarmowym bydła. Wskazują one, że zarówno grelina, jak i nesfatyna-1 oraz PNX-14 mogą pełnić złożone funkcje parakryne i neuroendokryne w obrębie układu pokarmowego, uczestnicząc w komunikacji osi jelito-mózg. Różnice w ekspresji, immunolokalizacji pomiędzy cielętami i dorosłymi osobnikami potwierdzają występowanie istotnych zmian rozwojowych w regulacji metabolicznej w okresie postnatalnym.

Słowa kluczowe: grelina, GHSR, GPR173, nesfatyna-1, feniksyna-14

2. Abstract

The digestive tract of ruminants is characterized by a complex organization, and its development and activity are controlled by numerous neural, hormonal, and metabolic factors. In recent years, increasing attention has been devoted to the role of endogenous signaling peptides in the integration of digestive processes, feed intake, and the maintenance of energy homeostasis. To date, most studies concerning orexigenic (appetite-stimulating) and anorexigenic (appetite-suppressing) peptides have been conducted in monogastric animals, whereas the mechanisms of their action in ruminants remain poorly understood. The aim of the present doctoral dissertation was to determine the mRNA expression, immunolocalization, and concentration of selected signaling peptides with orexigenic (ghrelin, phoenixin-14) and anorexigenic (nesfatin-1, leptin) activity, as well as their receptors (GHSR, GPR173, LEPR), in consecutive segments of the gastrointestinal tract of calves and adult cattle (*Bos taurus taurus*). The research material was obtained from twelve healthy male Polish Holstein-Friesian cattle, divided into calves ($n = 6$) and adult individuals ($n = 6$). Samples from nine consecutive segments of the gastrointestinal tract were collected for the assessment of mRNA expression using RT-qPCR, for the evaluation of protein distribution by immunohistochemistry (IHC), and for the determination of concentrations using the ELISA assay. Statistical analyses were performed using linear models and Tukey's post hoc tests, including interactions between age and gastrointestinal segment. The study revealed the presence of transcripts of all analyzed genes in all examined segments of the gastrointestinal tract (from the rumen to the rectum) in both calves and adult individuals. Immunohistochemical analyses confirmed the presence of all investigated peptides and receptors in the wall of the gastrointestinal tract in both age groups, from the rumen to the colon, except for GHSR, which presence was not detected in the rumen. The levels of immunoreactivity differed between age groups and organs. The obtained results provide comprehensive data on the distribution of key appetite-regulating peptides within the bovine gastrointestinal tract. They indicate that ghrelin, nesfatin-1, and phoenixin-14 may exert complex paracrine and neuroendocrine functions within the digestive system, participating in the gut-brain axis communication. Differences in expression and immunolocalization between calves and adults confirm the occurrence of significant developmental changes in metabolic regulation during the postnatal period.

Keywords: ghrelin, GHSR, GPR173, nesfatin-1, phoenixin-14

3. Wykaz skrótów

LKT – lotne kwasy tłuszczowe

ZO-1 – białko strefy zamykającej 1 (ang. *Zonula Occludens-1*)

GALT - tkanka limfoidalna związana z przewodem pokarmowym (ang. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*)

ENS – jelitowy układ nerwowy (ang. *Enteric Nervous System*)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PNX – feniksyna

GOAT – O-acylotransferaza greliny (ang. *Ghrelin O-acyltransferase*)

GHSR – receptor sekretagoga hormonu wzrostu (ang. *Growth Hormone Secretagogue Receptor*)

GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (ang. *G Protein-Coupled Receptor*)

NPY – neuropeptyd Y

AgRP – peptyd związany z agouti (ang. *Agouti-related protein*)

POMC – propiomelanokortyna

LepR – receptor leptyny

ObR – daw. receptor leptyny

JAK2 – kinaza Janusowa 2 (ang. *Janus Kinase 2*)

STAT - czynnik transdukujący sygnał i aktywujący transkrypcję (ang. *signal transducer and activator of transcription*)

PI3K – kinaza 3-fosfatydoinozytolu (ang. *Phosphoinositide 3-Kinase*)

Akt – kinaza białkowa B

MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

CART – transkrypt regulowany przez kokainę i amfetaminę (ang. *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript*)

HPG – podwzgórze–przysadka–gonady (ang. *Hypothalamic–Pituitary–Gonadal*)

NUCB2 – nukleobindyna 2

PC1/3 – konwertaza prohormonów 1/3 (ang. *Prohormone Convertase 1/3*)

HPA – podwzgórze–przysadka–nadnercza (ang. *Hypothalamic–Pituitary–Adrenal*)

SMIM20 – małe integralne białko błonowe 20 (ang. *Small Integral Membrane Protein 20*)

GPR173 – receptor sprzężony z białkiem G 173 (ang. *G Protein-Coupled Receptor 173*)

SREB3 – superkonserwowany receptor ekspresowany w mózgu 3 (ang. *Super Conserved Receptor Expressed in Brain 3*)

GnRH – hormon uwalniający gonadotropiny (ang. *Gonadotropin-Releasing Hormone*)

RT-qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

TMR – całkowicie wymieszana dawka (ang. *Total Mixed Ration*)

ANOVA – analiza wariancji (ang. *Analysis of Variance*)

GLM – uogólniony model liniowy (ang. *Generalized Linear Model*)

Q-Q plot – wykres kwantyl-kwantyl (ang. *Quantile-Quantile plot*)

ES – wielkość efektu (ang. *Effect Size*)

FC – zmiana ekspresji (ang. *Fold Change*)

IHC – immunohistochemiczna/immunohistochemiczny

DAB – 3,3'-diaminobenzzydina

mgv – średnia wartość szarości (ang. *mean gray value*)

nn – liczba jąder (ang. *nuclei number*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

SEM – błąd standardowy średniej (ang. *Standard Error of the Mean*)

CCK - cholecystokinina

4. Wstęp

4.1. Budowa przewodu pokarmowego przeżuwaczy

Wśród ssaków gospodarskich szczególne znaczenie przypisuje się bydłu domowemu (*Bos taurus taurus*), zaliczanemu do przeżuwaczy i odgrywającemu kluczową rolę w światowej gospodarce dzięki produkcji mięsa oraz mleka (Herring, 2014). Gatunek ten wyróżnia się specyficzną budową przewodu pokarmowego, zasadniczo różniącą się od budowy przewodu pokarmowego ssaków monogastrycznych. Czterekomorowy żołądek bydła, złożony z przedżołądków (żwacza, czepca i ksiąg) oraz trawieńca, warunkuje odmienny przebieg procesów trawienia i fermentacji (Diao i in., 2019; Herring, 2014). Szczególnie istotna jest fermentacja mikrobiologiczna zachodząca w żwaczu i prowadząca do powstawania lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), które stanowią główne źródło energii dla dorosłych przeżuwaczy (Fregulia i in., 2021; Mazinani i in., 2022).

Dojrzewanie przewodu pokarmowego przeżuwaczy to proces dynamiczny i wieloetapowy, rozpoczynający się już w okresie noworodkowym, a kontynuowany intensywnie w kolejnych miesiącach życia. Jego przebieg zależy od rodzaju diety, systemu odchowu oraz czynników środowiskowych i stresowych, które oddziałują zarówno w okresie prenatalnym, jak i postnatalnym (Govil i in., 2017; Osorio, 2020). Proces ten obejmuje rozwój funkcji trawiennych, dojrzewanie mikrobioty jelitowej, wzmacnianie bariery nabłonkowej oraz kształtowanie odporności śluzówkowej (Yasuda i in., 2006). Jednocześnie postępuje dojrzewanie motoryki przewodu pokarmowego, usprawniające mieszanie i transport treści pokarmowej (Zabielski i in., 1997). Wraz z przechodzeniem cieląt z diety mlecznej na pasze stałe rozpoczyna się intensywny rozwój fermentacyjny żwacza. Produkowane LKT – szczególnie maślan – wykazują silne działanie troficzne, stymulując pogrubienie nabłonka, angiogenezę oraz ekspresję transporterów jonów i kwasów monokarboksylowych. Efektem tych zmian jest morfologiczne dojrzewanie brodawek żwaczowych (Diao i in., 2019; Niwińska i in., 2017; Pokhrel i Jiang, 2024). Dodatkowo obecność pasz objętościowych sprzyja rozwojowi warstwy mięśniowej przedżołądków i usprawnia ich motorykę (Castells i in., 2012; Montoro i in., 2013). Z praktycznego punktu widzenia odpowiedni dobór pasz starterowych, zawierających łatwo fermentujące węglowodany oraz włókno strukturalne, sprzyja zrównoważonemu rozwojowi funkcjonalnemu żwacza. Należy jednak podkreślić, że nadmierna podaż skrobi przy jednoczesnym niedoborze włókna może prowadzić do obniżenia i destabilizacji pH

w żwaczu, kwasicy oraz niekorzystnych zmian w morfologii nabłonka (Gelsinger i in., 2020; Wickramasinghe i in., 2019).

Kształtowanie funkcji trawiennych obejmuje również zmiany w aktywności enzymów. Wzrost aktywności pepsyny, maltazy i amylazy trzustkowej świadczy o adaptacji do diety stałej, bogatej w skrobię (Guilloteau i in., 2009; Guo i in., 2021). Choć w wieku 6–8 miesięcy obserwuje się względne ustabilizowanie podstawowych procesów trawiennych, profil enzymatyczny przewodu pokarmowego cieląt nie jest jeszcze w pełni zbieżny z charakterystyką dorosłych przeżuwaczy. W tym samym okresie dochodzi także do stabilizacji składu mikrobioty żwacza. Po początkowym zasiedleniu przewodu pokarmowego przez bakterie tlenowe dominację stopniowo przejmują beztlenowce charakterystyczne dla fermentacji jelitowej, takie jak *Ruminococcus*, *Bacteroides* czy *Methanobrevibacter* (Das i in., 2025). Mimo że względna stabilizacja składu mikrobioty rozpoczyna się już około 2. miesiąca życia, porównania między cielętami 6-miesięcznymi a dorosłymi osobnikami wskazują, że skład mikrobioty nadal wykazuje różnice, nawet przy identycznym schemacie żywienia, co potwierdza długofalowy charakter tego procesu (Jami i in., 2013).

Rozwój strukturalny i funkcjonalny jelit jest wspierany przez dojrzewanie bariery jelitowej. Wyraźny wzrost ekspresji białek połączeń ścisłych, takich jak kładyna, okładyna i ZO-1 (białko strefy zamykającej 1), obserwowany jest zarówno w odpowiedzi na pasze stałe, jak i pod wpływem dodatków dietetycznych, np. maślanu sodu (Belli i in., 2024; Malmuthuge i in., 2013). W okresie odsadzenia i intensywnego wzrostu bariera jelitowa może ulec przejściowemu osłabieniu, co wiąże się z większą podatnością na infekcje oraz aktywację osi zapalnych (Steele i in., 2016; Ural i in., 2021). Równolegle dojrzewa odporność śluzówkowa jelit. Początkowa odporność bierna, oparta na immunoglobulinach z siary, ustępuje miejsca aktywnej odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Wzrost aktywności limfocytów T i B oraz dojrzewanie struktur tkanki limfoidalnej związanej z jelitami (GALT), w tym kępek Peyera, są kluczowe dla funkcji ochronnych przewodu pokarmowego (Vlasova i Saif, 2021). U cieląt w wieku 6–8 miesięcy kępki Peyera zlokalizowane w jelicie czczym nadal pełnią funkcję wtórnych narządów limfatycznych, natomiast te w jelicie biodrowym ulegają stopniowej involucji, co jest elementem fizjologicznego dojrzewania układu odpornościowego. U bydła dwuletniego involucja kępek biodrowych jest zazwyczaj zakończona, a struktury te nie wykazują już aktywności

immunologicznej. Kępki w jelicie czczym pozostają obecne, choć ich aktywność i liczba grudek chłonnych ulegają zmniejszeniu (Parsons i in., 1989; Yasuda i in., 2006).

Faza odsadzenia stanowi jeden z najbardziej wymagających etapów ontogenezy cieląt, w którym nakładają się na siebie intensywne zmiany żywieniowe i środowiskowe. Nagłe przejście z diety mlecznej na pasze stałe, połączone z separacją od matki i stresem wynikającym ze zmiany warunków utrzymania, wywołuje głęboką przebudowę procesów trawiennych oraz składu mikrobioty przewodu pokarmowego. W tym okresie często obserwuje się przejściowy spadek apetytu i tempa wzrostu, a także zwiększoną podatność na biegunki i infekcje dróg oddechowych, co istotnie wpływa na stan zdrowia i dalszy rozwój cieląt (Du i in., 2025; Enríquez i in., 2011). Według doniesień literaturowych śmiertelność cieląt w tym okresie, mimo że stosunkowo niska (najczęściej na poziomie kilku procent), wynika głównie z chorób przewodu pokarmowego i układu oddechowego (Shabtay, 2025). W związku z tym rośnie zainteresowanie strategiami łagodzenia stresu odsadzania, takimi jak optymalizacja protokołów przejścia na pasze stałe oraz suplementacja diety probiotykami, prebiotykami i kwasami organicznymi (Raza i in., 2022).

4.2. Homeostaza energetyczna

Dla adaptacji przewodu pokarmowego przeżuwaczy do zmieniającej się diety kluczowe znaczenie ma zrozumienie ogólnoustrojowych mechanizmów regulujących równowagę energetyczną. Utrzymanie homeostazy energetycznej u ssaków wymaga nie tylko precyzyjnej regulacji trawienia, wchłaniania, magazynowania i wykorzystania składników odżywczych, lecz także ścisłej kontroli pobierania pokarmu. Mechanizmy te opierają się na zintegrowanym działaniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (w tym jelitowego układu nerwowego, ENS) oraz układu endokrynnego. Dodatkowo ważną rolę odgrywają sygnały metaboliczne pochodzące z układu pokarmowego i tkanki tłuszczowej. Wspólnie uczestniczą one w dwukierunkowej komunikacji pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym (OUN) a obwodowymi systemami regulacji energetycznej, integrując informacje dotyczące statusu metabolicznego organizmu (Valassi i in., 2008; Wen i in., 2019). Szczególną rolę odgrywają receptory chemiczne i mechaniczne zlokalizowane w ścianie przewodu pokarmowego, reagujące na skład i objętość treści pokarmowej, obecność hormonów oraz rozciąganie błony mięśniowej. Sygnały te są przewodzone włóknami aferentnymi do jądra pasma samotnego i innych struktur pnia mózgu, skąd kierowane są do ośrodków podwzgórzowych. Tam integrowane są z sygnałami

metabolicznymi i hormonalnymi pochodzącymi z wątroby, trzustki i tkanki tłuszczowej (Cifuentes i Acosta, 2022; Gershon i Margolis, 2021; Gonkowski, 2021; Konturek i in., 2004). Z kolei droga eferentna obejmuje aktywację włókien autonomicznych, które modulują perystaltykę, przepływ krwi, wydzielanie enzymów trawiennych oraz aktywność komórek endokrynnych układu pokarmowego (Kentish i Page, 2015; Székely i in., 2016). Kluczową rolę w tej dwukierunkowej komunikacji pełnią endogenne peptydy sygnałowe, działające miejscowo (parakrynnie/autokrynnie) lub systemowo (endokrynnie). Integrują one obwodowe i ośrodkowe mechanizmy kontroli łaknienia oraz dostosowują trawienie i metabolizm do aktualnych potrzeb organizmu.

4.3. Peptydy sygnałowe

Kluczowym elementem komunikacji między układem pokarmowym a OUN są peptydy sygnałowe. Z punktu widzenia regulacji łaknienia i metabolizmu wyróżnia się dwie główne grupy: peptydy oreksygenne, które nasilają apetyt i inicjują pobieranie pokarmu, oraz peptydy anoreksygenne, które działają hamująco na pobieranie pokarmu i sprzyjają uczuciu sytości (Oh-I i in., 2006; Wen i in., 2019). Peptydy te funkcjonują zarówno na poziomie ośrodkowym – poprzez wpływ na ośrodki głodu i sytości zlokalizowane w podwzgórzu, jak i lokalnie, poza OUN, gdzie modulują sygnały inicjowane w przewodzie pokarmowym, wątrobie, trzustce i tkance tłuszczowej, przewodzone do pnia mózgu i dalej do podwzgórza. Ich działanie wpisuje się w złożoną sieć powiązań endokrynnych, neuronalnych i immunologicznych, umożliwiając organizmowi adaptację do zmiennych warunków środowiskowych i metabolicznych (Howick i in., 2017; Stengel i Taché, 2009).

Znaczenie, w kontekście pobierania pokarmu, takich peptydów sygnałowych jak grelina czy leptyna, zostało szeroko opisane u zwierząt monogastrycznych i u ludzi (Müller i in., 2015; Zhang i in., 2005), natomiast ich rola u przeżuwaczy pozostaje w dużej mierze niepoznana. Specyficzna fizjologia trawienia u bydła - obejmująca fermentacyjne trawienie w żwaczu, odmienny przebieg dojrzewania przewodu pokarmowego oraz kluczowe znaczenie czynników żywieniowych w modulacji osi jelito-mózg - sugeruje, że lokalizacja i poziom immunoekspresji tych peptydów może istotnie różnić się od obserwowanej u innych ssaków. Co więcej, wciąż identyfikowane są nowe cząsteczki regulacyjne o znaczeniu anoreksygennym czy oreksygennym, takie jak nesfatyna-1 czy feniksyna-14 (PNX-14) (Oh-I i in., 2006; Yosten i in., 2013). W odniesieniu do tych substancji, dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na ich funkcjach w OUN, podczas gdy

ich obecność i rola poza OUN - zwłaszcza w przewodzie pokarmowym - pozostają mniej poznane, włączając w to przeżuwacze.

4.3.1. Grelina

Jednym z najlepiej poznanych peptydów o działaniu oreksygenym jest grelina – 28-aminokwasowy hormon odkryty przez Kojimę i współautorów w 1999 roku (Kojima i in., 1999; Kojima i Kangawa, 2005). Głównym źródłem greliny są enteroendokryne komórki *X/A-like* zlokalizowane w obrębie dna i trzonu żołądka (u bydła – w trawieńcu) (Deaver i in., 2013; Stengel i Taché, 2009). Gen *GHRL* koduje preprogrelinę, będącą prekursorem progreliny, z której w wyniku cięcia proteolitycznego przez prohormon konwertazę 1/3 (PC1/3) powstaje aktywna grelina (Zhu i in., 2006; Seim i in., 2007). Dla uzyskania pełnej aktywności biologicznej hormon ten musi ulec acylacji w pozycji seryny 3, katalizowanej przez enzym O-acylotransferazę greliny (GOAT) (Gutierrez i in., 2008; Yang i in., 2008).

Aktywna forma greliny jest ligandem receptora sekretagogu hormonu wzrostu typu 1a (GHSR-1a), należącego do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR). Receptor GHSR występuje w dwóch izoformach: GHSR-1a oraz GHSR-1b, przy czym tylko GHSR-1a wiąże biologicznie aktywną grelinę (Howick i in., 2017). Ekspresję GHSR-1a wykazano przede wszystkim w podwzgórz, przysadce mózgowej, hipokampie, istocie czarnej, jądrze półkolumnowym oraz w przewodzie pokarmowym, trzustce, sercu i tkance tłuszczowej (Howard i in., 1996; Müller i in., 2015).

W podwzgórz aktywacja GHSR-1a prowadzi do pobudzenia neuronów zawierających neuropeptyd Y/peptyd związany z agouti (NPY/AgRP) oraz hamowania neuronów zawierających propiomelanokortynę (POMC), co skutkuje nasileniem łaknienia (Cowley i in., 2003; Howick i in., 2017). Równocześnie grelina silnie stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki, promuje odkładanie tłuszczu i obniża wydatkowanie energii (Howick i in., 2017; Tschöp i in., 2000). W przewodzie pokarmowym grelina zwiększa wydzielanie kwasu solnego i soku trzustkowego, nasila motorykę żołądka i jelit oraz działa troficznie na błonę śluzową (Akalu i in., 2020; Inui i in., 2004). Jej stężenie w osoczu wzrasta przed posiłkiem i obniża się po jego spożyciu, pełniąc funkcję sygnału inicjującego zachowania pokarmowe (Kojima i Kangawa, 2005; Müller i in., 2015). Na jej sekrecję wpływa głód, stres oraz stan metaboliczny organizmu (Müller i in., 2015).

Oprócz regulacji apetytu i funkcji przewodu pokarmowego grelina uczestniczy w kontroli gospodarki lipidowej i glukozowej, modulacji rytmu dobowego, funkcjonowaniu układu nagrody, a także w procesach zapalnych i immunologicznych (Akalu i in., 2020; Jiao i Luo, 2022; Mehdar, 2021). Z tego względu grelina uznawana jest za cząsteczkę plejotropową, potencjalnie istotną w patogenezie chorób metabolicznych, takich jak otyłość, anoreksja, cukrzyca typu 2 czy zespół metaboliczny. Jej znaczenie rozpatrywane jest również w kontekście potencjalnego markera biomedycznego oraz celu terapeutycznego w zaburzeniach metabolicznych i zapalnych (Akalu i in., 2020; Delporte, 2013).

4.3.2. Leptyna

Jednym z najważniejszych peptydów o działaniu anoreksygennym jest leptyna – 167-aminokwasowy hormon białkowy odkryty przez Zhanga i współpracowników w 1994 roku podczas badań nad fenotypem myszy *ob/ob* (Zhang i in., 1994). Leptyna jest produktem genu *LEP*, który koduje białko preproleptyny. Po odcięciu sekwencji sygnałowej z preproleptyny powstaje dojrzała forma leptyny, wydzielana głównie przez adipocyty białej tkanki tłuszczowej (Friedman i Halaas, 1998). Poziom leptyny we krwi odzwierciedla zawartość tkanki tłuszczowej, pełniąc rolę sygnału informującego o stanie energetycznym organizmu (Considine i in., 1996; Maffei i in., 1995). Wykazano także jej ekspresję w innych tkankach, m.in. w żołądku, łożysku i gruczołach sutkowych, jednak w ilościach znacznie mniejszych niż w adipocytach (Bado i in., 1998).

Receptor leptyny (LepR, dawniej ObR) należy do rodziny receptorów cytokinowych klasy I występuje w kilku izoformach powstałych w wyniku alternatywnego składowania (splicingu) (Wauman i in., 2017). Najważniejsza biologicznie jest długa forma receptora (LepRb), której aktywacja prowadzi do fosforylacji kinazy JAK2 (kinazy Janusowej 2) i aktywacji szlaku STAT3 (czynnika transdukcującego sygnał i aktywującego transkrypcję 3), a także PI3K/Akt (kinaza 3-fosfatydoinozytolu/kinaza białkowa B) i MAPK (kinaza białkowa aktywowana mitogenami) (Friedman i Halaas, 1998). Receptor ten obecny jest szczególnie licznie w neuronach jąder łukowatych podwzgórza, gdzie leptyna aktywuje szlak anoreksygenny POMC/CART (transkrypt regulowany przez kokainę i amfetaminę) oraz hamuje neurony oreksygenne zawierające NPY/AgRP, prowadząc do zmniejszenia łaknienia i zwiększenia wydatkowania energii (Schneeberger i in., 2014).

Poza regulacją bilansu energetycznego leptyna wpływa także na metabolizm glukozy i lipidów, funkcje osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG), procesy immunologiczne oraz

angiogenezę (Considine i in., 1996; Obradovic i in., 2021). Jej stężenie we krwi wzrasta wraz z zawartością tkanki tłuszczowej, natomiast spada w czasie głodzenia i niedożywienia. U osobników otyłych często obserwuje się zjawisko oporności na leptynę, charakteryzujące się osłabieniem odpowiedzi organizmu na wysokie stężenia leptyny w krążeniu (Myers i in., 2010).

Ze względu na wielokierunkowe działanie, leptyna uznawana jest za hormon plejotropowy, którego zaburzenia w wydzielaniu lub działaniu odgrywają istotną rolę w patogenezie otyłości, insulinooporności, cukrzycy typu 2 oraz innych chorób metabolicznych i endokrynnych. Coraz częściej podkreśla się jej potencjalne znaczenie jako biomarkera oraz celu terapeutycznego w leczeniu zaburzeń metabolicznych i zapalnych (Obradovic i in., 2021; Schneeberger i in., 2014).

4.3.3. Nesfatyna

Kolejnym peptydem o działaniu anoreksygennym jest nesfatyna-1 – 82-aminokwasowy fragment białka prekursorowego NUCB2 (nukleobindyny-2), kodowanego przez gen *NUCB2*. Nesfatyna została odkryta w 2006 roku przez Oh-I i wsp. podczas badań nad regulacją apetytu u gryzoni (Oh-I i in., 2006). Początkowo opisano jej obecność w podwzgórzu, w tym m.in. w jądrze łukowatym, przykomorowym i nadwzrokowym, a następnie wykazano jej szerokie występowanie zarówno w OUN, jak i w innych częściach organizmu (Goebel-Stengel i in., 2011). U ludzi i zwierząt jej obecność potwierdzono m.in. w trzustce, przewodzie pokarmowym, nerkach, sercu oraz białej i brunatnej tkance tłuszczowej (Kim i in., 2014; Zhang i in., 2010).

Nesfatyna-1 powstaje w wyniku proteolitycznego cięcia NUCB2 przez enzym prohormonalny PC1/3, analogicznie jak w przypadku greliny, co sugeruje współdzielenie szlaku aktywacji (Fisher i Fisher, 2024). Obecność NUCB2 wykazano m.in. w komórkach endokrynnych X/A żołądka, które jednocześnie produkują grelinę – peptyd o przeciwnym działaniu metabolicznym, co może sugerować złożoną współregulację obu cząsteczek w obrębie jednej populacji komórkowej (Stengel i Taché, 2009).

Dotychczas nie zidentyfikowano jednoznacznie receptora dla nesfatyny-1, jednakże istnieją doniesienia sugerujące, że może ona wiązać się z receptorem greliny GHSR-1a, konkurując o jego aktywację i tym samym wywołując przeciwstawne efekty fizjologiczne (Chen i in., 2022; Rupp i in., 2021). Mimo braku jednoznacznej identyfikacji receptora,

wiadomo, że nesfatyna-1 aktywuje anoreksygeny szlak neuronów zawierających POMC/CART i hamuje neurony zawierające NPY/AgRP w jądrze łukowatym, prowadząc do zahamowania łaknienia i zmniejszenia masy ciała (Pałasz i in., 2012; Price i in., 2008).

Pod względem fizjologicznym nesfatyna-1 wpływa również na wiele procesów niezwiązanych bezpośrednio z kontrolą pobierania pokarmu. Uczestniczy w odpowiedzi na stres, modulując aktywność osi podwzgórze–przysadka–nadnercza (HPA), działa przeciwłękowo i przeciwdepresyjnie, a także bierze udział w regulacji rytmu snu i czuwania (Ayada i in., 2015; Dore i in., 2017). Ponadto wpływa na homeostazę glukozową i wrażliwość insulinową, jak również pełni rolę immunomodulacyjną – uczestnicząc w kontroli procesów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej (Osiak-Wicha i in., 2024; Stengel, 2015). Ekspresję nesfatyny-1 wykazano również w narządach osi HPG, co sugeruje jej udział w regulacji funkcji rozrodczych zależnych od fazy cyklu płciowego, a także potencjalny wpływ na płodność (Parlak Ak i in., 2023).

Z uwagi na rozległą dystrybucję oraz liczne funkcje fizjologiczne, nesfatyna-1 uznawana jest za peptyd plejotropowy, istotny nie tylko w kontekście kontroli apetytu, ale również w regulacji osi neuroendokrynnych, metabolizmu energetycznego, odporności i zachowań emocjonalnych. Jej działanie przeciwstawne względem greliny, a jednocześnie podobieństwa w lokalizacji i biosyntezie, wskazują na możliwą rolę nesfatyny-1 jako czynnika równoważącego układ oreksygenno-anoreksygeny. Coraz częściej rozważa się jej potencjalne zastosowanie jako biomarkera zaburzeń metabolicznych oraz cel terapeutyczny w leczeniu otyłości, insulinooporności i zaburzeń odżywiania (Chen i in., 2022; Osiak-Wicha i in., 2024).

4.3.4. PNX-14

PNX-14 jest stosunkowo niedawno odkrytym neuropeptydem, którego funkcje biologiczne nadal są poznawane. Została zidentyfikowana w 2013 roku jako produkt proteolitycznego cięcia białka prekursorowego SMIM20 (małe integralne białko błonowe 20), kodowanego przez gen *SMIM20* (Yosten i in., 2013). W wyniku tego przetwarzania powstają dwie główne izoformy: PNX-14, składająca się z 14 aminokwasów, oraz PNX-20, zbudowana z 20 aminokwasów (Billert i in., 2020; Mukherjee i Unniappan, 2021). Obie formy są wysoko konserwowane ewolucyjnie, co wskazuje na ich istotne znaczenie biologiczne (Schalla i Stengel, 2018).

Immunoekspresję PNX-14 stwierdzono w OUN, przede wszystkim w podwzgórzu, a także w innych strukturach mózgowia i rdzenia kręgowego, jak również w licznych narządach, w tym w narządach przewodu pokarmowego, trzustce, sercu, płucach, śledzionie i przysadce mózgowej (Prinz i in., 2017; Yosten i in., 2013). Badania immunohistochemiczne wykazały obecność PNX-14 w ośrodkach podwzgórza zaangażowanych w regulację gospodarki energetycznej i funkcji autonomicznych, a także w obrębie jelita cienkiego oraz wysp trzustkowych, co wskazuje na jej udział zarówno w regulacji procesów metabolicznych, jak i w neuroendokrynnej kontroli homeostazy (Prinz i in., 2017).

Za działanie PNX-14 odpowiada prawdopodobnie receptor GPR173 (receptor sprzężony z białkiem G 173, inaczej SREB3 – superkonserwowany receptor ekspresjonowany w mózgu 3), należący do rodziny receptorów GPCR. Ekspresję GPR173 stwierdzono w podwzgórzu, przysadce, jajnikach, żołądku, jelicie cienkim, sercu, trzustce i skórze, co może potwierdzać wielokierunkowe działanie PNX-14 (McIlwraith i Belsham, 2018; Schalla i Stengel, 2018).

PNX-14 odgrywa wielokierunkową rolę fizjologiczną. PNX-14 odgrywa wielokierunkową rolę fizjologiczną. Na podstawie dotychczasowych danych można przypuszczać, że u ssaków może on wykazywać działanie oreksygenne (Schalla i in., 2017). Wpływa także na funkcje rozrodcze poprzez oddziaływanie na oś HPG, modulując wydzielanie hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRH) i przebieg cyklu płciowego (Młczyńska i in., 2023). Kolejnym istotnym obszarem działania PNX-14 jest układ sercowo-naczyniowy. PNX-14 wpływa na czynność mięśnia sercowego, modulując kurczliwość i ciśnienie krwi, a także wykazuje działanie ochronne wobec komórek śródbłonna naczyniowego (Can i in., 2024; Liang i in., 2022). Ponadto pełni rolę neuroprotekcyjną i przeciwzapalną – m.in. w modelach zapalenia jelita grubego czy uszkodzenia trzustki PNX-14 wykazywała działanie antyoksydacyjne i przeciwapoptotyczne (Buzcu i in., 2025; Ozdemir-Kumral i in., 2022). Peptyd ten został również powiązany z regulacją nastroju i zachowań emocjonalnych – uczestniczy w modulacji lęku i depresji oraz wpływa na pamięć i funkcje poznawcze (Kupcova i in., 2022; McIlwraith i Belsham, 2018). Obecność PNX-14 w ośrodkach stresu i interakcje z innymi neuropeptydami sugerują, że może ona działać jako element sieci integrującej sygnały metaboliczne, neuroendokrynne i emocjonalne.

Dostępne dane eksperymentalne i kliniczne wskazują, że PNX-14 jest peptydem plejotropowym, którego działanie obejmuje regulację apetytu, rozrodu, funkcji sercowo-naczyniowych, odporności i zachowań emocjonalnych, a także procesy metaboliczne w przewodzie pokarmowym. Z uwagi na szeroką dystrybucję i wielokierunkowe efekty biologiczne, PNX-14 uznawana jest za potencjalny biomarker zaburzeń metabolicznych i endokrynnych oraz kandydat na cel terapeutyczny w leczeniu otyłości, cukrzycy, chorób serca i zaburzeń psychicznych (Billert i in., 2020; Mcilwraith i Belsham, 2018; Muzammil i in., 2024; Schalla i Stengel, 2018).

4.3.5. Znaczenie peptydów w medycynie weterynaryjnej

W medycynie weterynaryjnej peptydy metaboliczne i neuroendokrynne coraz częściej postrzegane są nie tylko jako cząsteczki regulujące homeostazę organizmu, ale przede wszystkim jako potencjalne biomarkery diagnostyczne i możliwe narzędzia wspomagające terapie. Jednym z głównych obszarów ich zastosowania jest kontrola otyłości i zaburzeń metabolicznych u zwierząt towarzyszących. Leptyna, której stężenie koreluje z ilością tkanki tłuszczowej, jest badana jako marker nadwagi i otyłości u psów i kotów, a jej oznaczanie może wspomagać ocenę kondycji ciała oraz skuteczność programów odchudzania (Kołodziejski i in., 2021). Z kolei grelina i nesfatyna-1, o przeciwnym działaniu na apetyt, mogą znaleźć zastosowanie w monitorowaniu zaburzeń łaknienia oraz w terapii chorób związanych z nieprawidłowym bilansem energetycznym, takich jak anoreksja czy zespół metaboliczny (Friedrich i Stengel, 2021; Osiak-Wicha i in., 2024).

Znaczącą rolę przypisuje się tym peptydom również w zaburzeniach rozrodu zwierząt. Nesfatyna-1 i PNX-14 wykazują ekspresję w narządach rozrodczych samic i są analizowane w kontekście regulacji cyklu płciowego, płodności oraz patogenezy chorób układu rozrodczego. W badaniach na sukach stwierdzono zmiany w poziomach nesfatyny-1 w przebiegu ropnego zapalenia macicy, co wskazuje na jej potencjalne znaczenie jako biomarkera (Rybska i in., 2024). PNX-14 natomiast wykazuje działanie stymulujące neurony GnRH-pozytywne i wydzielanie gonadotropin, co czyni ją interesującym kandydatem w badaniach dotyczących terapii zaburzeń płodności (Mlyczyńska i in., 2023).

Kolejnym kierunkiem zastosowań jest leczenie chorób zapalnych i metabolicznych. Badania eksperymentalne wykazały, że PNX-14 działa cytoprotekcyjnie, ograniczając stres oksydacyjny i uszkodzenia tkanek w modelach cukrzycy indukowanej streptozotocyną oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, co sugeruje jej potencjalne weterynaryjne

wykorzystanie w terapii chorób metabolicznych i zapalnych (Buzcu i in., 2025; Ozdemir-Kumral i in., 2022).

Podsumowując, dostępne dane wskazują więc, że oznaczanie poziomów greliny, leptyny, nesfatyny-1 i PNX-14, a w przyszłości także ich modulacja farmakologiczna, mogą stanowić nowe narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne w praktyce weterynaryjnej. Szczególnie istotne jest ich potencjalne zastosowanie w kontroli otyłości i zaburzeń metabolicznych, chorób rozrodczych oraz stanów zapalnych, co ma znaczenie zarówno kliniczne, jak i ekonomiczne w leczeniu zwierząt towarzyszących i gospodarskich.

5. Hipotezy i cele badawcze

W świetle dotychczasowych badań przeprowadzonych głównie na zwierzętach monogastrycznych, peptydy sygnałowe takie jak grelina, leptyna, nesfatyna-1 oraz PNX-14 zostały uznane za istotne regulatory łaknienia, metabolizmu energetycznego oraz osi jelitowo-mózgowej. Ich obecność, funkcje oraz mechanizmy działania są dobrze poznane u ssaków monogastrycznych, natomiast u przeżuwaczy – w tym bydła domowego – wiedza ta pozostaje fragmentaryczna.

Wobec powyższego, zasadniczy problem badawczy niniejszej rozprawy sprowadza się do pytania, czy w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych osobników bydła domowego występują peptydy sygnałowe o działaniu oreksygennym (grelina, PNX-14) i anoreksygennym (leptyna, nesfatyna-1) oraz ich receptory, a jeśli tak, to czy istnieją różnice w poziomie ekspresji mRNA, rozmieszczeniu tkankowym (immunolokalizacji) i stężeniu tych związków pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego oraz grupami wiekowymi.

Odpowiedź na to pytanie pozwoli pogłębić zrozumienie molekularnych i tkankowych podstaw regulacji łaknienia u przeżuwaczy w różnych fazach rozwoju postnatalnego, a także dostarczy danych o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i terapeutycznym tych molekuł sygnałowych w medycynie weterynaryjnej.

W związku z powyższym sformułowano następujące hipotezy badawcze, mające za zadanie rozwiązanie przedstawionego problemu badawczego:

1. W ścianie przewodu pokarmowego bydła domowego (żwacz, czepiec, księża, trawieniec, dwunastnica, jelito czcze, jelito biodrowe, okrężnica, odbytnica) obecne są transkrypty genów kodujących białka prekursorowe greliny, PNX-14, leptyny, nesfatyny-1 (*GHRL*, *SMIM20*, *LEP*, *NUCB2*) oraz ich receptory (*GHSR*, *GPRI73*, *LEPR*).
2. Poziomy ekspresji mRNA analizowanych genów różnią się istotnie pomiędzy cielętami a osobnikami dorosłymi oraz pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego bydła domowego.
3. Produkty białkowe badanych genów są obecne w ścianie przewodu pokarmowego.
4. Rozmieszczenie badanych związków w ścianie przewodu pokarmowego, a także poziom immunoreakcji na te związki, różnią się pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego oraz pomiędzy grupami wiekowymi bydła domowego.

5. Stężenia badanych peptydów sygnałowych różnią się istotnie zarówno pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego, jak i pomiędzy grupami wiekowymi bydła domowego.

W celu weryfikacji powyższych hipotez postawiono następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Analiza ekspresji genów metodą RT-qPCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją): potwierdzenie obecności transkryptów genów kodujących badane związki w dziewięciu kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego (przedżołądki-odbytnica) oraz porównanie poziomów ekspresji między grupami wiekowymi i narządami przewodu pokarmowego bydła domowego.
2. Mapowanie lokalizacji białek metodą immunohistochemiczną (IHC): określenie rozmieszczenia badanych peptydów i ich receptorów w poszczególnych warstwach ściany narządów przewodu pokarmowego, z uwzględnieniem struktur ENS oraz porównanie tych wzorców pomiędzy grupami wiekowymi bydła domowego.
3. Oznaczenie stężenia białek testami immunoenzymatycznymi (ELISA): pomiar stężeń badanych związków w homogenatach tkankowych i porównanie ich pomiędzy grupami wiekowymi oraz odcinkami przewodu pokarmowego bydła domowego.

6. Materiały i metody

6.1. Zwierzęta

Badania przeprowadzono na zdrowych samcach bydła domowego rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Doświadczenie obejmowało dwie grupy wiekowe: cielęta w wieku 7–8 miesięcy, o masie ciała 218 ± 23 kg ($n = 6$) oraz osobniki dorosłe w wieku 20–24 miesięcy o masie ciała 768 ± 46 kg ($n = 6$). Wszystkie zwierzęta pochodziły z tej samej hodowli, były utrzymywane w jednakowych warunkach środowiskowych i objęte tym samym programem żywienia. Zwierzęta karmiono w systemie półintensywnym, obejmującym okresowy wypas pastwiskowy, a następnie żywienie metodą TMR (całkowicie wymieszana dawka).

Materiał do badań pobrano w miejscowej rzeźni. Na 18 godzin przed ubojem zwierzęta poddano okresowi głodzenia, przy zachowanym dostępie do świeżej wody. Do badań włączono wyłącznie osobniki, które wykazywały dobry stan zdrowia, a analiza poubojowa nie wykazała zmian patologicznych w przewodzie pokarmowym. Bezpośrednio po uboju, w czasie nieprzekraczającym 15 minut, pobrano fragmenty następujących odcinków przewodu pokarmowego: żwacza, czepca, ksiąg, trawieńca, dwunastnicy, jelita czczego, biodrowego, okrężnicy i odbytnicy. Z każdego odcinka uzyskano przekrojowe próbki, obejmujące wszystkie warstwy ściany przewodu pokarmowego i utrwalono je na dwa odmienne sposoby, dostosowane do każdej z trzech wykorzystywanych metod badawczych. W przypadku PCR i ELISA próbki mrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C . W przypadku analiz immunohistochemicznych próbki najpierw płukano w PBS, a następnie utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie. Zgodnie z obowiązującymi w Polsce przepisami prawa, ze względu na fakt, iż materiał badawczy pochodził od zwierząt przeznaczonych do standardowego uboju, badania nie wymagały uzyskania zgody komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.

6.2. RT-qPCR

6.2.1. Izolacja RNA i oznaczenie ekspresji genów metodą RT-qPCR

Fragmenty narządów obejmujące wszystkie warstwy histologiczne danego odcinka przewodu pokarmowego poddano izolacji całkowitego RNA z użyciem zestawu PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), zgodnie

z protokołem producenta. Uzyskany materiał oczyszczono z genomowego DNA przy użyciu DNase I (PureLink DNase Set; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Stężenie i czystość RNA oznaczano spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), a jego integralność oceniano w elektroforezie na 2% żelu agarozowym. Do syntezy cDNA użyto 300 ng RNA i zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Otrzymany materiał poddano analizie ekspresji genów metodą qPCR w aparacie QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Reakcje prowadzono z wykorzystaniem zestawu RT PCR Mix SYBR Green z HiROX (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), zgodnie z zaleceniami producenta.

Analizowano ekspresję genów: *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR* i *NUCB2*, kodujących odpowiednio białka prekursorowe greliny, receptor GHSR, białko prekursorowe PNX-14, GPR173, białko prekursorowe leptyny, receptor leptyny oraz białko prekursorowe nesfatyny-1. Jako geny referencyjne zastosowano *ACTB* i *RPS9* (Janovick-Guretzky i in., 2007). Sekwencje starterów (Tabela 1) zaprojektowano w programie Primer3web, a następnie zamówiono w firmie Genomed (Warszawa, Polska). Startery projektowano w taki sposób, aby obejmowały regiony intronowe i były umieszczone w różnych eksonach, co minimalizowało ryzyko amplifikacji genomowego DNA. Reakcje PCR prowadzono w trzech powtórzeniach technicznych dla każdej próbki. Parametry cyklu obejmowały: wstępne nagrzewanie w 95°C przez 3 min, następnie 45 cykli składających się z denaturacji w 95°C przez 15 s, przyłączania starterów w 57°C przez 30 s i elongacji w 72°C przez 30 s. Procent efektywności reakcji określano na podstawie krzywej standardowej z rozcieńczeń cDNA ($E = efficiency \cdot 10^{[-1/slope]}$). Względny poziom ekspresji analizowanych genów obliczano metodą $-\Delta\Delta CT$. Uzyskane wyniki normalizowano względem średniej ekspresji genów referencyjnych *ACTB* i *RPS9*.

Tabela 1. Startery użyte w badaniu.

Gen	Sekwencja startera (5' do 3') ¹	Długość produktu (bp)	Numer dostępowy GenBank	Wydajność reakcji qPCR
<i>GHRL</i>	F: ¹³³ TCAGGCAGACTGAAGCCCCG R: ²²³ GGATTTCCAGCTCGTCCTCTGC	91	NM_174067.2	1,98
<i>GHSR</i>	F: ⁶²² CGCTCCGGACTGCTCACAGT R: ⁸⁴² AAGGGCAGCCAGCAGAGGAT	222	NM_001143736.2	2,00
<i>SMIM20</i>	F: ²²⁹ GCCATAAATCGAGCTGGTAT R: ³⁷⁶ TGCTGCAGAACTGAAAGCAT	148	NM_001145428.1	1,96
<i>GPR173</i>	F: ⁸⁴³ GCAAGATTGTGGCCTTTATGGCTG R: ⁹⁶¹ CATGCGCTTGGCATAGAAG	119	NM_001015604.1	1,83
<i>LEP</i>	F: ⁴⁶ AAATGCGCTGTGGACCCCTGT R: ²⁴⁵ GAGCCCAGGGATGAAGTCCAA	200	NM_173928.2	2,00
<i>LEPR</i>	F: ¹⁷⁸¹ AATCTGCCAGTCTCCCAGTG R: ¹⁸⁹⁷ CAACTGTGTGGGCTGGAGTA	117	NM_001012285.2	1,97
<i>NUCB2</i>	F: ²⁷⁶ AAAAGCTCCAGAAAGCAGACA R: ³⁹³ GCCACTTCTTGCCTTTTCAG	118	NM_001075381.1	1,98
<i>ACTB</i>	F: ⁷⁹⁵ TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R: ⁹²⁷ AGGTAGTTTCGTGAATGCCG	133	NM_173979.3	2,02
<i>RSP9</i>	F: ¹²⁸ CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: ¹⁹¹ CCTCCAGACCTCACGTTTGTTT	64	NM_001101152.2	2,00

¹Liczby wskazują pozycję, w której odpowiednie startery wiążą się z genami docelowymi (w parach zasad, w kierunku od 5' do 3').

6.2.2. Analizy statystyczne qPCR

Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem programów Statistica v. 13.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, Stany Zjednoczone), GraphPad Prism v. 10.1.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, Stany Zjednoczone) oraz R v. 4.3.1. Dane uzyskane z analizy ekspresji poddano transformacji $\log_2$ w celu normalizacji, a rozkład normalny danych potwierdzono testem Shapiro-Wilka. Różnice w poziomie ekspresji mRNA w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego oceniano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z uogólnionym modelem liniowym (GLM), uwzględniającym wiek, odcinek przewodu pokarmowego oraz interakcję pomiędzy tymi czynnikami.

Reszty modelu poddano ocenie pod kątem normalności i jednorodności na podstawie wykresów Q-Q plot (wykres kwantyl-kwantyl), testu Shapiro-Wilka oraz wykresów reszt względem wartości dopasowanych. *Post hoc* zastosowano korekcję dla wielokrotnych

porównań Tukeya (HSD) w ramach testowania hipotez statystycznych. Za istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,01$, po uwzględnieniu korekty błędu rodziny, przy progu istotności ustawionym na 0,01 (co odpowiada 99-procentowemu przedziałowi ufności). Tak zaostrożony próg istotności został przyjęty w celu ograniczenia liczby przypadków fałszywej istotności statystycznej. Wielkość efektu (ES) dla istotnych różnic między cielętami i dorosłymi osobnikami obliczano za pomocą współczynnika Cohena d.

Wzorce współekspresji genów przedstawiono na wykresach korelacji uzyskanych w pakiecie corrrplot programu R, z oznaczeniem istotności: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Mapy ciepłe ekspresji wygenerowano w pakiecie „pheatmap” w programie R, po wcześniejszej normalizacji profili zmian ekspresji (FC) każdego genu metodą standaryzacji z-score, według wzoru: $z\text{-score} = (\text{wartość dla genu} - \text{średnia wartość genu}) / \text{odchylenie standardowe}$.

6.3. Immunoekspresja

6.3.1. Przygotowanie materiału

Próbki utrwalane przez 24 h w formaldehydzie przepłukiwano wodą wodociągową, a następnie odwodniono w rosnącej serii etanolu, prześwietlono w ksylenie i przesycono w parafinie (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy). Tak przygotowane próbki zatapiano w bloczkach parafinowych przy użyciu modułowej zatapiarki (MYR EC-350, Casa Álvarez Material Científico S.A., Madryt, Hiszpania), a następnie krojono na skrawki o grubości 5 μm za pomocą mikrotomu rotacyjnego (HM 360, Microm, Walldorf, Niemcy). Co piąty skrawek nanoszono na szkiełka SuperFrost® Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) i inkubowano w suszarce (CG Wamed, Warszawa, Polska) w temperaturze 37°C przez 12 h.

6.3.2. Analiza IHC

Analizę IHC przeprowadzono w celu wykrycia greliny, GHSR, nesfatyny-1, PNX-14 i GPR173 w narządach przewodu pokarmowego cieląt i dorosłych osobników bydła domowego. Szkiełka z preparatami odparafinowano w ksylenie, a następnie uwodniono w malejących stężeniach alkoholu etylowego. Pierwszego dnia przeprowadzono odzyskiwanie epitopów indukowane temperaturą w buforze cytrynianowym (10 mM cytrynian sodu, 0,05% Tween 20, pH 6,0) przez 8 min w temperaturze 80°C (multicooker RMC-PM381-E Redmond, Chiny), a następnie inkubowano preparaty w 3% roztworze

H₂O₂ przez 10 min w celu zablokowania endogennych peroksydaz. Po blokowaniu niespecyficznych miejsc wiązania białek (UltraVision Protein Block, 5 min; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) próbki inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko grelinie, GHSR, nesfatynie-1, PNX-14 oraz GPR173 (Tabela 2), rozcieńczonymi w zbuforowanym roztworze Emerald (Cell Marque Corp., Rocklin, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Do każdego skrawka stosowano tylko jedno przeciwciało pierwszorzędowe.

Tabela 2. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w badaniu.

Przeciwciało	Źródło	Numer katalogowy	Rozcieńczenie	Producent
Anty-grelina	królik	PA1-1070	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone
Anty-GHSR	królik	720278	5 µg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone
Anty-nesfatyna-1	mysz	H00004925-M03	1:500	Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota, Stany Zjednoczone
Anty-feniksyna-14	królik	H-079-01	1:200	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, Kalifornia, Stany Zjednoczone
Anty-GPR173	królik	PA5-33664	8.4 µg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone

GHSR – *growth hormone secretagogue receptor*

Specyficzność przeciwciał oceniano poprzez reakcję kontrolną negatywną (polegającą na zastąpieniu przeciwciała pierwszorzędowego rozcieńczalnikiem). Kontrolę przeprowadzono zgodnie z uprzednio opisanym protokołem.

Drugiego dnia skrawki inkubowano z dwustopniowym systemem detekcji BrightVision (poly-HRP –anti-Ms/Rb IgG; ImmunoLogic WellMed B.V., Duiven, Holandia) przez 45 min, a następnie wizualizowano reakcję przy użyciu substratu 3,3'-diaminobenzyny (DAB; ab64238; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania). Pomiędzy poszczególnymi etapami szkiełka płukano w 0,1 M PBS (pH 7,3). Po reakcji z DAB skrawki płukano w wodzie destylowanej, kontrastowano hematoksyliną Mayera (Patho, Mar-Four, Konstantynów Łódzki, Polska), płukano przez 10 min w wodzie wodociągowej, odwodniono w rosnących stężeniach etanolu, prześwietlono w ksylenie, zamykano w medium Shandon Consul-Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) i suszono w cieplarni (CG Wamed, Warszawa, Polska) w temperaturze 37°C przez 12 h.

Ocenę preparatów przeprowadzano za pomocą mikroskopu świetlnego BX-51 DSU (Olympus, Tokio, Japonia) wyposażonym w cyfrową kamerę kolorową DP-70 (Olympus, Tokio, Japonia). Zdjęcia wykonano w wysokiej rozdzielczości przy użyciu oprogramowania Cell[^]M 2.3 (Olympus cellSens Standard; Olympus, Tokio, Japonia) w jednolitych warunkach oświetleniowych oraz przy stałych parametrach jasności i kontrastu, przez tę samą osobę, nieznającą podziału na grupy doświadczalne, co minimalizowało ryzyko błędu. W żadnym z preparatów kontrolnych nie odnotowano pozytywnej immunoreakcji.

Do analizy reakcji IHC zastosowano półilościową metodę opisaną wcześniej (Crowe i Yue, 2019), wykorzystując oprogramowanie ImageJ v. 1.52 (Schneider i in., 2012). W przypadku PNX-14 intensywność reakcji oceniano poprzez podzielenie średniej wartości szarości (*mean gray value – mgv*) przez liczbę jąder komórkowych (*nuclei number – nn*). Dla zwiększenia dokładności jądra liczono ręcznie, korzystając z narzędzia „multipoint”.

W przypadku GPR173 reakcję obserwowano nie tylko w błonie śluzowej, lecz także w błonach podśluzowej i mięśniowej, dlatego pomiary przeprowadzono oddzielnie dla tych trzech obszarów. Dodatkowo reakcję stwierdzono także poza obszarem ciała komórki, wobec czego wyniki przedstawiono jako stosunek średniej wartości szarości do analizowanej powierzchni, obliczanej przy użyciu narzędzia „polygon selections”. W przypadku nesfatyny-1, greliny i GHSR wykonano osobne analizy błony śluzowej oraz splotów podśluzowego i warstwy mięśniowej ENS.

Dla każdego odcinka przewodu pokarmowego oraz każdego zwierzęcia losowo wybierano i analizowano po 100 neuronów ze splotu podśluzowego oraz 100 neuronów ze splotu warstwy mięśniowej. Obrazy rejestrowano przy powiększeniu 400× (obiektyw 40×, okular 10×), przy czym każde pole widzenia obejmowało obszar około 60 000 μm². Do analizy włączano wyłącznie wyraźnie rozpoznawalne ciała komórkowe neuronów.

6.3.3. ELISA

Z zamrożonego materiału odważano po 100 mg próbki, którą następnie homogenizowano w buforze fosforanowym (PBS, 0,1 M, pH = 7,3) w stosunku 1 : 9 (próbka : PBS). Homogenaty wirowano przy 12 000 × g na minutę przez 10 min w temperaturze 4°C w celu usunięcia zanieczyszczeń, a następnie zbierano supernatant. Zawartość białka całkowitego oznaczano przy użyciu zestawu Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) za pomocą spektrofotometru do mikropłytek Epoch (BioTek, Winooski, Vermont, Stany Zjednoczone) i wyrażano w μg/ml.

Poziom nesfatyny-1, greliny, GHSR, PNx-14 i GPR173 oznaczano w powtórzeniach podwójnych, stosując zestawy komercyjne (nesfatyna-1: QY-E60251, Qayee Bio-Technology Co. Szanghaj, Chiny; grelina: QY-E60249, Qayee Bio-Technology Co. Szanghaj, Chiny; GHSR: QY-E60250, Qayee Bio-Technology Co. Szanghaj, Chiny; PNx-14: EH4521, FineTest, Wuhan, Chiny; GPR173: MBS9330587, MyBioSource, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone), zgodnie z protokołami producentów dołączonych do każdego zestawu. Absorbancję mierzono za pomocą spektrofotometru do mikropłytek Epoch (BioTek, Winooski, Vermont, Stany Zjednoczone). Współczynnik zmienności wewnątrz testu nie przekroczył 8%, a współczynnik zmienności między testami nie przekroczył 10%. Próbkę do testów ELISA zostały zakodowane, co minimalizowało ryzyko błędu.

6.3.4. Analiza statystyczna immunoekspresji

Stężenie analizowanego markera w każdej próbce w analizie ELISA normalizowano względem całkowitej zawartości białka. Wyniki wyrażano jako pg lub ng markera na g białka całkowitego (pg/g białka dla nesfatyny-1, greliny, GHSR i PNx-14 oraz ng/g białka dla GPR173). Do analizy danych zarówno z analizy ELISA jak i półilościowej analizy IHC zastosowano liniowy model efektów mieszanych, uwzględniający odcinek przewodu pokarmowego oraz wiek i ich interakcję jako efekty stałe, a zwierzę jako efekt losowy.

Dodatkowo w każdej analizie stężenia i poziomu immunoreakcji na grelinę, nesfatynę-1 i GHSR badano również obecność interakcji między wiekiem a odcinkiem przewodu pokarmowego. W przypadku stwierdzenia istotnej statystycznie interakcji ($p < 0,05$) zastosowano model pełno-czynnikowy, obejmujący porównania parami między grupami wiekowymi w obrębie każdego odcinka przewodu pokarmowego oraz porównania między odcinkami w obrębie każdej grupy wiekowej. Jeśli nie stwierdzono istotnej interakcji, interpretowano jedynie efekty główne.

W sytuacjach, gdy dane nie spełniały założeń testów parametrycznych, stosowano odpowiednie alternatywy nieparametryczne (Aligned Rank Transform dla pełnego modelu lub test Friedmana dla jednego czynnika). Testy post hoc przeprowadzano przy użyciu testu Tukeya dla danych parametrycznych lub testu Dunna dla danych nieparametrycznych. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM), a poziom istotności statystycznej ustalono na $p < 0,05$. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono w programie GraphPad Prism, wersja 10.4.1 dla systemu Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Stany Zjednoczone).

7. Wyniki

7.1 Ekspresja genów (RT-qPCR)

Analiza RT-qPCR wykazała obecność mRNA wszystkich badanych genów we wszystkich analizowanych odcinkach przewodu pokarmowego, zarówno u cieląt, jak i u osobników dorosłych (Ryc. 1). Poziomy ekspresji *GHRL* istotnie różniły się pomiędzy odcinkami, przy czym najwyższe poziomy mRNA w obu grupach obserwowano w trawieńcu, istotnie niższe w dwunastnicy, a śladową ekspresję w pozostałych częściach przewodu pokarmowego ($p < 0,01$, Ryc. 1a).

U osobników dorosłych najwyższy poziom ekspresji *GHSR* odnotowano w jelicie biodrowym, nieco niższy (choć nieistotnie statystycznie) w czepcu i księgach, a najniższy w pozostałych narządach ($p < 0,01$). U cieląt najwyższą ekspresję stwierdzono w księgach, a najniższą w dwunastnicy i jelicie czczym ($p < 0,01$). Ponadto poziom ekspresji *GHSR* w jelicie czczym i biodrowym dorosłych osobników był istotnie wyższy w porównaniu z cielętami ($p = 0,003$, ES: 1,74, FC: 1,89 dla jelita czczego; $p = 0,003$, ES: 0,96, FC: 1,90 dla jelita biodrowego, Ryc. 1b).

Najwyższy poziom ekspresji *SMIM20* u dorosłych zaobserwowano w czepcu, następnie w żwaczu, a w dalszych odcinkach ekspresja stopniowo malała, osiągając najniższy poziom w jelicie czczym ($p < 0,01$). U cieląt najwyższą ekspresję stwierdzono w żwaczu, a najniższą w jelicie czczym ($p < 0,01$). Nie odnotowano istotnych różnic w ekspresji *SMIM20* pomiędzy cielętami a osobnikami dorosłymi pomiędzy korespondującymi odcinkami (Ryc. 1c).

U osobników dorosłych najwyższą ekspresję *GPR173* stwierdzono w księgach, następnie w jelicie biodrowym, a najniższą w dwunastnicy ($p < 0,01$). U cieląt najwyższy poziom transkryptu również obserwowano w księgach, a najniższy w dwunastnicy ($p < 0,01$). W jelicie biodrowym dorosłych poziom ekspresji *GPR173* był istotnie wyższy niż u cieląt ($p = 0,002$, ES: 1,77, FC: 2,62). Odwrotnie, w okrężnicy cieląt poziomy ekspresji *GPR173* były wyższe niż u osobników dorosłych ($p < 0,001$, ES: 0,60, FC: 2,88, Ryc. 1d).

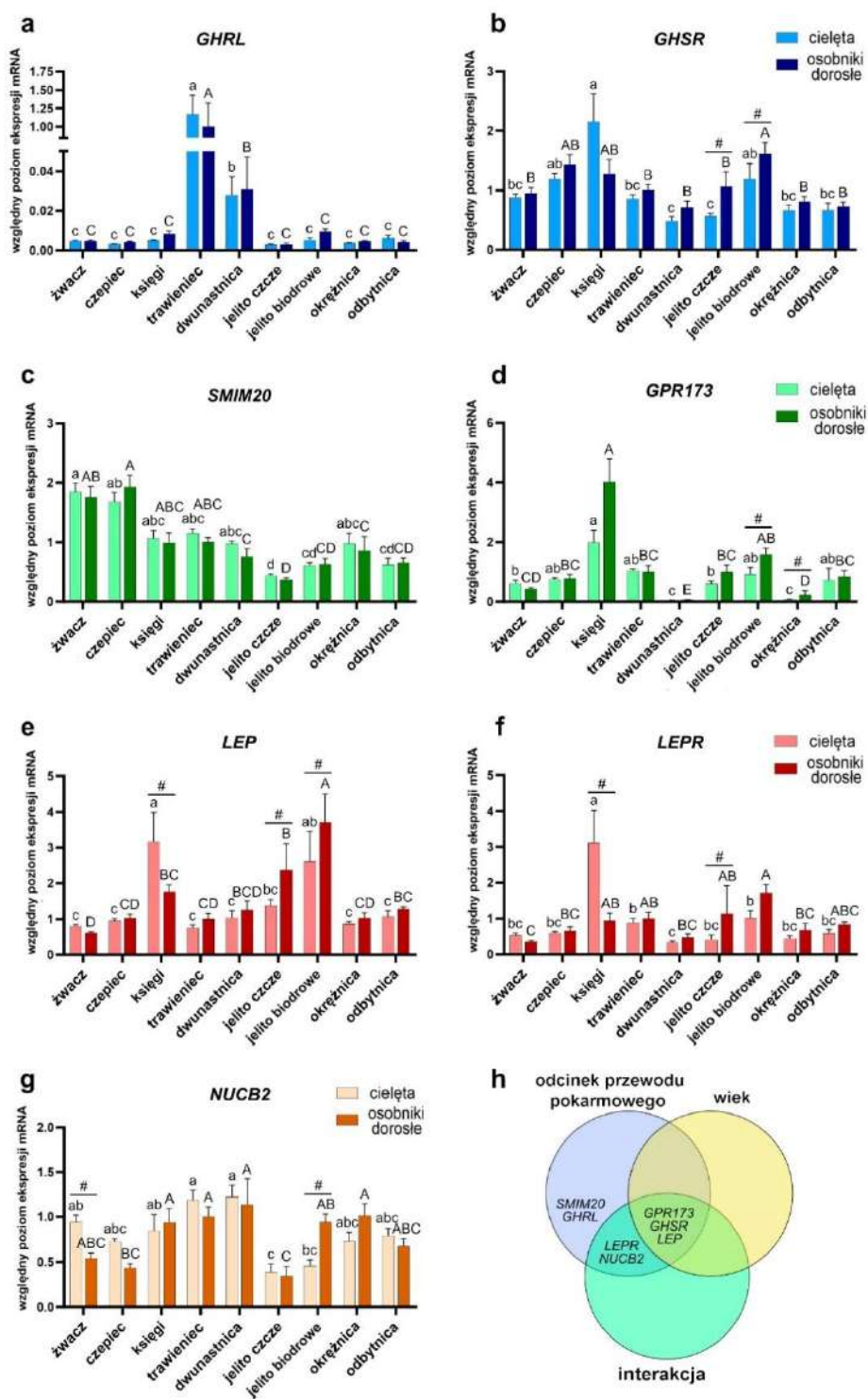
Poziom ekspresji *LEP* w jelicie biodrowym osobników dorosłych był istotnie wyższy niż w innych narządach ($p < 0,01$), a ten odcinek wraz z jelitem czczym wykazywał istotnie wyższą ekspresję u osobników dorosłych w porównaniu z cielętami ($p < 0,001$, ES: 3,67, FC: 1,41 dla jelita biodrowego; $p = 0,008$, ES: 1,11, FC: 1,73 dla jelita czczego). Najniższą

ekspresję *LEP* u dorosłych odnotowano w żwaczu. Z kolei u cieląt poziom transkryptu w księgach był istotnie wyższy niż u osobników dorosłych ($p < 0,001$, ES: 2,29, FC: 2,01) i to właśnie księgi stanowiły odcinek o najwyższym poziomie transkryptu u cieląt ($p < 0,01$, Ryc. 1e).

Najwyższy poziom ekspresji *LEPR* odnotowano w jelicie biodrowym osobników dorosłych, a najniższy w żwaczu ($p < 0,01$). U cieląt najwyższą ekspresję mRNA stwierdzono w księgach, natomiast w pozostałych odcinkach poziomy były istotnie niższe ($p < 0,01$). Różnice między grupami wiekowymi obejmowały wyższą ekspresję w księgach cieląt ($p < 0,001$, ES: 2,27, FC: 3,32) oraz wyższą ekspresję w jelicie czczym dorosłych ($p = 0,009$, ES: 1,03, FC: 1,92, Ryc. 1f).

Poziom ekspresji *NUCB2* był stosunkowo wyrównany pomiędzy odcinkami, a najniższe wartości stwierdzono w jelicie czczym, zarówno u dorosłych jak i u cieląt ($p < 0,01$). Różnice między grupami wiekowymi były istotne: w żwaczu ekspresja *NUCB2* była wyższa u cieląt ($p = 0,008$, ES: 2,41, FC: 1,73), natomiast w jelicie biodrowym wyższa u dorosłych ($p < 0,001$, ES: 2,59, FC: 2,05, Ryc. 1g).

Podsumowując (Ryc. 1h), interakcja pomiędzy odcinkiem przewodu pokarmowego a wiekiem, jak również każdy z tych czynników osobno, miały istotny wpływ na względne poziomy ekspresji *GPRI73*, *GHSR* i *LEP*. W przypadku *LEPR* i *NUCB2* istotny wpływ na ich poziom ekspresji miały zarówno odcinek przewodu pokarmowego, jak i interakcja odcinek $\times$ wiek, natomiast wiek był jedynym czynnikiem istotnie wpływającym na ekspresję *SMIM20* i *GHRL*.

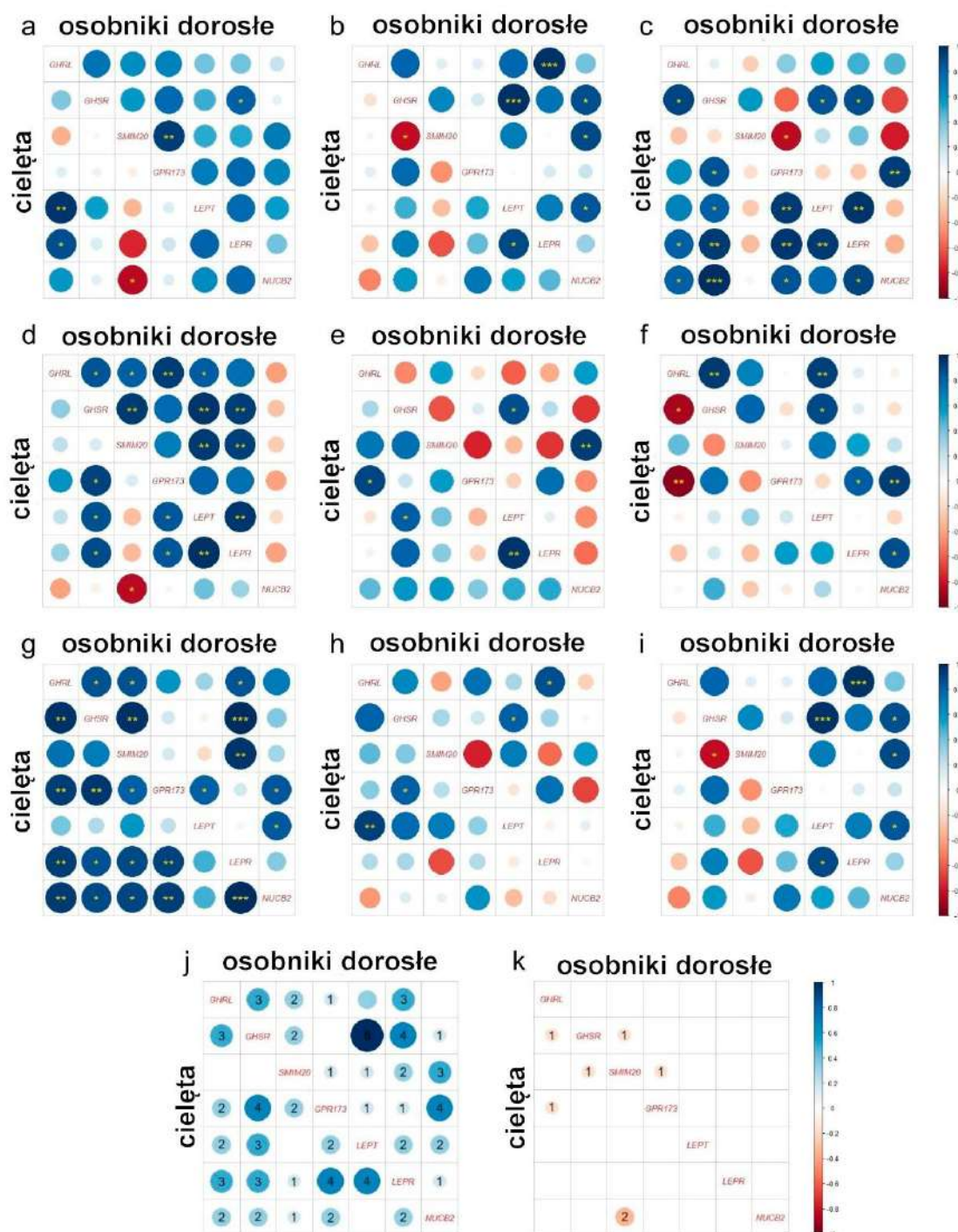


Rycina 1. Względna ekspresja genów (a) *GHRL*, (b) *GHSR*, (c) *SMIM20*, (d) *GPR173*, (e) *LEP*, (f) *LEPR* oraz (g) *NUCB2* w badanych odcinkach przewodu pokarmowego bydła domowego; (h) diagram Venna podsumowujący geny, dla których odcinek przewodu pokarmowego, wiek lub ich interakcja miały istotny wpływ na względny poziom ekspresji mRNA, oceniany testem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Różne małe litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u cieląt, różne wielkie litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u dorosłych osobników ($p < 0,01$). Symbol kratki (#) wskazuje istotne różnice w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy cielętami a dorosłymi w danym odcinku przewodu pokarmowego ($p < 0,01$). Ze względu na wykładniczy charakter względnej ekspresji mRNA obliczanej metodą $-\Delta\Delta CT$, przedstawiono średnie geometryczne wraz z błędem standardowym (SE).

7.1.1. Korelacje między poziomami ekspresji

W obu grupach wiekowych stwierdzono liczne istotne dodatnie korelacje pomiędzy poziomami ekspresji badanych genów. Szczegółowa analiza w postaci graficznej przedstawiona została na Ryc. 2a–i. Najwięcej statystycznie istotnych dodatnich korelacji zaobserwowano między ekspresją *LEP* i *GHSR* u dorosłych. Korelacje te występowały w siedmiu z dziewięciu badanych odcinków, ale nie w pierwszym (żwacz) i ostatnim (odbytnica). U cieląt największą liczbę korelacji dodatnich odnotowano w księgach, natomiast u dorosłych w trawieńcu.

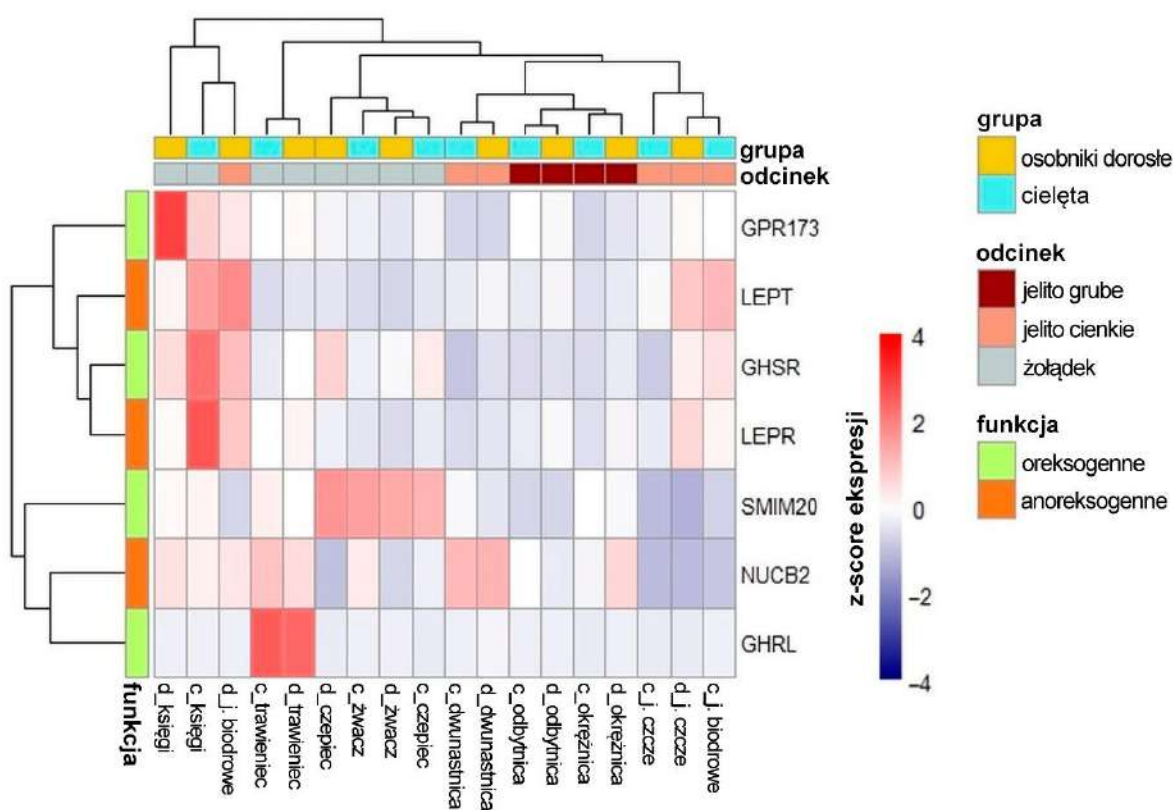
Dodatnie korelacje pomiędzy ligandem a receptorem (*LEP/LEPR*) stwierdzono w żołądku (księgi i trawieniec) zarówno cieląt, jak i dorosłych, a także w czepcu i dwunastnicy cieląt. Korelacje ligand–receptor zaobserwowano również w przypadku pozostałych par: *GHRL/GHSR* w księgach, jelicie czczym i odbytnicy cieląt oraz w trawieńcu i jelicie czczym dorosłych; *SMIM20/GPR173* w żwacz i księgach cieląt oraz dorosłych; *NUCB2/GHSR* w jelicie biodrowym cieląt oraz w czepcu i księgach dorosłych.



Rycina 2. Korelacje pomiędzy wzorcami ekspresji genów *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR* oraz *NUCB2* w: (a) żwaczu, (b) czepcu, (c) księgach, (d) trawieńcu, (e) dwunastnicy, (f) jelicie czczym, (g) jelicie biodrowym, (h) okrężnicy oraz (i) odbytnicy u cieląt i osobników dorosłych bydła domowego. Typ korelacji oznaczono kolorem: niebieski wskazuje korelacje dodatnie, a czerwony – korelacje ujemne. Wielkość punktów odzwierciedla wartość współczynnika korelacji. Istotność statystyczną oznaczono gwiazdkami (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Łączną liczbę istotnych korelacji dodatnich i ujemnych pomiędzy poziomami ekspresji analizowanych genów w odcinkach przewodu pokarmowego cieląt i osobników dorosłych przedstawiono odpowiednio w panelach (j) i (k).

7.1.2. Analiza mapy cieplnej

Analiza mapy cieplnej wykazała, że w większości odcinków przewodu pokarmowego wzorce ekspresji genów były podobne pomiędzy cielętami i osobnikami dorosłymi. Jednakże wyraźne różnice odnotowano w jelicie biodrowym – wzorzec ekspresji genów u osobników dorosłych w tym odcinku grupował się z wzorcem ekspresji w księgach cieląt i osobników dorosłych. W obu grupach wiekowych najwyższe poziomy ekspresji genów obserwowano w przedżołądkach i trawieńcu. Nie stwierdzono grupowania w zależności od typu peptydu (oreksygeny/anoreksygeny) (Ryc. 3).



Rycina 3. Mapa cieplna i dendrogram klasteryzacji hierarchicznej na podstawie wartości *z-score* ekspresji genów *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR* oraz *NUCB2* w odcinkach przewodu pokarmowego cieląt („c”) i osobników dorosłych („d”) bydła domowego. Wartości *z-score* obliczono dla każdego genu w celu uwidocznienia różnic w średnich poziomach ekspresji pomiędzy badanymi odcinkami.

7.2. Immunoekspresja

7.2.1. Grelina

Wśród badanych narządów przewodu pokarmowego głównym miejscem lokalizacji greliny była błona śluzowa, z wyraźną intensyfikacją immunoreakcji w komórkach

gruczołowych trawieńca. W przedżołądkach stwierdzono obecność reakcji IHC w nabłonku błony śluzowej (Ryc. 4). W dwunastnicy obserwowano pojedyncze komórki grelino-immunoreaktywne (ir) zarówno w nabłonku kosmków, jak i w kryptach jelitowych oraz gruczołach dwunastniczych. W jelicie czczym i biodrowym rozmieszczenie komórek grelino-ir było zasadniczo podobne do opisanego dla dwunastnicy. W okrężnicy immunoreakcja ograniczała się natomiast do nabłonka błony śluzowej i krypt jelitowych (Ryc. 5).

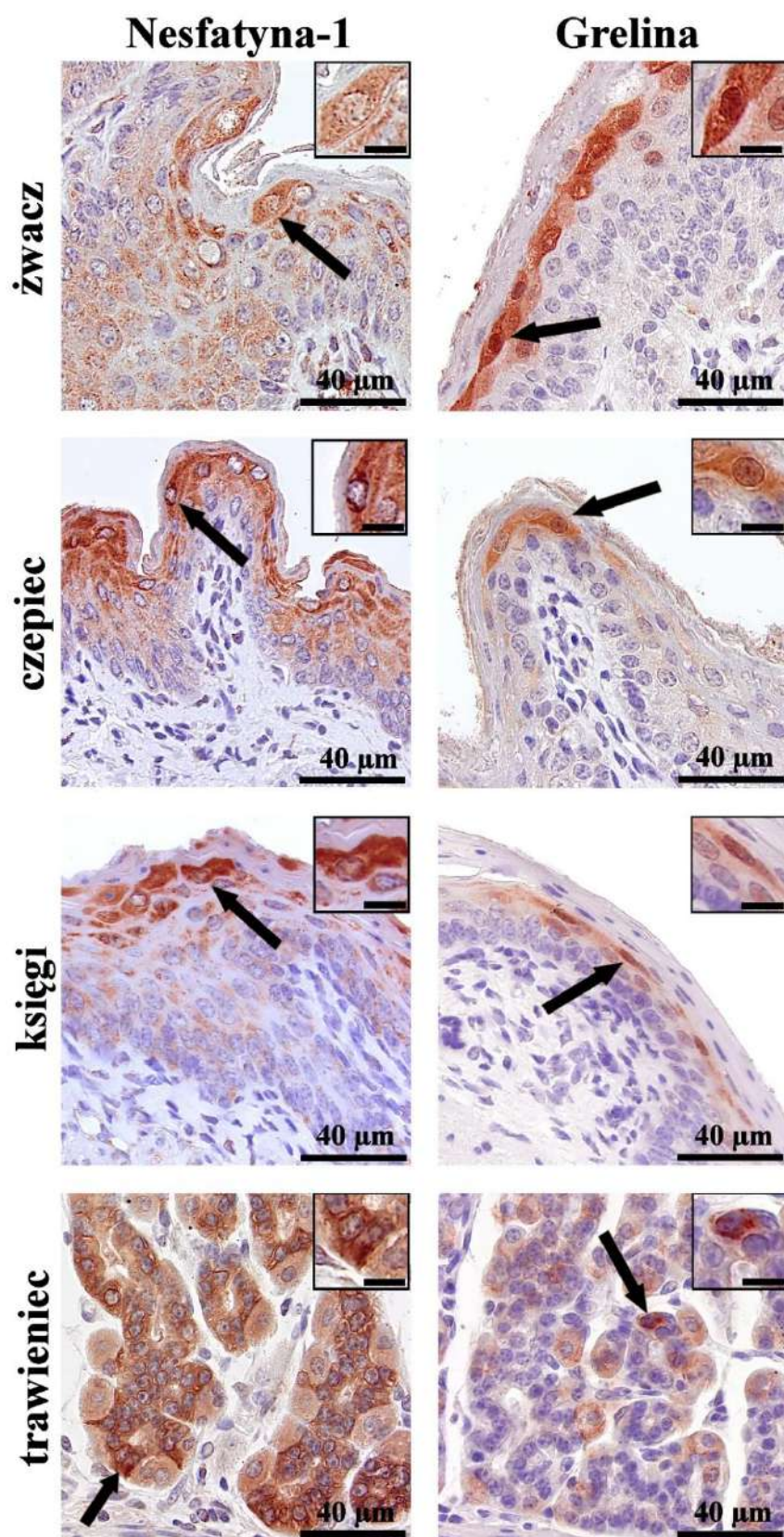
Analiza statystyczna wykazała, że niezależnie od przynależności do grupy wiekowej, poziom badanej immunoreakcji na grelinę w błonie śluzowej różni się istotnie pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego ($p < 0,001$; Ryc. 6a). Najwyższy poziom immunoreakcji na grelinę stwierdzono w trawieńcu ($p < 0,001$ w porównaniu z innymi odcinkami), natomiast pomiędzy pozostałymi odcinkami poziom ten był wyrównany.

Analiza IHC wykazała także obecność struktur grelino-ir w splotach podśluzowych oraz w splotach warstwy mięśniowej ENS przedżołądków, trawieńca i dwunastnicy w obu badanych grupach wiekowych (Ryc. 6b i c, Ryc. 7, Ryc. 8). W dwunastnicy opisywana immunoreakcja na grelinę ograniczała się do pojedynczych zwojów nerwowych. W obu typach splotów wszystkich wymienionych odcinków immunoreakcja na grelinę była widoczna przede wszystkim we włóknach nerwowych przebiegających w obrębie zwojów lub oplatających je. W żadnym ze zwojów ENS jelita czczego, jelita biodrowego ani okrężnicy nie stwierdzono immunoreakcji na grelinę.

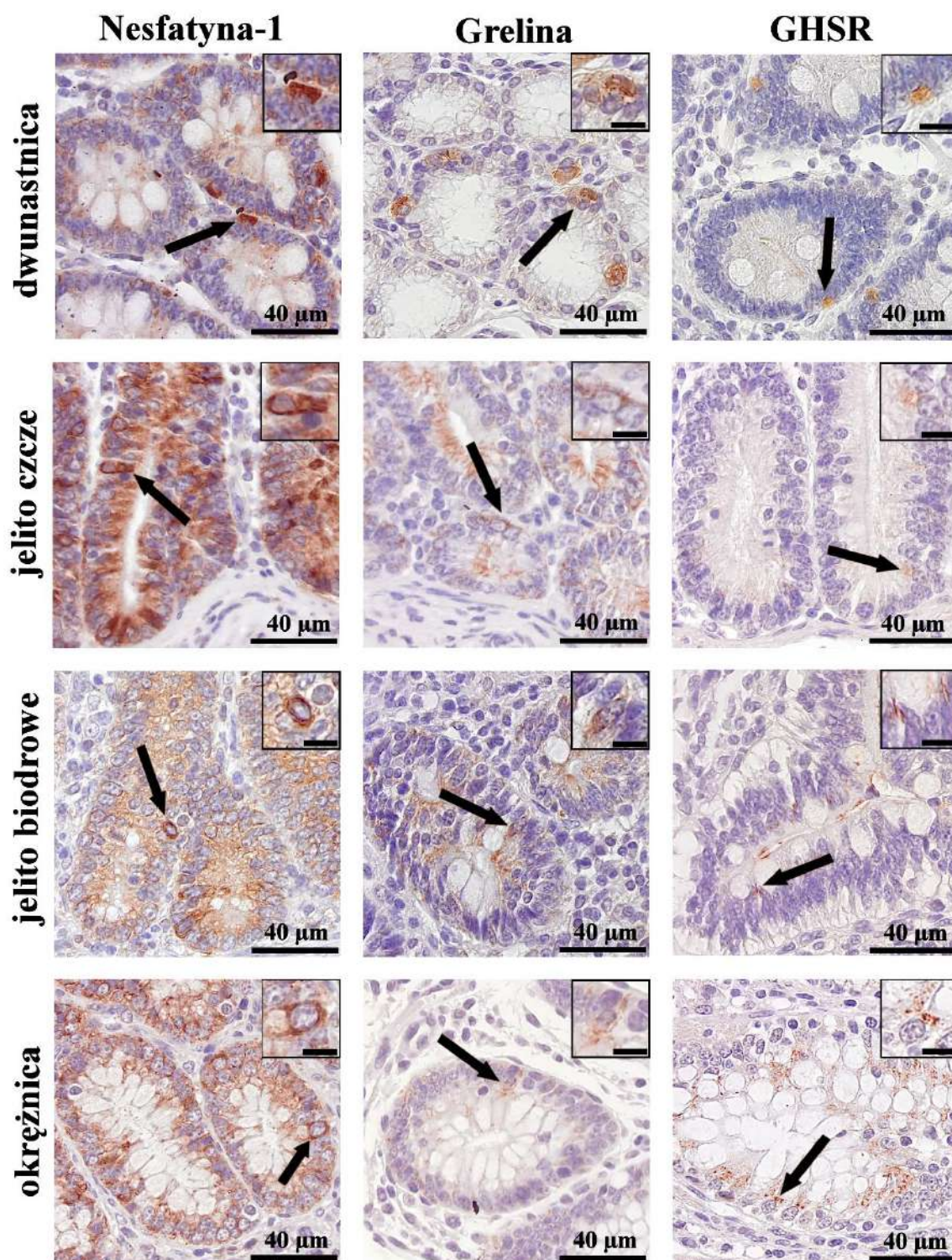
Analiza ilościowa poziomu immunoreakcji na grelinę w obrębie splotu podśluzowego wykazała istotną interakcję pomiędzy wiekiem a odcinkiem przewodu pokarmowego ($p = 0,021$). Niemniej jednak, jedynym statystycznie istotnym czynnikiem różnicującym poziom immunoreakcji okazał się odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). W księgach i dwunastnicy poziom immunoreakcji na grelinę w splocie podśluzowym był istotnie niższy niż w pozostałych analizowanych odcinkach ($p < 0,001$). Porównania między grupami wiekowymi wykazały istotnie wyższy poziom immunoreakcji na grelinę u osobników dorosłych w żwaczu ($p < 0,01$) oraz w księgach ($p < 0,05$), natomiast w trawieńcu wyższy poziom występował u cieląt ($p < 0,05$).

Analiza statystyczna poziomu immunoreakcji na grelinę w splotach warstwy mięśniowej nie wykazała istotnej interakcji pomiędzy odcinkiem przewodu pokarmowego

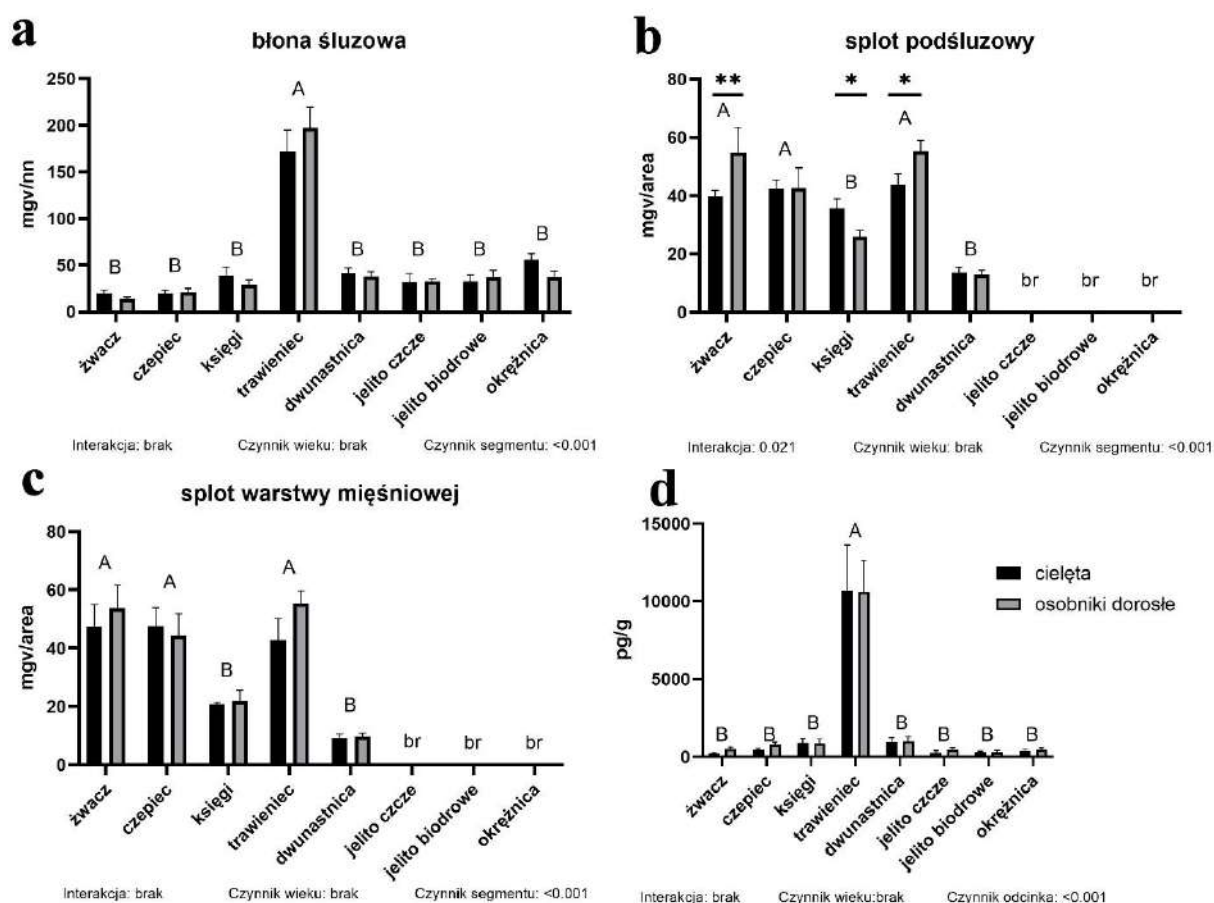
a wiekiem badanych zwierząt. Jedynym czynnikiem różnicującym był odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$), natomiast nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami wiekowymi. W obrębie ksiąg i dwunastnicy poziom immunoreakcji na grelinę był istotnie niższy w porównaniu z pozostałymi analizowanymi odcinkami ($p < 0,05$).



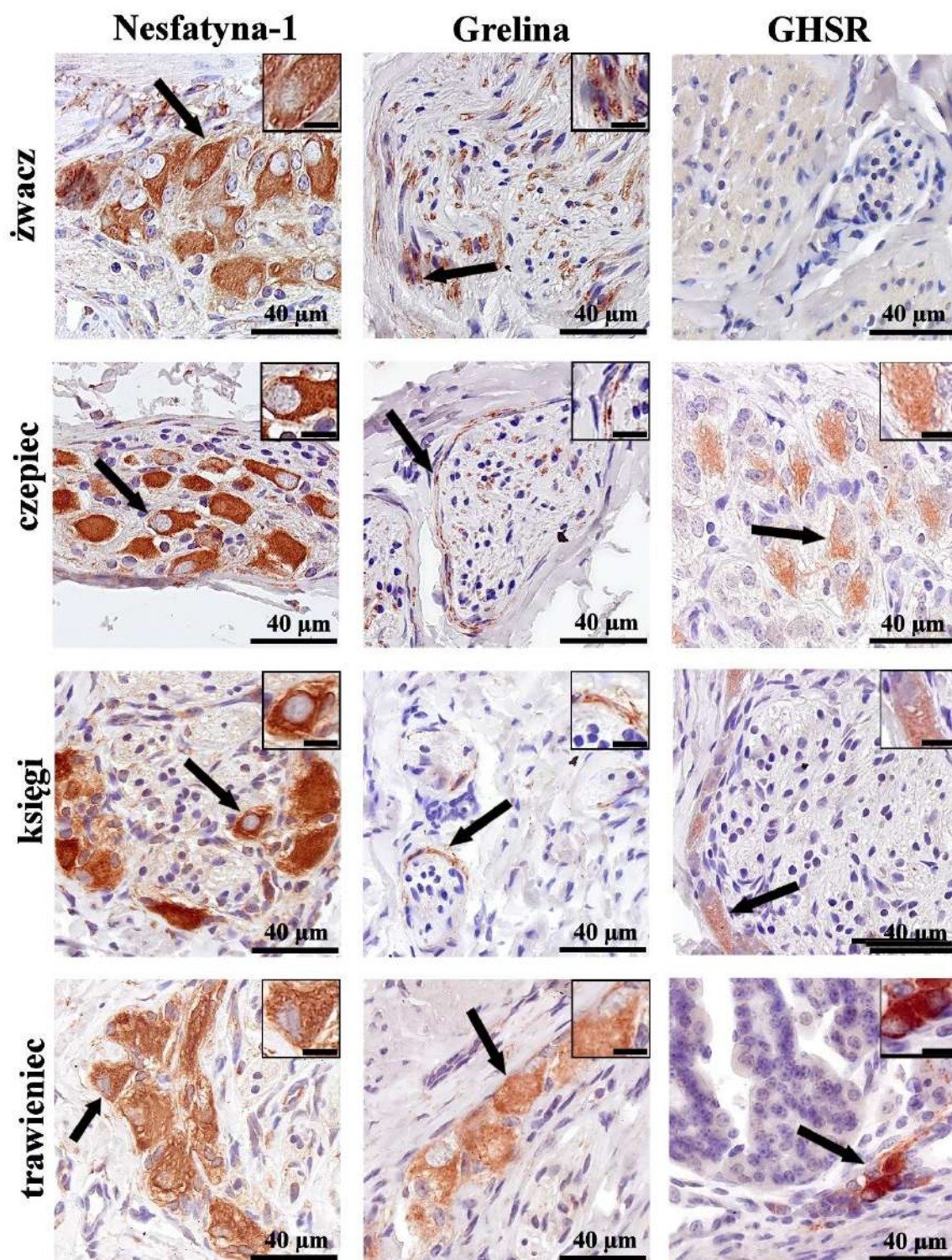
Rcyna 4. Immunolokalizacja nesfatyny-1 i greliny w błonie śluzowej żwacza, czepca, ksiąg i trawieńca cieląt rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (samce). Czarne strzałki wskazują przykładową reakcję immunohistochemiczną. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 µm dla głównego obrazu i 15 µm dla powiększonego fragmentu.



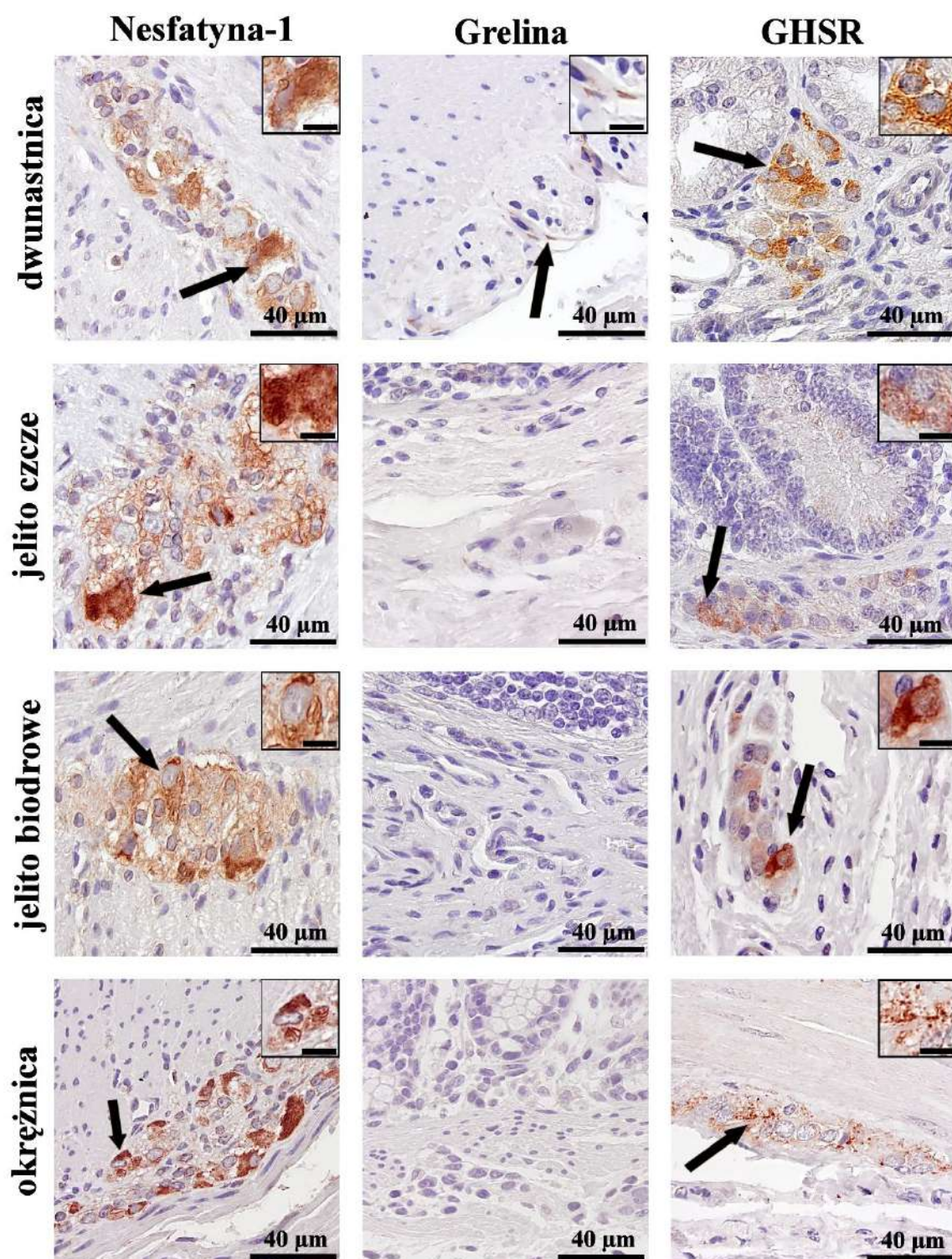
Rycina 5. Immunolokalizacja nesfatyny-1, greliny i GHSR w błonie śluzowej dwunastnicy, jelita czczego, biodrowego i okrężnicy cieląt rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (samce). Czarne strzałki wskazują przykładową reakcję immunohistochemiczną. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 µm dla głównego obrazu i 15 µm dla powiększonego fragmentu.



Rycina 6. Półilościowe oznaczenie poziomu immunoreakcji na grelinę (a-c) oraz stężenia greliny (d) w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych samców rasy holendersko-fryzyjskiej. Poziom immunoreakcji w błonie śluzowej (a), splecie podśluzowym jelitowego układu nerwowego (ENS) (b) oraz splecie warstwy mięśniowej ENS (c) wyrażono jako stosunek średniej wartości szarości (mgv) odpowiednio do liczby jąder komórkowych (nn) lub powierzchni analizowanego obszaru (area). Stężenie greliny (d) [pg/g białka całkowitego] oznaczono testem immunoenzymatycznym (ELISA). Wielkie litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego niezależnie od grupy wiekowej ($p < 0,05$), ponieważ interakcja pomiędzy głównymi czynnikami oraz czynniki wieku nie były istotne statystycznie. Gwiazdki (*) oznaczają istotne różnice w poziomie immunoreakcji lub stężeniu greliny pomiędzy cielętami i osobnikami dorosłymi w danym odcinku przewodu pokarmowego (* dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$). br – brak reakcji



Rycina 7. Immunolokalizacja nesfatyny-1, greliny i GHSR w jelitowym układzie nerwowym (ENS) żwacza, czepca, ksiąg i trawienca cieląt rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (samce). Czarne strzałki wskazują przykładową reakcję immunohistochemiczną. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 µm dla głównego obrazu i 15 µm dla powiększonego fragmentu.



Rycina 8. Immunolokalizacja nesfatyny-1, greliny i GHSR w jelitowym układzie nerwowym (ENS) dwunastnicy, jelita czczego, biodrowego i okrężnicy cieląt rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (samce). Czarne strzałki wskazują przykładową reakcję immunohistochemiczną. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 µm dla głównego obrazu i 15 µm dla powiększonego fragmentu.

Analiza statystyczna stężenia greliny, oznaczonego testem ELISA, wykazała, że jedynym czynnikiem różnicującym tę wartość był odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). Stężenie greliny nie przekraczało 1500 pg/g białka całkowitego. Najwyższe wartości stężenia peptydu odnotowano w trawieńcu w obu grupach wiekowych. Były one istotnie wyższe niż w pozostałych badanych odcinkach, w których stężenie greliny pozostawało wyrównane (Ryc. 6d).

7.2.2. GHSR

W błonie śluzowej przedżołądków cieląt i osobników dorosłych nie stwierdzono obecności GHSR. W kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego immunoreakcja na GHSR była obecna w komórkach nabłonka błony śluzowej (Ryc. 5, Ryc. 9a).

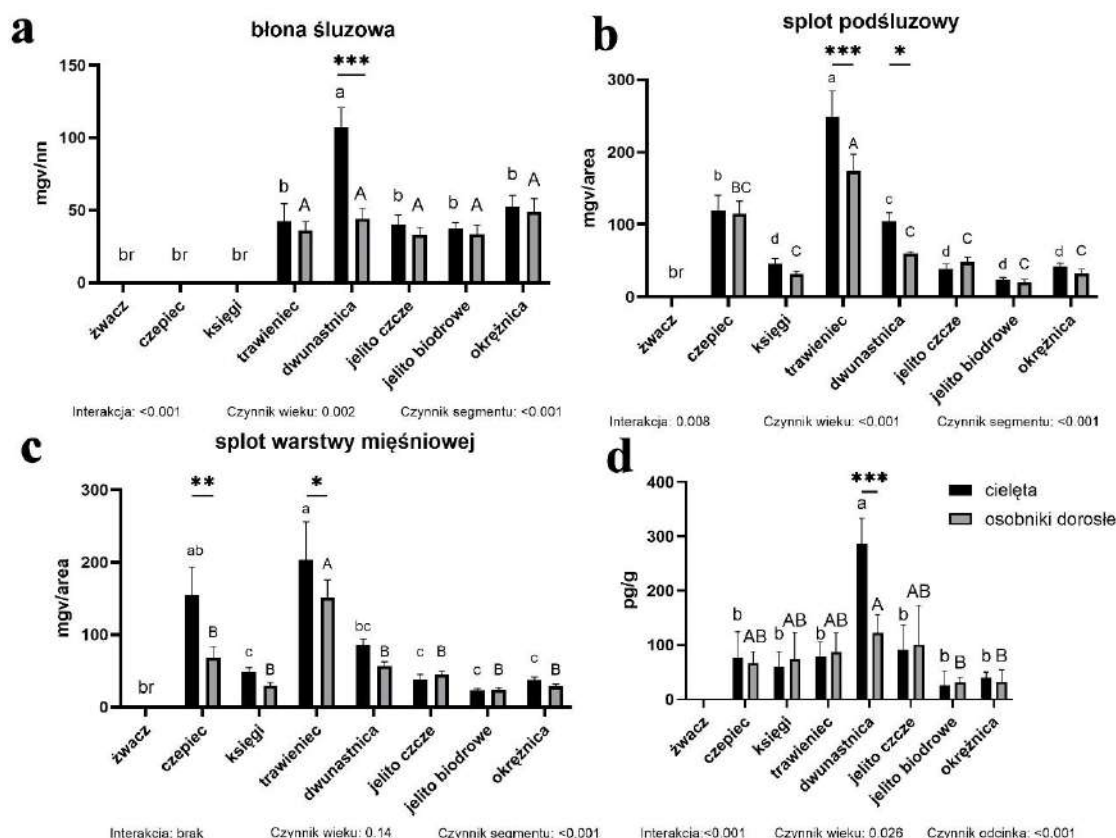
Analiza statystyczna wykazała, że istotnymi czynnikami różnicującymi poziom immunoreakcji na GHSR w błonie śluzowej były zarówno wiek ($p = 0,002$), jak i odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). Wykazano także istotną interakcję obu czynników ($p < 0,001$). W dwunastnicy cieląt zaobserwowano istotnie wyższy poziom immunoreakcji na GHSR niż w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego ($p < 0,001$), pomiędzy którymi poziomy immunoreakcji były wyrównane. U osobników dorosłych nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie immunoreakcji na GHSR pomiędzy badanymi odcinkami. Porównanie między grupami wiekowymi wykazało, że poziom immunoreakcji na GHSR w dwunastnicy był istotnie wyższy u cieląt niż u osobników dorosłych ($p < 0,001$, Ryc 9a).

Analiza IHC wykazała także obecność GHSR w ENS wszystkich badanych odcinkach przewodu pokarmowego obu grup wiekowych, z wyjątkiem żwacza (Ryc. 7, Ryc. 8). W obu splotach ENS immunoreakcja na GHSR ograniczała się wyłącznie do ciał komórek nerwowych.

Analiza statystyczna poziomu immunoreakcji na GHSR wykazała, że w splotie podśluzowym istotnymi czynnikami różnicującymi tę wartość były zarówno wiek zwierząt ($p < 0,001$), jak i odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). Wykazano także istotną interakcję pomiędzy tymi czynnikami ($p = 0,041$). U cieląt najwyższy poziom badanej immunoreakcji na GHSR odnotowano w trawieńcu ($p < 0,05$). Nieco niższe wartości obserwowano w czepcu i dwunastnicy, zaś pozostałe odcinki wykazywały wyraźnie niższy poziom badanej immunoreakcji (Ryc. 9b). U osobników dorosłych najwyższy poziom immunoreakcji na GHSR ($p < 0,05$) stwierdzono również w trawieńcu, natomiast pozostałe

odcinki przewodu pokarmowego w tej grupie wiekowej cechowały się niższymi i wzajemnie zbliżonymi wartościami. Porównanie między oboma grupami wiekowymi wykazało, że poziom badanej immunoreakcji był istotnie wyższy u cieląt niż u osobników dorosłych zarówno w trawieńcu ($p < 0,001$), jak i w dwunastnicy ($p < 0,05$).

W splotach warstwy mięśniowej ENS obu grup wiekowych nie stwierdzono istotnej interakcji pomiędzy odcinkiem przewodu pokarmowego a wiekiem, jednak zarówno odcinek ($p < 0,001$), jak i wiek ($p = 0,014$) były istotnymi czynnikami różnicującymi poziom immunoreakcji na GHSR (Ryc. 9c). Podobnie jak w przypadku splotu podśluzowego ENS, w splocie warstwy mięśniowej zwacza nie odnotowano obecności GHSR, niezależnie od wieku badanych zwierząt. U cieląt najwyższy poziom immunoreakcji na GHSR stwierdzono w trawieńcu, a nieco niższy w czepcu. W pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego stwierdzono wyraźnie niższe i zbliżone do siebie poziomy immunoreakcji na GHSR ($p < 0,05$). U osobników dorosłych najwyższy poziom badanej immunoreakcji stwierdzono również w trawieńcu, natomiast pozostałe odcinki przewodu pokarmowego cechowały się istotnie niższymi i wzajemnie porównywalnymi wartościami ($p < 0,05$). Porównanie między grupami wiekowymi wykazało istotnie wyższy poziom immunoreakcji u cieląt niż u osobników dorosłych zarówno w czepcu ($p < 0,01$), jak i w trawieńcu ($p < 0,05$).



Rycina 9. Półilościowe oznaczenie immunoreakcji na GHSR oraz stężenia GHSR w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych samców rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Immunoreakcję w błonie śluzowej (a), splocie podśluzowym ENS (b) oraz splocie warstwy mięśniowej ENS (c) wyrażono jako stosunek średniej wartości szarości (mgv) odpowiednio do liczby jąder komórkowych (nn) lub powierzchni analizowanego obszaru (area). Stężenie GHSR (d) [pg/g białka całkowitego] oznaczono testem immunoenzymatycznym (ELISA). Różne małe litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u cieląt, natomiast różne wielkie litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u osobników dorosłych ($p < 0,05$). Gwiazdki (*) oznaczają istotne różnice w poziomie immunoreakcji lub stężeniu greliny pomiędzy cielętami i osobnikami dorosłymi w danym odcinku przewodu pokarmowego (* dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$). br – brak reakcji

Analiza statystyczna stężenia GHSR, oznaczonego testem ELISA, wykazała, że istotnymi czynnikami różnicującym tę wartość były zarówno wiek ($p = 0,026$), jak i odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). Wykazano także istotną interakcję między tymi czynnikami ($p < 0,001$). Stężenie GHSR nie przekraczało 400 pg/g białka całkowitego. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano obecności receptora GHSR w żwaczu (Ryc. 9d). U cieląt najwyższe stężenie GHSR stwierdzono w dwunastnicy, zaś wartości w pozostałych odcinkach nie różniły się istotnie między sobą. U osobników dorosłych najwyższe stężenie również występowało w dwunastnicy, najniższe zaś w jelicie biodrowym i okrężnicy. Stężenie GHSR w dwunastnicy różniło się istotnie między grupami wiekowymi, bowiem poziom receptora był istotnie wyższy u cieląt niż u osobników dorosłych ($p < 0,001$).

7.2.3. Nesfatyna-1

Nesfatyna-1 była obserwowana we wszystkich badanych odcinkach przewodu pokarmowego, zarówno w błonie śluzowej, jak i w ENS (Ryc. 10). W błonie śluzowej przedłożadków komórki nesfatyno-1-ir znajdowały się w płaskich warstwach nabłonka, pod powierzchnią zrogowaciałą (Ryc. 4). W trawieńcu komórki nesfatyno-1-ir występowały głównie u podstaw gruczołów, natomiast w dwunastnicy zlokalizowane były głównie w gruczołach dwunastniczych i w podstawnych częściach krypt jelitowych (Ryc. 4, Ryc. 5). Pojedyncze, rozproszone komórki ir występowały również w całej błonie śluzowej dwunastnicy. Podobny wzorzec rozmieszczenia stwierdzono w jelicie czczym, biodrowym i okrężnicy, przy czym komórki nesfatyno-1-ir występowały głównie u podstaw krypt jelitowych.

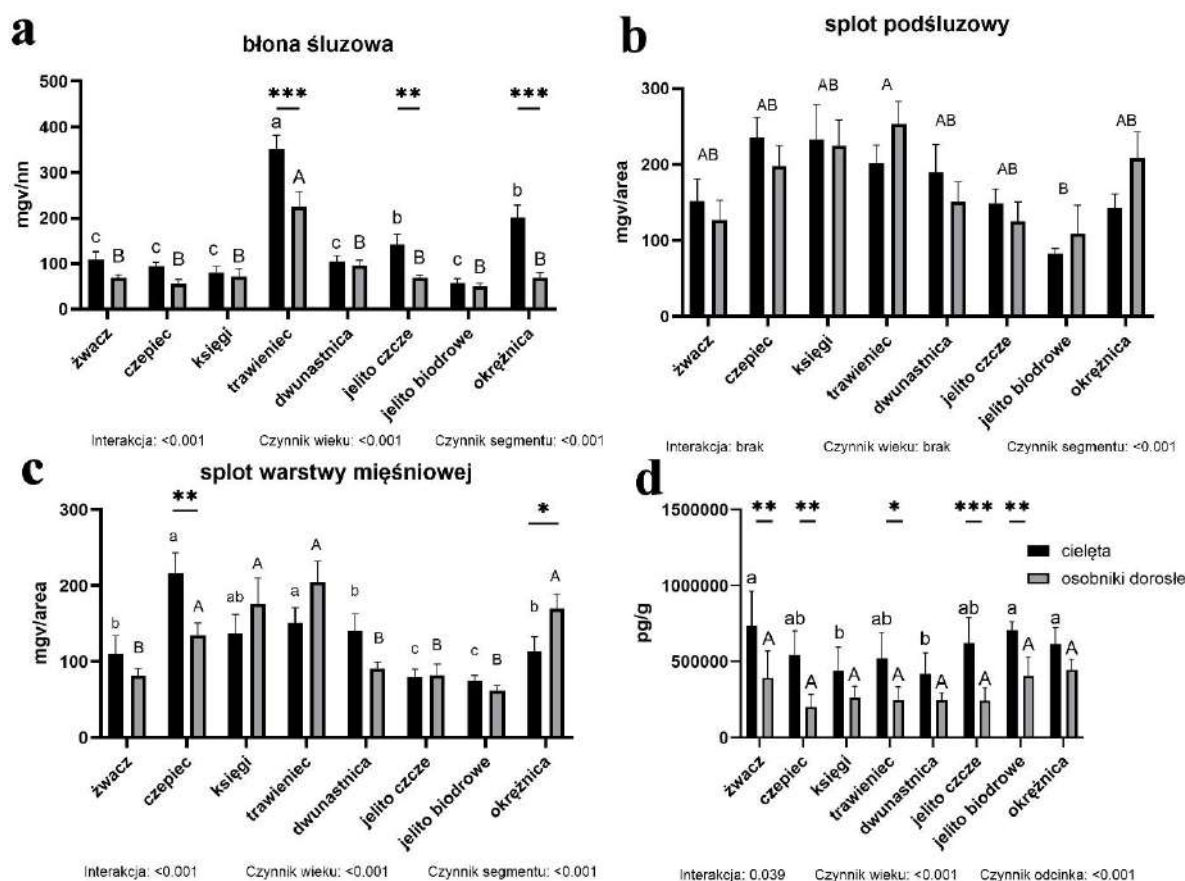
Analiza statystyczna wykazała, że zarówno wiek ($p < 0,001$), jak i odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$), były istotnymi czynnikami różnicującymi poziom immunoreakcji na nesfatynę-1 w błonie śluzowej (Ryc. 10a). Stwierdzono także interakcję między tymi dwoma czynnikami ($p < 0,001$). U cieląt najwyższy poziom badanej immunoreakcji odnotowano w trawieńcu. W jelicie czczym i okrężnicy wartości te były istotnie niższe, natomiast najniższe poziomy odnotowano w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego. U osobników dorosłych trawieniec również wykazywał najwyższy poziom immunoreakcji na nesfatynę-1, natomiast wszystkie pozostałe odcinki wykazywały istotnie niższe i wzajemnie porównywalne wartości. Porównanie między grupami wiekowymi wykazało, że poziom immunoreakcji był istotnie wyższy u cieląt niż u osobników dorosłych w trawieńcu ($p < 0,001$), jelicie czczym ($p < 0,01$) oraz okrężnicy ($p < 0,001$).

W ENS nesfatyna-1 lokalizowała się w ciałach komórek nerwowych, zarówno w splotach podśluzowych, jak i warstwy mięśniowej, we wszystkich badanych odcinkach przewodu pokarmowego (Ryc. 7, Ryc. 8).

Analiza pólnościowa poziomu immunoreakcji na nesfatynę-1 w splotach podśluzowych (Ryc. 10b) nie wykazała istotnej interakcji pomiędzy wiekiem a odcinkiem przewodu pokarmowego. Jedynym statystycznie istotnym czynnikiem różnicującym poziom badanej immunoreakcji był odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). Poziom immunoreakcji na nesfatynę-1 był istotnie wyższy w trawieńcu w porównaniu z jelitem

biodrowym. Nie odnotowano natomiast innych istotnych różnic pomiędzy pozostałymi odcinkami przewodu pokarmowego.

W splotach warstwy mięśniowej (Ryc. 10c) istotnymi statystycznie czynnikami różnicującymi poziom immunoreakcji na nesfatynę-1 były zarówno wiek ($p < 0,001$), jak i odcinek przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). Dodatkowo stwierdzono istotną interakcję pomiędzy wiekiem a odcinkiem przewodu pokarmowego ($p < 0,001$). U cieląt najwyższy poziom immunoreakcji na nesfatynę-1 odnotowano w czepcu, trawieńcu i księgach. Niższe wartości zaobserwowano w okrężnicy, żwaczu i dwunastnicy, natomiast najniższe w jelicie czczym i biodrowym. W splotach warstwy mięśniowej osobników dorosłych najwyższy poziom immunoreakcji na nesfatynę-1 stwierdzono w księgach, czepcu, trawieńcu i okrężnicy, najniższe wartości zaś wykazano w pozostałych odcinkach. Porównanie grup wiekowych wykazało obecność istotnych różnic w czepcu, gdzie wyższy poziom immunoreakcji na nesfatynę-1 występował u cieląt ($p < 0,01$), oraz w okrężnicy, gdzie wyższe wartości immunoreakcji obserwowano u osobników dorosłych ($p < 0,05$).



Rycina 10. Półilościowe oznaczenie immunoreakcji na nesfatynę-1 oraz stężenia nesfatyny-1 w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych samców rasy holendersko-fryzyjskiej. Immunoreakcję w błonie śluzowej (a), splocie podśluzowym ENS (b) oraz splocie warstwy mięśniowej ENS (c) wyrażono jako stosunek średniej wartości szarości (mgv) odpowiednio do liczby jąder komórkowych (nn) lub powierzchni analizowanego obszaru. Stężenie nesfatyny-1 (d) [pg/g białka całkowitego] oznaczono testem immunoenzymatycznym (ELISA). Różne małe litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u cieląt, natomiast różne wielkie litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u osobników dorosłych ($p < 0,05$), o ile interakcja pomiędzy głównymi czynnikami lub czynnikiem wieku nie była istotna – w takich przypadkach wielkie litery wskazują różnice pomiędzy odcinkami niezależnie od grupy wiekowej. Gwiazdki (*) oznaczają istotne różnice w poziomie immunoreakcji lub stężeniu greliny pomiędzy cielętami i osobnikami dorosłymi w danym odcinku przewodu pokarmowego (* dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$).

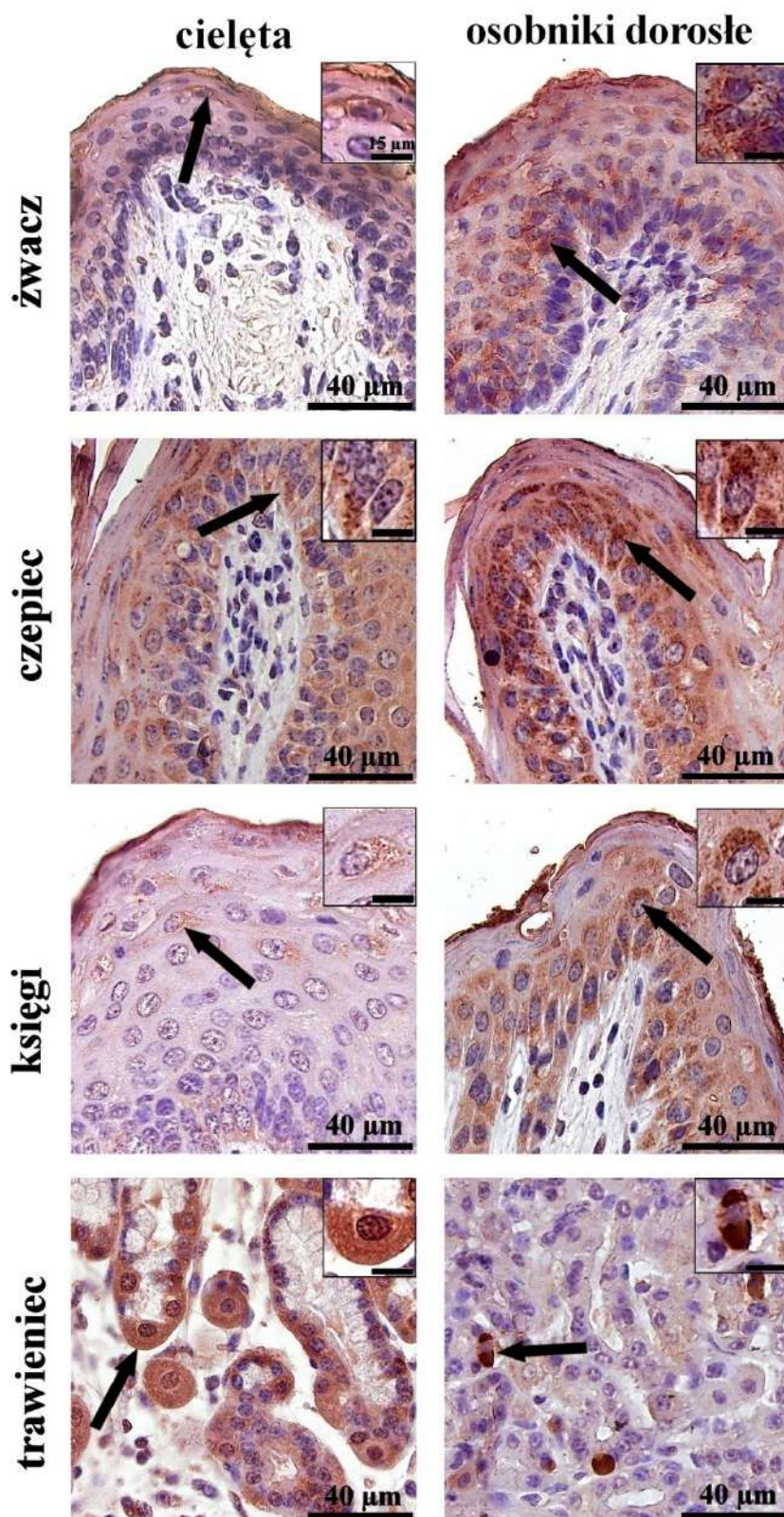
Analiza statystyczna stężenia nesfatyny-1 wykazała, że zarówno wiek ($p < 0,001$), jak i odcinek przewodu pokarmowego stanowiły istotne czynniki różnicujące ten parametr ($p < 0,001$, Ryc. 10d). Co więcej, wykazano interakcję pomiędzy oboma czynnikami ($p = 0,039$). Stężenie nesfatyny-1 nie przekraczało 1 000 000 pg/g białka całkowitego. Stężenie tego peptydu różniło się istotnie między grupami wiekowymi i było wyższe u cieląt niż osobników dorosłych, z istotnymi różnicami w żwaczu ($p < 0,01$), czepcu ($p < 0,05$), trawieńcu ($p < 0,05$), jelicie czczym ($p < 0,001$) i jelicie biodrowym ($p < 0,05$). U osobników dorosłych wartości stężenia nesfatyny-1 nie różniły się istotnie między odcinkami przewodu pokarmowego, natomiast u cieląt zaobserwowano istotnie wyższe stężenie nesfatyny-1

w żwaczu, jelicie biodrowym oraz okrężnicy w porównaniu z księgami i dwunastnicą, gdzie odnotowano najniższe stężenie tego związku.

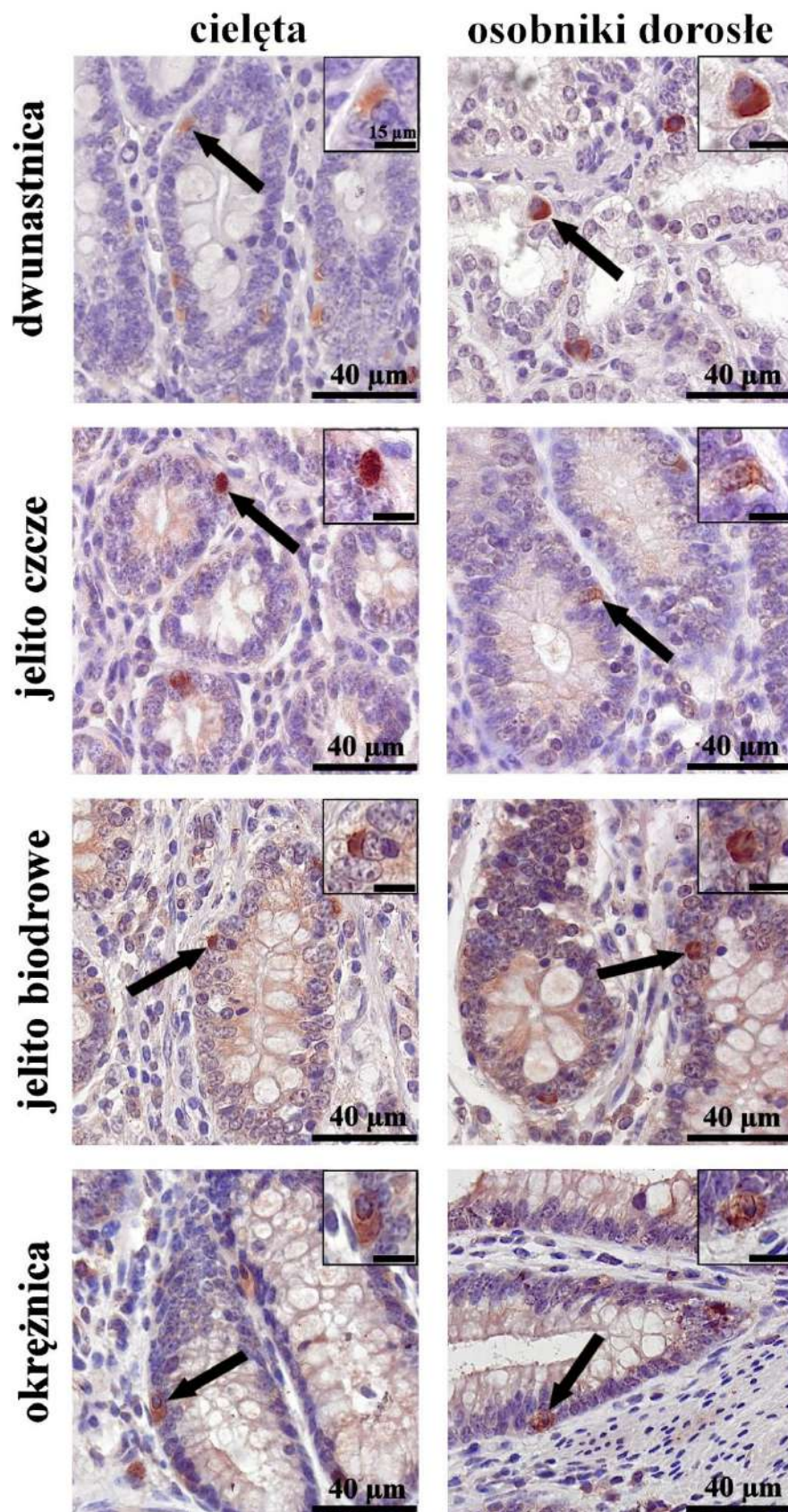
7.2.4. PNX-14

We wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego immunoreakcja na PNX-14 była ograniczona do błony śluzowej, gdzie komórki PNX-14-ir lokalizowały się w nabłonku (Ryc. 11, Ryc. 12, Ryc. 13a). Ponadto w trawieńcu immunoreakcję stwierdzono w gruczołach żołądkowych, w jelicie cienkim i grubym w kryptach jelitowych, natomiast w dwunastnicy w gruczołach dwunastniczych. W okrężnicy komórki PNX-14-ir występowały również w blaszce właściwej pomiędzy kryptami jelitowymi.

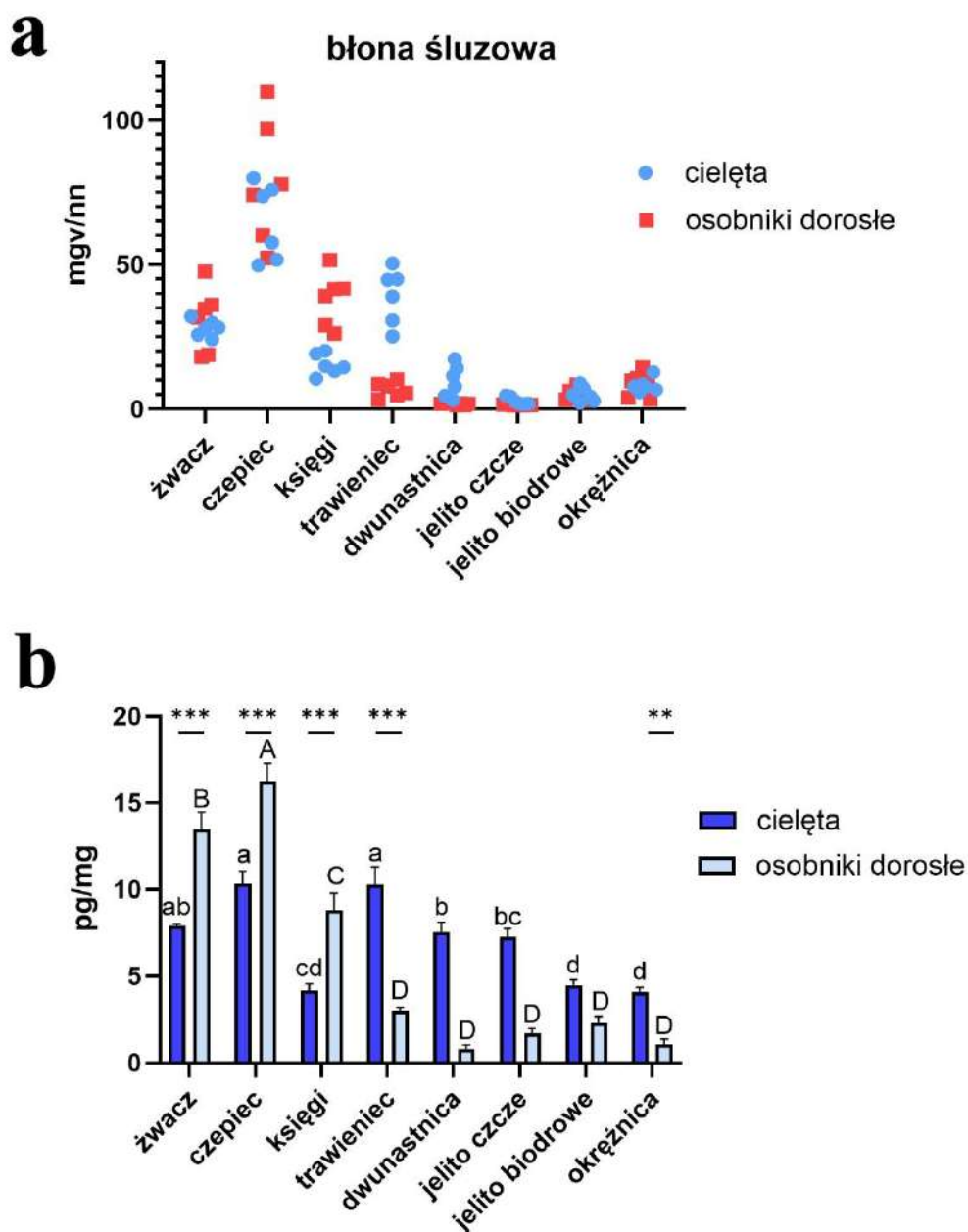
Analiza półilościowa wykazała wyższy poziom immunoreakcji na PNX-14 w przedżołądkach i trawieńcu w porównaniu z jelitem cienkim i jelitem grubym (Ryc. 13a). Najwyższy poziom badanej immunoreakcji stwierdzono w czepcu. Pomiedzy grupami wiekowymi istotne różnice w poziomie immunoreakcji stwierdzono jedynie w księgach, gdzie wartości były wyższe u osobników dorosłych oraz w trawieńcu, w którym wyższy poziom odnotowano u cieląt.



Rycina 11. Immunolokalizacja feniksyny-14 (PNX-14) w żwacz, czepcu, księgach i trawieńcu cieląt oraz osobników dorosłych bydła domowego. Czarna strzałka wskazuje reakcję immunohistochemiczną w komórce nabłonkowej. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 µm dla głównego obrazu i 15 µm dla powiększonego fragmentu.



Rycina 12. Immunolokalizacja feniksyny-14 (PNX-14) w dwunastnicy, jelicie czczym, jelicie biodrowym i okrężnicy cieląt oraz osobników dorosłych bydła domowego. Czarne strzałki wskazują reakcje immunohistochemiczne w komórkach nabłonkowych. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 µm dla głównego obrazu i 15 µm dla powiększonego fragmentu.



Rycina 13. Półilościowe oznaczenie immunoreakcji na feniksynę-14 (PNX-14) (a) oraz stężenia PNX-14 (b) w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych osobników samców bydła domowego. Poziom immunoreakcji wyrażono jako stosunek średniej wartości szarości (mgv) do liczby jąder komórkowych (nn). Niebieskimi kropkami oznaczono wartości u cieląt, czerwonymi kwadratami – u osobników dorosłych. Stężenie PNX-14 [pg/mg białka całkowitego] oznaczono testem immunoenzymatycznym (ELISA). Różne małe litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u cieląt, natomiast różne wielkie litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u osobników dorosłych ($p < 0,05$). Gwiazdki (*) oznaczają istotne różnice w poziomie immunoreakcji lub stężeniu PNX-14 pomiędzy cielętami i osobnikami dorosłymi w danym odcinku przewodu pokarmowego (***) dla $p < 0,001$).

Badanie ELISA wykazało, że stężenie PNX-14 nie przekraczało 20 pg/mg białka całkowitego. U cieląt najwyższe stężenie peptydu stwierdzono w czepcu i trawieńcu, natomiast w żwaczu było ono niższe, choć nieistotnie statystycznie (Ryc. 13b). W porównaniu z czepcem i trawieńcem istotnie niższe stężenia odnotowano w księgach,

dwunastnicy, jelicie czczym, biodrowym oraz okrężnicy, przy czym najniższe wartości stwierdzono w jelicie biodrowym i okrężnicy.

U osobników dorosłych najwyższe stężenie PNx-14 stwierdzono w czepcu, natomiast istotnie niższe wartości odnotowano kolejno w żwaczu i księgach (Ryc. 13b). W pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego stężenia PNx-14 były niższe i wzajemnie porównywalne statystycznie. Analiza porównawcza grup wiekowych wykazała wyższe stężenia PNx-14 u osobników dorosłych w żwaczu, czepcu i księgach ($p < 0,001$), natomiast u cieląt w trawieńcu, dwunastnicy, jelicie czczym ($p < 0,001$) oraz w okrężnicy ($p < 0,01$, Ryc. 13b).

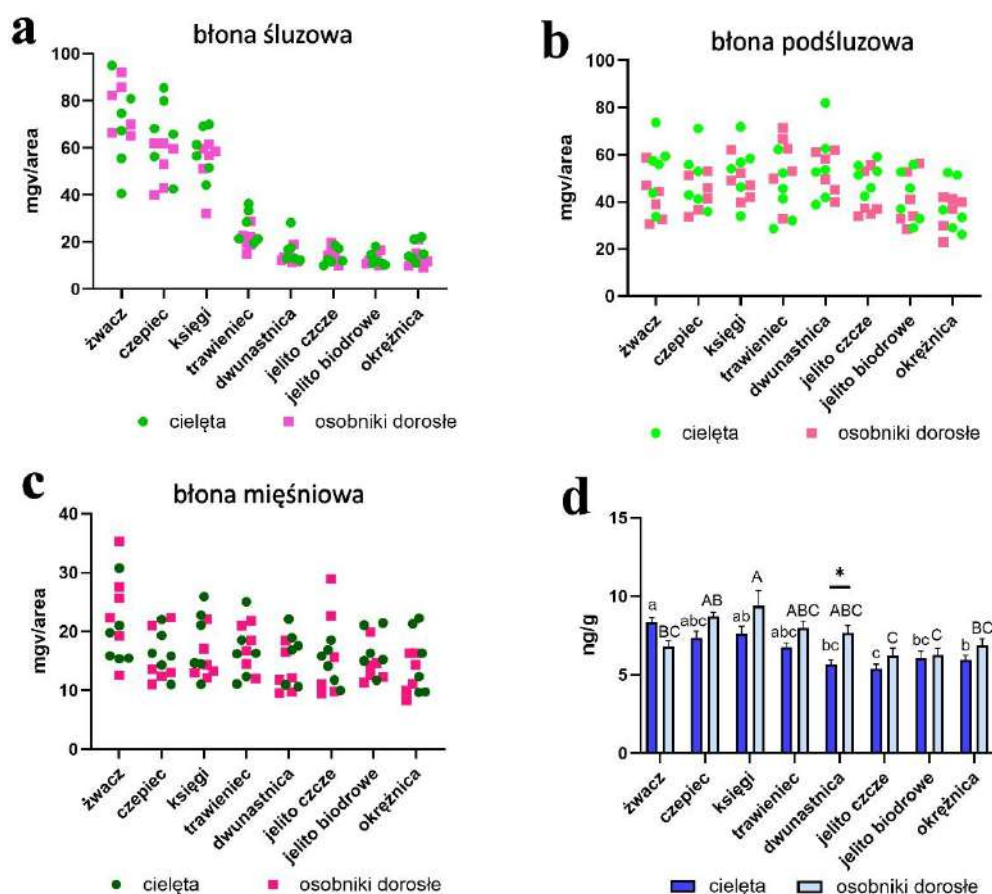
7.2.5. GPR173

Obecność GPR173 odnotowano we wszystkich warstwach wszystkich badanych odcinków przewodu pokarmowego obu grup wiekowych (Ryc. 14a-c). W błonie śluzowej przedżołądków obecność receptora stwierdzono w komórkach nabłonka, natomiast w trawieńcu w komórkach nabłonkowych gruczołów żołądkowych (Ryc. 15). W jelicie cienkim i okrężnicy immunoreakcję na GPR173 stwierdzono zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i w komórkach blaszki właściwej (Ryc. 16).

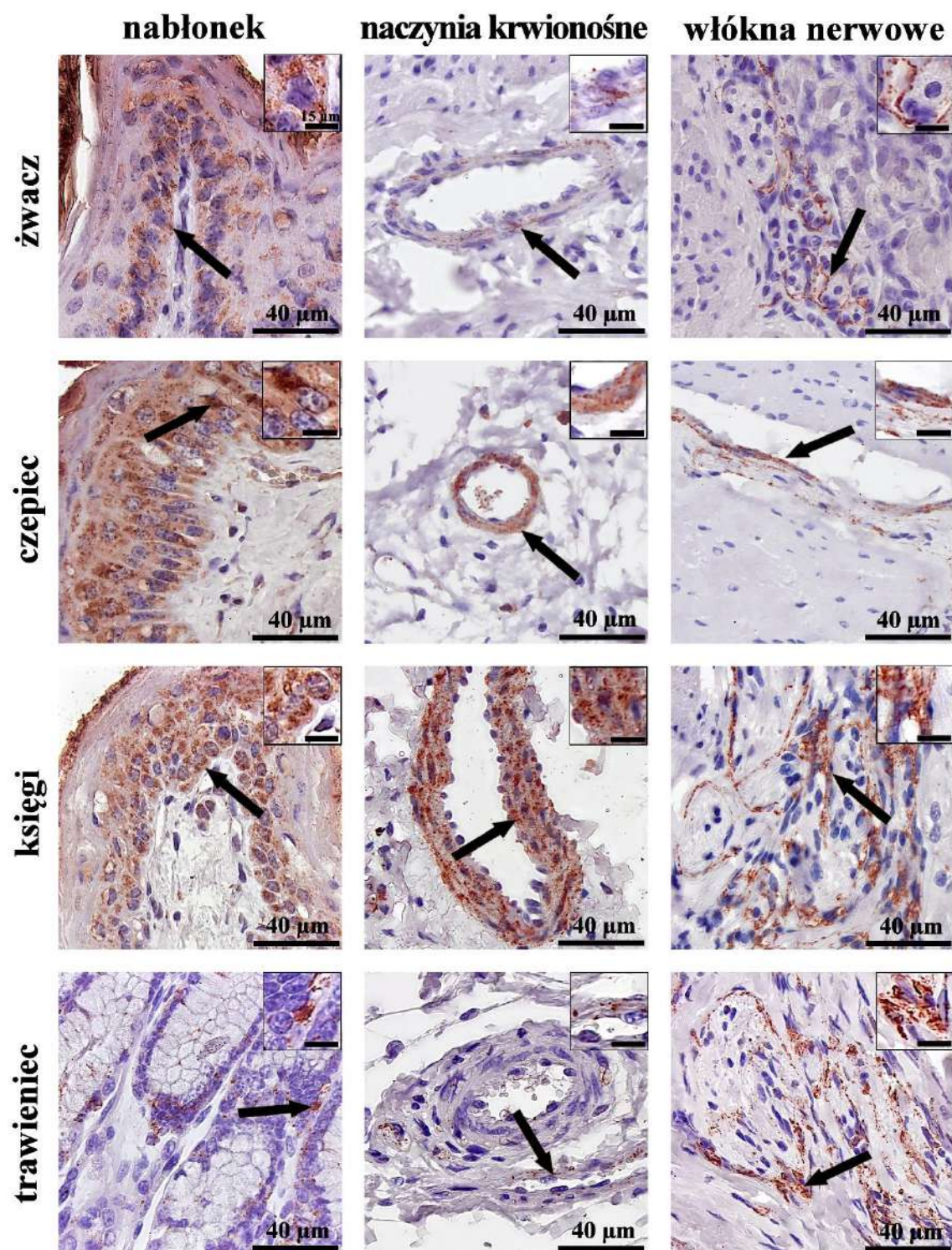
Analiza półilościowa wykazała najwyższy poziom immunoreakcji na GPR173 w błonie śluzowej przedżołądków, przy czym wartości te były porównywalne u cieląt i osobników dorosłych (Ryc. 14a). W błonie śluzowej pozostałych odcinków przewodu pokarmowego poziomy immunoreakcji były niższe i nie różniły się statystycznie pomiędzy oboma grupami wiekowym.

We wszystkich analizowanych odcinkach przewodu pokarmowego obecność GPR173 wykazano także w ścianach części naczyń krwionośnych. Ponadto w całym badanym przewodzie pokarmowym receptor GPR173 był obecny we włóknach nerwowych obu splotów ENS (Ryc. 15, Ryc. 16). Niemniej jednak włókna GPR173-ir nie miały jednolitego wzoru rozmieszczenia bowiem lokalizowano je zarówno wokół obu typów zwojów ENS jak i we włóknach biegnących w obrębie warstwy mięśniowej, podśluzowej i samej błonie śluzowej. Obecność GPR173 w ciałach neuronów ENS była zróżnicowana, od pojedynczych neuronów GPR173-ir w jelicie cienkim po liczne neurony GPR173-ir w okrężnicy.

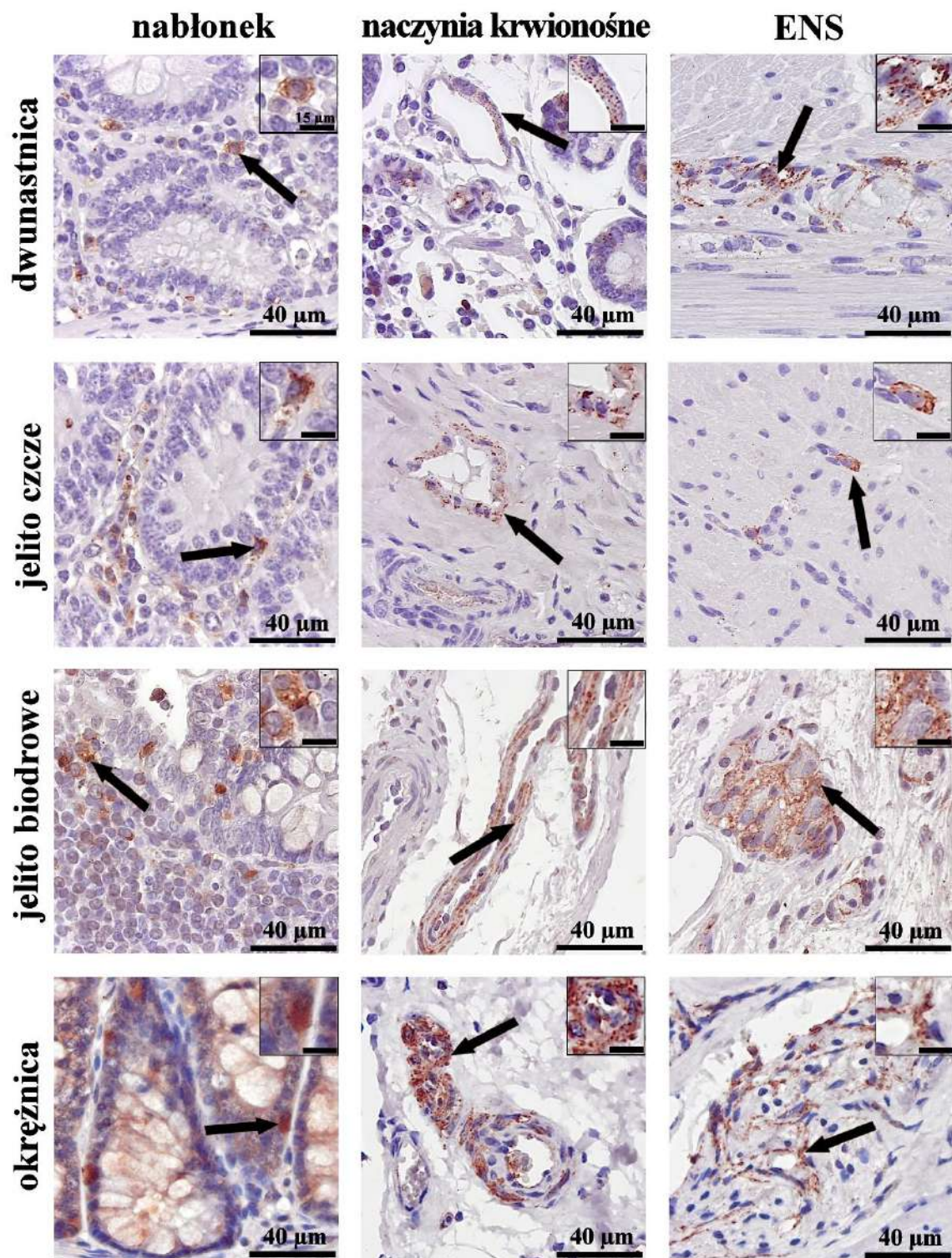
Analiza pólilościowa poziomu immunoreakcji na GPR173 w warstwie podśluzowej wykazała zbliżone wartości pomiędzy poszczególnymi odcinkami w obu grupach wiekowych (Ryc. 14b). Zarówno w trawieńcu, jak i w jelicie cienkim i grubym, poziomy immunoreakcji w błonie podśluzowej były wyższe niż w błonie śluzowej i błonie mięśniowej (Ryc. 14a-c). Podobnie jak w błonie podśluzowej, poziom immunoreakcji GPR173 w błonie mięśniowej również był porównywalny pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego w obu grupach wiekowych (Ryc. 14c).



Rycina 14. Półilościowe oznaczenie immunoreakcji na GPR173 w błonie śluzowej (a), błonie podśluzowej (b) i błonie mięśniowej (c) oraz stężenia GPR173 (d) w przewodzie pokarmowym cieląt i dorosłych osobników bydła domowego. Poziom immunoreakcji wyrażono jako stosunek średniej wartości szarości (mgv) do powierzchni badanego obszaru (area). Kropkami oznaczono wartości u cieląt, kwadratami u osobników dorosłych. Stężenie GPR173 [ng/g białka całkowitego] oznaczono testem immunoenzymatycznym (ELISA). Różne małe litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u cieląt, natomiast różne wielkie litery oznaczają istotne różnice pomiędzy odcinkami przewodu pokarmowego u osobników dorosłych ($p < 0,05$). Gwiazdki (*) oznaczają istotne różnice w poziomie immunoreakcji lub stężeniu PNX-14 pomiędzy cielętami i osobnikami dorosłymi w danym odcinku przewodu pokarmowego (* dla $p < 0,05$).



Rycina 15. Immunolokalizacja GPR173 w żwacz, czepcu, księgach i trawieńcu cieląt oraz dorosłego bydła domowego. Czarna strzałka wskazuje reakcję immunohistochemiczną w komórkach nabłonkowych, naczyniach krwionośnych i włóknach nerwowych. W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 μm dla głównego obrazu i 15 μm dla powiększonego fragmentu.



Rycina 16. Immunolokalizacja GPR173 w dwunastnicy, jelicie czczym, jelicie biodrowym i okrężnicy cieląt oraz dorosłego bydła domowego. Czarna strzałka wskazuje reakcję immunohistochemiczną w komórkach nabłonkowych, naczyniach krwionośnych oraz w jelitowym układzie nerwowym (ENS). W prawym górnym rogu – powiększony fragment z widoczną reakcją. Skala: 40 μm dla głównego obrazu i 15 μm dla powiększonego fragmentu.

Badanie testem ELISA wykazała, że stężenie GPR73 nie przekraczało 12 ng/g białka całkowitego. U cieląt najwyższe stężenie receptora stwierdzono w żwaczu, a nieco niższe (ale nie istotnie statystycznie) wartości odnotowano w czepcu, księgach i trawieńcu (Ryc. 14d). Z kolei dużo niższe stężenia stwierdzono w jelicie cienkim i grubym, przy minimum w jelicie czczym. U osobników dorosłych najwyższe stężenie GPR173 zaobserwowano w księgach, a następnie w czepcu, trawieńcu i dwunastnicy, przy czym różnice pomiędzy tymi odcinkami nie były statystycznie istotne. Pozostałe odcinki przewodu pokarmowego wykazywały niższe poziomy GPR173, przy czym najniższe wartości stwierdzono w jelicie czczym i biodrowym. Porównanie grup wiekowych wykazało istotnie wyższe stężenie GPR173 w dwunastnicy osobników dorosłych w porównaniu z cielętami ($p < 0,05$).

8. Dyskusja

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy trzy niezależne badania umożliwiły kompleksową ocenę ekspresji, lokalizacji i poziomu immunoreakcji wybranych peptydów oraz ich receptorów w przewodzie pokarmowym bydła domowego, z uwzględnieniem różnic wiekowych i narządowych.

Spośród badanych związków szczególne miejsce w regulacji funkcji przewodu pokarmowego zajmuje grelina. Pierwotne badania nad ekspresją *GHRL* sugerowały, że jej głównym źródłem jest żołądek (Kojima i in., 1999). Wzorec ten utrzymuje się od ponad 20 lat, a wyniki niniejszego badania potwierdzają te obserwacje, wykazując najwyższy poziom ekspresji w trawieńcu, a następnie dwunastnicy. Dane literaturowe dotyczące ekspresji greliny w przewodzie pokarmowym bydła domowego pozostają jednak bardzo ograniczone. W badaniu Hayashiego i wsp. (2020) oceniano poziom ekspresji greliny w przewodzie pokarmowym dorosłych krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej oraz 2-tygodniowych cieląt płci męskiej, porównując wartości między grupami wiekowymi. mRNA greliny wykryto we wszystkich analizowanych odcinkach przewodu pokarmowego: od żwacza do okrężnicy. Zarówno u dorosłych krów, jak i u cieląt najwyższy poziom ekspresji stwierdzono w trawieńcu (Hayashi i in., 2020). Ding i wsp. badali ekspresję greliny u jaków i bydła domowego (Ding i in., 2018). Spośród narządów przewodu pokarmowego analizie poddano jedynie trawieniec i dwunastnicę. W obu gatunkach wyższy poziom greliny obserwowano w trawieńcu (Ding i in., 2018). Ekspresję greliny w przewodzie pokarmowym analizowano również u reniferów, wykazując jej obecność we wszystkich badanych odcinkach – od przełyku do okrężnicy – z najwyższym poziomem w trawieńcu, następnie w przełyku i dwunastnicy (Zhang i in., 2018). Podobne wyniki uzyskano u owiec, gdzie mRNA greliny wykrywano we wszystkich komorach żołądka oraz w jelicie cienkim, przy czym najwyższa ekspresja występowała w trawieńcu, co wzmacnia wniosek o konserwatywnym charakterze miejsca syntezy u przeżuwaczy (Huang i in., 2006; Wang i in., 2014). Obserwacje te są zgodne także z wynikami badań prowadzonych u gatunków ssaków monogastrycznych, takich jak człowiek (Ueberberg i in., 2009), świnia (Dall’Aglio i in., 2013), mysz (Morash i in., 2010) czy kawia domowa (Okuhara i in., 2018).

Poziomy immunoreakcji oraz wartości stężeń greliny były spójne z wynikami ekspresji mRNA, osiągając najwyższe wartości w trawieńcu, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że głównym miejscem syntezy greliny

u przeżuwaczy jest trawieniec, w którym obserwowano najwyższe stężenia tego hormonu (Arne i in., 2021; Jonova i in., 2022). Odpowiada to także obserwacjom opisanym u innych gatunków (Date i in., 2000; Hayashida i in., 2001). Taka międzygatunkowa zgodność dodatkowo potwierdza ewolucyjną konserwację roli greliny w procesach fizjologicznych, zwłaszcza w regulacji apetytu, a także w potencjalnych lokalnych działaniach w obrębie żołądka lub innych odcinków przewodu pokarmowego (Kojima i Kangawa, 2005; Müller i in., 2015).

Zgodnie z doniesieniami Hayashida i wsp. (2002) stężenie greliny oraz ilość komórek grelino-ir są niskie w okresie płodowym, a następnie wzrastają wraz z wiekiem, co wskazuje na zależność stężenia greliny od etapu rozwojowego (Hayashida i in., 2002). Brak różnic pomiędzy cielętami a dorosłymi osobnikami w niniejszym badaniu może zatem sugerować, że docelowy poziom greliny ustala się jeszcze przed osiągnięciem pełnej dojrzałości, co mogłoby odzwierciedlać jej znaczenie w procesach niezwiązanych bezpośrednio z końcowym etapem rozwoju przewodu pokarmowego. Analiza ekspresji *GHRL* dodatkowo potwierdziła brak różnic między grupami wiekowymi, wzmacniając wniosek, iż produkcja greliny nie jest ściśle zależna od etapu dojrzewania przewodu pokarmowego.

Oprócz wysokiego poziomu immunoreakcji na grelinę w trawieńcu, w ENS żołądka i dwunastnicy obserwowano umiarkowaną immunoreakcję we włóknach otaczających ciała komórek nerwowych. Brak sygnału w ciałach neuronów przy jednoczesnej obecności immunoreaktywnych włókien nie przesądza o braku lokalnej syntezy badanego peptydu w obrębie ENS. Wzorzec ten może wynikać z szybkiego transportu peptydu z ciała neuronu do jego zakończeń, co skutkuje niską zawartością w ciałach neuronów, niewykrywalną przy zastosowanej metodzie IHC. Alternatywnie, dodatnie włókna mogą pochodzić z neuronów zlokalizowanych poza ścianą jelita, a sam sygnał w ciałach komórek nerwowych może być trudny do uchwycenia z powodu ograniczonej czułości techniki. Wyniki te różnią się od obserwacji u kawii domowej, gdzie obecność greliny wykazano bezpośrednio w ciałach neuronów spłotu warstwy mięśniowej (Xu i in., 2005). Różnice te mogą wynikać ze specyfiki gatunkowej lub z odmienności metodologicznych, co podkreśla potrzebę dalszych badań porównawczych. Interpretację wyników uzyskanych w niniejszym badaniu wspierają dane *in vivo*, które dowodzą, że dożylnie podanie greliny zmniejsza odruchową odpowiedź żołądka na rozciąganie, a efekt ten zanika po przecięciu nerwu błędnego. Ponadto wykazano, że grelina obniża aktywację neuronów zwoju dalszego nerwu błędnego, będącego głównym

ośrodkiem aferentnych włókien czuciowych żołądka (Meleine i in., 2020). Co istotne, dane przedstawione w przeglądzie Perelló i wsp. (2022) wskazują, że receptor greliny (GHSR) występuje w neuronach czuciowych nerwu błędnego unerwiających żołądek. Wyniki te stanowią uzasadnienie dla hipotezy, że grelina obecna we włóknach nerwowych może modulować aktywność aferentnych dróg błędnych, a tym samym uczestniczyć w komunikacji jelitowo-mózgowej, wykraczającej poza jej klasyczne funkcje endokrynne (Perelló i in., 2022).

W niniejszym badaniu immunoreakcję na grelinę stwierdzono również w komórkach nabłonka płaskiego przedżołądków. Ponieważ w błonie śluzowej tych odcinków nie wykazano obecności receptora GHSR, a sygnał ograniczał się jedynie do struktur ENS, można przypuszczać, że grelina pełni tam przede wszystkim funkcję czynnika systemowego (po przeniknięciu do naczyń krwionośnych) bądź działa pośrednio poprzez sieci nerwowe, zamiast wywierać bezpośrednie efekty miejscowe na nabłonek. W żwaczu receptor nie był wykrywalny, natomiast w pozostałych przedżołądkach jego obecność ograniczała się do ENS, co wskazuje na neuronalny charakter przekazywania sygnału w tych odcinkach. Odmienny obraz uzyskano w jelitach, gdzie obecność GHSR wykazano zarówno w błonie śluzowej, jak i w strukturach ENS, co sugeruje podwójny mechanizm działania: lokalną odpowiedź tkankową oraz udział w sygnalizacji nerwowej. Należy jednak podkreślić, że wyniki te różnią się od wyników uzyskanych przez Karakoç i wsp. (2022), którzy opisali obecność greliny w błonie mięśniowej trawieńca. Rozbieżności te mogą wynikać z odmienności metodologicznych lub sposobu przygotowania materiału badawczego i wymagają dalszej weryfikacji (Karakoç i in., 2022).

Biologiczne działanie greliny zależy między innymi od rozmieszczenia i poziomu ekspresji jej receptora (GHSR). Doniesienia dotyczące lokalizacji GHSR u bydła są nieliczne i dotyczą głównie trawieńca. W pracy Karakoç i wsp. (2022) wykazano sygnał receptora w komórkach nabłonkowych, w tym okładzinowych, natomiast analiza nie obejmowała struktur ENS (Karakoç i in., 2022). W niniejszych analizach względnie silniejszą immunoreakcję obserwowano natomiast w obrębie ENS niż w błonie śluzowej, co może wskazywać, że w badanych odcinkach przekazywanie sygnału grelinowego ma przede wszystkim charakter neuronalny.

U człowieka Ueberberg i wsp. (2009) wykazali obecność mRNA GHSR w żołądku oraz w mniejszym stopniu w jelicie biodrowym, natomiast nie w okrężnicy, co różni się od obserwacji przedstawionych w niniejszej pracy (Ueberberg i in., 2009). Badania prowadzone u młodych świń tybetańskich oraz rasy Yorkshire wykazały ekspresję mRNA *GHSR* we

wszystkich badanych odcinkach przewodu pokarmowego, tj. w żołądku, jelicie cienkim, jelicie ślepym i okrężnicy, przy czym najwyższe poziomy odnotowano w dwunastnicy i jelicie czczym (Sun i in., 2019). Ekspresję *GHSR* analizowano również u szczura i kawii domowej – u szczura mRNA obecne było w żołądku, jelicie cienkim i grubym, z najwyższym poziomem w żołądku, natomiast u kawii domowej nie stwierdzono jego obecności (Kitazawa i in., 2011).

Porównanie wyników qPCR i ELISA wskazało na brak pełnej zgodności między poziomem mRNA a ilością białka *GHSR*: najwyższa ekspresja transkryptu występowała w księgach cieląt, podczas gdy białko dominowało w dwunastnicy, zwłaszcza u młodych osobników. Co więcej, peptydu nie wykryto w żwaczu, podczas gdy badanie qPCR wykazało obecność mRNA *GHSR* w tym odcinku. Podobne rozbieżności opisywano w literaturze i tłumaczono je mechanizmami regulacji posttranskrypcyjnej oraz translacyjnej, które mogą prowadzić do słabej korelacji między poziomem mRNA a ilością białka (Liu i in., 2016; Vogel i Marcotte, 2012).

W kontekście uzyskanych wyników dotyczących greliny i jej receptora, szczególnie interesującym peptydem pozostaje nesfatyna-1, której funkcje w przewodzie pokarmowym bydła nie zostały jeszcze zbadane. Dotychczas u bydła nesfatynę-1 oznaczano wyłącznie w osoczu (Aydin, 2013; Morton i in., 2018), dlatego niniejsze badanie dostarcza pierwszych danych dotyczących jej dystrybucji narządowej u tego gatunku. Zgodnie z dostępnymi doniesieniami, zestawionymi m.in. w pracy przeglądowej (Kras i in., 2022), peptyd ten może pełnić funkcję ochronną w zaburzeniach przewodu pokarmowego. Obecność *NUCB2* wykazano wcześniej w żołądku i jelitach gryzoni oraz psów, przy czym ekspresja była zwykle wyższa w żołądku niż w jelitach (Kras i in., 2022; Prinz i Stengel, 2016).

W niniejszym badaniu wykazano obecność zarówno mRNA, jak i samego peptydu nesfatyny-1 we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego cieląt oraz dorosłych osobników bydła domowego. Immunoreaktywność w komórkach nabłonkowych przedżołądków, szczególnie w warstwach przylegających do światła, sugeruje potencjalną lokalną rolę tego peptydu. Warto podkreślić, że nabłonek żwacza charakteryzuje się dużą aktywnością metaboliczną oraz ekspresją genów związanych z odpowiedzią immunologiczną (Fregulia i in., 2021), dlatego obecność nesfatyny-1 w tym rejonie może odzwierciedlać jej udział w regulacji procesów metabolicznych lub immunomodulacyjnych. Możliwość taką potwierdzają badania w modelach gryzoni, w których podanie nesfatyny-1 przy wrzodach żołądka ograniczało nacieki leukocytarne oraz stężenie cytokin prozapalnych

(Kolgazi i in., 2017), a także obserwacje w innych narządach, gdzie wykazywała ona działanie przeciwzapalne (Cheng i in., 2022; Meng i in., 2022). Z kolei w niektórych stanach patologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, opisano jej aktywność prozapalną (Chang i in., 2023), co sugeruje, że właściwości immunoregulacyjne nesfatyny-1 mogą być zależne od kontekstu tkankowego. Wysoki poziom immunoreakcji tego peptydu w obrębie ENS wspiera hipotezę o jego udziale w regulacji czynności przewodu pokarmowego. Brak jednoznacznie zidentyfikowanego receptora dla nesfatyny-1 znacząco ogranicza możliwość pełnego zrozumienia mechanizmów jej działania. Istnieją sugestie, że jej efekty mogą być realizowane przez alternatywne szlaki sygnalizacyjne lub parakryne, co wymaga dalszych badań.

Stężenie nesfatyny-1 było zbliżone pomiędzy poszczególnymi narządami przewodu pokarmowego w obrębie każdej grupy wiekowej, natomiast zaobserwowano wyraźnie wyższe wartości u cieląt w porównaniu z osobnikami dorosłymi. Różnice te mogą wynikać z odmienności fizjologicznych związanych z dietą i dojrzewaniem przewodu pokarmowego, a także z procesów rozwojowych, w tym osiągania dojrzałości płciowej (Ranjan i in., 2019).

W przypadku nesfatyny-1, podobnie jak w odniesieniu do GHSR, stwierdzono rozbieżność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA a ilością białka. W jelicie biodrowym wyższy poziom ekspresji *NUCB2* mRNA obserwowano u osobników dorosłych, natomiast stężenie peptydu było większe u cieląt, co ponownie sugeruje możliwość regulacji posttranskrypcyjnej.

Najwyższe stężenia nesfatyny-1 odnotowano w trawieńcu, co częściowo odpowiada profilowi ekspresji greliny i może sugerować ich funkcjonalne powiązania, choć mechanizmy tej zależności pozostają niejasne (Chen i in., 2022). Również analiza IHC wykazała zbliżony wzór lokalizacji obu peptydów.

Interesującą obserwacją jest przewaga stężenia nesfatyny-1 w stosunku do greliny i GHSR, mimo że zwierzęta znajdowały się w stanie głodzenia. Nesfatyna-1 jest znana jako peptyd anoreksygenny o działaniu ośrodkowym, przeciwnym do działania greliny (Chen i in., 2022). Jednak jej obwodowe wydzielanie może pełnić odmienne funkcje, co może tłumaczyć, dlaczego stężenie tego peptydu w przewodzie pokarmowym nie musi obniżać się w warunkach głodzenia.

Kolejnym anoreksygennym hormonem istotnym w regulacji homeostazy energetycznej jest leptyna. Jej rola w przewodzie pokarmowym bydląt pozostaje nie w pełni poznana, ponieważ dotychczasowe wyniki badań są niejednoznaczne. Chelikani i wsp. (2003) nie wykryli mRNA *LEP* w przewodzie pokarmowym cieląt (Chelikani i in., 2003),

przy czym należy zaznaczyć, że analiza produktów PCR została przeprowadzona metodą półilościową na żelu agarozowym, podczas gdy w niniejszej pracy zastosowano qPCR w czasie rzeczywistym. Z kolei Hayashi i wsp. (2020) stwierdzili ekspresję mRNA *LEP* we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego u cieląt przed odstawieniem, natomiast u dorosłych poziomy były minimalne (Hayashi i in., 2020). Różnice te mogą wynikać z odmienności wieku i płci zwierząt objętych badaniem. Podobnie w badaniu Yonekura i wsp. (2002) ekspresję genu wykazano w żwaczu, trawieńcu i dwunastnicy jedynie u najmłodszych cieląt, podczas gdy u starszych osobników obecność *LEP* ograniczała się do dwunastnicy, a u cieląt karmionych preparatem mleko zastępczym obejmowała dodatkowo żwacz i trawieniec (Yonekura i in., 2002). Z kolei w pracy Alam i wsp. (2012) nie stwierdzono ekspresji *LEP* w dwunastnicy krów mlecznych (Alam i in., 2012). Różnice pomiędzy wynikami wcześniejszych badań a wynikami uzyskanymi w niniejszym eksperymencie mogą wynikać nie tylko z różnic metodologicznych, ale także z wpływu czynników takich jak płeć, wiek, status hormonalny, rasa, dieta lub warunki środowiskowe zwierząt.

W niniejszym badaniu *LEP* był obecny we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego, również u dorosłych osobników. Brak ekspresji *LEP* opisywany w niektórych wcześniejszych badaniach wydaje się zaskakujący, zwłaszcza że obecność leptyny w przewodzie pokarmowym bydła potwierdzono wcześniej (Hayashi i in., 2020), a ekspresję mRNA *LEP* udokumentowano również w żołądku szczurów (Bado i in., 1998) i ludzi (Mix i in., 2000). Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki wskazują ponadto, że poziom ekspresji *LEP* w czepcu cieląt był wyższy niż u dorosłych, co może być związane z intensywnymi procesami rozwojowymi zachodzącymi w tym przedżołądku. Z kolei w jelicie czczym i biodrowym dorosłych osobników odnotowano wyższą ekspresję *LEP* niż u cieląt, co sugeruje, że leptyna może uczestniczyć w procesach związanych z absorpcją składników odżywczych.

Ekspresję genu receptora leptyny (*LEPR*) potwierdzono u bydła m.in. w trawieńcu, dwunastnicy, jelicie czczym i biodrowym (Chelikani i in., 2003), choć inne badania nie zawsze wykazywały obecność jego transkryptu w obrębie przewodu pokarmowego tego gatunku (Alam i in., 2012). Obecność mRNA *LEPR* wykazano także u człowieka, w żołądku (Mix i in., 2000) oraz u myszy, w żołądku i jelitach (Morton i in., 1998).

Uzyskane wyniki wskazują, że wzorzec ekspresji genu leptyny jest zbieżny z ekspresją jej receptora, co sugeruje możliwość regulacji *LEPR* przez ligand i pełnienia swoistych funkcji w przewodzie pokarmowym. Wykazano, że u innych gatunków leptyna

moduluje absorpcję makroskładników oraz wpływa na motorykę przewodu pokarmowego (Yarandi i in., 2011). W tym kontekście podwyższona ekspresja *LEP* i *LEPR* u dorosłych osobników w odcinkach odpowiedzialnych za absorpcję składników pokarmowych może odzwierciedlać udział leptyny w regulacji tego procesu. Z kolei wyższy poziom ekspresji *LEP* i *LEPR* w czepcu cieląt sugeruje rolę leptyny w rozwoju tego przedżołądka.

Wśród peptydów regulujących pobieranie pokarmu oraz funkcje przewodu pokarmowego szczególną uwagę zwraca PNx-14, której ekspresję, lokalizację i stężenie w narządach przewodu pokarmowego po raz pierwszy opisano u bydła w ramach niniejszego badania. Ekspresja mRNA *SMIM20* osiągała najwyższe wartości w początkowych odcinkach przewodu pokarmowego i stopniowo malała w jego dalszych segmentach, co znalazło potwierdzenie w analizie stężenia białka. Analiza ELISA wykazała wyższe stężenia PNx-14 u cieląt w większości odcinków przewodu pokarmowego, z wyjątkiem żwacza, czepca i ksiąg, gdzie większe poziomy obserwowano u dorosłych. Wzorec ten może być związany z ograniczoną aktywnością przedżołądków u młodych zwierząt, rozwijających swoje funkcje dopiero wraz z wprowadzaniem paszy stałej. Sugeruje to, że PNx-14 może uczestniczyć w procesach adaptacyjnych i dojrzewaniu funkcjonalnym przewodu pokarmowego cieląt (Valassi i in., 2008). U osobników dorosłych natomiast wyższe poziomy PNx-14 w przedżołądkach mogą wiązać się z udziałem w procesach fermentacyjnych oraz regulacji integralności błony śluzowej, co znajduje pewne oparcie w obserwacjach wskazujących na działanie ochronne egzogennej PNx-14 w stresie przewodu pokarmowego u szczurów (Zandeh-Rahimi i in., 2022). Ponieważ jednak endogenne poziomy PNx-14 u bydła były stosunkowo niskie, znaczenie tego efektu w warunkach fizjologicznych pozostaje niejasne.

Najwyższe stężenia PNx-14 w niniejszym badaniu odnotowano w trawieńcu oraz jelitach cieląt, co może wskazywać na jej rolę w wczesnym rozwoju przewodu pokarmowego (Pisoni i Relling, 2020). Obecność PNx-14 w przewodzie pokarmowym innych gatunków, m.in. szczurów i myszy, gdzie lokalizowano ją w żołądku i jelicie cienkim (Mukherjee i Unniappan, 2021; Prinz i in., 2017; Yosten i in., 2013), potwierdza możliwość pełnienia lokalnych funkcji. Warto jednak zaznaczyć, że poziom immunoreakcji na PNx-14 w niniejszym badaniu był ograniczony – w błonie śluzowej wszystkich badanych odcinków wykrywano jedynie pojedyncze komórki PNx-14-ir (około 1 komórka PNx-14-ir na 100). Choć może to sugerować niewielkie znaczenie fizjologiczne, nie można wykluczyć, że nawet niskie poziomy PNx-14 wywierają istotny efekt biologiczny, podobnie jak inne

czynniki o niskiej koncentracji, np. cytokiny (Tomaszewska i in., 2023). Możliwe jest również, że wydzielanie PNX-14 jest warunkowo regulowane, np. przez stres czy stan zapalny (Friedrich i Stengel, 2023; Zandeh-Rahimi i in., 2022).

Obecność PNX-14 w gruczołach jelitowych oraz w blaszce właściwej okrężnicy sugeruje jej potencjalny udział w funkcjach immunologicznych, co potwierdza lokalizacja w obszarach bogatych w komórki odpornościowe (Montalban-Arques i in., 2018). Gatunkowo specyficzne różnice w immunoreakcji na PNX-14 – takie jak brak sygnału w żołądku szczura (Prinz i in., 2017) czy obecność w nabłonku u myszy (Mukherjee i Unniappan, 2021) – wskazują, że jej rola w przewodzie pokarmowym może być zróżnicowana między gatunkami, co podkreśla potrzebę dalszych badań porównawczych.

Wyniki analizy IHC dla GPR173 wykazały jego obecność we włóknach nerwowych splotów podśluzowych i warstwy mięśniowej, a także w pojedynczych neuronach w jelicie cienkim i grubym. Takie rozmieszczenie odpowiada znanym funkcjom receptorów GPCR w ENS, gdzie uczestniczą one w regulacji motoryki i wydzielania jelitowego (Weinberg i Puthenveedu, 2019). Obecność GPR173 stwierdzono również w komórkach nabłonkowych, naczyniach krwionośnych oraz prawdopodobnie w komórkach odpornościowych blaszki właściwej, co może wskazywać na jego szersze funkcje, niezwiązane bezpośrednio z PNX-14.

Istotnie wyższy poziom ekspresji GPR173 w porównaniu z PNX-14 sugeruje, że receptor ten może oddziaływać także z innymi ligandami, co pozostaje kwestią otwartą. He i wsp. (2023) zaproponowali, że GPR173 może być potencjalnym receptorem cholecystokininy (CCK) (He i in., 2023), jednak najnowsze dane podają tę hipotezę w wątpliwość (Guerra i in., 2024.).

Różnice wiekowe w ekspresji *GPR173*, np. wyższe poziomy w dwunastnicy osobników dorosłych, mogą odzwierciedlać adaptacje fizjologiczne do zmieniających się wymagań metabolicznych. Lokalizacja receptora w ENS oraz w błonie śluzowej wspiera hipotezę, że może pełnić rolę w integracji sygnałów metabolicznych i immunologicznych w obrębie przewodu pokarmowego. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami dotyczącymi udziału receptorów GPCR w regulacji osi jelito-układ odpornościowy-mózg (Aleti i in., 2023).

Obserwacje przeprowadzone w niniejszym badaniu wskazują, że PNX-14 i GPR173 są stale obecne w przewodzie pokarmowym bydła, co sugeruje ich potencjalne znaczenie

obwodowe, odmienne od ośrodkowego, oreksygenne działanie PNx-14. Wyniki te są zgodne z doniesieniami Schalla i wsp., którzy wykazali, że PNx-14 nie przenika bariery krew–mózg *in vitro*, co dodatkowo przemawia za jej rolą lokalną (Schalla i in., 2023).

Trudności w uzyskaniu efektu oreksygenne po podaniu dootrzewnowym (Schalla i in., 2017; Schalla i Stengel, 2018), przy jednoczesnej zdolności PNx-14 do stymulacji wydzielania insuliny (Billert i in., 2020), wskazują na jej potencjalny udział w regulacji procesów metabolicznych, zwłaszcza w utrzymaniu homeostazy glukozy. Ponadto doniesienia, że PNx-14 może modulować ekspresję greliny w żołądku (Mukherjee i Unniappan, 2021) oraz wpływać na pobór pokarmu w sposób zależny od rytmu dobowego (Schalla i in., 2017), sugerują istnienie interakcji z innymi peptydami regulacyjnymi.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały zróżnicowane wzorce ekspresji mRNA i lokalizacji analizowanych peptydów oraz ich receptorów w przewodzie pokarmowym bydła, zarówno w kontekście wiekowym, jak i narządowym. Obserwowane różnice mogą odzwierciedlać odmienne funkcje fizjologiczne oraz adaptacyjne w trakcie rozwoju układu pokarmowego. Uzyskane dane stanowią podstawę do dalszych badań nad rolą lokalnych szlaków neuropeptydowych w regulacji czynności trawiennych i metabolicznych u przeżuwaczy.

9. Wnioski

1. Transkrypty genów kodujących białko prekursorowe greliny, GHSR, białko prekursorowe nesfatyny-1, białko prekursorowe leptyny, LEPR, białko prekursorowe PNX-14 oraz GPR173 (*GHRL*, *GHSR*, *NUCB2*, *LEP*, *LEPR*, *SMIM20*, *GPR173*) są obecne w żwaczu, czepcu, księgach, trawieńcu, dwunastnicy, jelicie czczym, jelicie biodrowym, okrężnicy oraz odbytnicy cieląt i osobników dorosłych bydła domowego.
2. Poziomy ekspresji *GHRL*, *GHSR*, *NUCB2*, *LEP*, *LEPR*, *SMIM20* oraz *GPR173* są zależne zarówno od wieku zwierząt, jak i od odcinka przewodu pokarmowego bydła domowego.
3. Grelina, nesfatyna-1, PNX-14 oraz receptor GPR173 występują w ścianach narządów przewodu pokarmowego (od żwacza po okrężnicę) cieląt i osobników dorosłych bydła domowego. Receptor GHSR występuje w ścianie przewodu pokarmowego obu grup wiekowych (od czepca do okrężnicy), ale nie w żwaczu.
4. Schemat rozmieszczenia badanych związków biologicznie aktywnych w ścianie przewodu pokarmowego różni się w zależności od odcinka przewodu pokarmowego, ale jest niezależny od wieku bydła domowego. Z kolei poziomy immunoreakcji na poszczególne związki różnią się zarówno w zależności od wieku, jak i od narządu bydła domowego.
5. Stężenia badanych związków różnią się zarówno w zależności od odcinka przewodu pokarmowego, jak i wieku bydła domowego.

10. Bibliografia

1. Akalu, Y., Molla, M. D., Dessie, G. i Ayelign, B. (2020). Physiological Effect of Ghrelin on Body Systems. *International Journal of Endocrinology*, 2020, 1385138. <https://doi.org/10.1155/2020/1385138>
2. Alam, T., Kenny, D. A., Sweeney, T., Buckley, F., Prendiville, R., McGee, M. i Waters, S. M. (2012). Expression of genes involved in energy homeostasis in the duodenum and liver of Holstein-Friesian and Jersey cows and their F1 hybrid. *Physiological Genomics*, 44(2), 198–209. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00102.2011>
3. Aleti, G., Troyer, E. A. i Hong, S. (2023). G protein-coupled receptors: A target for microbial metabolites and a mechanistic link to microbiome-immune-brain interactions. *Brain, Behavior, and Immunity - Health*, 32, 100671. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100671>
4. Arne, A., Ilgaza, A. i Kalnina, L. A. (2021). Ghrelin Immunoreactive Cell Amounts in the Abomasum in 4-Month-Old Calves by Feeding Different Amounts of Prebiotics and New Synbiotics. *Veterinary Medicine International*, 2021, 5542372. <https://doi.org/10.1155/2021/5542372>
5. Ayada, C., Toru, Ü. i Korkut, Y. (2015). Nesfatin-1 and its effects on different systems. *Hippokratia*, 19(1), 4.
6. Aydin, S. (2013). Presence of adropin, nesfatin-1, apelin-12, ghrelins and salusins peptides in the milk, cheese whey and plasma of dairy cows. *Peptides*, 43, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.02.014>
7. Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.-P., Bortoluzzi, M.-N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. i Lewin, M. J. M. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394(6695), 790–793. <https://doi.org/10.1038/29547>
8. Belli, A. L., Coelho, S. G., Campolina, J. P., Neves, L. F. M., Neto, H. C. D., Silva, C. S., Machado, F. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Carvalho, W. A., Costa, S. de F. i M. Campos, M. (2024). Effects of Supplementing Milk Replacer with Sodium Butyrate on Dairy Calves. *Animals*, 14(2), 277. <https://doi.org/10.3390/ani14020277>
9. Billert, M., Rak, A., Nowak, K. W. i Skrzypski, M. (2020). Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8378. <https://doi.org/10.3390/ijms21218378>

10. Buzcu, H., Yüksel, M., Kırmızıkan, S., Çikler, E. i Karakoyun, B. (2025). Phoenixin-14 ameliorates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms. *Peptides*, 192, 171431. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2025.171431>
11. Can, U., Akdu, S. i Şahinoğlu, S. (2024). The Levels of Phoenixin-14 and Phoenixin-20 in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders Drug Targets*, 24(11), 1315–1322. <https://doi.org/10.2174/0118715303267256231210060250>
12. Castells, L., Bach, A., Araujo, G., Montoro, C. i Terré, M. (2012). Effect of different forage sources on performance and feeding behavior of Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 286–293. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4405>
13. Chang, J.-W., Liu, S.-C., Lin, Y.-Y., He, X.-Y., Wu, Y.-S., Su, C.-M., Tsai, C.-H., Chen, H.-T., Fong, Y.-C., Hu, S.-L., Huang, C.-C. i Tang, C.-H. (2023). Nesfatin-1 Stimulates CCL2-dependent Monocyte Migration And M1 Macrophage Polarization: Implications For Rheumatoid Arthritis Therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 19(1), 281–293. <https://doi.org/10.7150/ijbs.77987>
14. Chelikani, P. K., Glimm, D. R. i Kennelly, J. J. (2003). Short Communication: Tissue Distribution of Leptin and Leptin Receptor mRNA in the Bovine. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2369–2372. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73830-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73830-2)
15. Chen, X., Dong, J., Jiao, Q., Du, X., Bi, M. i Jiang, H. (2022). “Sibling” battle or harmony: Crosstalk between nesfatin-1 and ghrelin. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 79(3), 169. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04193-6>
16. Cheng, H., Zhu, Y., Chen, L. i Wang, Y. (2022). Nesfatin-1 alleviated lipopolysaccharide-induced acute lung injury through regulating inflammatory response associated with macrophages modulation. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 17(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13019-022-01952-1>
17. Cifuentes, L. i Acosta, A. (2022). Homeostatic regulation of food intake. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 46(2), 101794. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101794>
18. Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J. i Bauer, T. L., i Caro, J. F. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*, 334(5), 292–295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>

19. Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., Cone, R.D. i Horvath, T. L. (2003). The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649–661. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1)
20. Crowe, A. R. i Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis. *Bio-protocol*, 9(24), e3465. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3465>
21. Dall’Aglia, C., Zannoni, A., Forni, M., Bacci, M. L., Ceccarelli, P. i Boiti, C. (2013). Orexin system expression in the gastrointestinal tract of pigs. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.001>
22. Das, M., Santra, S., Lalsangi, S. B., Khamaru, D., Chakraborty, A., Jayaseelan, P. i Banerjee, R. (2025). Microbiota of Livestock. W D. Lahiri, M. Nag, D. Bhattacharya i R. R. Ray (Red.), *Biofilm Associated Livestock Diseases and their Management* (s. 513–550). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-96-1885-9_22
23. Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K. i Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141(11), 4255–4261. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7757>
24. Deaver, S. E., Hoyer, P. B., Dial, S. M., Field, M. E., Collier, R. J. i Rhoads, M. L. (2013). Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 150–157. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5506>
25. Delporte, C. (2013). Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica*, 2013, 518909. <https://doi.org/10.1155/2013/518909>
26. Diao, Q., Zhang, R. i Fu, T. (2019). Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals*, 9(8), 490. <https://doi.org/10.3390/ani9080490>
27. Ding, Y., Zhang, N., Li, J., Jin, Y. i Shao, B. (2018). Molecular cloning and expression of ghrelin in the hypothalamus-pituitary-gastrointestinal tract axis of the Yak (*Bos grunniens*) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 47(6), 583–590. <https://doi.org/10.1111/ahe.12400>

28. Dore, R., Levata, L., Lehnert, H. i Schulz, C. (2017). Nesfatin-1: Functions and physiology of a novel regulatory peptide. *The Journal of Endocrinology*, 232(1), R45–R65. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0361>
29. Du, W., Xu, W., Hu, Y., Zhao, S., Li, F., Song, D., Shen, J. i Xu, Q. (2025). Editorial: Crosslinking of feed nutrients, microbiome and production in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1610490>
30. Enríquez, D., Hötzel, M. J. i Ungerfeld, R. (2011). Minimising the stress of weaning of beef calves: A review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-28>
31. Fisher, L. i Fisher, A. (2024). *Integrative Review of Ghrelin Family Peptides, Musculoskeletal Health and Osteoporotic Fractures*. Cambridge Scholars Publishing.
32. Fregulia, P., Neves, A. L. A., Dias, R. J. P. i Campos, M. M. (2021). A review of rumen parameters in bovines with divergent feed efficiencies: What do these parameters tell us about improving animal productivity and sustainability? *Livestock Science*, 254, 104761. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104761>
33. Friedman, J. M. i Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763–770. <https://doi.org/10.1038/27376>
34. Friedrich, T. i Stengel, A. (2021). Role of the Novel Peptide Phoenixin in Stress Response and Possible Interactions with Nesfatin-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9156. <https://doi.org/10.3390/ijms22179156>
35. Gelsinger, S. L., Coblenz, W. K., Zanton, G. I., Ogden, R. K. i Akins, M. S. (2020). Physiological effects of starter-induced ruminal acidosis in calves before, during, and after weaning. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2762–2772. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17494>
36. Gershon, M. D. i Margolis, K. G. (2021). The gut, its microbiome, and the brain: Connections and communications. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(18), e143768. <https://doi.org/10.1172/JCI143768>
37. Goebel-Stengel, M., Wang, L., Stengel, A. i Taché, Y. (2011). Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research*, 1396, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.031>
38. Gonkowski, S. (2021). Aquaporins in the nervous structures supplying the digestive organs – a review. *Annals of Animal Science*, 21(1), 47–61. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0060>

39. Govil, K., Yadav, D., Patil, A., Nayak, S., Baghel, R., Yadav, P., Malapure, C. i Thakur, D. (2017). Feeding management for early rumen development in calves. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1132–1139.
40. Guerra, L., Escudero-Castelan, N. i Elphick, M. (2024). *CCK-type neuropeptides do not act as ligands for GPR173-type receptors (SREBs): The importance of an evolutionary approach to receptor deorphanisation*. Pobrano 6 października 2024, z <https://www.authorea.com/doi/full/10.22541/au.172459605.58731804/v1?commit=6ac025ff73617c6f03359ecd8170b0a5a9107a20>
41. Guilloteau, P., Zabielski, R. i Blum, J. W. (2009). Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: Ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 3, 37–46.
42. Guo, L., Yao, J. i Cao, Y. (2021). Regulation of pancreatic exocrine in ruminants and the related mechanism: The signal transduction and more. *Animal Nutrition*, 7(4), 1145–1151. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.004>
43. Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., Witcher, D. R., Luo, S., Onyia, J. E. i Hale, J. E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6320–6325. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800708105>
44. Hayashi, H., Yamakado, M., Yamaguchi, M. i Kozakai, T. (2020). Leptin and ghrelin expressions in the gastrointestinal tracts of calves and cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 82(4), 475–478. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0680>
45. Hayashida, T., Murakami, K., Mogi, K., Nishihara, M., Nakazato, M., Mondal, M. S., Horii, Y., Kojima, M., Kangawa, K. i Murakami, N. (2001). Ghrelin in domestic animals: Distribution in stomach and its possible role. *Domestic Animal Endocrinology*, 21(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(01\)00104-7](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(01)00104-7)
46. Hayashida, T., Nakahara, K., Mondal, M. S., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K. i Murakami, N. (2002). *Ghrelin in neonatal rats: Distribution in stomach and its possible role*. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1730239>
47. He, L., Shi, H., Zhang, G., Peng, Y., Ghosh, A., Zhang, M., Hu, X., Liu, C., Shao, Y., Wang, S., Chen, L., Sun, W., Su, J., Chen, X., Zhang, L., Chan, Y.-S., Pei, D., Tortorella, M., Guo, Y., Yan, H. i He, J. (2023). A Novel CCK Receptor GPR173 Mediates Potentiation of GABAergic Inhibition. *Journal of Neuroscience*, 43(13), 2305–2325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2035-22.2023>

48. Herring, A. D. (2014). Beef Cattle. W N. K. Van Alfen (Red.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (s. 1–20). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00130-3>
49. Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberators, P. A., Rosenblum, C. I., Hamelin, M., Hreniuk, D. L., Palyha, O. C., Anderson, J., Paress, P. S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K. K., McKee, K. K., Pong, S. S., Chaung, L. Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., ... Van der Ploeg, L. H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5277), 974–977. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.974>
50. Howick, K., Griffin, B. T., Cryan, J. F. i Schellekens, H. (2017). From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 273. <https://doi.org/10.3390/ijms18020273>
51. Huang, Z.-G., Xiong, L., Liu, Z.-S., Qiao, Y., Dai, R., Xie, Z., Liu, S.-R., Shi, G.-Q. i Liu, G.-Q. (2006). The Tissue Distribution and Developmental Changes of *ghrelin* mRNA Expression in Sheep. *Acta Genetica Sinica*, 33(9), 808–813. [https://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60114-5](https://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60114-5)
52. Inui, A., Asakawa, A., Bowers, C. Y., Mantovani, G., Laviano, A., Meguid, M. M. i Fujimiya, M. (2004). Ghrelin, appetite, and gastric motility: The emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(3), 439–456. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0641rev>
53. Jami, E., Israel, A., Kotser, A. i Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7(6), 1069–1079. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>
54. Janovick-Guretzky, N. A., Dann, H. M., Carlson, D. B., Murphy, M. R., Loor, J. J. i Drackley, J. K. (2007). Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2246–2252. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-640>
55. Jiao, Z.-T. i Luo, Q. (2022). Molecular Mechanisms and Health Benefits of Ghrelin: A Narrative Review. *Nutrients*, 14(19), Artykuł 19. <https://doi.org/10.3390/nu14194191>
56. Jonova, S., Ilgaza, A., Ilgazy, A., Zolovs, M. i Gatina, L. (2022). The amount of ghrelin-immunoreactive cells in the abomasum and intestines of 13-14-week-old

- calves supplemented with Jerusalem artichoke flour alone or in combination with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Veterinary World*, 15(4), 1080–1086. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1080-1086>
57. Karakoç, Z., Topaloğlu, U. i Bayram, B. (2022). Immunohistochemical distributions of leptin, ghrelin and obestatin hormones in bull and ram abomasum. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 51(3), 411–418. <https://doi.org/10.1111/ahe.12801>
 58. Kentish, S. J. i Page, A. J. (2015). The role of gastrointestinal vagal afferent fibres in obesity. *The Journal of Physiology*, 593(4), 775–786. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.278226>
 59. Kim, J., Chung, Y., Kim, H., Im, E., Lee, H. i Yang, H. (2014). The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse. *Development and Reproduction*, 18(4), 301. <https://doi.org/10.12717/DR.2014.18.4.301>
 60. Kitazawa, T., Nakamura, T., Saeki, A., Teraoka, H., Hiraga, T. i Kaiya, H. (2011). Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides*, 32(9), 1876–1886. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.026>
 61. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. i Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
 62. Kojima, M. i Kangawa, K. (2005). Ghrelin: Structure and function. *Physiological Reviews*, 85(2), 495–522. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2004>
 63. Kolgazi, M., Ozdemir-Kumral, Z. N., Cantali-Ozturk, C., Demirci, E. K., Yuksel, M., Sirvanci, S. i Yegen, B. C. (2017). Anti-inflammatory effects of nesfatin-1 on acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of cyclo-oxygenase pathway. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 68(5), 765–777.
 64. Kołodziejcki, P. A., Pruszyńska-Oszmałek, E., Wojciechowicz, T., Sassek, M., Leciejewska, N., Jasaszwilli, M., Billert, M., Małek, E., Szczepankiewicz, D., Misiewicz-Mielnik, M., Hertig, I., Nogowski, L., Nowak, K. W., Strowski, M. Z. i Skrzypski, M. (2021). The Role of Peptide Hormones Discovered in the 21st Century in the Regulation of Adipose Tissue Functions. *Genes*, 12(5), 756. <https://doi.org/10.3390/genes12050756>

65. Konturek, S. J., Konturek, J. W., Pawlik, T. i Brzozowski, T. (2004). Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 55(1 Pt 2), 137–154.
66. Kras, K., Muszyński, S., Tomaszewska, E. i Arciszewski, M. B. (2022). Minireview: Peripheral Nesfatin-1 in Regulation of the Gut Activity-15 Years since the Discovery. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(1), 101. <https://doi.org/10.3390/ani12010101>
67. Kupcova, I., Danisovic, L., Grgac, I. i Harsanyi, S. (2022). Anxiety and Depression: What Do We Know of Neuropeptides? *Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)*, 12(8), 262. <https://doi.org/10.3390/bs12080262>
68. Liang, H., Zhao, Q., Lv, S. i Ji, X. (2022). Regulation and physiological functions of phoenixin. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 956500. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.956500>
69. Liu, Y., Beyer, A. i Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
70. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R. i Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, 1(11), 1155–1161. <https://doi.org/10.1038/nm1195-1155>
71. Malmuthuge, N., Li, M., Goonewardene, L. A., Oba, M. i Guan, L. L. (2013). Effect of calf starter feeding on gut microbial diversity and expression of genes involved in host immune responses and tight junctions in dairy calves during weaning transition. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3189–3200. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6200>
72. Mazinani, M., Memili, E. i Rude, B. J. (2022). Harnessing the Value of Rumen Protected Amino Acids to Enhance Animal Performance – A Review. *Annals of Animal Science*, 22(1), 43–62. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0018>
73. Mcilwraith, E. K. i Belsham, D. D. (2018). Phoenixin: Uncovering its receptor, signaling and functions. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(5), 774–778. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.13>
74. Meale, S. J., Chaucheyras-Durand, F., Berends, H., Guan, L. L. i Steele, M. A. (2017). From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract1. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5984–5995. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12474>

75. Mehdar, K. M. (2021). The distribution of ghrelin cells in the human and animal gastrointestinal tract: A review of the evidence. *Folia Morphologica*, 80(2), 225–236. <https://doi.org/10.5603/FM.a2020.0077>
76. Meleine, M., Mounien, L., Atmani, K., Ouelaa, W., Bôle-Feysot, C., Guérin, C., Depoortere, I. i Gourcerol, G. (2020). Ghrelin inhibits autonomic response to gastric distension in rats by acting on vagal pathway. *Scientific Reports*, 10, 9986. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67053-y>
77. Meng, Q., Lu, Q., Zhang, Z., Liu, J., Lou, Y., Wang, Y. i Liu, J. (2022). Nesfatin-1 inhibits free fatty acid (FFA)-induced endothelial inflammation via Gfi1/NF- κ B signaling. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 86(1), 47–55. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab186>
78. Mix, H., Widjaja, A., Jandl, O., Cornberg, M., Kaul, A., Göke, M., Beil, W., Kuske, M., Brabant, G., Manns, M. P. i Wagner, S. (2000). Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut*, 47(4), 481–486. <https://doi.org/10.1136/gut.47.4.481>
79. Mlyczyńska, E., Kurowska, P., Wachowska, D., Grzesiak, M., Dupont, J. i Rak, A. (2023). Phoenixin-14 as a novel direct regulator of porcine luteal cell functions†. *Biology of Reproduction*, 110(1), 154–168. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad138>
80. Montalban-Arques, A., Chaparro, M., Gisbert, J. P. i Bernardo, D. (2018). The Innate Immune System in the Gastrointestinal Tract: Role of Intraepithelial Lymphocytes and Lamina Propria Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(8), 1649–1659. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy177>
81. Montoro, C., Miller-Cushon, E. K., DeVries, T. J. i Bach, A. (2013). Effect of physical form of forage on performance, feeding behavior, and digestibility of Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1117–1124. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5731>
82. Morash, M. G., Gagnon, J., Nelson, S. i Anini, Y. (2010). Tissue distribution and effects of fasting and obesity on the ghrelin axis in mice. *Regulatory Peptides*, 163(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.03.010>
83. Morton, K. A., Hargreaves, L., Mortazavi, S., Weber, L. P., Blanco, A. M. i Unniappan, S. (2018). Tissue-specific expression and circulating concentrations of nesfatin-1 in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 65, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.04.006>

84. Morton, N. M., Emilsson, V., Liu, Y.-L. i Cawthorne, M. A. (1998). Leptin Action in Intestinal Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 26194–26201. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.26194>
85. Mukherjee, K. i Unniappan, S. (2021). Mouse gastric mucosal endocrine cells are sources and sites of action of Phoenixin-20. *Peptides*, 141, 170551. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170551>
86. Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., Batterham, R. L., Benoit, S. C., Bowers, C. Y., Broglio, F., Casanueva, F. F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P. A., Cowley, M., Cummings, D. E., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S.L., Diéguez, C., Granata, R., Grill, H.J., Grove, K., Habegger, K.M., Heppner, K., Heiman, M.L., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J.O., Kirchner, H., Korbonits, M., Laferrère, B., LeRoux, C.W., Lopez, M., Morin, S., Nakazato, M., Nass, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Schwartz, T.W., Seeley, R.J., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorner, M.O., van der Lely, A.J., van der Ploeg, L.H., Zigman, J.M., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R.G., Horvath, T. i Tschöp, M. H. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4(6), 437–460. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005>
87. Muzammil, A. N., Barathan, M., Yazid, M. D., Sulaiman, N., Makpol, S., Mohamed Ibrahim, N., Jaafar, F. i Abdullah, N. A. H. (2024). A systematic scoping review of the multifaceted role of phoenixin in metabolism: Insights from in vitro and in vivo studies. *Frontiers in Endocrinology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1406531>
88. Myers, M. G., Leibel, R. L., Seeley, R. J. i Schwartz, M. W. (2010). Obesity and leptin resistance: Distinguishing cause from effect. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(11), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.002>
89. Niwińska, B., Hanczakowska, E., Arciszewski, M. B. i Klebaniuk, R. (2017). Review: Exogenous butyrate: implications for the functional development of ruminal epithelium and calf performance. *Animal*, 11(9), 1522–1530. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000167>
90. Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojobori, T. i Isenovic, E. R. (2021). Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>

91. Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., Eguchi, H., Yamamoto, M., Imaki, T., Hashimoto, K., Tsuchiya, T., Monden, T., Horiguchi, K., Yamada, M. i Mori, M. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112), 709–712. <https://doi.org/10.1038/nature05162>
92. Okuhara, Y., Kaiya, H., Teraoka, H. i Kitazawa, T. (2018). Structural determination, distribution, and physiological actions of ghrelin in the guinea pig. *Peptides*, 99, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.010>
93. Osiak-Wicha, C., Muszyński, S., Tomaszewska, E., Kras, K., Ropka-Molik, K., Zhyla, M. i Arciszewski, M. B. (2024). Gene Expression Level and Immunohistochemical Localization of Cannabinoid and Cannabinoid-Related Receptors in The Small Intestine of Holstein Bulls. *Annals of Animal Science*, 24(3), 779–789. <https://doi.org/10.2478/aoas-2024-0016>
94. Osorio, Johan. S. (2020). Gut health, stress, and immunity in neonatal dairy calves: The host side of host-pathogen interactions. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00509-3>
95. Ozdemir-Kumral, Z. N., Sen, E., Yapici, H. B., Atakul, N., Domruk, O. F., Aldag, Y., Sen, L. S., Kanpaltı Mustafaoğlu, F., Yuksel, M., Akakin, D., Erzik, C., Haklar, G. i Imeryuz, N. (2022). Phoenixin 14 ameliorates pancreatic injury in streptozotocin-induced diabetic rats by alleviating oxidative burden. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74(11), 1651–1659. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac055>
96. Pałasz, A., Krzystanek, M., Worthington, J., Czajkowska, B., Kostro, K., Wiaderkiewicz, R. i Bajor, G. (2012). Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*, 46(3), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.12.002>
97. Parlak Ak, T., Yaman, M., Bayrakdar, A. i Bulmus, O. (2023). Expression of phoenixin-14 and nesfatin-1 in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the phases of the estrous cycle. *Neuropeptides*, 97, 102299. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102299>
98. Parsons, K. R., Howard, C. J., Jones, B. V. i Sopp, P. (1989). Investigation of bovine gut associated lymphoid tissue (GALT) using monoclonal antibodies against bovine lymphocytes. *Veterinary Pathology*, 26(5), 396–408. <https://doi.org/10.1177/030098588902600505>
99. Perelló, M., Cornejo, M. P., De Francesco, P. N., Fernandez, G., Gautron, L. i Valdivia, L. S. (2022). The controversial role of the vagus nerve in mediating

- ghrelin's actions: Gut feelings and beyond. *IBRO Neuroscience Reports*, 12, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.03.003>
100. Pokhrel, B. i Jiang, H. (2024). Postnatal Growth and Development of the Rumen: Integrating Physiological and Molecular Insights. *Biology*, 13(4), 269. <https://doi.org/10.3390/biology13040269>
 101. Price, C. J., Samson, W. K. i Ferguson, A. V. (2008). Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain research*, 1230, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.084>
 102. Prinz, P., Scharner, S., Friedrich, T., Schalla, M., Goebel-Stengel, M., Rose, M. i Stengel, A. (2017). Central and peripheral expression sites of phoenixin-14 immunoreactivity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.048>
 103. Prinz, P. i Stengel, A. (2016). Expression and regulation of peripheral NUCB2/nesfatin-1. *Current Opinion in Pharmacology*, 31, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.08.012>
 104. Ranjan, A., Choubey, M., Yada, T. i Krishna, A. (2019). Immunohistochemical localization and possible functions of nesfatin-1 in the testis of mice during pubertal development and sexual maturation. *Journal of Molecular Histology*, 50(6), 533–549. <https://doi.org/10.1007/s10735-019-09846-8>
 105. Raza, M., Yousaf, M. S., Ahmad, J., Rashid, M. A., Majeed, K. A., Tahir, S. K., Ashraf, S., Numan, M., Khalid, A. i Rehman, H. (2022). Prebiotics supplementation modulates pre-weaning stress in male cattle calves by improving growth performance, health scores and serum biomarkers. *Czech Journal of Animal Science*, 67(3), 102–113. <https://doi.org/10.17221/70/2021-CJAS>
 106. Rupp, S. K., Wölk, E. i Stengel, A. (2021). Nesfatin-1 Receptor: Distribution, Signaling and Increasing Evidence for a G Protein-Coupled Receptor - A Systematic Review. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 740174. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.740174>
 107. Rybska, M., Skrzypski, M., Billert, M., Wojciechowicz, T., Łukomska, A., Pawlak, P., Nowak, T., Pusiak, K. i Wąsowska, B. (2024). Nesfatin-1 expression and blood plasma concentration in female dogs suffering from cystic endometrial hyperplasia and pyometra and its possible interaction with phoenixin-14. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 486. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04336-w>

108. Schalla, M. A., Oerter, S., Cubukova, A., Metzger, M., Appelt-Menzel, A. i Stengel, A. (2023). Locked Out: Phoenixin-14 Does Not Cross a Stem-Cell-Derived Blood–Brain Barrier Model. *Brain Sciences*, 13(7), 7. <https://doi.org/10.3390/brainsci13070980>
109. Schalla, M. A. i Stengel, A. (2018). Phoenixin-A Pleiotropic Gut-Brain Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1726. <https://doi.org/10.3390/ijms19061726>
110. Schalla, M., Prinz, P., Friedrich, T., Scharner, S., Kobelt, P., Goebel-Stengel, M., Rose, M. i Stengel, A. (2017). Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides*, 96, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.08.004>
111. Schneeberger, M., Gomis, R. i Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *The Journal of Endocrinology*, 220(2), T25–46. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0398>
112. Schneider, C. A., Rasband, W. S. i Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
113. Seim, I., Collet, C., Herington, A. C. i Chopin, L. K. (2007). Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics*, 8, 298. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-298>
114. Shabtay, A. (2025). Combined approaches to reduce stress and improve livestock well-being: A review. *Cell Stress i Chaperones*, 30(5), 100091. <https://doi.org/10.1016/j.cstres.2025.100091>
115. Steele, M. A., Penner, G. B., Chaucheyras-Durand, F. i Guan, L. L. (2016). Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4955–4966. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10351>
116. Stengel, A. (2015). Nesfatin-1—More than a food intake regulatory peptide. *Peptides*, 72, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.06.002>
117. Stengel, A. i Taché, Y. (2009). Regulation of Food Intake: The Gastric X/A-like Endocrine Cell in the Spotlight. *Current gastroenterology reports*, 11(6), 448–454. <https://doi.org/10.1007/s11894-009-0069-4>

118. Sun, W.-K., Cheng, C., Liu, R., Chen, Y.-H., Zeng, K., Chen, X.-H., Gu, Y.-R., Li, J.-L., Lv, X.-B. i Gao, R. (2019). Expression patterns of GHRL, GHSR, LEP, LEPR, SST and CCK genes in the gastrointestinal tissues of Tibetan and Yorkshire pigs. *Czech Journal of Animal Science*, 64(6), 239–247. <https://doi.org/10.17221/40/2018-CJAS>
119. Székely, M., Soós, S., Pétervári, E. i Balaskó, M. (2016). Chapter 14—Nutritional Impact on Anabolic and Catabolic Signaling. W M. Malavolta i E. Mocchegiani (Red.), *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (s. 189–204). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00014-5>
120. Tschöp, M., Smiley, D. L. i Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908–913. <https://doi.org/10.1038/35038090>
121. Ueberberg, B., Unger, N., Saeger, W., Mann, K. i Petersenn, S. (2009). Expression of Ghrelin and its Receptor in Human Tissues. *Hormone and Metabolic Research*, 41, 814–821. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1233462>
122. Ural, D. A., Erdoğan, S., Erdoğan, H. i Ural, K. (2021). Heat stress, intestinal barrier disruption and calves: Multidisciplinary perspective field study. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 265–269. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1004746>
123. Valassi, E., Scacchi, M. i Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 18(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
124. Vlasova, A. N. i Saif, L. J. (2021). Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643206>
125. Vogel, C. i Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
126. Wang, W., Cheng, L., Guo, J., Ma, Y. i Li, F. (2014). Expression of Ghrelin in gastrointestinal tract and the effect of early weaning on Ghrelin expression in lambs. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 909–914. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2935-2>
127. Wauman, J., Zabeau, L. i Tavernier, J. (2017). The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00030>

128. Weinberg, Z. Y. i Puthenveedu, M. A. (2019). Regulation of G protein-coupled receptor signaling by plasma membrane organization and endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20(2), 121–129. <https://doi.org/10.1111/tra.12628>
129. Wen, S., Wang, C., Gong, M. i Zhou, L. (2019). An overview of energy and metabolic regulation. *Science China Life Sciences*, 62(6), 771–790. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9371-4>
130. Wickramasinghe, H. K. J. P., Kramer, A. J. i Appuhamy, J. a. D. R. N. (2019). Drinking water intake of newborn dairy calves and its effects on feed intake, growth performance, health status, and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 377–387. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15579>
131. Xu, L., Depoortere, I., Tomasetto, C., Zandecki, M., Tang, M., Timmermans, J.-P. i Peeters, T. L. (2005). Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. *Regulatory Peptides*, 124(1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.07.022>
132. Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V. i Goldstein, J. L. (2008). Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell*, 132(3), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017>
133. Yarandi, S. S., Hebbar, G., Sauer, C. G., Cole, C. R. i Ziegler, T. R. (2011). Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition*, 27(3), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.004>
134. Yasuda, M., Jenne, C. N., Kennedy, L. J. i Reynolds, J. D. (2006). The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Veterinary Research*, 37(3), 401–415. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006008>
135. Yonekura, S., Kitade, K., Furukawa, G., Takahashi, K., Katsumata, N., Katoh, K. i Obara, Y. (2002). Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. *Domestic Animal Endocrinology*, 22(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00114-X)
136. Yosten, G. L. C., Lyu, R.-M., Hsueh, A. J. W., Avsian-Kretchmer, O., Chang, J.-K., Tullock, C. W., Le Dun, S., Dun, N. i Samson, W. K. (2013). A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of neuroendocrinology*, 25(2), 206–215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02381.x>

137. Zabielski, R., Kiela, P., Leśniewska, V., Krzemiński, R., Mikołajczyk, M. i Barej, W. (1997). Kinetics of pancreatic juice secretion in relation to duodenal migrating myoelectric complex in preruminant and ruminant calves fed twice daily. *British Journal of Nutrition*, 78(3), 427–442. <https://doi.org/10.1079/BJN19970161>
138. Zhang, A.-Q., Li, X.-L., Jiang, C.-Y., Lin, L., Shi, R.-H., Chen, J.-D. i Oomura, Y. (2010). Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(14), 1735. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i14.1735>
139. Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M. i DiMarchi, R. (2005). Leptin: Structure, Function and Biology. W *Vitamins i Hormones* (T. 71, s. 345–372). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)71012-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)71012-8)
140. Zhang, M., Zhu, X., Xu, X., Jin, X., Bao, H., Dugeer, S., Du, C., Cao, G. i Yang, Y. (2018). Molecular characterization and expression patterns of ghrelin in the reindeer (*Rangifer tarandus*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21(1), 55–64. <https://doi.org/10.24425/119022>
141. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. i Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
142. Zhu, X., Cao, Y., Voogd, K. i Steiner, D. F. (2006). On the processing of proghrelin to ghrelin. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38867–38870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607955200>



Article

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*)

Katarzyna Kras ^{1,*} , Katarzyna Ropka-Molik ² , Siemowit Muszyński ³ and Marcin B. Arciszewski ¹

¹ Department of Animal Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12 St., 20-950 Lublin, Poland; mb.arciszewski@wp.pl

² Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, Krakowska 1 St., 32-083 Balice, Poland; katarzyna.ropka@iz.edu.pl

³ Department of Biophysics, Faculty of Environmental Biology, University of Life Sciences in Lublin, 13 Akademicka St., 20-950 Lublin, Poland; siemowit.muszynski@up.lublin.pl

* Correspondence: katarzyna.kras@up.lublin.pl

Abstract: The regulation of food intake occurs at multiple levels, and two of the components of this process are orexigenic and anorexigenic peptides, which stimulate or inhibit appetite, respectively. The study of the function of these compounds in domestic cattle is essential for production efficiency, animal welfare, and health, as well as for economic benefits, environmental protection, and the contribution to a better understanding of physiological aspects that can be applied to other species. In this study, the real-time PCR method was utilized to determine the expression levels of *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2* (which encode ghrelin, its receptor, phoenixin-14, its receptor, leptin, its receptor, and nesfatin-1, respectively) in the gastrointestinal tract (GIT) of Polish Holstein–Friesian breed cattle. In all analyzed GIT segments, mRNA for all the genes was present in both age groups, confirming their significance in these tissues. Gene expression levels varied distinctly across different GIT segments and between young and mature subjects. The differences between calves and adults were particularly pronounced in areas such as the forestomachs, ileum, and jejunum, indicating potential changes in peptides regulating food intake based on the developmental phase. In mature individuals, the forestomachs predominantly displayed an increase in *GHRL* expression, while the intestines had elevated levels of *GHSR*, *GPR173*, *LEP*, and *NUCB2*. In contrast, the forestomachs in calves showed upregulated expressions of *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2*, highlighting the potential importance of peptides from these genes in bovine forestomach development.

Keywords: food intake; gastrointestinal tract; orexigenic peptides; anorexigenic peptides; cattle; real-time PCR



Citation: 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*). *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 533. <https://doi.org/10.3390/ijms25010533>

Academic Editors: Brad Freking, Luisa Dalla Valle and Oliana Carnevali

Received: 2 October 2023

Revised: 28 December 2023

Accepted: 29 December 2023

Published: 31 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The regulation of food intake in mammals occurs through intricate processes encompassing multiple levels, intertwined with a cyclic pattern of hunger and satiety referred to as the food intake cycle [1]. The gastrointestinal tract (GIT) and the nervous systems, including the central nervous system (CNS) and the enteric nervous system (ENS), engage in a two-way communication facilitated by the parasympathetic and sympathetic inputs, both through efferent and afferent fibers [2,3]. The efferent neuronal pathways play a crucial role in regulating the activity of the gut during both interdigestive and digestive phases [2,4,5]. In contrast, the afferent pathway transmits signals from various sensors in the intestine to the CNS. These sensors are sensitive to mechanical and chemical stimuli, including hormones, nutrients, and peptides [2,6]. There are numerous endogenous peptides in the GIT that act as regulators of food intake. Depending on their specific actions,

they can be classified as either orexigenic peptides, which stimulate appetite, or anorexigenic peptides, which suppress appetite. The best-known orexigenic peptide in the GIT is ghrelin, which stimulates hunger sensations and promotes food intake [7]. In contrast, the anorexigenic adipokine leptin acts locally to decrease appetite [8]. The intricate interplay between anorexigenic and orexigenic peptides is essential for maintaining appropriate energy balance, body weight, and overall nutritional status [3,9,10].

The roles and mechanisms of action of some of the aforementioned well-known peptides are fairly well understood. However, new substances with molecular mechanisms that are not fully explained are constantly being discovered. Newly discovered appetite-regulating peptides, nesfatin-1 and phoenixin-14, were found in the hypothalamus and coexist in the same neuronal population [11]. As the hypothalamus acts as a central hub for the integration of signals that determine food intake, the function of peptides discovered in this structure, particularly in areas responsible for the regulation of food intake, is relatively well understood. However, the precise peripheral functions of these peptides in the GIT organs, which are the first to come into contact with ingested food, are not yet fully understood. It is also unclear to what extent these peptides are present in the GIT of different animal species.

The lack of literature on nesfatin-1 and phoenixin-14 in the GIT of domestic cattle (*Bos taurus taurus*), crucial contributors to global economies through meat and dairy production [12], warrants investigation. While existing studies focus on leptin, leptin receptor, and ghrelin, key elements like the ghrelin receptor, phoenixin-14, and nesfatin-1 remain unexplored [13]. This study aims to bridge these gaps, analyzing mRNA expression of orexigenic peptides and their receptors (*GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*) and anorexigenic peptides and their receptors (*LEP*, *LEPR*, *NUCB2*) in the GIT of domestic cattle.

Considering the complex stomach subdivision (rumen, reticulum, omasum, abomasum) in ruminant cattle, this research also delves into GIT segment-related variations. Additionally, calves undergoing intensive growth, weight gain, and a transition from pre-ruminants to ruminants, offer a unique perspective. This transformation may influence the physiology and functions of the GIT, even in animals with relatively developed forestomachs such as the calves included in this study [14].

Therefore, this study aims to investigate the mRNA expression patterns of key orexigenic and anorexigenic peptides, including ghrelin, leptin, and newly discovered peptides such as nesfatin-1 and phoenixin-14, and their receptors, across different segments of the gastrointestinal tract in domestic cattle, with a focus on age-related differences to enhance our understanding of the complex feeding mechanisms in polygastric animals and their implications for livestock health.

Understanding mRNA expression in the GIT of polygastric animals, distinct from their monogastric counterparts, provides valuable insights into intricate feeding mechanisms. Imbalances in these peptides expression might disrupt appetite regulation and nutrient utilization, potentially impacting the health and growth performance of cattle. Ultimately, this research contributes essential knowledge to enhance livestock well-being and optimize agricultural practices.

2. Results

2.1. mRNA Expression Levels

The real-time PCR analysis revealed the presence of mRNA of all genes in all examined segments in both age groups (Figure 1). The expression levels of *GHRL* varied significantly among the segments, with the highest mRNA levels in both groups observed in the abomasum, significantly lower levels in the duodenum, and negligible expression in the remaining GIT sections ($p < 0.01$) (Figure 1a).

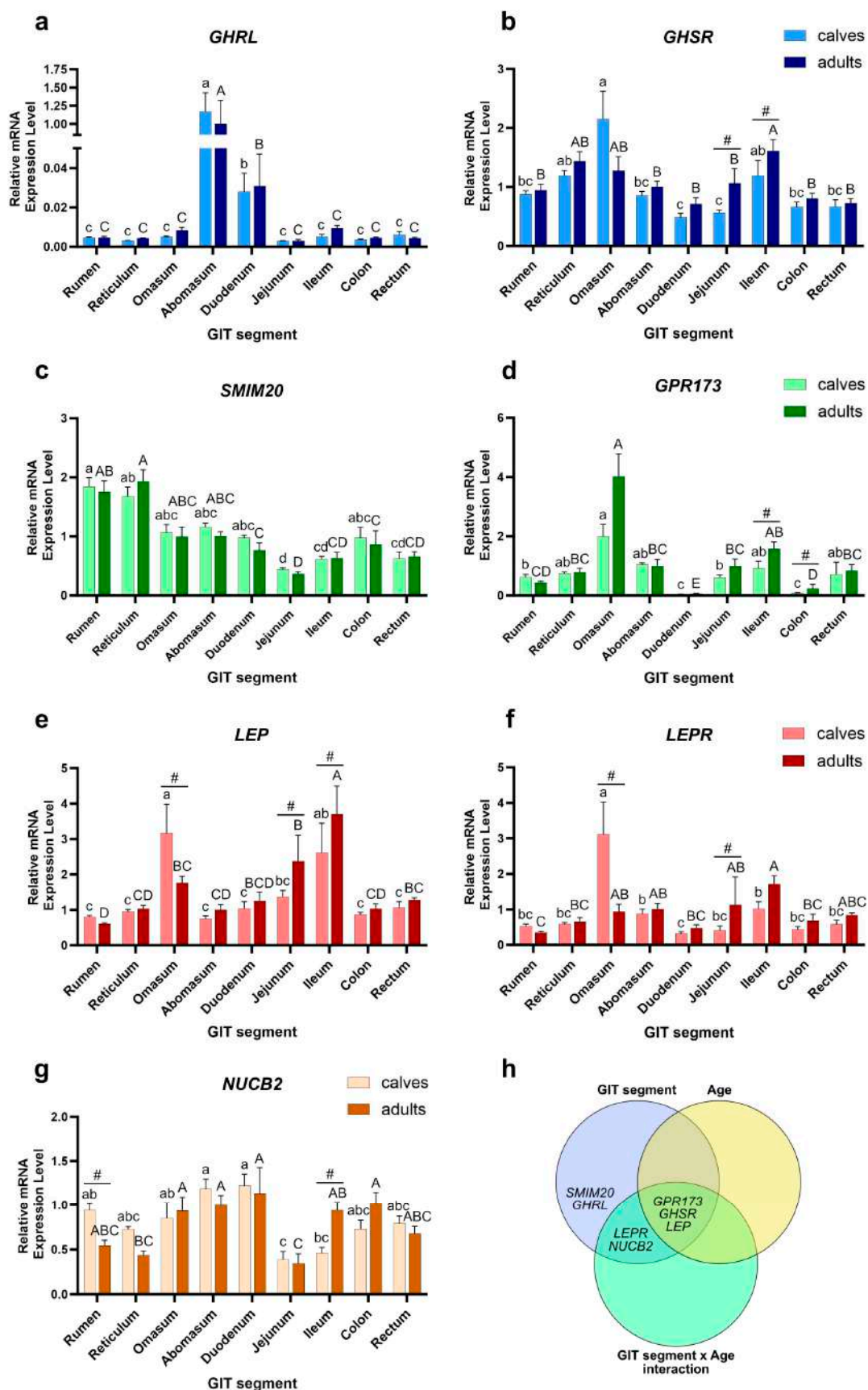


Figure 1. Gene expression levels. The relative expression of genes (a) *GHRL*, (b) *GHSR*, (c) *SMIM20*, (d) *GPR173*, (e) *LEP*, (f) *LEPR*, and (g) *NUCB2* in the examined bovine GIT segments, (h) Venn diagram

summarizing the genes measured for which GIT segment, age, or their interaction had a significant impact on their relative mRNA expression levels as tested by the two-way ANOVA. Expression was normalized using the geometric mean of housekeeping genes *RPS9* and *ACTB* and is presented relative to the levels observed in the adult abomasum. Different lowercase letters denote significant differences between GIT segments in calves, while different uppercase letters denote significant differences between GIT segments in adult individuals ($p < 0.01$). A hash (#) highlights significant differences in mRNA expression between calves and adults within a specific GIT segment ($p < 0.01$). Owing to the exponential characteristics of relative mRNA expression computed via the $-\Delta\Delta CT$ method, the geometric means along with SE (standard errors) are presented.

In adults, the highest expression level of *GHSR* was observed in the ileum, slightly lower (but insignificantly) in the reticulum and omasum, and lowest in the remaining tissues ($p < 0.01$). In calves, the highest expression level was noted in the omasum, while the lowest in the duodenum and jejunum ($p < 0.01$). Furthermore, the *GHSR* expression level in the jejunum and ileum of adult individuals was significantly higher compared to calves ($p = 0.003$, Cohen's d Effect Size (ES): 1.74, Fold Change (FC): 1.89 for jejunum, and $p = 0.003$, ES: 0.96, FC: 1.90 for ileum) (Figure 1b).

The highest expression level of *SMIM20* in adults was observed in the reticulum, followed by the rumen, and gradually decreased in other segments, with the jejunum exhibiting the lowest transcript level ($p < 0.01$). In calves, the highest expression was noted in the rumen, while the lowest in the jejunum ($p < 0.01$). There were no significant differences in *SMIM20* expression levels between calves and adult individuals (Figure 1c).

In adults, the highest expression level of *GPR173* was found in the omasum, followed by the ileum, while the lowest level was observed in the duodenum ($p < 0.01$). In calves, the highest transcript level was also observed in the omasum, and lowest in the duodenum ($p < 0.01$). In the ileum of adult individuals, *GPR173* expression level was significantly higher compared to calves ($p = 0.002$, ES: 1.77, FC: 2.62). On the contrary, in the colon of calves, *GPR173* expression levels were higher compared to those of adults ($p < 0.001$, ES: 0.60, FC: 2.88) (Figure 1d).

LEP expression level in the adult ileum was significantly higher than in other tissues ($p < 0.01$), and this segment, along with the jejunum, also showed significantly higher expression in adult individuals compared to calves ($p < 0.001$, ES: 3.67, FC: 1.41 for ileum, and $p = 0.008$, ES: 1.11, FC: 1.73 for jejunum). The lowest *LEP* expression level in adults was observed in the rumen. On the contrary, the transcript level in the omasum of calves was significantly higher compared to that of adults ($p < 0.001$, ES: 2.29, FC: 2.01) and it was the segment with the highest transcript level in calves ($p < 0.01$) (Figure 1e).

The highest level of *LEPR* was observed in the adult ileum, while the lowest expression was found in the rumen ($p < 0.01$). In calves, the highest mRNA expression was observed in the omasum, while significantly lower mRNA expression was observed in the remaining segments ($p < 0.01$). Significant differences in *LEPR* expression levels were observed between age groups, with higher expression in the omasum of calves compared to adults ($p < 0.001$, ES: 2.27, FC: 3.32), and higher expression in the jejunum of adults ($p = 0.009$, ES: 1.03, FC: 1.92) (Figure 1f).

The expression level of *NUCB2* was relatively consistent among segments, with the lowest expression in the jejunum both in adults and calves ($p < 0.01$). Significant differences in *NUCB2* expression were observed between age groups. In the rumen, the expression of *NUCB2* was higher in calves compared to adult individuals ($p = 0.008$, ES: 2.41, FC: 1.73), while in the ileum *NUCB2* expression was significantly higher in adult individuals ($p < 0.001$, ES: 2.59, FC: 2.05) (Figure 1g).

In summary, as shown in Figure 1h, the interaction between the GIT segment and age, as well as both the GIT segment and age alone, had a significant impact on the relative *GPR173*, *GHSR*, and *LEP* expression levels. In the case of *LEPR* and *NUCB2*, both GIT segment and GIT segment $\times$ age interaction had a significant impact on expression levels; finally, age was the only factor significantly affecting *SMIM20* and *GHRL* expression levels.

2.2. Correlations between Expression Levels

Multiple significant positive correlations were found among the expression levels of the studied genes in both calves and adults. A thorough analysis is shown in Figure 2a–i. The highest number of positive correlations was observed between the expression levels of *LEP* and *GHSR* in adult individuals. These correlations were present in seven out of the nine examined segments but were not found in the first (rumen) and last (rectum) segments. In calves, the highest number of positive correlations was noted in the omasum, while in adults it was in the abomasum which presented the greatest number of positive correlations. Positive correlations between the ligand (*LEP*) and its receptor (*LEPR*) were identified in the stomach (omasum and abomasum) of both calves and adults, as well as in the reticulum and duodenum of calves. Ligand–receptor correlations were also observed between the remaining pairs: *GHRL*/*GHSR* in the omasum, jejunum, and rectum of calves, and in the abomasum and jejunum of adults; *SMIM20*/*GPR173* in the rumen and omasum of calves and the rumen and omasum of adults; *NUCB2*/*GHSR* in the ileum of calves, and the reticulum and omasum of adults.

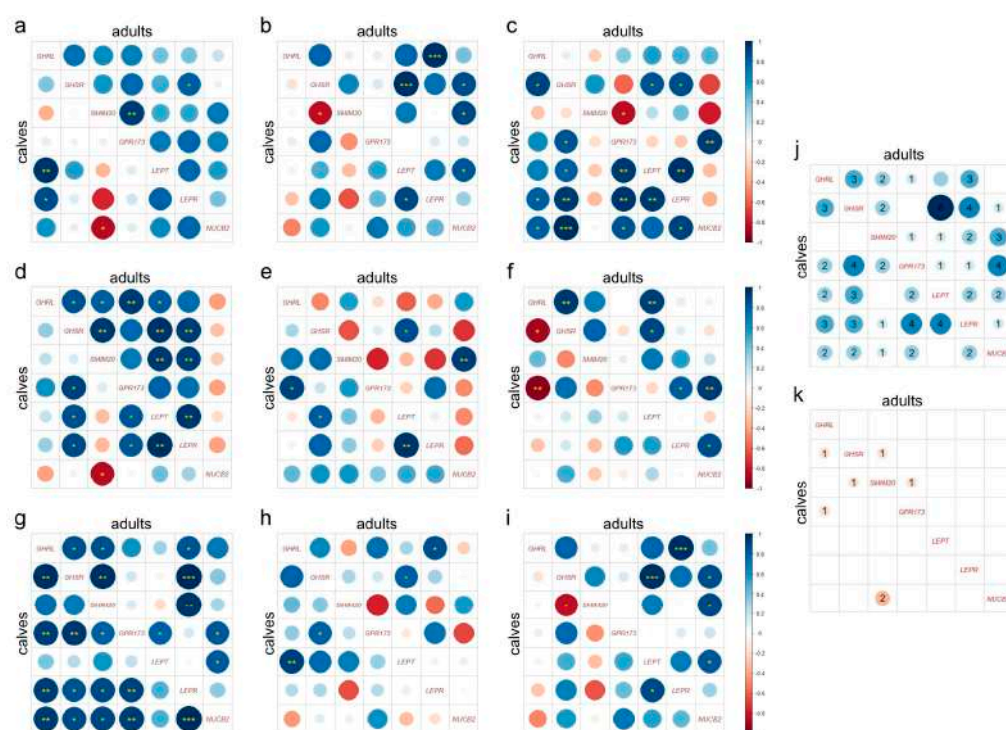


Figure 2. Correlation plot analysis. The correlation among expression patterns for *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2* in (a) rumen, (b) reticulum, (c) omasum, (d) abomasum, (e) duodenum, (f) jejunum, (g) ileum, (h) colon, and (i) rectum, for both calves and adult individuals. The correlation type is indicated by the color, with blue representing a positive correlation and red representing a negative correlation. The size of the dots reflects the magnitude of the correlation coefficient. Statistically significant correlations are marked with asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The total number of significant (j) positive and (k) negative correlations among the expression levels of the seven analyzed genes in the GIT segments for calves and adults is presented.

2.3. Heatmap Analysis

The heatmap analysis showed that, in most GIT segments, gene expression patterns were similar between calves and adults. However, a remarkable disparity in gene expression between the two groups was found in the ileum, as the pattern of genes expression in the adults' ileum is clustered with genes expression pattern in the omasum of calves and adults. Generally, the highest levels of gene expression were found in the

forestomachs and abomasum. No clustering was observed based on the peptide type (orexigenic/anorexigenic) (Figure 3).

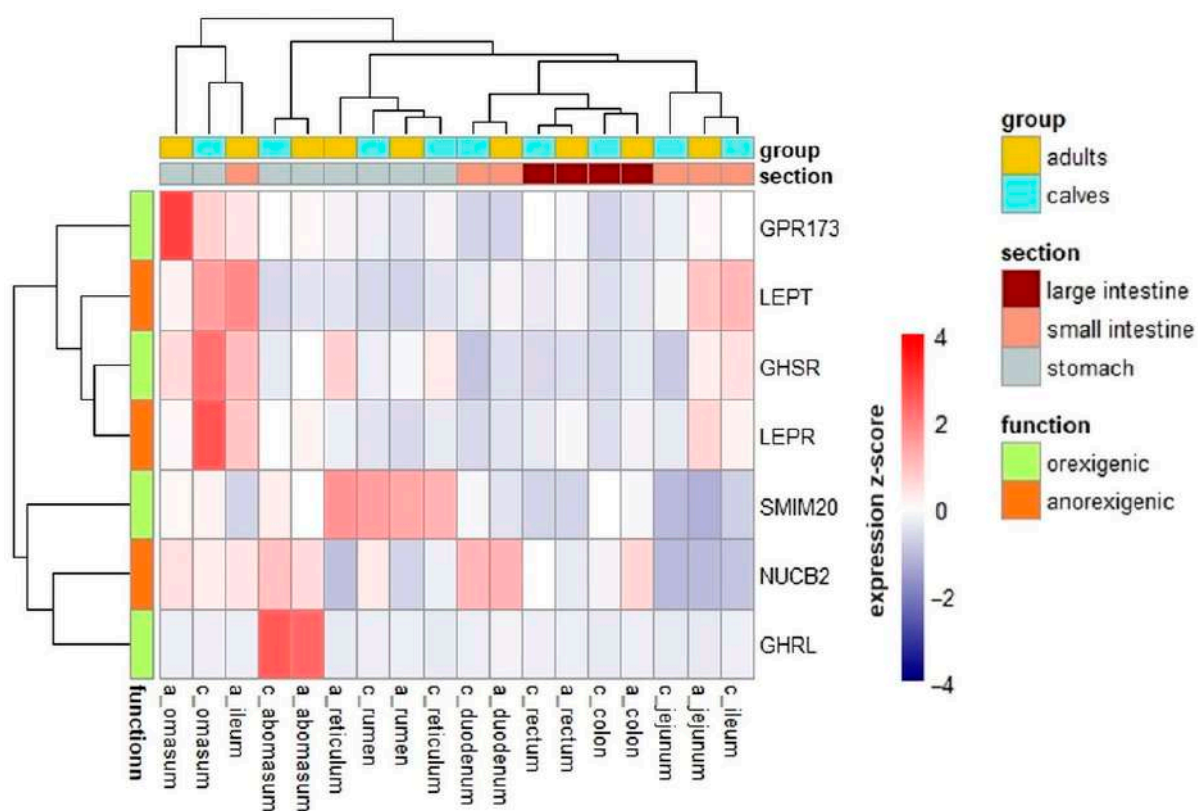


Figure 3. Heatmap and dendrogram of hierarchical clustering based on the z-score of gene expression. The heatmap illustrates the GIT segment-specific expression patterns of *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2* genes in both calves and adult individuals. Expression levels are represented as z-scores calculated per row (per gene) to highlight variations in the average expression of each gene across the GIT segments in both calves and adults. The x-axis represents sampled tissues, using the prefix “c” for calves and “a” for adults.

3. Discussion

In livestock animals, such as domestic cattle, optimal nutrition and consistent weight gain are important factors. These not only impact production efficiency, but further influence the health, longevity, and quality of products such as meat and dairy [15,16]. With such implications, studies on feed intake regulation and related genes are highly valuable [17,18]. While all mammals have a natural mechanism to regulate food intake, it is not uniform across all species. Various factors such as dietary needs, lifestyle, and evolutionary changes explain some of these differences, but some shared mechanisms and communication pathways are present in different mammalian species. In most mammals, the hypothalamus is the main area for the regulation of food intake, with a focus on the arcuate nucleus (ARC) and nucleus tractus solitarius (NTS). These areas process and integrate signals of satiety and hunger from the body, leading to the secretion of various anorexigenic and orexigenic compounds. This then triggers either a catabolic pathway for anorexigenic peptides or an anabolic pathway for orexigenic peptides, which, in turn, involve other brain structures. Hypothalamic neurons in areas responsible for satiety and hunger can be activated by different factors, including regulatory proteins which were the main focus of this study [1,19].

One of the best-known orexigenic proteins is ghrelin, which was isolated from the rat stomach and identified in 1999 by Kojima et al. [20] as a result of their search for a ligand for the orphan receptor GHS-R [20]. It is derived from the precursor protein

proghrelin [21]. The earliest known functions of ghrelin include stimulating food intake, influencing lipid metabolism, and regulating growth hormone release [22,23]. Ghrelin also acts locally at GIT to regulate motility and gastric acid secretion [24]. Considering its numerous functions, ghrelin is an important target for potential therapies addressing numerous conditions, including obesity. The initial study on ghrelin expression conducted by its discoverers suggested that the stomach might be its primary source [20]. This pattern of expression has remained consistent for over 20 years, and our results align with it, as the highest expression level was found in the abomasum, followed by the duodenum. However, literature data on the expression of ghrelin in the GIT of domestic cattle are very limited. In a 2020 study, Hayashi et al. [13] examined the level of ghrelin expression in the organs of the GIT of adult Holstein cows and 2-week-old male Holstein calves, simultaneously comparing expression levels between the two age groups. They detected the presence of ghrelin mRNA in all examined sections, namely the rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, and colon. However, in both cows and calves, the level of ghrelin expression in the abomasum exceeded the expression levels found in the other organs [13]. Ding et al. [25] conducted an analysis of ghrelin expression in yaks, comparing it with the expression in domestic cattle. However, among the organs analyzed, only two, the abomasum and the duodenum, came from the GIT. The level of ghrelin in the abomasum exceeded the expression level in the duodenum for both cattle and yaks [25]. The level of ghrelin expression in the GIT was also analyzed in another large ruminant, the reindeer. Here, again, expression was observed throughout the entire GIT from the esophagus to the colon, with the highest level in the abomasum, followed by the esophagus and duodenum [26]. Moreover, studies involving sheep, an example of small ruminant, showed the presence of ghrelin mRNA in all chambers of the stomach and in the small intestine, with the highest expression in the abomasum [27,28]. These studies are consistent with similar research conducted on other mammalian species, such as humans [29], pigs [30], mice [31], and guinea pigs [32]. Ding et al. [25] indicated that ghrelin is a protein with significant conservation across species, and, when combined with consistent findings from diverse animal research, this might underscore its pivotal role. The predominant expression of ghrelin in the abomasum implies its potential involvement in managing food consumption in domestic cattle. Furthermore, in our study, *GHRL* expression level did not differ between groups, suggesting that the ghrelin production is not influenced by the developmental stage of the GIT. However, its activity could be modulated by the transcription of its receptor, as we observed that *GHSR* transcription in the small intestine was dependent on age.

Building upon what has been mentioned previously, ghrelin operates via the GHS-R receptor. It is noteworthy that ghrelin activity hinges on the receptor specific variant. The GHS-R splits into two subtypes, GHS-R1a and GHS-R1b, with ghrelin connecting through GHS-R1a [7]. In the available literature, there is a noticeable gap concerning the expression of *GHSR* in the GIT of cattle. However, with respect to human tissues, Ueberberg and his team [29] studied healthy human organs, including sections of the GIT, and found *GHSR* mRNA in the stomach and, to a lesser extent, in the ileum. This is in line with our research, but, in contrast to our study, no expression was found in the colon [29]. On the other hand, studies conducted on young Tibetan and Yorkshire pigs have revealed *GHSR* mRNA expression in all examined organs of the GIT, namely the stomach, small intestine, cecum, and colon. The highest expression levels have been found in the duodenum and jejunum [33]. The expression of *GHSR* has also been studied in rat and guinea pig GIT organs. Expression has been demonstrated in rats, i.e., in the stomach, all sections of the small intestine, colon, and cecum, with the highest level of expression found in the stomach. Interestingly, *GHSR* expression was not found in the same tissues in guinea pigs [34]. Results of our study may indicate that ghrelin, or other GHSR ligands, have a direct effect on the bovine GIT. Furthermore, *GHSR* expression level was higher in the jejunum and ileum of adults compared to those of calves, indicating the potential role of this receptor in nutrient absorption. While the calves we studied have a well-developed digestive tract, the

latter is still undergoing growth and development and may differ physiologically from that of adult cattle. Our study suggests that the ghrelin receptor may be one of the factors that develop with age to regulate food absorption.

Anorexigenic nesfatin-1, in spite of its opposing action to ghrelin, shares many features with this peptide. Firstly, it is speculated that nesfatin-1 may act as a ligand for the ghrelin receptor GHS-R1a [35–37]. Secondly, both hormones are known to be colocalized in X/A-like cells in the oxyntic glands in the fundus of the stomach, as well as in the pancreas, hypothalamus, and intestine. Additionally, both peptides are formed by enzyme prohormone convertase (PC) 1/3, which converts pro-protein (in the case of nesfatin-1, NUCB2) to their final forms [37]. These similarities, along with their opposing effects on appetite, suggest the need for further research into the interaction between ghrelin and nesfatin-1. As noted in a previous review article, nesfatin-1 has been found to play a protective role in GIT disorders [38]. While its expression in the GIT of cattle has not yet been studied, research has found nesfatin-1 expression in the stomach and intestines of other species, such as rats, mice, and dogs, where the expression level of *NUCB2* in the stomach consistently exceeds that found in the intestines [38,39]. This study is the first to examine *NUCB2* expression across all segments of the digestive tract in domestic cattle, from the rumen to the rectum. The expression level remained relatively consistent and showed a decrease with age only in the rumen. It is worth noting that in calves the development of the forestomachs is concomitant to the initiation of solid food consumption [40]. Consequently, nesfatin-1 may play a supportive role in organ development. In the ileum, higher expression of nesfatin-1 was noted in adult individuals, a phenomenon which could indicate that nesfatin-1 has other or more complex roles in the mature intestine. One aspect that needs further investigation is whether nesfatin-1 affects the expression level of *GHSR*, as it is a possible ligand for *GHSR*. Our study suggests a potential relationship between the two, as both *NUCB2* and *GHSR* expression levels were found to be higher in adults than in calves, possibly due to increased food absorption in adults. Additionally, given that nesfatin-1 can permeate the blood–brain barrier [41], it is plausible to infer that some of this expression facilitates its anorexigenic central action. However, as previously mentioned, there are indications pointing toward nesfatin local activity in the GIT. Therefore, the findings of this study suggest that nesfatin-1 may also exert its local influence on the GIT of domestic cattle and one of the mechanisms may be increased nutrient absorption.

Leptin is a key regulator of the body energy homeostasis, playing an important role in modulating hunger and energy consumption. Primarily produced by adipocytes or fat cells, leptin serves as an indicator to the brain regarding the body fat storage levels. As these levels increase, more leptin is generated, resulting in reduced hunger and increased energy use. On the other hand, when the body fat levels decrease, the production of leptin decreases, causing an increase in appetite and decrease in energy consumption [42]. Interestingly, available studies contrast with ours, as Chelikani et al. [43] noted the absence of *LEP* mRNA in the GIT of calves of domestic cattle [43]. However, it should be noted that in this research PCR products were analyzed semi-quantitatively on agarose gel after electrophoresis, while in the present study real-time PCR was used. Another research endeavor by Hayashi et al. [13] showed the expression of *LEP* mRNA in all sections of the GIT, but only in unweaned calves. In contrast, in adults, the expression was minimal and significantly lower compared to calves [13]. The difference between the present study and that of Hayashi et al. [13] was age and sex of the study subjects: 2-year-old males vs. 5-year-old females (adults) and 7-month-old males vs. 2-week-old males (calves). Furthermore, in a 2002 study, *LEP* expression in the rumen, abomasum, and duodenum was observed only in 3-week-old calves. In older calves and adults, *LEP* mRNA was found only in the duodenum. The same study also showed that, in older calves fed with replacement milk, *LEP* expression also appeared in the rumen and abomasum [44]. Additionally, another study showed a lack of *LEP* expression in the duodenum of dairy cows [45]. This suggests that there may be age, sex, or nutritional-status-related differences that affect the regulation of leptin production in the GIT of cattle. Further research in this

area would help better understand these differences and their potential implications for cattle health and production, especially since leptin was present throughout the GIT in our study, including in adult individuals. However, the lack of *LEP* expression in the previous studies is intriguing, as leptin immunoexpression has been found in bovine GIT [13] and *LEP* mRNA has been confirmed to be present in the stomach of rats [46] and humans [47]. In the present study, *LEP* expression level in the omasum of calves was higher than that found in the omasum of adult cattle. As we mentioned earlier, the calves in our study had a relatively well-developed, yet still developing GIT. The forestomachs are the sections where a great deal of change takes place as the ruminant develops. Therefore, further research should investigate the potential function of leptin in the developing calf stomach, as it may play a different role than an anorexigenic peptide. Additionally, in the jejunum and ileum of adult cattle, *LEP* expression level was higher than in calves. Again, as mentioned above, these segments are heavily involved in nutrient absorption; therefore, leptin, along with the ghrelin receptor, may play a role in this process.

The leptin receptor, known as Lep-R or Ob-R, is part of the type I cytokine receptor group and has six different isoforms, specifically Lep-Ra-f [48]. Research in domestic cattle GIT has shown occurrence of the gene expression in sections such as the abomasum, duodenum, jejunum, and ileum [43]. Interestingly, Alam et al. [45] found no expression of the leptin receptor gene in the duodenum of dairy cows, similarly to findings regarding the leptin gene itself [45]. Studies on other species have revealed the presence of *LEPR* mRNA in the human stomach [47] and the stomach and intestines of mice [49]. The present research indicates that the expression pattern of the leptin gene closely matches that of its receptor, suggesting that the ligand might regulate the receptor expression and that leptin may have specific functions in the digestive tract. Studies have demonstrated that leptin may modulate the absorption of macronutrients and influence motility in other species [8]. This is in line with the fact that, in adults, levels of expression for both *LEP* and its receptor *LEPR* were elevated in sections responsible for nutrient absorption. Additionally, both *LEP* and *LEPR* expression levels were significantly higher in the omasum of calves, a phenomenon which may indicate a role played by leptin in the development of this forestomach.

Phoenixin-14, discovered in 2013, emerges from the precursor protein SMIM20 as one of its isoforms. It is known to function as an orexigenic peptide, but its role in the GIT is not well understood. While phoenixin-14 expression at the protein level in the GIT has been demonstrated, there is a lack of literature on its precursor *SMIM20* mRNA expression [50]. Phoenixin-14, which shows considerable homology between species, acts as a ligand for GPR173, a receptor from the G-protein coupled receptor family. This is particularly intriguing, as these receptors are often responsible for relaying important signals [51]. The mRNA expression of *GPR173* in the GIT has not been previously quantified. This study aims to provide the first description of *SMIM20* and *GPR173* expression in the GIT of bovines. The results suggest that *SMIM20* mRNA expression is highest in the initial segments of the digestive tract and gradually decreases. In contrast, *GPR173* expression is highest in the omasum. This could suggest that phoenixin-14, produced mainly in the rumen and reticulum, has a primary effect in the omasum, potentially playing a role in regulating muscular contractions in this segment. However, it is important to note that mRNA levels do not always match protein levels. Therefore, a further investigation is needed to fully understand the role of phoenixin-14 in the bovine digestive system. *GPR173* expression level was higher in adults' ileum and colon compared to those of calves. This suggests that phoenixin-14 or another unknown ligand for GPR173 may modulate nutrient and/or water absorption.

An interesting observation from the study is that the levels of genes encoding the only two orexigenic peptides examined in the study, ghrelin and phoenixin-14, were not age-dependent (Figure 1h). This could suggest that orexigenic mechanisms in GIT develop earlier in an animal's life than anorexigenic ones. However, further research is needed to examine this matter, as no such conclusions can be drawn from the results of the two

peptides. On the contrary, the expression levels of their receptors were age-dependent (Figure 1h).

In the correlation analysis, a large number of positive correlations in gene expression was noted, which may suggest close working and mutual regulation. Especially in the case of leptin and its receptor, recurring positive correlations were noted. It is worth mentioning that one of the Ob-R isoforms (Ob-Re) can regulate serum leptin concentrations [48], and further studies are needed to examine such relationships in the GIT. Other ligand–receptor correlations were found, as described in the Results sections; however, they differed between groups, while the correlations between leptin and its receptor were similar in both age groups. The most frequent positive correlations were found to occur between the *GHSR* and *LEP* expression levels. This may seem a coincidence, as the *GHSR* encodes a receptor for ghrelin, which in turn acts in opposition to leptin encoded by the *LEP*. However, a study previously cited by us showed a similar pattern of *GHSR* and *LEP* gene expression in pigs [33]. As similar results were obtained in studies with two different species, this aspect needs to be carefully examined in future studies.

The heatmap analysis suggests a potential outlier in the data from the ileum of adult cattle, mainly due to the upregulated expression of *NUCB2*, *LEPR*, and *LEP*. Further investigation is necessary, as mentioned previously in relation to *LEP*. This potential outlier may be related to the role of these proteins in water and nutrients absorption. A speculative hypothesis could be a connection between these peptides and the absorption of vitamin B12 and other fat-soluble vitamins. Given that the ileum plays a key role in this process [52], exploring this possibility could be worthwhile. Additionally, in the heatmap analysis, a clustering between *GHRL* and *NUCB2* can be noted. This is an interesting observation considering the previously mentioned aspects, such as the colocalization of the two peptides encoded by these genes, the sharing of the enzyme, or the potential sharing of the receptor.

Understanding the regulation of food intake in livestock animals, such as cattle, is important for the optimization of meat and dairy production, promotion of sustainable farming, and improvement of animal welfare [53]. Therefore, this aspect is not only significant economically, but also ethically. Furthermore, dairy cows are proposed as a model for the study of food intake in humans, as they share more similarities with humans than the commonly used rodents, e.g., rats or mice. This is because humans and cattle both have a common circadian rhythm, which is significant in nutrition [54].

The limitation of our study is the sample size, which may be considered small. Despite setting a stricter-than-usual significance threshold, this might have influenced our statistical analysis. Nevertheless, a sample size of six or less per group has been previously used in the evaluation of mRNA expression of genes coding for GIT hormones in cattle [13,25], other ruminants [26–28,43,44], farm animals [30,33], and even laboratory animals [31,34]. Nonetheless, we believe that this limitation does not completely undermine the novelty of our study. This study, in fact, is the first to report mRNA expression of genes encoding phoenixin-14, nesfatin-1, and GPR173 in the GIT of cattle. We also validated previous reports about the absence of expression of some genes in specific GIT segments in cattle, such as *GHSR* in the colon [29] and *LEP* in the duodenum [45], which, however, were detected in our study. We are of the view that conducting experiments on tissues obtained from healthy cattle during standard culling, specifically from those without pre-existing gastrointestinal conditions and whose carcasses are designated for commercial purposes and consumption, holds significant value for veterinary science, sustainable farming, and human nutrition. Nevertheless, further studies with a larger sample size are recommended to more comprehensively clarify the expression patterns of these genes in domestic cattle of different ages, sexes, or breeds. The accumulation of such data over time can provide deeper insights into the roles of these orexigenic and anorexigenic peptides and their receptors in the GIT of these significant polygastric herbivores.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

The study was conducted on healthy male domestic cattle from the Polish Holstein–Friesian breed aged 20–24 months and weighing 768 ± 46 kg ($n = 6$, adults) and aged 7–8 months weighing 218 ± 23 kg ($n = 6$, calves). All animals, both calves and adults, came from the same farm, lived in the same environment, followed the same feeding regimen, and were the only animals slaughtered that day. The cattle were fed in a semi-intensive system. This entailed a period of grazing on pasture, followed by the total mixed ration (TMR) feeding method [55]. Tissue samples for the study were collected at the local cattle slaughterhouse. The selected animals showed good health, and post-mortem analyses did not reveal any pathologies in the digestive tract. Therefore, the collected material was representative of healthy individuals. The animals were fasted for 18 h before slaughter. Sections of the GIT, namely the rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, colon, and rectum, were taken, ensuring that all layers of the respective section were present in the excised fragment (total of 54 samples in each age group). The tissues were rinsed immediately after collection with a physiological saline solution and placed in liquid nitrogen, then frozen at -80 °C. All samples were taken within 15 min of slaughter. According to Polish law, since all tissue collection procedures were conducted post-mortem, ethical review and approval from the Ethics Committee for this study were not required.

4.2. Real-Time qPCR Gene Expression Measurement

Tissue fragments were excised from the collected samples, ensuring that they encompassed all layers of the respective section. Subsequently, total RNA was isolated using the PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and following the manufacturer's provided protocol. The isolated material was further purified from genomic DNA by incubating it with DNase I (PureLink DNase Set; Invitrogen, Waltham, MA, USA). Next, the concentration and purity of the isolated RNA were measured using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), and its integrity was assessed via electrophoresis on a 2% agarose gel. Total RNA in the amount of 300 ng was reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The resulting cDNA was subjected to real-time PCR analysis to measure the expression of mRNA genes *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2*, which encode ghrelin, GHS-R, phoenixin-14, GPR173, leptin, LEP-R, and nesfatin-1, respectively. *ACTB* and *RPS9* were used as housekeeping genes [56]. The primer sequences (see Table 1) were designed in Primer3web [57] and obtained from Genomed (Genomed, Warszawa, Poland). The primers for each qPCR amplicon were designed to span introns and were ideally located in different exons to prevent DNA amplification. Real-time PCR analysis was performed on a QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), utilizing RT PCR Mix SYBR Green with HiROX, according to the protocol (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). Each sample was subjected to three technical replicates for the reactions. The parameters were as follows: pre-run at 95 °C for 3 min, 45 cycles with a denaturation step at 95 °C for 15 s, annealing at 57 °C for 30 s and an extension step at 72 °C for 30 s. The amplicon efficiency was determined by analyzing the slope coefficient of the standard curve derived from serial dilutions of pooled cDNA ($E = \text{efficiency} (10^{[-1/\text{slope}]})$). Using the $-\Delta\Delta\text{CT}$ method, the relative expression of *GHRL*, *GHSR*, *SMIM20*, *GPR173*, *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2* genes was calculated [58].

Table 1. Primers used in the study.

Gene	Primer Sequences (5' to 3') ¹	Product Length (bp)	GeneBank Accession Number	qPCR Efficiency
<i>GHRL</i>	F: ¹³³ TCAGGCAGACTGAAGCCCCG R: ²²³ GGATTTCAGCTCGTCCTCTGC	91	NM_174067.2	1.98
<i>GHSR</i>	F: ⁶²² CGCTCCGGACTGCTCACAGT R: ⁸⁴² AAGGGCAGCCAGCAGAGGAT	221	NM_001143736.2	2.00
<i>SMIM20</i>	F: ²²⁹ GCCATAAATCGAGCTGGTAT R: ³⁷⁶ TGCTGCAGAACTGAAAGCAT	148	NM_001145428.1	1.96
<i>GPR173</i>	F: ⁸⁴³ GCAAGATTGTGGCCTTTATGGCTG R: ⁹⁶¹ CATGCGCTTGGCATAGAAG	119	NM_001015604.1	1.83
<i>LEP</i>	F: ⁴⁶ AAATGCGCTGTGGACCCCTGT R: ²⁴⁵ GAGCCAGGGATGAAGTCCAA	200	NM_173928.2	2.00
<i>LEPR</i>	F: ¹⁷⁸¹ AATCTGCCAGTCTCCAGTG R: ¹⁸⁹⁷ CAACTGTGTGGGCTGGAGTA	117	NM_001012285.2	1.97
<i>NUCB2</i>	F: ²⁷⁶ AAAAGCTCCAGAAAGCAGACA R: ³⁹³ GCCACTTCTTGCCTTTTCAG	118	NM_001075381.1	1.98
<i>ACTB</i>	F: ⁷⁹⁵ TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R: ⁹²⁷ AGGTAGTTTCGTGAATGCCG	133	NM_173979.3	2.02
<i>RPS9</i>	F: ¹²⁸ CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: ¹⁹¹ CCTCCAGACCTCACGTTTGTTT	64	NM_001101152.2	2.00

¹ The numbers indicate the position at which the respective primers bind to the target genes (bp in 5' to 3' direction).

4.3. Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using the Statistica software (v. 13.0, TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA), GraphPad Prism software (v. 10.1.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and R software, v. 4.3.1 [59]. To evaluate differences in mRNA expression across GIT sections, relative quantification data were log2 transformed for normalization, and the data normality was confirmed using the Shapiro–Wilk test. The data were analyzed using a two-way ANOVA, with the general linear model including each gene as a dependent variable and GIT segment, age, and their interaction as the independent effects. Model residuals were tested to validate the assumption of normality and homoscedasticity using QQ-plots, the Shapiro–Wilk test, and residual–fitted values plots. Tukey’s HSD post hoc test, as recommended by the GraphPad software, was applied for correction of multiple comparison tests using statistical hypothesis testing. A multiplicity-adjusted p -value < 0.01 was considered statistically significant, accounting for multiple comparisons against a family-wise alpha error threshold set to 0.01 (99% confidence interval). This stricter-than-usual threshold was chosen to limit the number of statistically significant findings. Additionally, Cohen’s d was used as an indicator of effect size of all significant differences in gene expression within specific GIT segments between calves and adults.

Correlation plots illustrating the expression patterns of the analyzed genes in GIT sections were generated using the corrplot package in R. Significant correlations are indicated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The heatmaps depicting gene expression data were produced using the pheatmap package in R, after scaling the fold change profiles of each gene individually using the z-score formula ($z\text{-score} = (\text{individual gene value} - \text{mean gene value})/\text{SD}$).

5. Conclusions

This study revealed consistent mRNA presence for all examined genes across various GIT segments in both calves and adult cattle, emphasizing their importance in GIT organs. Notable expression differences were observed between the two age groups, particularly in the rumen, omasum, jejunum, ileum, and colon, suggesting that peptide activity regulating food intake varies with developmental stages. In adults, heightened expression of *GHSR*, *GPR173*, *LEP*, and *NUCB2* in the small and large intestines implies they play a role in

nutrient absorption. Conversely, elevated levels of *LEP*, *LEPR*, and *NUCB2* in the omasum and rumen of calves underline their possible importance in the development of bovine forestomachs. The study also found that the expression of orexigenic peptides *GHRL* and *SMIM20* is not dependent on age, suggesting more uniform mechanisms for orexigenic processes compared to anorexigenic ones.

Author Contributions: Conceptualization, K.K. and M.B.A.; methodology, K.K. and K.R.-M.; software, S.M.; validation, K.R.-M. and S.M.; formal analysis, K.K.; investigation, K.K.; resources, K.K.; writing—original draft preparation, K.K.; writing—review and editing, M.B.A., S.M., K.R.-M., and K.K.; visualization, K.K. and S.M.; supervision, M.B.A.; funding acquisition, K.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by project no. WKN/MN-1/WET/22, provided by the University of Life Sciences in Lublin, Poland, for Katarzyna Kras.

Institutional Review Board Statement: Ethical approval from the Ethics Committee was not required for this study, as all procedures were conducted postmortem on carcasses from animals designated for commercial purposes and consumption and slaughtered using conventional methods in a slaughterhouse. The process of slaughter and all post-slaughter operations were carried out in accordance with Council Regulation (EC) No. 1099/2009 of 24 September 2009. The animals were immobilized, stunned with a mechanical device, and bled out by severing the jugular veins were waived for this study due to the post-mortem nature of material collection.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data will be made available on the request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cifuentes, L.; Acosta, A. Homeostatic regulation of food intake. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2022**, *46*, 101794. [\[CrossRef\]](#)
2. Konturek, S.J.; Konturek, J.W.; Pawlik, T.; Brzozowski, T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J. Physiol. Pharmacol.* **2004**, *55*, 137–154. [\[PubMed\]](#)
3. Székely, M.; Soós, S.; Pétervári, E.; Balaskó, M. Chapter 14—Nutritional Impact on Anabolic and Catabolic Signaling. In *Molecular Basis of Nutrition and Aging*; Malavolta, M., Mocchegiani, E., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 189–204. ISBN 978-0-12-801816-3.
4. Gershon, M.D.; Margolis, K.G. The gut, its microbiome, and the brain: Connections and communications. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, e143768. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Gonkowski, S. Aquaporins in the nervous structures supplying the digestive organs—A review. *Ann. Anim. Sci.* **2021**, *21*, 47–61. [\[CrossRef\]](#)
6. Kentish, S.J.; Page, A.J. The role of gastrointestinal vagal afferent fibres in obesity. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 775–786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Howick, K.; Griffin, B.T.; Cryan, J.F.; Schellekens, H. From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Yarandi, S.S.; Hebbard, G.; Sauer, C.G.; Cole, C.R.; Ziegler, T.R. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition* **2011**, *27*, 269–275. [\[CrossRef\]](#)
9. Wren, A.M.; Bloom, S.R. Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2116–2130. [\[CrossRef\]](#)
10. Zac-Varghese, S.; Tan, T.; Bloom, S.R. Hormonal interactions between gut and brain. *Discov. Med.* **2010**, *10*, 543–552.
11. Pałasz, A.; Rojczyk, E.; Bogus, K.; Worthington, J.J.; Wiaderkiewicz, R. The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* **2015**, *592*, 17–21. [\[CrossRef\]](#)
12. Herring, A.D. Beef Cattle. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*; Van Alfen, N.K., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 1–20. [\[CrossRef\]](#)
13. Hayashi, H.; Yamakado, M.; Yamaguchi, M.; Kozakai, T. Leptin and ghrelin expressions in the gastrointestinal tracts of calves and cows. *J. Vet. Med. Sci.* **2020**, *82*, 475–478. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. König, H.E.; Liebich, H.-C. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals. Textbook and Colour Atlas*; Schattauer: Stuttgart, Germany, 2014; pp. 375–384.
15. Prodanović, R.; Nedić, S.; Simeunović, P.; Borožan, S.; Nedić, S.; Bojkovski, J.; Kirovski, D.; Vujanac, I. Effects of chestnut tannins supplementation of prepartum moderate yielding dairy cows on metabolic health, antioxidant and colostrum indices. *Ann. Anim. Sci.* **2021**, *21*, 609–621. [\[CrossRef\]](#)

16. Tirado-González, D.; Tirado-Estrada, G.; Miranda-Romero, L.; Ramírez-Valverde, R.; Medina-Cuéllar, S.; Salem, A. Effects of Addition of Exogenous Fibrolytic Enzymes on Digestibility and Milk and Meat Production—A Systematic Review. *Ann. Anim. Sci.* **2021**, *21*, 1159–1192. [\[CrossRef\]](#)
17. Mazinani, M.; Memili, E.; Rude, B. Harnessing the Value of Rumen Protected Amino Acids to Enhance Animal Performance—A Review. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 43–62. [\[CrossRef\]](#)
18. Tyra, M.; Ropka-Molik, K.; Piórkowska, K.; Szyndler-Nędza, M.; Małopolska, M.; Babicz, M.; Mucha, A.; Żak, G.; Eckert, R. Association of ghrelin gene polymorphisms with slaughter traits in pig. *Ann. Anim. Sci.* **2023**, *23*, 431–437. [\[CrossRef\]](#)
19. Valassi, E.; Scacchi, M.; Cavagnini, F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2008**, *18*, 158–168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **1999**, *402*, 656–660. [\[CrossRef\]](#)
21. Zhu, X.; Cao, Y.; Voogd, K.; Steiner, D.F. On the processing of proghrelin to ghrelin. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38867–38870. [\[CrossRef\]](#)
22. Kojima, M.; Kangawa, K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 495–522. [\[CrossRef\]](#)
23. Pradhan, G.; Samson, S.L.; Sun, Y. Ghrelin: Much more than a hunger hormone. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2013**, *16*, 619–624. [\[CrossRef\]](#)
24. Cheung, C.K.; Wu, J.C. Role of ghrelin in the pathophysiology of gastrointestinal disease. *Gut and liver* **2013**, *7*, 505–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ding, Y.; Zhang, N.; Li, J.; Jin, Y.; Shao, B. Molecular cloning and expression of ghrelin in the hypothalamus-pituitary-gastrointestinal tract axis of the Yak (*Bos grunniens*) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Anat. Histol. Embryol.* **2018**, *47*, 583–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Zhang, M.; Zhu, X.; Xu, X.; Jin, X.; Bao, H.; Dugeer, S.; Du, C.; Cao, G.; Yang, Y. Molecular characterization and expression patterns of ghrelin in the reindeer (*Rangifer tarandus*). *Pol. J. Vet. Sci.* **2018**, *21*, 55–64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Huang, Z.G.; Xiong, L.; Liu, Z.S.; Qiao, Y.; Dai, R.; Xie, Z.; Liu, S.R.; Shi, G.Q.; Liu, G.Q. The tissue distribution and developmental changes of ghrelin mRNA expression in sheep. *Acta Genet. Sin.* **2006**, *33*, 808–813. [\[CrossRef\]](#)
28. Wang, W.; Cheng, L.; Guo, J.; Ma, Y.; Li, F. Expression of Ghrelin in gastrointestinal tract and the effect of early weaning on Ghrelin expression in lambs. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 909–914. [\[CrossRef\]](#)
29. Ueberberg, B.; Unger, N.; Saeger, W.; Mann, K.; Petersenn, S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm. Metab. Res.* **2009**, *41*, 814–821. [\[CrossRef\]](#)
30. Dall’aglio, C.; Zannoni, A.; Forni, M.; Bacci, M.L.; Ceccarelli, P.; Boiti, C. Orexin system expression in the gastrointestinal tract of pigs. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *95*, 8–14. [\[CrossRef\]](#)
31. Morash, M.G.; Gagnon, J.; Nelson, S.; Anini, Y. Tissue distribution and effects of fasting and obesity on the ghrelin axis in mice. *Regul. Pept.* **2010**, *163*, 62–73. [\[CrossRef\]](#)
32. Okuhara, Y.; Kaiya, H.; Teraoka, H.; Kitazawa, T. Structural determination, distribution, and physiological actions of ghrelin in the guinea pig. *Peptides* **2018**, *99*, 70–81. [\[CrossRef\]](#)
33. Sun, W.; Cheng, C.; Liu, R.; Chen, Y.; Zeng, K.; Chen, X.; Gu, Y.; Li, J.; Lv, X.; Gao, R. Expression patterns of GHRL, GHSR, LEP, LEPR, SST and CCK genes in the gastrointestinal tissues of Tibetan and Yorkshire pigs. *Czech J. Anim. Sci.* **2019**, *64*, 239–247. [\[CrossRef\]](#)
34. Kitazawa, T.; Nakamura, T.; Saeki, A.; Teraoka, H.; Hiraga, T.; Kaiya, H. Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides* **2011**, *32*, 1876–1886. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Fan, X.T.; Tian, Z.; Li, S.Z.; Zhai, T.; Liu, J.L.; Wang, R.; Zhang, C.S.; Wang, L.X.; Yuan, J.H.; Zhou, Y.; et al. Ghrelin Receptor Is Required for the Effect of Nesfatin-1 on Glucose Metabolism. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 633. [\[CrossRef\]](#)
36. Rupp, S.K.; Wölk, E.; Stengel, A. Nesfatin-1 Receptor: Distribution, Signaling and Increasing Evidence for a G Protein-Coupled Receptor—A Systematic Review. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 740174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Chen, X.; Dong, J.; Jiao, Q.; Du, X.; Bi, M.; Jiang, H. “Sibling” battle or harmony: Crosstalk between nesfatin-1 and ghrelin. *Cell Mol. Life Sci.* **2022**, *79*, 169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kras, K.; Muszyński, S.; Tomaszewska, E.; Arciszewski, M.B. Minireview: Peripheral Nesfatin-1 in Regulation of the Gut Activity—15 Years since the Discovery. *Animals* **2022**, *12*, 101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Prinz, P.; Stengel, A. Expression and regulation of peripheral NUCB2/nesfatin-1. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016**, *31*, 25–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Diao, Q.; Zhang, R.; Fu, T. Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals* **2019**, *9*, 490. [\[CrossRef\]](#)
41. Pan, W.; Hsuchou, H.; Kastin, A.J. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* **2007**, *28*, 2223–2228. [\[CrossRef\]](#)
42. Zhang, F.; Chen, Y.; Heiman, M.; Dimarchi, R. Leptin: Structure, function and biology. *Vitam. Horm.* **2005**, *71*, 345–372. [\[CrossRef\]](#)
43. Chelikani, P.K.; Glimm, D.R.; Kennelly, J.J. Short communication: Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 2369–2372. [\[CrossRef\]](#)
44. Yonekura, S.; Kitade, K.; Furukawa, G.; Takahashi, K.; Katsumata, N.; Katoh, K.; Obara, Y. Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2002**, *22*, 25–35. [\[CrossRef\]](#)

45. Alam, T.; Kenny, D.A.; Sweeney, T.; Buckley, F.; Prendiville, R.; McGee, M.; Waters, S.M. Expression of genes involved in energy homeostasis in the duodenum and liver of Holstein-Friesian and Jersey cows and their F(1) hybrid. *Physiol. Genomics* **2012**, *44*, 198–209. [CrossRef]
46. Bado, A.; Levasseur, S.; Attoub, S.; Kermorgant, S.; Laigneau, J.P.; Bortoluzzi, M.N.; Moizo, L.; Lehy, T.; Guerre-Millo, M.; Le Marchand-Brustel, Y.; et al. The stomach is a source of leptin. *Nature* **1998**, *394*, 790–793. [CrossRef]
47. Mix, H.; Widjaja, A.; Jandl, O.; Cornberg, M.; Kaul, A.; Göke, M.; Beil, W.; Kuske, M.; Brabant, G.; Manns, M.P.; et al. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut* **2000**, *47*, 481–486. [CrossRef]
48. Gorska, E.; Popko, K.; Stelmaszczyk-Emmel, A.; Ciepiela, O.; Kucharska, A.; Wasik, M. Leptin receptors. *Eur. J. Med. Res.* **2010**, *15* (Suppl. S2), 50–54. [CrossRef]
49. Morton, N.M.; Emilsson, V.; Liu, Y.L.; Cawthorne, M.A. Leptin action in intestinal cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26194–26201. [CrossRef]
50. Schalla, M.A.; Stengel, A. Phoenixin—A Pleiotropic Gut-Brain Peptide. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1726. [CrossRef]
51. Rosenbaum, D.M.; Rasmussen, S.G.; Kobilka, B.K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2009**, *459*, 356–363. [CrossRef]
52. González-Montaña, J.R.; Escalera-Valente, F.; Alonso, A.J.; Lomillos, J.M.; Robles, R.; Alonso, M.E. Relationship between Vitamin B12 and Cobalt Metabolism in Domestic Ruminant: An Update. *Animals* **2020**, *10*, 1855. [CrossRef]
53. Kizilaslan, M.; Arzik, Y.; Cinar, M.; Konca, Y. Genome-wise engineering of ruminant nutrition—Nutrigenomics: Applications, challenges, and future perspectives—A review. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 511–521. [CrossRef]
54. Allen, M.S.; Bradford, B.J.; Harvatine, K.J. The cow as a model to study food intake regulation. *Annu. Rev. Nutr.* **2005**, *25*, 523–547. [CrossRef] [PubMed]
55. Włodarczyk, R.; Budvytis, M. Proper nutrition for high yielding cows - how to fully utilize their production potential. [*Życie Weter.* **2011**, *86*, 771–776. (In Polish)
56. Janovick-Guretzky, N.A.; Dann, H.N.; Carlson, D.B.; Murphy, M.R.; Loor, J.J.; Drackley, J.K. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2246–2252. [CrossRef] [PubMed]
57. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [CrossRef]
58. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [CrossRef]
59. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2023; Available online: <https://www.R-project.org> (accessed on 30 December 2023).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

RESEARCH

Open Access



Immunolocalization and quantification of the phoenixin and GPR173 in the gastrointestinal tract of Holstein–Friesian bulls

Katarzyna Kras^{1*}, Cezary Osiak-Wicha¹ and Marcin B. Arciszewski¹

Abstract

Phoenixin (PNX), well-conserved but newly discovered neuropeptide, is involved in various physiological processes, such as food intake, cardiovascular functions, reproductive functions, and stress regulation. PNX is the predicted ligand of GPR173 receptor, but due to its relatively recent discovery in 2013, there is a lack of studies describing the exact mechanism of action of the peptide. In addition, the protein was not been well-studied in specific organs, particularly in the gastrointestinal tract (GIT) of ruminants, including domestic cattle, which are among the world's main livestock animals. Therefore, this study aimed to investigate the immunolocalization and quantification of PNX and GPR173 in the GIT of domestic cattle. Study material, including GIT sections of two age groups, calves and adult bulls ($n=6$ per group), was obtained from a slaughterhouse. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemical (IHC) analyses were performed. Analyses revealed low levels of PNX in the GIT of both age groups, with localization restricted to epithelial cells across all examined GIT segments, with statistically significant differences between age groups and GIT segments, which may result from the delayed development of forestomachs in calves. On the other hand, GPR173 levels were shown to be higher than those of PNX and to have a wider distribution extending beyond the epithelium to the blood vessels wall and the intrinsic nervous system. This may suggest that PNX is not the only ligand for this receptor. Overall, the results may suggest that both PNX and GPR173 could possibly play protective roles related to the immune response, regulate digestive and absorptive functions, and due to receptor presence in nerve fibres, may play a role in regulating GIT secretion and motility. These findings could potentially facilitate further research into the therapeutic potential of targeting PNX and GPR173 in managing gastrointestinal disorders in domestic cattle and other species, and can also be further used for experimental, clinical or pharmacological research into the treatment of eating disorders not only in humans, but also in farm animals.

Keywords Cattle, Developmental metabolism, GPCR, PNX, Polygastric animals, Ruminants, SMIM20

Background

Phoenixin (PNX), although likely one of the oldest neuropeptides, has only recently been identified and has sparked significant interest due to its wide-ranging physiological roles and highly conserved structure across species [1, 2]. PNX is derived from the enzymatic cleavage of small integral membrane protein 20 (SMIM20), a precursor protein encoded by the *SMIM20* gene. This cleavage

*Correspondence:

Katarzyna Kras
katarzyna.kras@up.lublin.pl

¹ Department of Animal Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-950 Lublin, Poland



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

results in the production of two primary isoforms: PNx-14, which is 14 amino acids long, and PNx-20, which consists of 20 amino acids [2, 3]. *SMIM20* mRNA expression has been extensively investigated in both central and peripheral tissues, including the gastrointestinal tract (GIT), heart, and lungs. Notably, the highest expression levels were found in the hypothalamus, followed by the heart, with lower levels detected in other organs [2, 4]. The detection of PNx in various species, such as humans, rodents, pigs, cattle, and chickens, coupled with its highly conserved structure, particularly in mammals, suggests a crucial biological role for this peptide [5].

Discovered in 2013 by Yosten et al. through a bioinformatic approach [2], PNx has been implicated in various regulatory functions within the body. This peptide is particularly notable for its involvement in critical processes such as stimulating food intake [6], reproductive function by controlling hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis [7, 8], and cardiovascular regulation [9] (for the review see [5, 10]). As research into PNx progresses, its potential impact on different bodily systems is becoming more evident, with emerging studies highlighting its roles in mental health, including anxiety and depression [11, 12]. Nevertheless, the functional repertoire of PNx is expanding as new roles are continuously uncovered. However, the role of PNx in the GIT remains elusive due to the scarcity of related research. It is known that *SMIM20* mRNA is present in the GIT of domestic cattle [13], and the localization of PNx in the GIT has also been described in other species [4]. Mukherjee and Unniappan identified the presence of PNx in endocrine cells of the stomach and intestines, providing a basis for the hypothesis that PNx is another GIT hormone [14]. Additionally, it has been determined that PNx alone cannot cross the blood-brain barrier [15]. While it is true that the existence of a transporter to make this possible is postulated, it may also suggest that PNx produced by GIT cells likely serves yet unidentified local functions, independent of its role in the central nervous system (CNS). Preliminary findings suggest a protective role for PNx against duodenal ulcers [16], and its regulatory role in the gastric cells on the expression of hormones such as ghrelin [14], but other confirmed functions of the peptide in this system are not known.

PNx exerts its effects probably through the GPR173 receptor, also known as the super-conserved receptor expressed in the brain 3 (SREB3), which is part of the extensive family of G protein-coupled receptors (GPCRs). Localization studies of GPR173 have confirmed its presence in the hypothalamus, pituitary gland, and ovaries, supporting its association with the HPG axis, where PNx serves a regulatory function [5, 8, 11]. Importantly for this study, the presence of the receptor has previously

been detected also in the stomach and small intestine of mice, further supporting the hypothesis that PNx may act locally in the GIT via GPR173. Additionally, GPR173 is expressed in the heart, skin, and pancreas [17].

Despite the detection of *SMIM20* and *GPR173* mRNA across all segments of the GIT in both calves and adult cattle [13], there is a notable gap in our understanding of the actual presence and immunolocalization of the PNx peptide and GPR173 protein in these tissues. This study aims to address the gap in knowledge by investigating the immunolocalization and quantification of PNx and its putative receptor GPR173 in distinct segments of the GIT in calves and adult cattle. Based on the known presence of *SMIM20* mRNA in the ruminant GIT, we hypothesize that PNx and GPR173 are localized in distinct patterns and that their expression levels vary between calves and adults, reflecting developmental differences in metabolic activity and GIT function. We specifically anticipate higher expression in segments showing higher age-dependent metabolic activity, such as the rumen in adults and the abomasum in calves, which may suggest specialized roles in digestion and nutrient absorption during different developmental stages. Understanding these patterns could provide valuable insights into the functional roles of PNx and GPR173 in ruminant physiology and inform strategies for optimizing nutrition and health in livestock.

Results

PNx and GPR173 immunolocalization

Forestomach: rumen, reticulum, and omasum

In the forestomach compartments, both PNx and GPR173 exhibited specific and distinct localization patterns. PNx immunoreactivity (IR) was restricted to the mucosal epithelium in all three compartments. In the rumen, reticulum, and omasum, PNx was observed in the cytoplasm of epithelial cells (Fig. 1). The semi-quantitative analysis revealed that the strongest reaction occurred in the reticulum (Fig. 2a). Moreover, a clear intergroup difference in reaction intensity was observed, with the reaction being more intense in adults within the omasum.

For GPR173, the receptor was present in the mucosal epithelium as granular structures occupying significant areas of the cytoplasm and single nuclei in all of the forestomach compartments (Fig. 3). GPR173 was also detected in the blood vessels (Fig. 3). Here, it appeared as dispersed granules forming occasional fibre-like arrangements within the vessel walls, with variable intensities across different vessels. Notably, the rumen lacked receptor localization in endothelial cells, in contrast with the reticulum and omasum. Moreover, IR was not observed in every vessel. The semi-quantitative analysis

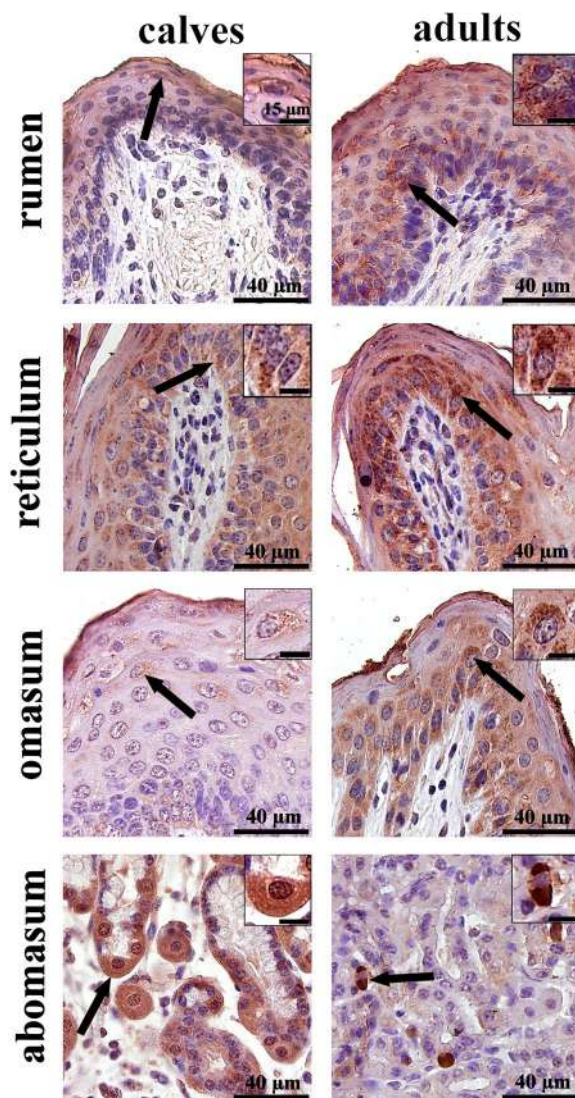


Fig. 1 Immunolocalization of phenixin (PNX) in the stomach of domestic cattle. Immunoreactions in the rumen, reticulum, omasum and abomasum in calves and adult domestic cattle. Black arrow indicate immunoreaction in the epithelial cell. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 µm for the main image and 15 µm for the magnified reaction inset

demonstrated the highest IR of GPR173 in the mucosa, with similar levels observed in both groups (Fig. 2b-d). In the remaining layers, the immunoexpression levels were consistent across segments.

Abomasum

In the abomasum, PNX-IR was primarily observed in the cytoplasm and nuclei of epithelial cells (Fig. 1). The semi-quantitative analysis revealed a higher level of reaction in calves compared to adults (Fig. 2a). GPR173 receptor localization in the abomasum was present in glandular

epithelial cells, affecting the cytoplasm and single nuclei (Fig. 3). The receptor was found as either diffuse or focal granular structures. Additionally, blood vessels in the abomasum showed GPR173 localization throughout their walls, including the endothelium, although the intensity and coverage varied among different vessels, and not all vessels were found to have IR (Fig. 3). The semi-quantitative analysis demonstrated a lower level of GPR173 immunoexpression in the mucosa of the abomasum compared to the forestomachs (Fig. 2b). The reaction in the remaining layers of the abomasum was consistent with that observed in other GIT segments. No noticeable differences were found between the groups (Fig. 2b-d).

Small intestine: duodenum, jejunum, and ileum

In the small intestine, PNX-IR and GPR173 receptor localization were consistent across the duodenum, jejunum, and ileum. PNX-positive cells were infrequent and often appeared as single cells in the glandular epithelium (Fig. 4). In the duodenum, jejunum and ileum, IR localization was similar, with a predominantly cytoplasmic distribution, whereas in the duodenum, IR was also observed in the duodenal glands. The semi-quantitative analysis of immunoexpression did not reveal clear inter-group differences, but it was noticeable that the level of reaction in the intestines was lower than in the stomach (Fig. 2a).

For GPR173, the receptor was intensely localized in the mucosal epithelium and lamina propria (Fig. 5). In the duodenum, the cells exhibited strong granular localization in the cytoplasm and nucleus. The jejunum and ileum exhibited similar patterns, with the receptor present in both the cytoplasm and nuclei of glandular epithelial cells and lamina propria cells in both age groups. The blood vessels across these sections showed GPR173 localization throughout their walls, including the endothelium, although IR was not found in every vessel (Fig. 5). The semi-quantitative analysis revealed that the reaction was very consistent both between groups and intestinal segments (Fig. 2b-d). Among the three layers, the highest IR level of GPR173 was observed in the sub-mucosal layer.

Large intestine: colon

In the colon, PNX and GPR173 localization mirrored that observed in the small intestine. PNX-positive cells were located in the glandular epithelium and showed a sparse cytoplasmic distribution similar to that in the small intestine (Fig. 4). In this section, PNX-IR cells were also noted in the lamina propria between the glands. GPR173 receptor localization in the colonic mucosa was evident in the cytoplasm and nuclei of glandular epithelial cells, as well as in lamina propria cells, which was consistent

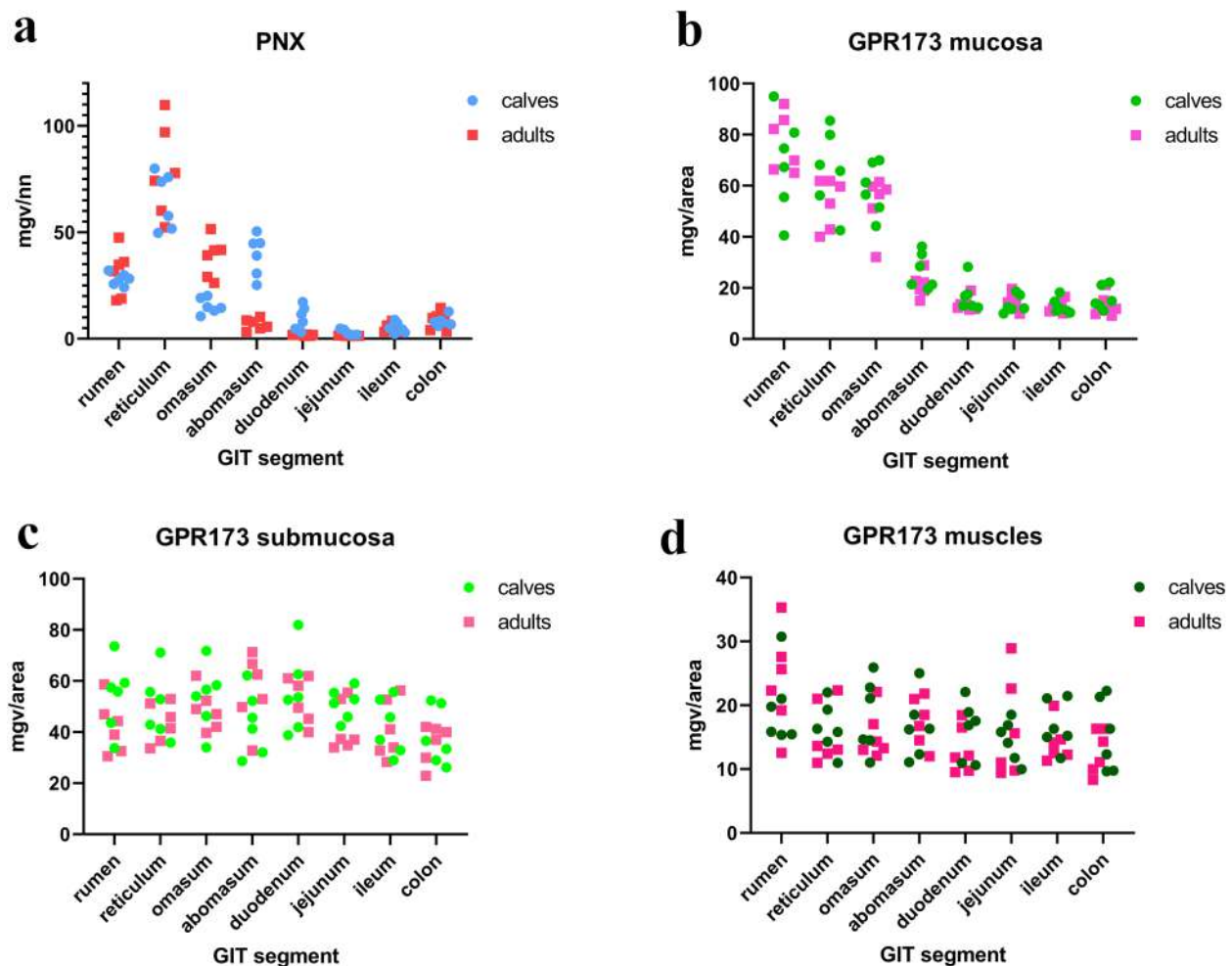


Fig. 2 Semi-quantitative determination of immunohistochemistry (IHC) reactions. **a** Immunoexpression of phenoxin (PNX) expressed as the ratio of mean gray value (mgv) to nuclei number (nn) in the gastrointestinal tract (GIT) of cattle calves (dots) and adults (squares). **b-d** Immunoexpression of GPR173 expressed as the mgv-to-area ratio in the GIT of cattle calves (dots) and adults (squares), measured in the mucosal layer (**b**), submucosal layer (**c**), and muscular layer (**d**)

with the patterns observed in the jejunum and ileum (Fig. 5). The blood vessels in the colon exhibited strong receptor localization throughout their walls, including the endothelium, similar to other intestinal sections (Fig. 5). The semi-quantitative analysis showed a similar reaction to that observed in the small intestine, indicating that it was consistent and highest in the submucosal layer (Fig. 2b-d).

Neuronal reactions

Throughout the GIT, GPR173 displayed prominent localization in the nerve fibres within both the submucosal and muscular plexuses (Figs. 3 and 5). These reactions were intense and uneven, affecting fibres encircling nerve ganglia and fibres within the muscular, submucosal, and mucosal layers. In the intestines, single neurons in the

small intestine and multiple neurons in the colon exhibited receptor localization.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

PNX

In calves, the reticulum and abomasum presented the highest concentration of PNX, with slightly lower, but not statistically significant, levels in the rumen (Fig. 6). Significantly lower concentrations were detected in the omasum, duodenum, jejunum, ileum, and colon relative to the reticulum and abomasum, with the ileum and colon showing the lowest levels of PNX. Significant differences were identified between the following segments: rumen and omasum ($P=0.007$), rumen and ileum ($P=0.003$), rumen and colon ($P<0.001$), reticulum and omasum ($P<0.001$), reticulum and duodenum ($P=0.043$), reticulum and jejunum ($P=0.014$), reticulum

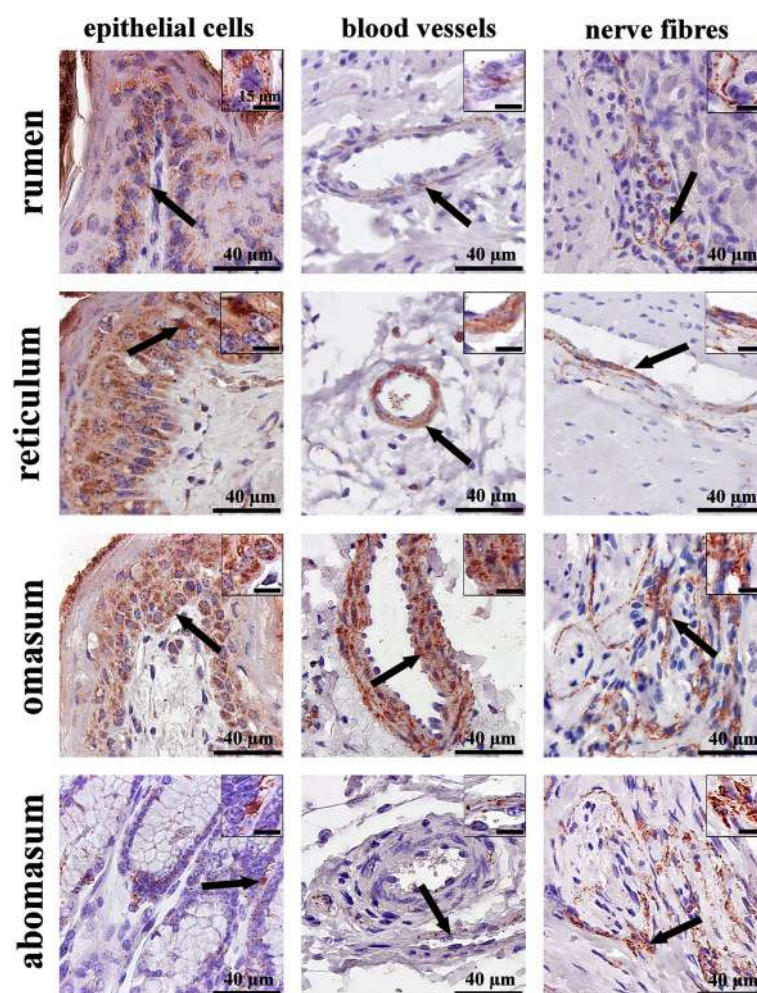


Fig. 3 Immunolocalization of GPR173 in the stomach of domestic cattle. Immunoreactions in the rumen, reticulum, omasum and abomasum in calves and adult domestic cattle. Black arrow indicate immunoreaction in the epithelial cell, blood vessels, and nerve fibres. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 µm for the main image and 15 µm for the magnified reaction inset

and ileum ($P < 0.001$), reticulum and colon ($P < 0.001$), omasum and abomasum ($P < 0.001$), omasum and duodenum ($P = 0.024$), abomasum and duodenum ($P = 0.047$), abomasum and jejunum ($P = 0.021$), abomasum and ileum ($P < 0.001$), abomasum and colon ($P < 0.001$), duodenum and ileum ($P = 0.011$), duodenum and colon ($P = 0.003$), jejunum and ileum ($P = 0.044$), and jejunum and colon ($P = 0.008$).

In adult cattle, PNx levels were highest in the reticulum, followed by the rumen and omasum (Fig. 6). The remaining GIT segments presented similar to one another, yet low PNx concentrations. Statistically significant differences were detected between the rumen and other segments (rumen vs. reticulum ($P = 0.05$) and $P < 0.001$ for comparisons with the remaining segments), the reticulum and other segments ($P < 0.001$) and the omasum and other segments ($P < 0.001$).

Comparative analysis between calves and adults revealed significantly higher PNx levels in adults within the rumen, reticulum and omasum ($P < 0.001$) but in calves within the abomasum, duodenum, jejunum, and colon ($P = 0.005$ for the colon and $P < 0.001$ for the abomasum, duodenum, and jejunum) (Fig. 6).

GPR173

In calves, the rumen presented the highest concentration of GPR173, with slightly lower, yet not statistically significant, levels observed in the reticulum, omasum, and abomasum (Fig. 7). The lowest concentrations were found in the intestines. Significant differences in GPR173 levels were identified between the following segments: the rumen and duodenum ($P = 0.002$), the rumen and jejunum ($P < 0.001$), the rumen and ileum ($P = 0.016$), the

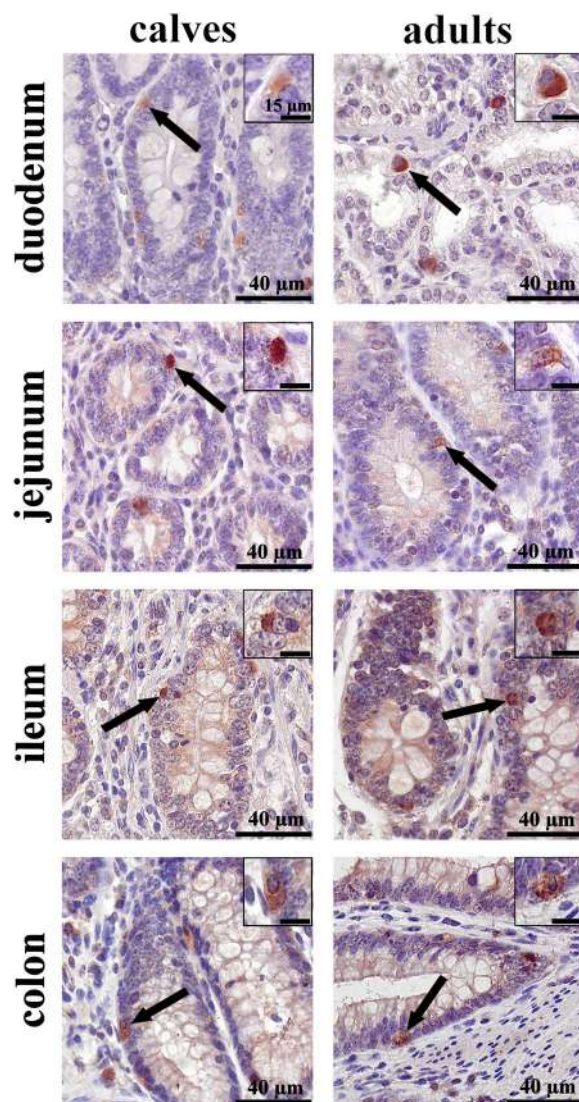


Fig. 4 Immunolocalization of phenixin (PNX) in the intestines of domestic cattle. Immunoreactions in the duodenum, jejunum, ileum and colon in calves and adult domestic cattle. Black arrow indicate immunoreaction in the epithelial cells. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 µm for the main image and 15 µm for the magnified reaction inset

rumen and colon ($P=0.010$), and the omasum and jejunum ($P=0.023$).

In adult cattle, the omasum presented the highest concentration of GPR173, followed by the reticulum, abomasum, and duodenum, with no significant differences among them (Fig. 7). The remaining segments of the GIT presented the lowest levels of GPR173. Significant differences were noted between the following segments: the rumen and omasum ($P=0.004$), the reticulum and jejunum ($P=0.005$), the reticulum and ileum ($P=0.007$), the

omasum and jejunum ($P<0.001$), the omasum and ileum ($P<0.001$), and the omasum and colon ($P=0.005$).

Comparative analysis between age groups revealed a significant difference in GPR173 levels in the duodenum, with adults exhibiting higher levels than calves ($P=0.018$) (Fig. 7).

Discussion

The findings from this study provide a novel and comprehensive analysis of the immunolocalization and levels of PNx and its receptor GPR173 across various segments of the bulls GIT in both calves and adult cattle. This is the first study to localize and quantify the levels of PNx and GPR173 in multiple GIT segments of cattle across different age groups. The differential expression patterns observed suggest potential roles for these molecules in bulls GIT physiology and possibly reveal age-related differences in their regulatory mechanisms. Semi-quantitative IHC analysis revealed an immunoexpression pattern similar to that observed in ELISA. However, any observed differences in the case of GPR173 were attributable to the receptor's immunoexpression being present in three distinct layers of the GIT: the mucosa, submucosa, and muscular layers. The level of reaction differed slightly among these layers.

The levels of PNx were higher in calves compared to adults in all segments except the forestomachs, where adults had greater concentrations. While this pattern may provide insights into the potential roles of PNx, it remains speculative. The limited activity of the rumen, reticulum, and omasum in calves, which gradually develop their functions with the introduction of solid feed, may explain the differential expression between age groups. It is possible that PNx plays a role in food processing, as suggested by its presence in premetazoans where it is believed to influence food intake [1, 18]. However, our data are not sufficient to fully support this function, and further studies are needed to better understand the peptide's role in the forestomachs of calves. These findings might suggest that PNx contributes to the early development of these compartments [19]; however, no direct evidence from our or previous studies supports this. Based on previous research, PNx has been shown to play a role in regulating food intake and homeostatic processes, primarily through its central effects in the hypothalamus, where it influences meal size and duration by potentially reducing satiation [6]. Additionally, studies report that PNx can be produced peripherally in the gut and pancreas, raising the possibility that it may also signal locally to regulate digestive functions, immune responses, or glucose metabolism [20]. In our study, the higher levels of PNx observed in calves compared to adults, particularly in the abomasum

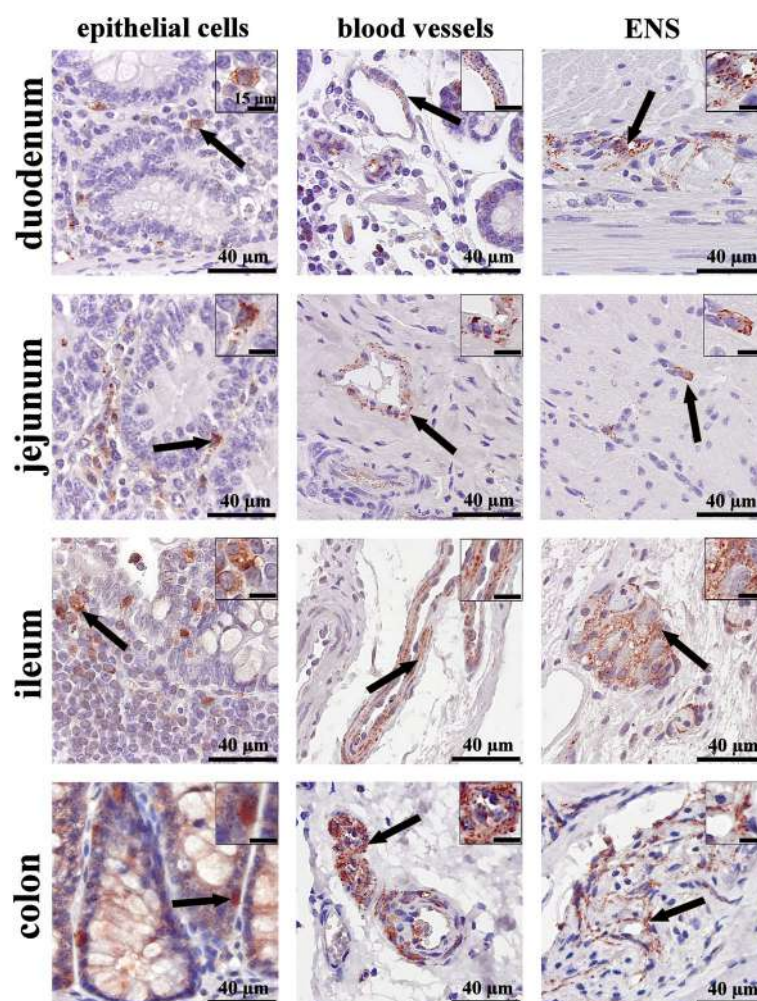


Fig. 5 Immunolocalization of GPR173 in the intestines of domestic cattle. Immunolocalization in the duodenum, jejunum, ileum and colon in calves and adult domestic cattle. Black arrow indicate immunoreaction in the epithelial cell, blood vessels, and enteric nervous system (ENS). In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 µm for the main image and 15 µm for the magnified reaction inset

and intestines, suggest that PNx might contribute to the early development of the GIT [19]. While direct evidence of PNx's role in GIT development remains unknown, these observations, combined with its known central effects and peripheral presence, warrant further investigation into its possible contributions to digestive maturation in calves. The higher levels of PNx observed in the rumen, reticulum, and omasum of adult cattle may suggest involvement in processes such as microbial fermentation and nutrient absorption, which require mucosal protection and regulation. While this is assumptive, PNx could theoretically help maintain mucosal integrity and manage inflammation associated with microbial activity, as suggested by studies like those of Zandeh-Rahimi et al. in 2022 [16]. Their work demonstrated protective effects of exogenous PNx against gastrointestinal stress in a rat model, however the much lower endogenous levels

of PNx analysed in the bulls' GIT in our study suggest that such protective benefits may not be as pronounced in cattle. Therefore, it remains tentative whether PNx confers similar protective effects in cattle at physiological levels, and further research is needed to better understand its role.

There are no studies available on the levels of PNx in segments of the GIT in cattle. However, a study conducted in rats by the discoverers of PNx demonstrated the highest levels in the stomach, followed by the jejunum, duodenum, ileum, and colon [2]. Furthermore, the protein levels are consistent with those reported in our previous study assessing the mRNA levels of the PNx precursor SMIM20, as *SMIM20* mRNA was most abundant in the rumen and reticulum [13]. Notably, the discrepancy between mRNA and protein levels is highlighted by the lack of statistically significant differences

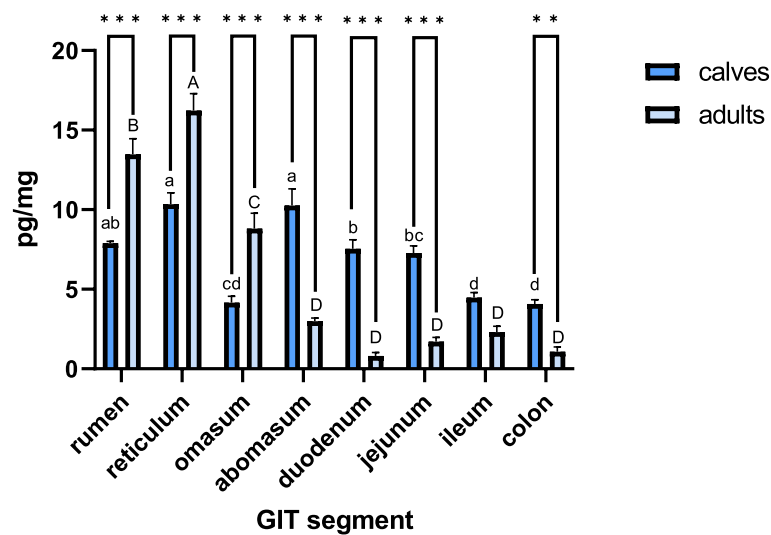


Fig. 6 Phenixin concentration [pg/mg total protein] in the gastrointestinal tract (GIT) of calves and adult cattle. Different lowercase letters denote significant differences between GIT segments in calves, whereas different uppercase letters denote significant differences between GIT segments in adults ($p < 0.05$). The asterisks (*) highlight significant differences in the phenixin-14 concentration between calves and adults within a specific GIT segment (** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$)

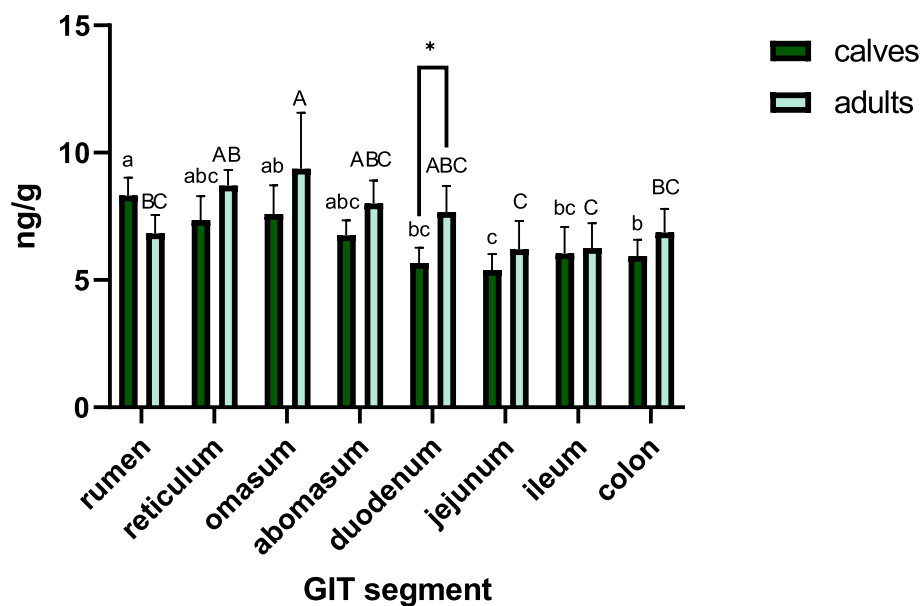


Fig. 7 GPR173 concentration [ng/mg total protein] in the gastrointestinal tract (GIT) of calves and adult cattle. Different lowercase letters denote significant differences between GIT segments in calves, whereas different uppercase letters denote significant differences between GIT segments in adults ($p < 0.05$). The asterisk (*) highlights significant differences in the GPR173 concentration between calves and adults within a specific GIT segment ($p < 0.05$)

in mRNA levels between adult individuals and calves [13], despite differences observed at the protein level. This is due to post-transcriptional and translational regulatory processes that regulate protein expression. Therefore, it has been estimated that the correlation

between mRNA and protein expression levels is often characterized by low explanatory power [21, 22].

Immunolocalization of PNX was observed exclusively in the mucosa of all sections of the GIT in relatively small amounts (approximately 1 IR cell per 100

cells in most cases). This supports the notion that it does not play significant roles in the cattle GIT. On the other hand, while the levels of PNx detected in the bovine GIT are relatively low, this does not necessarily imply that its role is insignificant. The small amounts of PNx could be due to the small size of the peptide; nevertheless, it is possible that even low concentrations can exert significant biological effects. For example, interleukin-6, a cytokine known for its crucial role in inflammation and immune responses, also exists at low concentrations but has profound impacts on physiological processes [23]. This suggests that even small amounts of PNx could play important roles in maintaining gut health and regulating various functions within the GIT. An alternative explanation is that PNx is secreted under specific conditions, such as during stress or inflammation, as referenced in previous studies [16, 24]. Furthermore, considering that PNx is an orexigenic peptide that stimulates appetite [15], its levels would typically be expected to rise in response to fasting. However, the low levels observed in our fasted animals may suggest that lower levels of PNx are typical for ruminants, or its role in appetite control may be less pronounced compared to monogastric animals.

An immunolocalization study of PNx in the rat GIT demonstrated the presence of PNx between the intestinal glands and the lamina propria of the mucosa but not in epithelial cells. Interestingly, no IR was detected in the stomach or colon [4]. A subsequent study on mice demonstrated localization in epithelial cells in both the stomach and the small intestine [14]. Our study differs from the aforementioned research, as we observed an IR in all examined segments of the GIT, from the stomach to the colon. Additionally, we noted PNx-IR in the intestinal glands, as well as an IR between the glands in the colon. This particular localization in the lamina propria suggests that PNx may be potentially involved in immune functions, as it is located in areas populated by cells usually responsible for the immune response [25]. These species-specific differences in PNx localization suggest that its role in the GIT may vary significantly between species. Again, the observed differences could be attributed to distinct physiological and anatomical characteristics between monogastric animals, such as rats, and polygastric animals, such as cattle, particularly with regard to their digestive systems and microbial interactions. Additionally, the presence of PNx in immune-related regions in cattle, but not in rats, raises questions about its involvement in immune functions, specifically in ruminants. Given these observed discrepancies in the research, further exploration of this topic is clearly needed. Conducting additional analyses involving other

species will be essential to deepen our understanding and address the existing knowledge gaps.

GPR173 showed distinct localization patterns throughout the entire GIT, particularly in the nerve fibres within both the submucosal and muscular plexuses. The prominent localization of GPR173 in neural tissues suggests that it plays a significant role in modulating gut motility and neural signalling. The uneven reactions of GPR173 in nerve fibres suggest that its activity might be finely tuned to specific physiological conditions, contributing to the adaptive responses of the GIT to various stimuli. Additionally, immunoreactivity was incidentally present in individual neurons of the intestines, indicating non-uniform localization of the receptor. This finding aligns with the established roles of GPCRs in the enteric nervous system, where they modulate various aspects of gut motility and secretion [26]. Additionally, GPR173 was observed in epithelial cells, blood vessels, and possibly immune cells in the lamina propria. The granular presence of the receptor in these areas, coupled with the low levels of PNx, implies that GPR173 might interact with other ligands to fulfil its roles. The fact that GPR173 levels were much higher than PNx levels (PNx in pg/mg of total protein, whereas GPR173 in ng/mg of total protein) further support this notion. Notably, He et al. postulated that GPR173 is a receptor for CCK, which is known to be an important gastrointestinal hormone [27]. This hypothesis could account for the widespread distribution of GPR173 observed in our study. However, this remains a subject of debate, as a very recent study by Guerra et al. (preprint) challenges this proposition [28].

The age-related differences in GPR173 levels, particularly the higher levels in the duodenum of adults compared to calves, could reflect developmental changes in digestive physiology and nutrient absorption efficiency. The differential expression might be a potential adaptation to increased metabolic demands in adults. The localization of GPR173 aligns with the observations of Aleti et al., indicating that GPCR family receptors might mediate interactions between microbial metabolites and host cells and could be responsible for regulating the gut-immune-brain axis [29].

There are no other studies describing the immunolocalization of GPR173 in the bovine GIT. A related study has demonstrated its immunolocalization in the stomach and small intestine of mice. In that species, the pattern differs slightly from our findings, as the immunoexpression was restricted to epithelial cells [14]. Additionally, our study on the expression of *GPR173* mRNA in the bovine GIT revealed somewhat different expression patterns compared with the protein expression levels described in the present study. For both mRNA and protein, the highest levels were noted in the omasum. However, the mRNA

levels were much more variable between different sections compared to the protein levels, which were relatively consistent across various sections of the GIT [13].

Our observation that PNX and GPR173 are consistently present throughout the GIT may support their peripheral roles, possibly distinct from their central effects on food intake regulation. These findings align with those of Schalla et al. [15], who reported that PNX does not cross the blood–brain barrier *in vitro*, potentially indicating its localized action in peripheral tissues. This, in turn, may support the notion that peripheral PNX might not function as a gut–brain peptide, with its effects being confined to peripheral tissues rather than influencing CNS processes. Moreover, the documented challenges in inducing the expected orexigenic effect of PNX via intraperitoneal administration [5, 6] and the peptide's ability to stimulate insulin secretion [3] suggest that PNX's functional scope extends to metabolic regulation within the GIT. Intraperitoneal administration difficulties may arise from the challenges in ensuring effective delivery and bioavailability of PNX, possibly due to its rapid degradation or insufficient targeting of specific receptor sites within the GIT. This suggests that PNX's effects are highly context-dependent and may require precise delivery mechanisms to elicit significant biological responses. The peptide's ability to stimulate insulin secretion also points to a broader role in metabolic regulation, potentially influencing glucose homeostasis and energy balance within the GIT. This metabolic role may involve interactions with other gut hormones and regulatory peptides, further underscoring the complexity of PNX's functions beyond its primary sites of action. One study suggests that PNX regulates ghrelin expression in gastric cells [14], and another study indicates that PNX induced stimulation of food intake only during the light phase, which may also indicate an interaction with other regulatory peptides, in this case possibly with ghrelin [6].

One limitation of our study is that the available anti-phoenixin-14 antibodies and ELISA kits probably bind to all SMIM20 protein derivatives, so in addition to PNX-14, all our results also include PNX-20, and probably PNX-8 and PNX-5 [30]. However, to date, the differences in the action of both main isoforms (PNX-14 and -20) in the GIT are yet to be fully distinguished [14]. Additionally, since PNX has orexigenic properties and may be released during fasting, our exclusive use of fasted animals might not fully capture its role under normal feeding conditions, possibly underestimating its involvement in digestion or appetite regulation. Another limitation is the size of experimental groups, which may be considered small. The decision to use this sample size was influenced by the need to source all animals from the same farm to ensure consistent living conditions. Despite this, the study still

fills a gap in the information concerning the localization and levels of PNX and its receptor GPR173 in the GIT of domestic cattle. We believe that utilizing tissues from livestock processed in commercial slaughterhouses offers valuable insights for scientific research, complementing studies that use animals from controlled experimental settings. Unlike controlled experiments, tissues obtained from commercially culled animals allow researchers to examine physiological and biochemical parameters as they naturally occur under typical farming conditions. This approach provides practical benefits for the agricultural sector. Based on these results, further research is warranted in other species, as well as in domestic cattle.

Conclusion

In conclusion, despite the low concentration of PNX in the bovine GIT, it cannot be ruled out that it may play a significant role in digestive processes or the immune response. Conversely, GPR173 is more abundant, indicating that it may interact with other ligands and contribute to GIT functions through broader mechanisms. The complexities of their interactions and the context-dependent nature of their effects highlight the need for precise delivery mechanisms and a deeper understanding of their roles in bovine health and nutrition. The high levels of PNX in forestomachs, which are unique to ruminants, may indicate that PNX has important functions in polygastric animals.

Methods

Animals and tissue samples

This study involved healthy male Polish Holstein–Friesian cattle, including two distinct age groups: six adult animals aged 20–24 months, weighing 768 ± 46 kg, and six calves aged 7–8 months, weighing 218 ± 23 kg. All the subjects were sourced from a single farm, ensuring uniform living conditions, diet, and environmental factors. Both groups followed a semi-intensive feeding regimen, consisting of initial grazing on pasture followed by the total mixed ration feeding method, as described by Włodarczyk et al. in 2011 [31].

The number of animals required for this study was determined prior to conducting the experiment using Mead's resource equation approach [32, 33]. According to this heuristic, the error degrees of freedom df_{error} should be no lower than 10. In a mixed-effects model where age is the only two-level fixed factor (calves vs. adults) and no blocking or additional fixed effects are included, a total sample size of 12 animals (i.e., $n=6$ per group) yields $df_{\text{error}}=10$, which satisfies Mead's recommendation.

Tissue samples were collected at a local slaughterhouse. Prior to slaughter, the cattle were fasted for 18 h. Next, tissue sections were obtained from various segments of

the GIT, including the rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, and colon. Care was taken to include all layers of each GIT section in the excised samples. Immediately after collection, the tissues were rinsed with a physiological saline solution to remove any residual contents and contaminants. Part of the material designated for ELISA testing was immediately placed in liquid nitrogen and then transferred to -80°C , while samples intended for IHC studies were placed in buffered 4% formaldehyde.

Additionally, post-mortem examinations, conducted by the official veterinarian responsible for ante-mortem and post-mortem inspections, ensuring animals are fit for slaughter and their carcasses suitable for entry into the human food chain, confirmed the good health of the animals and revealed no pathologies within their digestive tracts, confirming the validity of the collected samples for this study. Given that tissue collection was conducted post-mortem, ethical review and approval by the Ethics Committee were not required under Polish law.

Tissue processing

Samples fixed for 24 h in formaldehyde were rinsed in tap water, dehydrated in an increasing ethanol series, cleared in xylene and infiltrated with paraffin. The fixed samples were then embedded in paraffin via a modular embedding centre (MYR EC-350, Casa Álvarez Material Científico SA, Madrid, Spain) and subsequently sliced into $5\text{ }\mu\text{m}$ -thick sections via a rotary microtome (HM 360, Microm, Walldorf, Germany). Every fifth slice was placed on SuperFrost® Plus slides (Thermo Scientific, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and stored in an incubator (CG Wamed, Warsaw, Poland) at 37°C for 12 h.

From each frozen sample, 100 mg was weighed and homogenized in phosphate-buffered saline (PBS, 0.1 M, $\text{pH}=7.3$) at a ratio of 1:9 (tissue:PBS). The homogenates were centrifuged at $12,000\times g$ for 10 min at 4°C to remove debris, and the supernatants were collected. The protein content was subsequently determined using Pierce BCA kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and expressed in $\mu\text{g/ml}$.

IHC

For this study, IHC analysis was carried out to detect PNX and GPR173 in the GIT tissues of calves and adult domestic cattle. The IHC analysis followed the protocol described by Osiak-Wicha et al., [34] with additional steps utilizing xylene for dewaxing the slides and rehydration in a descending concentration of ethyl alcohol. During the first day, using the sodium-citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, $\text{pH}=6.0$), heat-induced epitope retrieval was performed (8 min at 80°C , multicooker RMC-PM381-E Redmond, China), followed

by a 10-min incubation in 3% H_2O_2 . Next, after blocking in UltraVision Protein Block (5 min; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), an overnight incubation in 4°C with primary antibodies directed against PNX-14 and GPR173 was carried out (Table 1). Only one primary antibody per section was used. The specificity of the antibodies was evaluated through two methods: a negative control, where the primary antibodies were substituted with the antibody diluent, and a preabsorption experiment, where the primary antibodies were mixed with an excess of the target synthetic protein before incubation. Specificity of the anti-PNX-14 antibody was also previously characterized [2, 30]. These two types of control reactions for both primary antibodies were conducted according to the described protocol. The next day, the sections were incubated with a BrightVision two-step detection system of poly-HRP-anti-Ms/Rb IgG (ImmunoLogic WellMed B.V., Duiven, Netherlands; Table 1) for a total of 45 min, and immunostaining was performed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB substrate kit; ab64238; Abcam, Cambridge, UK). PBS was used to rinse the slides between each step. After DAB staining, the sections were washed with distilled water, counterstained with Meyer's hematoxylin (Patho, Mar-Four, Konstantynów Łódzki, Poland), washed with tap water for 10 min, dehydrated with ascending concentrations of ethyl alcohol, cleared with xylene, cover-slipped with Shandon Consul-Mount (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and dried in an incubator (CG Wamed, Warsaw, Poland) at 37°C for 12 h.

The stained slides were examined under a light microscope (BX-51 DSU, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital colour camera (DP-70, Olympus, Tokyo, Japan). High-resolution digital photographs were taken using Cell^M 2.3 software (Olympus cellSens Standard) under consistent lighting conditions and uniform settings for brightness and contrast by a single individual. No positive IR was observed in any of the control sections (Supplementary 1). The semi-quantitative method of IHC reaction analysis was applied according to the previously described protocol [35] using the ImageJ 1.52 software [36]. For the analysis of PNX, measurements were performed by dividing the obtained *mean gray value* by the number of cell nuclei. To improve accuracy, a modification to the protocol was introduced, and cell nuclei were manually counted using the "multipoint" tool. In the case of GPR173, the reaction was observed not only in the mucosa but also in the submucosa and muscularis layers, prompting measurements to be divided among these three sections. Additionally, the reaction in this case was detected also outside the cell body. Thus, the results were presented as the ratio of the *mean gray value* to the analysed area, calculated using the "polygon selections" tool.

Table 1 Primary and secondary antibodies used in the study

Antibody	Host	Catalog number	Dilution	Manufacturer
Primary antibody				
Anti – phoenixin-14 amide	rabbit	H-079–01	1:200	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, US
Anti-GPR173	rabbit	PA5-33,664	8.4 µg/mL	Thermo Scientific, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany
Secondary antibody				
Anti-mouse/Anti-rabbit	goat	DPVB-HRP	RTU ^a	Immunologic, Duiven, Netherlands

^a RTU Ready To Use

ELISA

PNX and GPR173 levels were determined in duplicate using commercially available kits (EH4521, FineTest, Wuhan, China – PNX-14; MBS9330587, MyBioSource, San Diego, CA, USA – GPR173) according to the manufacturer's protocol. The absorbance values were measured using the Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). The intra-assay coefficient of variation did not exceed 8% in either measurement, inter-assay coefficient of variation did not exceed 10%, and the sensitivity of the kits was 0.938 pg/ml for PNX-14 and 0.1 ng/ml for GPR173. The ELISA assays were performed by an associate who was blind to the treatment groups to minimize potential bias.

Statistical analysis

The concentration of the target analyte in each sample was normalized to the total protein content. The results are expressed as pg or ng of target analyte per mg of total protein (pg/mg protein for PNX and ng/mg protein for GPR173). A linear mixed-effects model was used to analyse the data, including the GIT section and age and their interaction as fixed effects, and animal as random effects. Post hoc comparisons were conducted using Tukey's HSD test to evaluate pairwise differences between groups. Homogeneity of variance was tested using Levene's test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. All the statistical analyses were conducted using GraphPad Prism, version 9.5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, US; www.graphpad.com; accessed on June 10, 2024).

Abbreviations

PNX	Phenoxin
SMIM20	Small integral membrane protein 20
GIT	Gastrointestinal tract
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IHC	Immunohistochemistry
HPG	Hypothalamic–pituitary–gonadal
SREB3	Super-conserved receptor expressed in the brain 3
GPCR	G protein-coupled receptors
CCK	Cholecystokinin
IR	Immunoreactivity
PBS	Phosphate-buffered saline
CNS	Central nervous system
ENS	Enteric nervous system

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04545-x>.

Supplementary Material 1.

Acknowledgements

The authors would like to express sincere gratitude to Professor Ewa Tomaszewska for her invaluable substantive support throughout the course of this research.

Authors' contributions

K.K.: conceptualization, study design, methodology, writing—original draft preparation, data analysis, visualization; C.O.-W.: statistical analysis of data, writing—reviewing and editing; M.B.A.: conceptualization, writing—reviewing and editing, supervision. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This research was supported by project no. WKN/MN-1/WET/22, provided by the University of Life Sciences in Lublin, Poland, for Katarzyna Kras.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

According to Polish law, since all tissue collection procedures were conducted post-mortem, ethical review and approval from the Ethics Committee for this study were not required.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 3 August 2024 Accepted: 30 January 2025

Published online: 18 February 2025

References

1. Yañez-Guerra LA, Thiel D, Jékely G. Premetazoan Origin of Neuropeptide Signaling. *Mol Biol Evol.* 2022;39(4):msac051.
2. Yosten GLC, Lyu RM, Hsueh AJW, Avsian-Kretschmer O, Chang JK, Tullock CW, et al. A novel reproductive peptide, phenoxin. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(2):206–15.
3. Billert M, Rak A, Nowak KW, Skrzypski M. Phenoxin: More than Reproductive Peptide. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8378.
4. Prinz P, Scharner S, Friedrich T, Schalla M, Goebel-Stengel M, Rose M, et al. Central and peripheral expression sites of phenoxin-14 immunoreactivity in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(1):195–201.
5. Schalla MA, Stengel A. Phenoxin-A Pleiotropic Gut-Brain Peptide. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1726.
6. Schalla M, Prinz P, Friedrich T, Scharner S, Kobelt P, Goebel-Stengel M, et al. Phenoxin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides.* 2017;96:53–60.
7. Mlyczyńska E, Kurowska P, Wachowska D, Grzesiak M, Dupont J, Rak A. Phenoxin-14 as a novel direct regulator of porcine luteal cell functions. *Biol Reprod.* 2023;110(1):154–68.
8. Parlak Ak T, Yaman M, Bayrakdar A, Bulmus O. Expression of phenoxin-14 and nesfatin-1 in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the phases of the estrous cycle. *Neuropeptides.* 2023;97: 102299.
9. Rocca C, Scavell F, Granieri MC, Pasqua T, Amodio N, Imbrogno S, et al. Phenoxin-14: detection and novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(4):743–56.
10. Liang H, Zhao Q, Lv S, Ji X. Regulation and physiological functions of phenoxin. *Front Mol Biosci.* 2022;9: 956500.
11. McIlwraith EK, Belsham DD. Phenoxin: uncovering its receptor, signaling and functions. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(5):774–8.
12. Kupcova I, Danisovic L, Grgac I, Harsanyi S. Anxiety and Depression: What Do We Know of Neuropeptides? *Behav Sci Basel Switz.* 2022;12(8):262.
13. Kras K, Ropka-Molik K, Muszyński S, Arciszewski MB. 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*). *Int J Mol Sci.* 2023;25(1):533.

14. Mukherjee K, Unniappan S. Mouse gastric mucosal endocrine cells are sources and sites of action of Phoenixin-20. *Peptides*. 2021;141:170551.
15. Schalla MA, Oerter S, Cubukova A, Metzger M, Appelt-Menzel A, Stengel A. Locked Out: Phoenixin-14 Does Not Cross a Stem-Cell-Derived Blood-Brain Barrier Model. *Brain Sci*. 2023;13(7):980.
16. Zandeh-Rahimi Y, Panahi N, Hesarak S, Shirazi-Beheshti SH. Protective Effects of Phoenixin-14 Peptide in the Indomethacin-Induced Duodenal Ulcer: An Experimental Study. *Int J Pept Res Ther*. 2022;28(1):43.
17. McIlwraith EK, Zhang N, Belsham DD. The Regulation of Phoenixin: A Fascinating Multidimensional Peptide. *J Endocr Soc*. 2022;6(2):bvab192.
18. Govil K, Yadav D, Patil A, Nayak S, Baghel R, Yadav P, et al. Feeding management for early rumen development in calves. *J Entomol Zool Stud*. 2017;5(3):1132–9.
19. Pisoni L, Relling AE. The effects of supplementing yeast fermentation products on gut permeability, hormone concentration, and growth in newborn dairy calves. *Transl Anim Sci*. 2020;4(2):809–21.
20. Muzammil AN, Barathan M, Yazid MD, Sulaiman N, Makpol S, Mohamed Ibrahim N, et al. A systematic scoping review of the multifaceted role of phoenixin in metabolism: insights from in vitro and in vivo studies. *Front Endocrinol*. 2024;15:1406531.
21. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227–32.
22. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*. 2015;5(1):10775.
23. Tomaszewska E, Świątkiewicz M, Muszyński S, Donaldson J, Ropka-Molik K, Arciszewski MB, et al. Repetitive Cerulein-Induced Chronic Pancreatitis in Growing Pigs-A Pilot Study. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9):7715.
24. Friedrich T, Stengel A. Current state of phoenixin-the implications of the pleiotropic peptide in stress and its potential as a therapeutic target. *Front Pharmacol*. 2023;14:1076800.
25. Montalban-Arques A, Chaparro M, Gisbert JP, Bernardo D. The Innate Immune System in the Gastrointestinal Tract: Role of Intraepithelial Lymphocytes and Lamina Propria Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(8):1649–59.
26. Weinberg ZY, Puthenveedu MA. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by plasma membrane organization and endocytosis. *Traffic Cph Den*. 2019;20(2):121–9.
27. He L, Shi H, Zhang G, Peng Y, Ghosh A, Zhang M, et al. A Novel CCK Receptor GPR173 Mediates Potentiation of GABAergic Inhibition. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2023;43(13):2305–25.
28. Guerra L, Escudero-Castelan N, Elphick M. CCK-type neuropeptides do not act as ligands for GPR173-type receptors (SREBs): the importance of an evolutionary approach to receptor deorphanisation. *Authorea*. August 25, 2024 [preprint].
29. Aleti G, Troyer EA, Hong S. G protein-coupled receptors: A target for microbial metabolites and a mechanistic link to microbiome-immune-brain interactions. *Brain Behav Immun - Health*. 2023;32:100671.
30. Friedrich T, Schalla MA, Goebel-Stengel M, Kobelt P, Rose M, Stengel A. Inflammatory Stress Induced by Intraperitoneal Injection of LPS Increases Phoenixin Expression and Activity in Distinct Rat Brain Nuclei. *Brain Sci*. 2022;12(2):135.
31. Włodarczyk R, Budvytis M. Proper nutrition for high yielding cows - how to fully utilize their production potential. *Vet Life*. 2011;86:771–6.
32. Mead R, Gilmour SG, Mead A. *Statistical Principles for the Design of Experiments: Applications to Real Experiments*. Cambridge: Cambridge University Press; 2012.
33. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci*. 2017;24(5):101–5.
34. Osiak-Wicha C, Muszyński S, Tomaszewska E, Kras K, Ropka-Molik K, Zhyla M, et al. Gene Expression Level and Immunohistochemical Localization of Cannabinoid and Cannabinoid-Related Receptors in The Small Intestine of Holstein Bulls (*Bos taurus taurus*). *Ann Anim Sci*. 2024;24(3):779–89.
35. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis. *Bio-Protoc*. 2019;9(24):e3465.
36. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–5.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

DOI 10.24425/pjvs.2025.156064

Original article

Immunolocalization and immunoexpression levels of sibling peptides nesfatin-1 and ghrelin, and their potentially shared receptor in the gastrointestinal tract of Holstein-Friesian bulls

K. Kras, C. Osiak-Wicha, M.B. Arciszewski

Department of Animal Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-950 Lublin, Poland

Correspondence to: K. Kras, e-mail: katarzyna.kras@up.lublin.pl

Abstract

This study investigates the localization and immunoexpression levels of nesfatin-1 and ghrelin – two metabolically active peptides – and their putative shared receptor, growth hormone secretagogue receptor (GHSR), across the gastrointestinal tract (GIT) of Holstein-Friesian bulls. Recognized for their opposing roles in energy balance, nesfatin-1 and ghrelin are considered “sibling peptides” due to their complementary physiological functions and origin within the gastrointestinal system. The investigation encompassed both immature (calves) and mature (adult) cattle to assess developmental variation in the immunoexpression and localization of these peptides. Immunohistochemistry and ELISA were used to determine their localization patterns and quantify protein concentrations across distinct GIT segments. Nesfatin-1 was found broadly distributed in mucosal layers and the enteric nervous system (ENS), with a pronounced presence in the abomasum and duodenum. Notably, calves exhibited higher levels of nesfatin-1 across most GIT regions, suggesting age-related differences in metabolic regulation. Ghrelin was predominantly localized in the abomasum and, to a lesser extent, in other gastrointestinal regions, including the forestomachs and intestinal mucosa. Its presence in neuronal structures of the ENS, although less abundant, hints at potential neural roles beyond endocrine signalling. GHSR immunoexpression was restricted mainly to the enteric ganglia and selected epithelial cells, with significant levels observed in the duodenum, particularly in calves. The receptor was absent in the rumen, implying that ghrelin activity in this region might be mediated via systemic or paracrine pathways rather than local receptor binding. The findings reveal both overlapping and distinct localization patterns of these peptides and their receptor, showing complex interactions in GIT physiology. Elevated nesfatin-1 immunoexpression in young animals suggests a potential developmental role, while the conserved ghrelin distribution reinforces its established gastric functions. These results may contribute insights into the regulatory architecture of bovine metabolism and potentially inform strategies for optimizing cattle growth and health management, providing a relevant reference point for veterinary sciences.

Keywords: cattle, gastrointestinal tract, ghrelin, growth hormone secretagogue receptor, nesfatin-1



Introduction

The regulation of energy balance and metabolic processes in mammals relies on a complex network of peptides, that act across various physiological systems to maintain homeostasis (Wen et al. 2019). Understanding the roles and interactions of these molecules is especially relevant in livestock species, such as domestic cattle (*Bos taurus taurus*), where energy regulation directly impacts growth, reproduction and overall productivity (Yang et al. 2023, Muzemil and Buhari 2024). Among these regulatory peptides, nesfatin-1 and ghrelin have gained attention due to their distinct yet inter-linked roles in appetite modulation and energy homeostasis (Kojima et al. 1999, Oh-I et al. 2006, Stengel and Taché 2010). While considerable research has explored these peptides in humans and experimental models, their localization and function in cattle, particularly at different developmental stages, remain inadequately characterized. As ruminants, cattle possess a multi-chambered stomach system that supports unique mechanisms of feed intake and nutrient absorption compared to other herbivores, making direct extrapolation from non-ruminant studies problematic. Consequently, a ruminant-specific analysis is necessary to determine whether these regulatory peptides function similarly or undergo specific adaptations to accommodate the distinctive physiology of cattle.

Nesfatin-1, a product of the precursor protein nucleobindin-2 (NUCB2), exerts notable anorexigenic effects by inhibiting food intake and influencing energy expenditure (Oh-I et al. 2006). Initially discovered in hypothalamic regions associated with appetite suppression, nesfatin-1 appears to have broader functions, including stress response, insulin sensitivity and metabolic regulation (Ayada et al. 2015, Stengel 2015, Dore et al. 2017, Schalla and Stengel 2018, Kras et al. 2022). Its presence in the central nervous system, gastrointestinal tract (GIT) and adipose tissue, suggests that nesfatin-1 may play multiple roles in energy homeostasis (Stengel et al. 2009, Ramanjaneya et al. 2010, Zhang et al. 2010, Goebel-Stengel et al. 2011, Kim et al. 2014). By contrast, ghrelin, another key regulatory peptide, is primarily produced in the stomach and operates as a potent hunger signal (Kojima et al. 1999, Kojima and Kangawa 2005, Müller et al. 2015). Its orexigenic properties involve stimulating appetite, promoting gastric motility and enhancing growth hormone secretion via the growth hormone secretagogue receptor (GHSR) (Kojima and Kangawa 2005, Akalu et al. 2020, Jiao and Luo 2022). This contrasting relationship - nesfatin-1 as anorexigenic factor versus ghrelin as an orexigenic factor - highlights their complex interplay within the same regulatory network.

Despite these opposing effects, nesfatin-1 and ghrelin share overlapping regulatory roles in energy balance, particularly within the hypothalamic pathways. This functional antagonism, sometimes described “sibling peptides”, owing to their GIT origin and similar post-translational modifications (Chen et al. 2022), is reminiscent of other peptide pairs, such as glucagon and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), which are both derived from the same proglucagon precursor but exert opposite influences on glucose metabolism (Sandoval and D’Alessio 2015). While ghrelin’s gastrointestinal distribution has been characterized in several species (Mehdar 2021), including cattle (Jonova et al. 2022), corresponding data for nesfatin-1 are less abundant (Kras et al. 2022), creating a crucial knowledge gap in bovine physiology. Both peptides are also thought to interact with the same receptor, GHSR. GHSR, traditionally associated with ghrelin, has recently been proposed as a potential receptor for nesfatin-1, although this nesfatin-1’s potential use of this receptor remains uncertain (Ozturk et al. 2015, Fan et al. 2018, Chen et al. 2022). Such a receptor-sharing mechanism introduces a fascinating element of regulatory complexity, as the receptor’s activation could lead to divergent physiological outcomes, depending on the ligand involved. This possibility is especially compelling in the context of cattle, where efficient energy management is critical at different growth stages, ranging from the rapid development seen in calves to the maintenance-focused energy balance in adult animals (Diao et al. 2019).

This study focuses on the immunolocalization and protein levels of nesfatin-1, ghrelin and GHSR in different GIT organs of cattle to better understand how these peptides contribute to metabolic regulation across age groups. We hypothesize that nesfatin-1, ghrelin and GHSR display distinct localization patterns in the GIT of both calves and adult cattle, reflecting specific metabolic demands and developmental needs. The primary aim of this study is to compare the immunolocalization and quantifiable levels of nesfatin-1, ghrelin and GHSR across all stomach compartments and intestinal regions in adult and calf cattle, using immunohistochemistry (IHC) and ELISA techniques. Given the central role of energy balance in livestock growth and productivity, mapping the localization of nesfatin-1, ghrelin and their receptor in the bovine GIT may provide essential baseline knowledge for veterinary science.

Table 1. Primary and secondary antibodies used in the study.

Antibody	Host	Catalog number	Dilution	Manufacturer
Primary antibody				
Anti-nesfatin-1	mouse	H00004925-M03	1:500	Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA
Anti-ghrelin	rabbit	PA1-1070	1:500	Thermo Scientific, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany
Anti-GHSR	rabbit	720278	1:100	Thermo Scientific, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany
Secondary antibody				
Anti-mouse/Anti-rabbit	goat	DPVB-HRP	RTU ¹	ImmunoLogic, Duiven, Netherlands

¹ RTU – Ready To Use; GHSR – Growth Hormone Secretagogue Receptor

Materials and Methods

Animals

This study was conducted on healthy male Polish Holstein–Friesian cattle, divided into two age groups: six adult individuals (20–24 months old, weighing 768 ± 46 kg) and six calves (7–8 months old, weighing 218 ± 23 kg). All animals were obtained from the same farm to maintain consistency in housing, diet and environmental conditions. Both groups were managed under a semi-intensive feeding system, beginning with pasture grazing and transitioning to a total mixed ration approach, following the methodology outlined by Włodarczyk and Budvytis (2011).

The animals were slaughtered in a licensed local slaughterhouse under standard commercial conditions, following a fasting period of approximately 12 hours in accordance with routine pre-slaughter practices. The slaughter process and all subsequent procedures complied with the Council Regulation (EC) No. 1099/2009 of 24 September 2009.

Post-mortem examinations by the official veterinary inspector confirmed the animals' good health and the absence of gastrointestinal pathologies, validating the collected samples. Ethical approval by the Ethics Committee was not required under Polish law, as all procedures involved post-mortem examination of carcasses from animals that were intended for commercial use and human consumption.

Tissue processing

Sections of the GIT (rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, colon) were collected immediately post-mortem, gently cleaned and subsequently preserved in liquid nitrogen before storage at -80°C for ELISA, or fixed in 4% buffered formaldehyde for IHC. The tissue processing, IHC and ELISA methodologies were described in detail in a previous study (Kras et al. 2025). Briefly, formalde-

hyde-fixed samples were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned ($5\ \mu\text{m}$) and placed on SuperFrost® Plus slides (Thermo Scientific, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Frozen samples were homogenized in PBS, centrifuged and protein content was determined using a Pierce BCA kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

IHC and ELISA

IHC involved antigen retrieval, blocking, incubation with primary antibodies (Table 1) and detection via a poly-HRP system with DAB staining (Kras et al. 2025). Control reactions validated antibody specificity. ELISA assays were conducted using commercial kits (nesfatin-1 – QY-E60251, Qayee Bio-Technology Co. Shanghai, China; ghrelin – QY-E60249, Qayee Bio-Technology Co. Shanghai, China; GHSR – QY-E60250, Qayee Bio-Technology Co. Shanghai, China) with absorbance measured spectrophotometrically. Assays were performed in duplicate, with intra- and inter-assay variations below 8% and 10%, respectively.

Semi-quantitative analysis

A semi-quantitative analysis of the IHC reaction was conducted following a previously described protocol (Crowe and Yue 2019) using ImageJ 1.52 software (Schneider et al. 2012). The measurements were calculated by dividing the mean gray value by the number of cell nuclei. To enhance accuracy, the protocol was adjusted to include manual counting of cell nuclei using the “multipoint” tool. Immunoreactivity (IR) results in the ENS were presented as the ratio of the mean gray value to the analyzed area, calculated using the “Polygon Selection” tool. IR in the ENS was assessed using a neuron-based sampling method. For each GIT segment and each animal, 100 neurons from the myenteric plexus and 100 neurons from the submucosal plexus were randomly selected and analyzed. Images were

captured under 400× magnification (objective 40×, ocular 10×), with each field covering an approximate area of 60 000 µm². Only clearly identifiable neuronal cell bodies were included in the analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 10.5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Prior to comparative analysis, all data were assessed for compliance with the assumptions of parametric testing. The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normality of distributions, and Levene's test was used to verify homogeneity of variances. When these assumptions were met, linear mixed-model was applied to determine the effects of two fixed factors: age group (young vs. adult cattle) and GIT segment. The presence of interaction between age and GIT segment was examined in all analyses. When a statistically significant interaction was observed ($p < 0.05$), a full-factorial model was used, including pairwise comparisons between age groups within each GIT segment as well as comparisons between GIT segments within each age group. If no significant interaction was found, only the main effects were interpreted. In cases where data violated parametric assumptions, appropriate non-parametric alternatives (Aligned Rank Transform for full model, or Friedman's test with one factor) were used where applicable, post hoc tests were conducted using Tukey's multiple comparisons test for parametric data or Dunn's test for non-parametric data. Results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Nesfatin-1 immunolocalization

Nesfatin-1 was observed in all examined sections of the GIT, both in the mucosa and within the ENS (Fig. 1a-c). In the mucosa of the forestomachs, immunoreactive cells were visible in the flat epithelial layers beneath the keratinized surface (Fig. 2). In the abomasum, a high density of immunoreactive cells was clustered at the base of the glands, while in the duodenum the most intense IR was found in the duodenal glands and basal regions of intestinal crypts (Fig. 3). Single scattered cells with IR were also present throughout the mucosa. A similar pattern was noted in the jejunum, ileum and colon, with immunoreactive cells most abundant near the base of the glands. Statistical analysis of IR in the mucosal layer (Fig. 1a) revealed a significant interaction between age and GIT segment

($p < 0.001$). In calves, mucosal IR was highest in the abomasum ($p < 0.001$ vs. all other segments), followed by the jejunum and colon, which were significantly higher than the remaining segments ($p < 0.001$). These remaining segments exhibited similarly lower levels. In adults, the abomasum also showed the highest IR ($p < 0.001$), while all other segments had lower and statistically comparable immunoexpression. Comparison between age groups revealed that calves showed significantly higher mucosal IR in the abomasum ($p < 0.001$), jejunum ($p < 0.01$) and colon ($p < 0.001$) compared to adults.

Within the ENS, nesfatin-1 was localized to neuronal cell bodies in both the submucosal and myenteric plexuses of all examined GIT regions (Fig. 4 and 5).

In the submucosal plexus (Fig. 1b), no interaction between age and segment was found, but the segment effect was significant ($p < 0.001$). IR was significantly higher in the abomasum compared to the ileum ($p = 0.017$), while no significant differences were observed between the other segments, nor between age groups.

In contrast, the myenteric plexus (Fig. 1c) showed a significant interaction between age and segment ($p < 0.001$). In calves, IR was highest in the reticulum, which was comparable to the omasum and abomasum. These three segments (with the exception of the omasum) showed significantly higher IR than the colon ($p = 0.006$), rumen ($p = 0.010$) and duodenum ($p < 0.001$). The jejunum and ileum had the lowest IR and were significantly different from all other segments ($p < 0.001$). In adults, IR in the myenteric plexus was highest in the omasum, abomasum and colon, which were significantly greater than the other segments ($p < 0.001$). When comparing age groups, significant differences were observed in the reticulum, where calves had higher IR ($p < 0.01$) and in the colon, where adults showed higher IR ($p < 0.05$).

Nesfatin-1 protein level

The concentration of nesfatin-1 did not exceed 1 000 000 pg/g of total protein (Fig. 6a). The protein level differed significantly between groups and was generally higher in calves compared to adults, with statistically significant differences observed in the rumen ($p < 0.01$), reticulum ($p < 0.05$), abomasum ($p < 0.05$), jejunum ($p < 0.001$) and ileum ($p < 0.05$). Within groups, protein levels were relatively consistent across segments, except in calves, where a relatively higher nesfatin-1 protein level was noted in the rumen, ileum and colon compared to the omasum and duodenum.

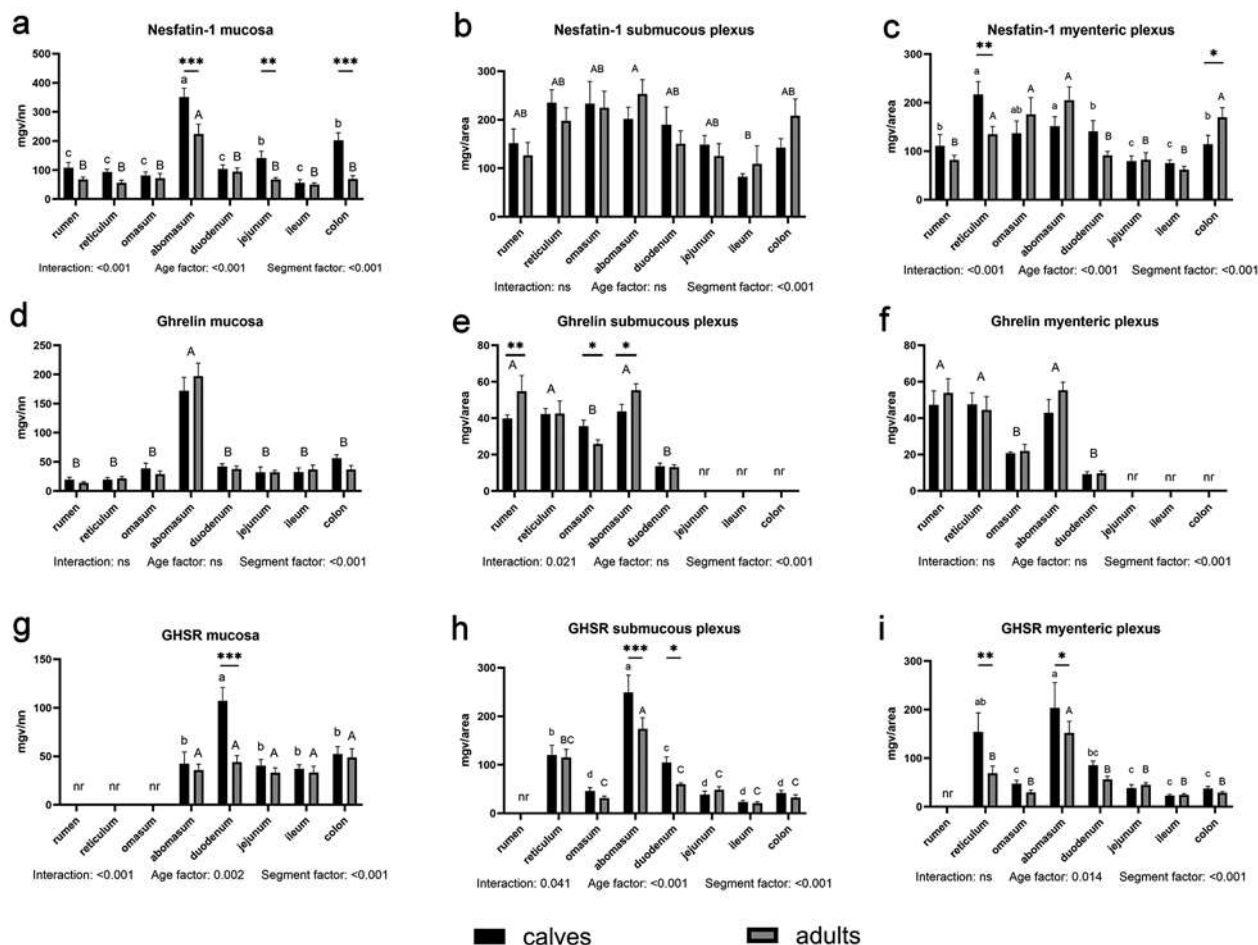


Fig. 1. Semi-quantitative determination of immunohistochemistry (IHC) reactions in the gastrointestinal tract (GIT) of calves and adult Holstein-Friesian bulls. Immunoexpression of nesfatin-1 (a, b, c), ghrelin (d, e, f) and GHSR (g, h, i) in the mucosa (a, d, g) was expressed as the ratio of mean gray value (mgv) to nuclei number (nn), whereas in the enteric nervous system (ENS) (b, c, e, f, h, i) it was expressed as the ratio of mgv to the surface area of the analyzed region. Different lowercase letters denote significant differences between GIT segments in calves, whereas different uppercase letters denote significant differences between GIT segments in adults ($p < 0.05$), unless the interaction between the main factors or age as a main factor was not significant – in such cases, uppercase letters indicate differences between segments regardless of age group. The asterisks (*) highlight significant differences in the immunoreaction levels between calves and adults within a specific GIT segment (* for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$).

Ghrelin immunolocalization

Ghrelin was primarily detected in the glandular cells of the abomasum, where its IR was most prominent. In the forestomachs, ghrelin-positive cells were localized in the outer epithelial layers, similarly to nesfatin-1 (Fig. 2). In the duodenum, single immunoreactive cells were present in the epithelium of the villi and in both duodenal and intestinal glands. In the jejunum and ileum, the distribution was similar to that of the duodenum, with the expected absence of duodenal glands. In the colon, immunoreactive cells were observed near the luminal surface (Fig. 3).

Statistical analysis of mucosal IR (Fig. 1d) revealed no interaction between segment and age, but the segment effect was significant ($p < 0.001$). IR was highest in the abomasum, which showed significantly greater

immunoexpression compared to all other GIT segments ($p < 0.001$). There were no significant age-related differences in mucosal IR.

In the ENS, ghrelin was detected in both the submucosal and myenteric plexuses of the forestomachs, abomasum and duodenum (Fig. 4 and 5). In the duodenum, however, IR was sparse and limited to occasional ganglia. In both plexuses, ghrelin was located primarily in fibers within or surrounding the ganglia, rather than in neuronal cell bodies.

In the submucosal plexus (Fig. 1e), a significant interaction between age and segment was detected ($p = 0.021$), although only the segment factor remained statistically significant overall ($p < 0.001$). No IR was detected in the jejunum, ileum or colon. Among the remaining segments, the omasum showed significantly lower IR than all others ($p < 0.001$). Age-related compa-

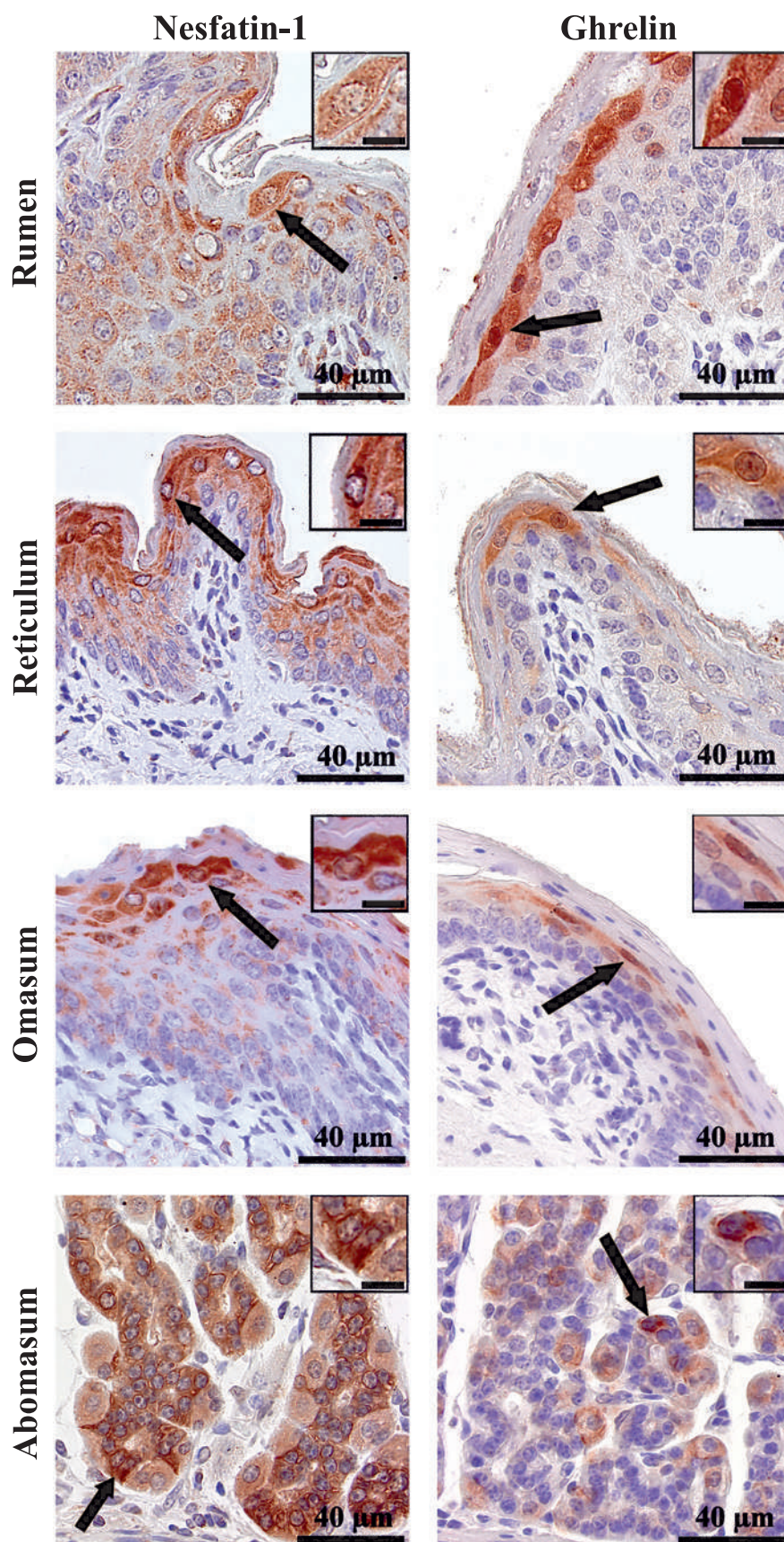


Fig. 2. Immunolocalization of nesfatin-1 and ghrelin in the mucosa of the rumen, reticulum, omasum and abomasum of Holstein-Friesian male calves. Black arrows indicate an example immunoreaction. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 μ m for the main image and 15 μ m for the magnified reaction inset.

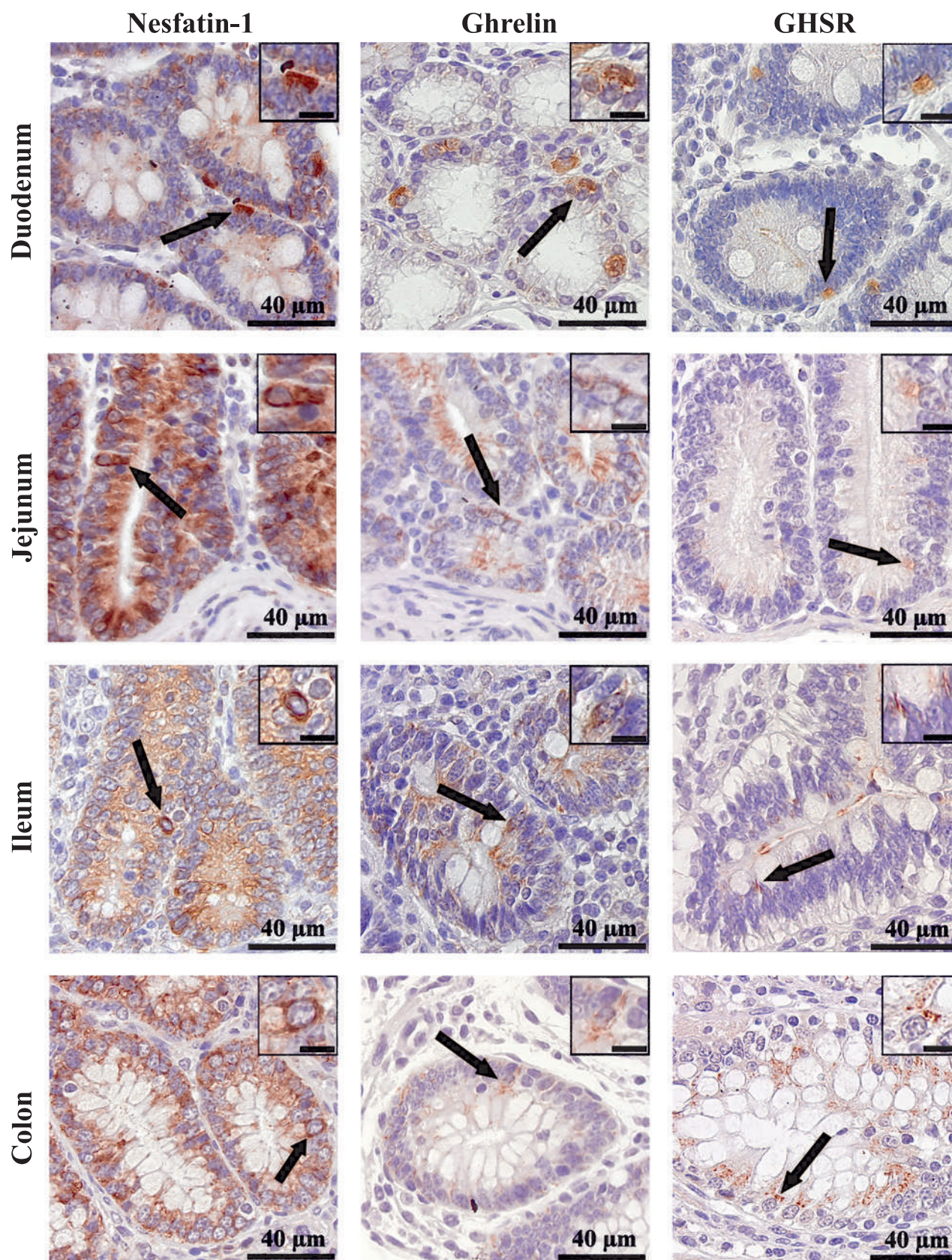


Fig. 3. Immunolocalization of nesfatin-1, ghrelin and GHSR in the mucosa of the duodenum, jejunum, ileum and colon of Holstein-Friesian male calves. Black arrows indicate an example immunoreaction. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 μ m for the main image and 15 μ m for the magnified reaction inset.

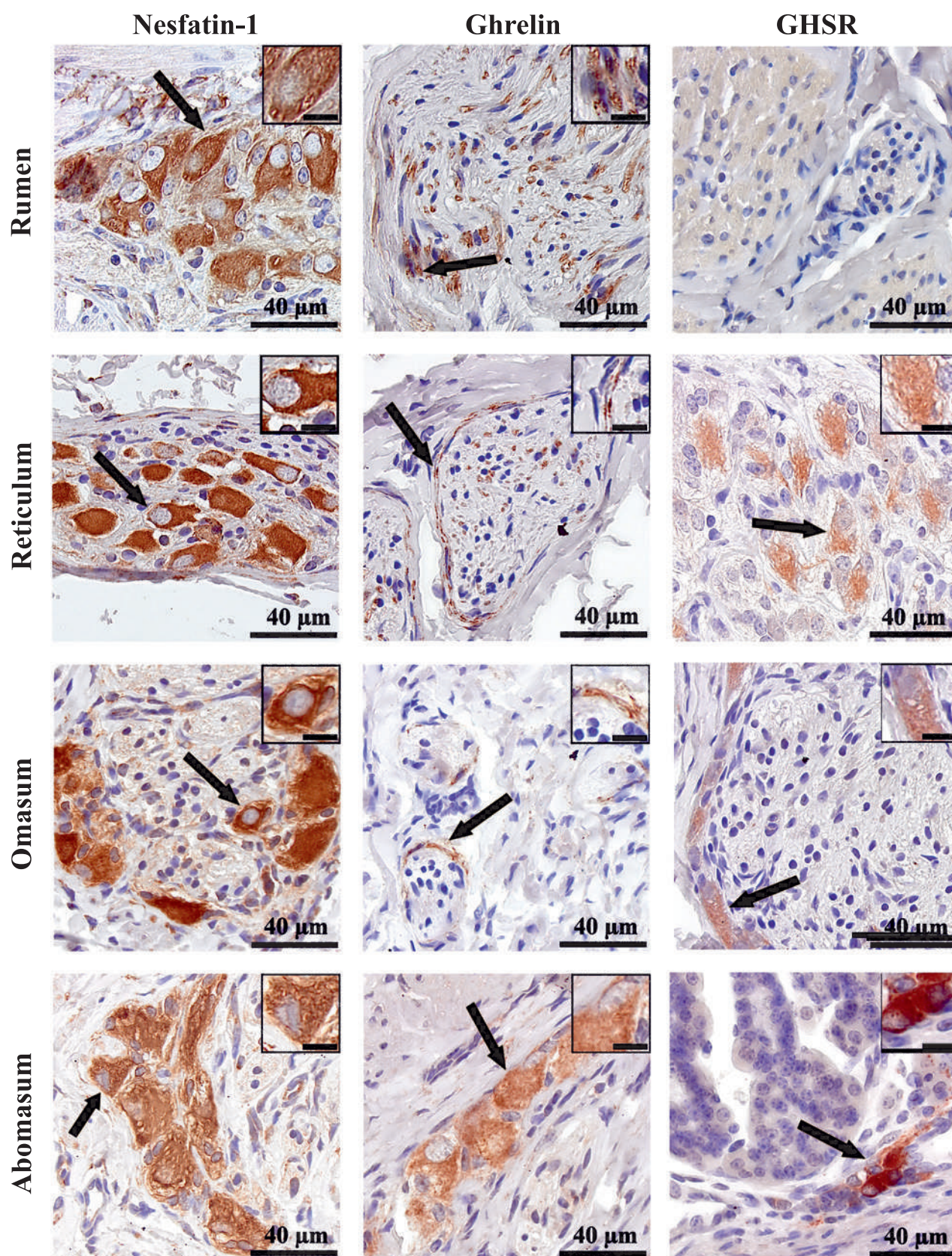


Fig. 4. Immunolocalization of nesfatin-1, ghrelin and GHSR in the enteric nervous system (ENS) of the rumen, reticulum, omasum and abomasum of Holstein-Friesian male calves. Black arrows indicate an example immunoreaction. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 µm for the main image and 15 µm for the magnified reaction inset.

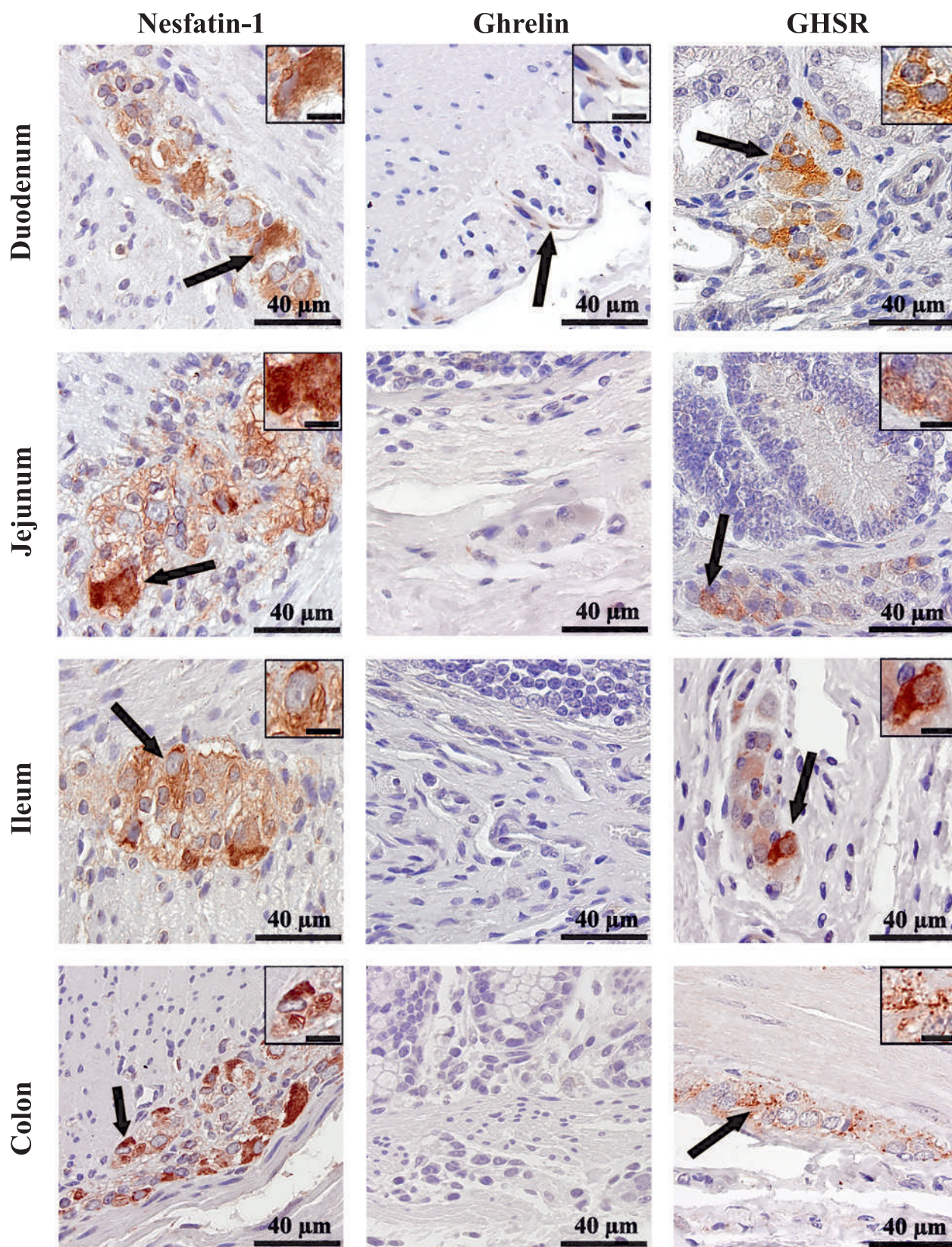


Fig. 5. Immunolocalization of nesfatin-1, ghrelin and GHSR in the enteric nervous system (ENS) of the duodenum, jejunum, ileum and colon of Holstein-Friesian male calves. Black arrows indicate an example immunoreaction. In the top right corner, a magnified view of the reaction. Scale bar: 40 µm for the main image and 15 µm for the magnified reaction inset.

risons revealed that IR was higher in adults in the rumen ($p<0.01$) and omasum ($p<0.05$), whereas in the abomasum, calves exhibited higher IR ($p<0.05$).

In the myenteric plexus (Fig. 1f), no interaction between segment and age was found, but the segment effect was again significant ($p<0.001$). As in the submucosal plexus, no IR was observed in the jejunum, ileum or colon and the omasum displayed significantly lower IR than all other segments ($p<0.001$). No significant age-related differences were observed in this plexus.

Ghrelin protein level

The highest concentration of ghrelin was found in the abomasum of both age groups, with a significant difference compared to the other segments. No other significant differences were observed either between groups or between segments (Fig. 6b).

GHSR immunolocalization

GHSR IR was not detected in the mucosa of the forestomachs. In the remaining GIT segments, sparse IR was observed in epithelial cells, with the most prominent signal found in the duodenum of calves (Fig. 1g and 3). Statistical analysis revealed a significant interaction between age and segment ($p<0.001$). In calves, the duodenum showed significantly higher IR than all other mucosal segments ($p<0.001$), while the remaining positive segments (abomasum, jejunum, ileum, colon) displayed significantly lower and comparable levels. In adults, there were no significant differences in mucosal IR between segments. When comparing age groups, IR in the duodenum was significantly higher in calves than in adults ($p<0.001$).

Within the ENS, GHSR was detected in neuronal cell bodies of both the submucosal and myenteric plexuses across all GIT segments except the rumen, where no IR was observed (Fig. 4 and 5).

In the submucosal plexus (Fig. 1h), statistical analysis showed a significant interaction between segment and age ($p=0.041$). In calves, IR was highest in the abomasum ($p<0.001$ vs. all other segments), followed by the reticulum and then the duodenum, both of which were significantly higher than the omasum, jejunum, ileum and colon ($p<0.001$). In adults, the abomasum also showed the highest IR ($p<0.001$ vs. all other segments), followed by the reticulum, while the remaining segments displayed lower and statistically similar immunoexpression. Between age groups, the abomasum ($p<0.001$) and duodenum ($p<0.05$) showed significantly higher IR in calves.

In the myenteric plexus (Fig. 1i), there was no interaction, but both segment ($p<0.001$) and age ($p=0.014$) had significant effects. In calves, IR was highest in the

abomasum ($p<0.001$ vs. all other segments), followed by the reticulum, which was significantly higher than the omasum, jejunum, ileum and colon. The duodenum showed intermediate values, not significantly different from the lower-expressing segments. In adults, the abomasum again showed the highest IR ($p<0.001$), while all other segments were significantly lower and statistically comparable. In age comparisons, the reticulum ($p<0.01$) and abomasum ($p<0.05$) displayed higher IR in calves.

GHSR protein level

Protein level measurements show that GHSR is undetectable in the rumen. The highest level is recorded in the duodenum, where the only significant difference between groups is found ($p<0.001$), with higher receptor levels in calves compared to adults. In calves, aside from the significantly higher level in the duodenum compared to other segments, no other intersegmental differences are observed. In adults, however, a difference is noted between the duodenum and the ileum and colon (Fig. 6c).

Discussion

The results of this study provide significant insights into the immunolocalization and levels of nesfatin-1, ghrelin and GHSR in the GIT of Holstein-Friesian bulls, and supports the hypothesis that their levels and localization are age-dependent and region-specific within the bovine digestive system.

An interesting finding was the higher level of nesfatin-1 compared to ghrelin and GHSR, despite the animals being in a fasting state. Nesfatin-1 is recognized for its central anorexigenic activity, opposing the appetite-stimulating effects of ghrelin (Chen et al. 2022). However, despite its central role in suppressing food intake, peripheral nesfatin-1 secretion may fulfill alternative physiological functions. As a result, its level in the GIT during fasting would not necessarily be low, since it may play distinct local roles unrelated to appetite regulation, which has been confirmed in other species (Kras et al. 2022). The highest levels of nesfatin-1 were observed in the abomasum, consistent with the pattern seen for ghrelin, suggesting a functional relationship between these two peptides, as previously discussed in the context of their classification as “sibling peptides” despite their differences. Furthermore, the presence of nesfatin-1 in epithelial cells of the forestomachs, particularly in layers close to the lumen, indicates a local regulatory function within the GIT. Studies have shown that the rumen epithelium is metabolically active and additionally expresses numerous genes

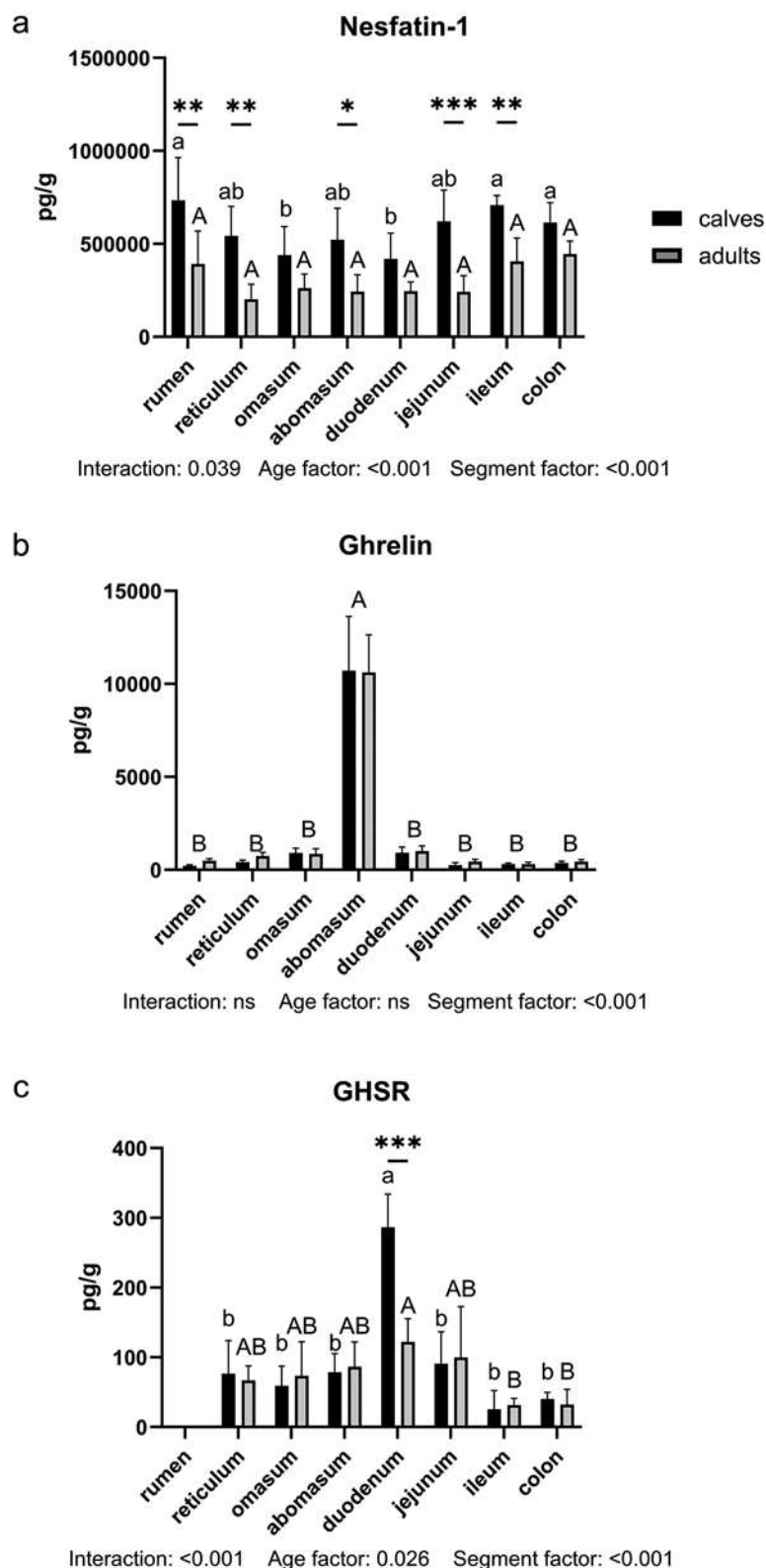


Fig. 6. Nesfatin-1 (a), ghrelin (b) and GHSR (c) concentration [pg/g total protein] in the gastrointestinal tract (GIT) of calves and adult Holstein-Friesian bulls. Different lowercase letters denote significant differences between GIT segments in calves, whereas different uppercase letters denote significant differences between GIT segments in adults ($p < 0.05$), unless the interaction between the main factors or age as a main factor was not significant - in such cases, uppercase letters indicate differences between segments regardless of age group. The asterisks (*) highlight significant differences in the concentrations between calves and adults within a specific GIT segment (* for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$).

involved in immune responses (Fregulia et al. 2021). Therefore, IR in this area may suggest that nesfatin-1 could play either a metabolic or immune-related role. Supporting this, nesfatin-1 has been shown to reduce leukocyte infiltration and pro-inflammatory cytokines in a rat model of intestinal ulcers (Kolgazi et al. 2017). Similar anti-inflammatory effects were observed in other tissues, including the vascular endothelium and lungs, where nesfatin-1 inhibited NF- κ B signaling and macrophage activation (Meng et al. 2021, Cheng et al. 2022). However, in certain pathological contexts such as rheumatoid arthritis, it may enhance inflammatory responses (Chang et al. 2023). These findings indicate that the immunoregulatory effects of nesfatin-1 may be tissue- and context-specific. Interestingly, the intense localization of nesfatin-1 within the ENS further supports the notion of its potential involvement in broader aspects of GIT physiology. Although the absence of a clearly identified receptor complicates the interpretation of its local actions, it remains plausible that nesfatin-1 signals via an as yet uncharacterized receptor – possibly involving GHSR—or that it exerts paracrine effects within this region. Nesfatin-1 in cattle has previously been identified solely in plasma (Aydin 2013, Morton et al. 2018); therefore, no available literature exists for comparison with our findings. However, studies conducted on animals such as rats and pigs demonstrated a similar pattern of nesfatin-1 immunolocalization within the GIT, aligning with the distribution observed in our findings (Kras et al. 2022). The increased peptide levels observed in calves may be attributed to age-related physiological factors, including differences in diet, the immature state of the GIT, or regulatory processes that are still undergoing transition and have not yet stabilized, in contrast to those observed in adult animals. Studies also suggest a link between nesfatin-1 and sexual maturation, which may be reflected in the increased nesfatin-1 levels in developing calves (Ranjan et al. 2019).

The IR and concentration of ghrelin followed the expected pattern, with the highest levels observed in the abomasum, consistent with findings in other species (Date et al. 2000, Hayashida et al. 2001). This consistency across species reinforces the evolutionary conservation of ghrelin's role in various physiological processes, including appetite regulation and potentially local actions within the stomach or other functions in the GIT (Kojima and Kangawa 2005, Müller et al. 2015). However, the detection of ghrelin in the ENS of the stomach and duodenum was unexpected. Although the IR was not particularly strong, a clear pattern of ghrelin localization within fibers surrounding ENS neurons suggests that ghrelin may act via the vagus nerve or other neural pathways to mediate gastro-

intestinal signaling. This interpretation aligns with experimental data showing that ghrelin reduces neuronal activation in the nodose ganglion, a key hub of vagal sensory neurons, following gastric distension. This effect is abolished by vagotomy, confirming that intact vagal afferents are necessary for ghrelin's action on gastric sensitivity (Meleine et al. 2020). Moreover, ghrelin receptors in these neurons co-localize with TRPV1 and ASIC3, ion channels involved in mechanosensation, suggesting that ghrelin modulates gastric afferent excitability at a peripheral level. Complementary findings by Perelló et al. (2022) further support the presence of ghrelin receptor immunoreexpression in vagal sensory pathways, and provide a broader framework for ghrelin's neuromodulatory role in gut-brain communication beyond its classic endocrine functions (Perelló et al. 2022). As mentioned previously, ghrelin was detected in the squamous epithelial cells of the forestomachs. However, the absence of ghrelin receptors in the mucosa of all forestomachs suggests that ghrelin may be secreted in this location for a paracrine or systemic effect. This supports the hypothesis that ghrelin could act as a signaling molecule to distant targets via neural or circulatory routes, rather than exerting direct effects within the forestomachs.

Studies on cattle have shown the highest ghrelin levels in the abomasum, consistent with the current results (Arne et al. 2021, Jonova et al. 2022). However, Karakoç et al. (2022) reported ghrelin presence in the smooth muscle of the abomasum, which contrasts with the current findings (Karakoç et al. 2022). This discrepancy could be attributed to methodological differences or variation in sample handling, but further investigation is warranted to clarify this point. According to available data (Sakata and Sakai 2010), ghrelin levels are low in fetuses and increase with age, indicating that ghrelin levels are age-dependent. The lack of differences between calves and adult bulls in our study may suggest that the final ghrelin levels are established before full maturity in cattle, which could reflect its important role in processes not directly linked to the complete development of the digestive tract.

Among the three molecules studied, GHSR exhibited the lowest levels of IR. Notably, GHSR was absent in the rumen, both in ELISA and IHC analysis. In the other forestomachs, GHSR was detected only within the ENS, suggesting that its primary role in these regions might be related to neural signaling rather than local action. This may suggest that ghrelin secreted in the forestomachs does not exhibit a local effect, but rather acts in a systemic manner. In the intestines, however, GHSR was present in both the mucosa and ENS, supporting a dual role in both local tissue response and neural signaling. In the available litera-

ture, there is only one study that examined the localization of GHSR in cattle, and it focused exclusively on the abomasum. Karakoç et al. (2022) identified the presence of GHSR in epithelial and parietal cells of the abomasum (Karakoç et al. 2022). However, their study does not provide data on the presence of IR in ENS ganglia, leaving this issue unresolved, especially since our study showed a more intense reaction in the ENS of the abomasum than in the mucosa.

A potential limitation of this study is that nesfatin-1 is derived from its precursor protein, NUCB2. Consequently, the antibodies used in the study may have bound not only to nesfatin-1 but also to NUCB2. This cross-reactivity could have influenced the specificity of the detected signals, potentially affecting the interpretation of the results. In particular, this factor may have contributed to the relatively high nesfatin-1 concentrations observed in comparison to ghrelin and GHSR. A similar consideration applies to ghrelin, which is produced from the precursor protein preproghrelin and may therefore be detected by the antibody alongside its mature form.

This study provides a detailed map of nesfatin-1, ghrelin and GHSR distribution in the bovine digestive tract, highlighting both organ- and age-dependent patterns. High nesfatin-1 levels during fasting and its presence in the ENS suggest broader functional roles beyond appetite regulation. The consistent pattern of ghrelin localization reinforces its conserved function in gastric signaling, while the restricted presence of GHSR in the ENS of the forestomachs underscores its potential role in neural regulation. These findings lay the groundwork for further veterinary research into the complex endocrine and neural interactions governing bovine digestion and metabolism.

Acknowledgements

We would like to express our deepest gratitude to Professor Siemowit Muszyński and Professor Ewa Tomaszewska for their invaluable support during our research and the development of this article. Their guidance, insightful feedback and expertise have been instrumental in shaping our work.

References

- Akalu Y, Molla MD, Dessie G, Ayelign B (2020) Physiological Effect of Ghrelin on Body Systems. *Int J Endocrinol* 2020: 1385138.
- Arne A, Ilgaza A, Kalnina LA (2021) Ghrelin Immunoreactive Cell Amounts in the Abomasum in 4-Month-Old Calves by Feeding Different Amounts of Prebiotics and New Synbiotics. *Vet Med Int* 2021: 5542372.
- Ayada C, Toru Ü, Korkut Y (2015) Nesfatin-1 and its effects on different systems. *Hippokratia* 19: 4-10.
- Aydin S (2013) Presence of adropin, nesfatin-1, apelin-12, ghrelins and salusins peptides in the milk, cheese whey and plasma of dairy cows. *Peptides* 43: 83-87.
- Chang JW, Liu SC, Lin YY, He XY, Wu YS, Su CM, Tsai CH, Chen HT, Fong YC, Hu SL, Huang CC, Tang CH (2023) Nesfatin-1 Stimulates CCL2-dependent Monocyte Migration And M1 Macrophage Polarization: Implications For Rheumatoid Arthritis Therapy. *Int J Biol Sci* 19: 281-293.
- Chen X, Dong J, Jiao Q, Du X, Bi M, Jiang H (2022) "Sibling" battle or harmony: crosstalk between nesfatin-1 and ghrelin. *Cell Mol Life Sci* 79: 169.
- Cheng H, Zhu Y, Chen L, Wang Y (2022) Nesfatin-1 alleviated lipopolysaccharide-induced acute lung injury through regulating inflammatory response associated with macrophages modulation. *J Cardiothorac Surg* 17: 206.
- Crowe AR, Yue W (2019) Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio Protoc* 9: e3465.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141: 4255-4261.
- Diao Q, Zhang R, Fu T (2019) Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals (Basel)* 9: 490.
- Dore R, Levata L, Lehnert H, Schulz C (2017) Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *J Endocrinol* 232: R45-R65.
- Fan XT, Tian Z, Li SZ, Zhai T, Liu JL, Wang R, Zhang CS, Wang LX, Yuan JH, Zhou Y, Dong J (2018) Ghrelin Receptor Is Required for the Effect of Nesfatin-1 on Glucose Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 633.
- Fregulia P, Neves AL, Dias RJ, Campos MM (2021) A review of rumen parameters in bovines with divergent feed efficiencies: What do these parameters tell us about improving animal productivity and sustainability? *Livest Sci* 254: 104761.
- Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A, Taché Y (2011) Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res* 1396: 20-34.
- Hayashida T, Murakami K, Mogi K, Nishihara M, Nakazato M, Mondal MS, Horii Y, Kojima M, Kangawa K, Murakami N (2001) Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 21: 17-24.
- Jiao ZT, Luo Q (2022) Molecular Mechanisms and Health Benefits of Ghrelin: A Narrative Review. *Nutrients* 14: 4191.
- Jonova S, Ilgaza A, Ilgazs A, Zolovs M, Gatina L (2022) The amount of ghrelin-immunoreactive cells in the abomasum and intestines of 13-14-week-old calves supplemented with Jerusalem artichoke flour alone or in combination with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Vet World* 15: 1080-1086.
- Karakoç Z, Topaloğlu U, Bayram B (2022) Immunohistochemical distributions of leptin, ghrelin and obestatin hormones in bull and ram abomasum. *Anat Histol Embryol* 51: 411-418.
- Kim J, Chung Y, Kim H, Im E, Lee H, Yang H (2014) The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse. *Dev Reprod* 18: 301-309.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

- Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85: 495-522.
- Kolgazi M, Ozdemir-Kumral ZN, Cantali-Ozturk C, Demirci EK, Yuksel M, Sirvanci S, Yegen BC (2017) Anti-inflammatory effects of nesfatin-1 on acetic acid-induced gastric ulcer in rats: involvement of cyclo-oxygenase pathway. *J Physiol Pharmacol* 68: 765-777.
- Kras K, Muszyński S, Tomaszewska E, Arciszewski MB (2022) Minireview: Peripheral Nesfatin-1 in Regulation of the Gut Activity-15 Years since the Discovery. *Animals (Basel)* 12: 101.
- Kras K, Osiak-Wicha C, Arciszewski MB (2025) Immunolocalization and quantification of the phoenixin and GPR173 in the gastrointestinal tract of Holstein-Friesian bulls. *BMC Vet Res* 21: 76.
- Mehdar KM (2021) The distribution of ghrelin cells in the human and animal gastrointestinal tract: a review of the evidence. *Folia Morphol (Warsz)* 80: 225-236.
- Meleine M, Mounien L, Atmani K, Ouelaa W, Bôle-Feysot C, Guérin C, Depoortere I, Gourcerol G (2020) Ghrelin inhibits autonomic response to gastric distension in rats by acting on vagal pathway. *Sci Rep* 10: 9986.
- Meng Q, Lu Q, Zhang Z, Liu J, Lou Y, Wang Y, Liu J (2021) Nesfatin-1 inhibits free fatty acid (FFA)-induced endothelial inflammation via Gfi1/NF- κ B signaling. *Biosci Biotechnol Biochem* 86: 47-55.
- Morton KA, Hargreaves L, Mortazavi S, Weber LP, Blanco AM, Unniappan S (2018) Tissue-specific expression and circulating concentrations of nesfatin-1 in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 65: 56-66.
- Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F, Casanueva FF, D'Alessio D, Depoortere I, Geliebter A, Ghigo E, Cole PA, Cowley M, Cummings DE, Dagher A, Diano S, Dickson SL, Diéguez C, Granata R, Grill HJ, Grove K, Habegger KM, Heppner K, Heiman ML, Holsen L, Holst B, Inui A, Jansson JO, Kirchner H, Korbonits M, Laferrère B, LeRoux CW, Lopez M, Morin S, Nakazato M, Nass R, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Schwartz TW, Seeley RJ, Sleeman M, Sun Y, Sussel L, Tong J, Thorner MO, van der Lely AJ, van der Ploeg LH, Zigman JM, Kojima M, Kangawa K, Smith RG, Horvath T, Tschöp MH (2015) Ghrelin. *Mol Metab* 4: 437-460.
- Muzemil A, Buhari A (2024) Emerging techniques for manipulating endocrine function in animal production: A comprehensive review. *J Ist Vet Sci* 8: 92-109.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M (2006) Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443: 709-712.
- Ozturk CC, Oktay S, Yuksel M, Akakin D, Yarat A, Kasimay Cakir O (2015) Anti-inflammatory effects of nesfatin-1 in rats with acetic acid - induced colitis and underlying mechanisms. *J Physiol Pharmacol* 66: 741-750.
- Perelló M, Cornejo MP, De Francesco PN, Fernandez G, Gautron L, Valdivia LS (2022) The controversial role of the vagus nerve in mediating ghrelin's actions: gut feelings and beyond. *IBRO Neurosci Rep* 12: 228-239.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS (2010) Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 151: 3169-3180.
- Ranjan A, Choubey M, Yada T, Krishna A (2019) Immunohistochemical localization and possible functions of nesfatin-1 in the testis of mice during pubertal development and sexual maturation. *J Mol Histol* 50: 533-549.
- Sakata I, Sakai T (2010) Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept* 2010: 945056.
- Sandoval DA, D'Alessio DA (2015) Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* 95: 513-548.
- Schalla MA, Stengel A (2018) Current Understanding of the Role of Nesfatin-1. *J Endocr Soc* 2: 1188-1206.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
- Stengel A (2015) Nesfatin-1 - More than a food intake regulatory peptide. *Peptides* 72: 175-183.
- Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW (2009) Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 150: 232-238.
- Stengel A, Taché Y (2010) Nesfatin-1- role as possible new potent regulator of food intake. *Regul Pept* 163: 18-23.
- Wen S, Wang C, Gong M, Zhou L (2019) An overview of energy and metabolic regulation. *Sci China Life Sci* 62: 771-790.
- Włodarczyk R, Budvytis M (2011) Proper nutrition for high-yielding cows - how to fulfil their productive potential. *Życie Weter* 86: 771-776.
- Yang F, Zhao S, Wang P, Xiang W (2023) Hypothalamic neuroendocrine integration of reproduction and metabolism in mammals. *J Endocrinol* 258: e230079.
- Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y (2010) Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 16: 1735-1741.

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 17.10.2025

mgr Katarzyna Kinga Kras
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 65 18
katarzyna.kras@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy 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*). Int. J. Mol. Sci. (2024), 25, 533. DOI: 10.3390/ijms25010533 mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu i opracowaniu materiału do analiz, opracowaniu metodyki badań, wykonaniu analiz qPCR, wykonaniu części analiz statystycznych, opracowaniu graficznym części wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.


.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 17.10.2025

mgr Katarzyna Kinga Kras
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 65 18
katarzyna.kras@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. 2025 Immunolocalization and quantification of the phoenixin and GPR173 in the gastrointestinal tract of Holstein–Friesian bulls. BMC Vet Res 21, 76. DOI: 10.1186/s12917-025-04545-x mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu i opracowaniu materiału do analiz, opracowaniu metodyki badań, wykonaniu wszystkich analiz laboratoryjnych, wykonaniu analiz statystycznych, analizie i opracowaniu graficznym wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.



.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

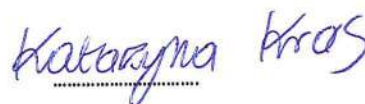
Lublin, 17.10.2025

mgr Katarzyna Kinga Kras
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 65 18
katarzyna.kras@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. 2025 Immunolocalization and immunoexpression levels of sibling peptides nesfatin-1 and ghrelin, and their potentially shared receptor in Holstein–Friesian bulls. PJVS 28(3), 389-402. DOI: 10.24425/pjvs.2025.156064 mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu i opracowaniu materiału do analiz, opracowaniu metodyki badań, wykonaniu wszystkich analiz laboratoryjnych, wykonaniu analiz statystycznych, analizie i opracowaniu graficznym wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 17.10.2025

Prof. dr hab. Marcin Arciszewski
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 69 24
mb.arciszewski@wp.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy 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*). Int. J. Mol. Sci. (2024), 25, 533. DOI: 10.3390/ijms25010533 mój udział polegał na współtworzeniu planu badań, nadzorowaniu pracy, redagowaniu manuskryptu oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 17.10.2025

Prof. dr hab. Marcin Arciszewski
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 69 24
mb.arciszewski@wp.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. 2025 Immunolocalization and quantification of the phoenixin and GPR173 in the gastrointestinal tract of Holstein–Friesian bulls. BMC Vet Res 21, 76. DOI: 10.1186/s12917-025-04545-x mój udział polegał na współtworzeniu planu badań, nadzorowaniu pracy, redagowaniu manuskryptu oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 17.10.2025

Prof. dr hab. Marcin Arciszewski
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 69 24
mb.arciszewski@wp.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. 2025 Immunolocalization and immunoexpression levels of sibling peptides nesfatin-1 and ghrelin, and their potentially shared receptor in Holstein–Friesian bulls. PJVS 28(3), 389-402. DOI: 10.24425/pjvs.2025.156064 mój udział polegał na współtworzeniu planu badań, nadzorowaniu pracy, redagowaniu manuskryptu oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 14.10.2025

dr hab. Siemowit Muszyński, prof. Uczelni
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
tel. 81 445 69 05
siemowit.muszynski@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy 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*). Int. J. Mol. Sci. (2024), 25, 533. DOI: 10.3390/ijms25010533 mój udział polegał na pomocy w przeprowadzeniu analiz statystycznych, pomocy w interpretacji wyników oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 17.10.2025

lek. wet. Cezary Osiak-Wicha
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 67 37
cezary.wicha@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. 2025 Immunolocalization and quantification of the phoenixin and GPR173 in the gastrointestinal tract of Holstein–Friesian bulls. BMC Vet Res 21, 76. DOI: 10.1186/s12917-025-04545-x mój udział polegał na pomocy w analizach statystycznych i opracowaniu graficznym wyników oraz pomocy w redagowaniu manuskryptu.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

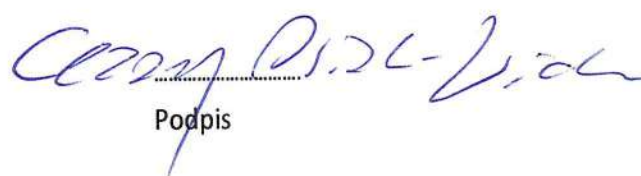
Lublin, 17.10.2025

lek. wet. Cezary Osiak-Wicha
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. 81 445 67 37
cezary.wicha@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kras, K.; Osiak-Wicha, C.; Arciszewski, M.B. 2025 Immunolocalization and immunoexpression levels of sibling peptides nesfatin-1 and ghrelin, and their potentially shared receptor in Holstein–Friesian bulls. PJVS 28(3), 389-402. DOI: 10.24425/pjvs.2025.156064 mój udział polegał na pomocy w analizach statystycznych, pomocy w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje pracy, pomocy w redagowaniu manuskryptu.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Balice, 19.08.2025

prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice
tel. 666 081 208
katarzyna.ropka@iz.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy 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*). Int. J. Mol. Sci. (2024), 25, 533. DOI: 10.3390/ijms25010533 mój udział polegał na pomocy w opracowaniu metodologii analiz PCR, nadzorze i pomocy w prowadzeniu analiz laboratoryjnych (PCR), pomocy w interpretacji wyników, redagowaniu manuskryptu oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji pracy.



Podpis