



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Dominika Szadkowska

wpł. dec. 27.10.
2025v.
SEKRETARIAT
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
/ mgr Małgorzata Malinowska /
starszy specjalista

**Wpływ wybranych ekstraktów oraz związków
z *Cirsium palustre* (L.) Scop. (*Asteraceae*)
na aktywność motoryczną izolowanych
wycinków jelita świni**

Effects of selected extracts and constituents
from *Cirsium palustre* (L.) Scop. (*Asteraceae*) on the motility
of isolated porcine intestinal specimens

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Marty Mendel, prof. SGGW
Zakład Farmakologii i Toksykologii
Katedra Nauk Przedklinicznych

Promotor pomocniczy:
dr n. farm. Jakub Władysław Strawa
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

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

Data 24.10.2025 Czytelny podpis promotora M. Mendel

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 27.10.2025 Czytelny podpis autora rozprawy Dominika Szadkowska

*Serdecznie dziękuję **Pani dr hab. Marcie Mendel, prof. SGGW** za merytoryczne wsparcie, inspirujące wskazówki i życzliwość, wymagającą opiekę naukową na każdym etapie powstawania tej pracy.*

***Panu dr Jakubowi Strawie** dziękuję za cenne uwagi, dyskusje i gotowość do dzielenia się doświadczeniem, które istotnie ukierunkowały moje badania. Jestem wdzięczna **Pracownikom Zakładu Farmakologii i Toksykologii** za pomoc organizacyjną i techniczną, dostęp do aparatury, dzielenie się wiedzą oraz atmosferę współpracy, dzięki której realizacja projektu była możliwa. Najgłębsze podziękowania kieruję do mojej **Rodziny** za nieustające wsparcie, cierpliwość i wiarę we mnie. Szczególnie dziękuję mojemu **Synkowi** – za to, że pojawił się w najwłaściwszym momencie i przypomniał mi, co jest naprawdę ważne. Ta praca powstała także dzięki Wam.*

Spis treści

STRESZCZENIE	7
WYKAZ SKRÓTÓW	11
1. WSTĘP.....	13
1.1. Rośliny lecznicze w medycynie, w tym weterynaryjnej	13
1.1.1. Medycyna tradycyjna	13
1.1.2. Fitoterapia.....	14
1.1.3. Fitoterapia w weterynarii	15
1.1.4. Stosowanie roślin leczniczych w medycynie człowieka i weterynaryjnej - obecny status prawny	17
1.2. Charakterystyka ostrożeńca błotnego (<i>Cirsium palustre</i>).....	19
1.2.1. Biologia i występowanie <i>Cirsium palustre</i>	19
1.2.2. Właściwości farmakologiczne <i>Cirsium palustre</i>	20
1.2.3. Charakterystyka fitochemiczna <i>Cirsium palustre</i>	22
1.2.4. Olejki eteryczne zawarte w <i>C. palustre</i>	30
1.2.5. <i>Cirsium</i> jako roślina lecznicza	31
1.3. Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego.....	33
1.3.1. Wykorzystanie roślin leczniczych w terapii zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego	33
1.4. Izolowane wycinki jelita świni jako model badawczy	39
2. CELE BADAŃ	44
3. MATERIAŁY I METODY	45
3.1. Materiały	45
3.1.1. Zwierzęta	45
3.1.2. Materiał roślinny	46
3.1.3. Odczynniki chemiczne i aparatura	46
3.2. Metody	47
3.2.1. Przygotowanie surowych wyciągów (CP1-CP3) i frakcji (CP4-CP6).....	47
3.2.2. Analiza fitochemiczna wyciągów i frakcji metodą LC-PDA-HRMS	48
3.2.3. Pobranie i preparacja wycinków jelit	49
3.2.4. Rejestracja aktywności motorycznej mięśniówki gładkiej wycinków	49
3.2.5. Przebieg doświadczeń	50
3.2.5.1. Preinkubacja	50
3.2.5.2. Ocena wpływu wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność motoryczną mięśniówki okrężnej i podłużnej jelita czczego i okrężnicy świni.....	42
3.2.5.3. Ocena wpływu głównych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność motoryczną mięśniówki okrężnej i podłużnej jelita czczego i okrężnicy świni.....	52
3.2.6. Analiza i prezentacja wyników	53
4. WYNIKI	54
4.1. Otrzymywanie ekstraktów.....	54
4.2. Profilowanie	54
4.3. Wpływ wyciągów, frakcji oraz flawonoidów <i>C. palustre</i> na motorykę jelit	61
4.3.1. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej jelita czczego.....	61
4.3.2. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej jelita czczego.....	63

4.3.3. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej okrężnicy	65
4.3.4. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej okrężnicy	67
4.3.5. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej jelita czczego	69
4.3.6. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej jelita czczego	70
4.3.7. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej okrężnicy	71
4.3.8. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej okrężnicy	73
4.3.9. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność mięśniówki podłużnej jelita czczego indukowaną ACh	74
4.3.10. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność mięśniówki okrężnej jelita czczego indukowaną ACh	77
4.3.11. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność mięśniówki podłużnej okrężnicy indukowaną ACh	79
4.3.12. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z <i>C. palustre</i> na aktywność mięśniówki okrężnej okrężnicy indukowaną ACh	81
4.3.13. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na indukowaną ACh aktywność mięśniówki podłużnej jelita czczego	83
4.3.14. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na indukowaną ACh aktywność mięśniówki okrężnej jelita czczego	84
4.3.15. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na indukowaną ACh aktywność mięśniówki podłużnej okrężnicy	85
4.3.16. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z <i>C. palustre</i> na indukowaną ACh aktywność mięśniówki okrężnej okrężnicy	86
5. DYSKUSJA	89
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	106
6.1. Podsumowanie wyników	106
6.2. Wnioski	110
PIŚMIENNICTWO	113

Streszczenie

Ostrożeń błotny (*Cirsium palustre* (L.) Scop.) to roślina należąca do rodziny Astrowatych *Asteraceae*, szeroko rozpowszechniona w Europie i Azji. Na tle dobrze udokumentowanego składu chemicznego i zastosowań innych przedstawicieli tej rodziny, niepełna charakterystyka chemiczna oraz ograniczone dane dotyczące właściwości farmakologicznych *C. palustre* stanowiły przesłankę do podjęcia badań fitochemicznych i oceny jego aktywności biologicznej. Celem niniejszej pracy było określenie profilu fitochemicznego oraz zbadanie wpływu wyciągów, frakcji i wybranych metabolitów wtórnych wyizolowanych z kwiatostanów *C. palustre* na aktywność motoryczną jelita czczego i okrężnicy świni. Postawiono hipotezę, że obecne w materiale roślinnym flawonoidy są zdolne do modulowania kurczliwości mięśniówki gładkiej jelit, stanowiąc obiecującą podstawę do opracowania nowych leków roślinnych w terapii zaburzeń przewodu pokarmowego. Pozyskany ze stanowiska naturalnego surowiec - kwiaty ostrożenia błotnego, posłużył jako materiał do badań. W wyniku ekstrakcji wspomagananej ultradźwiękami uzyskano wyciągi: metanolowy (CP1), 50% metanolowy (CP2) oraz wodny (CP3). Równolegle przeprowadzono frakcjonowanie metodą ciecz-ciecz, ekstraktu otrzymanego po oczyszczeniu w aparacie Soxhleta, w wyniku którego otrzymano frakcje: eterową (CP4), octanową (CP5) oraz *n*-butanolową (CP6). Następnie otrzymane wyciągi i frakcje poddano analizie fitochemicznej metodą LC-PDA-HRMS, w wyniku której stwierdzono obecność 37 metabolitów wtórnych. Dominowały estry kwasu chinowego z kwasami: kawowym, ferulowym i *p*-kumarowym oraz liczne flawonoidy, głównie flawony, występujące zarówno w formie aglikonów, jak i glikozydów. Do badań farmakologicznych wytypowano wyróżniające się: apigeninę (API), luteolinę (LUT), chrysoeriol (CHRY) oraz 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC). Jako model doświadczalny do badań farmakologicznych wybrano izolowane wycinki jelita czczego i okrężnicy świni, mając na uwadze jego wysoki potencjał translacyjny. Zaobserwowano, że wyciągi, frakcje oraz izolowane flawonoidy modulowały aktywność mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego (spontaniczną lub indukowaną acetylocholiną (ACh)) w sposób zależny od dawki – CP1 wykazywał efekt spazmolityczny na mięśniówkę jelita czczego i okrężnicy zarówno w warunkach aktywności spontanicznej jak i kurczliwości indukowanej ACh. Wyciąg CP2 działał dwukierunkowo – zwiększał spontaniczną kurczliwość w obu odcinkach jelita, jednocześnie osłabiając skurcze wywołane ACh. W warunkach aktywności spontanicznej CP3 wywoływał efekt proskurczowy w okrężnicy i mięśniówce okrężnej jelita czczego, natomiast w mięśniówce podłużnej działanie prokinetyczne ograniczało się

do najniższego stężenia, po czym następowała miorelaksacja. W warunkach indukowanych ACh odpowiedź mięśniówki podłużnej okrężnicy nie różniła się istotnie od kontroli, podczas gdy w mięśniówce okrężnej okrężnicy oraz w jelicie czczym obserwowano efekt prokinetyczny. Frakcja CP4 wykazywała działanie proskurczowe na mięśniówkę jelita czczego i okrężnicy w warunkach aktywności spontanicznej i indukowanej ACh, z wyjątkiem indukowanych ACh skurczów warstwy podłużnej okrężnicy, wobec których działał rozkurczowo. Frakcje CP5 i CP6 wykazywały prokinetyczne działanie na oba odcinki jelit, zarówno dla kurczliwości spontanicznej jak i indukowanej ACh. API zwiększała spontaniczną kurczliwość jelita czczego i okrężnicy, natomiast w warunkach indukowanych ACh działała prokinetycznie wyłącznie na mięśniówkę podłużną okrężnicy, a w pozostałych przypadkach spazmolitycznie. A7GLC nasilał w sposób zależny od dawki zarówno spontaniczną, jak i indukowaną ACh kurczliwość obu odcinków jelita. LUT wykazywała silne działanie miorelaksacyjne, z wyjątkiem prokinetycznego wpływu na mięśniówkę podłużną jelita czczego. CHRY działał silnie spazmolitycznie, osłabiając kurczliwość spontaniczną i indukowaną ACh we wszystkich wycinkach mięśniówki gładkiej. Wnioski z przeprowadzonych badań wskazują, że *C. palustre* stanowi bogate źródło aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych, zdolnych do istotnej modulacji motoryki przewodu pokarmowego. Zależność efektu od dawki otwiera perspektywę dla personalizacji terapii. Ponadto, udokumentowane w literaturze właściwości jego składników, m.in. przeciwzapalne, immunomodulujące, neuroprotektoryjne oraz wspierające integralność bariery jelitowej stanowią uzasadnienie dla dalszych badań nad wykorzystaniem tego gatunku w schorzeniach przebiegających z zaburzeniami motoryki, takich jak: zespół jelita drażliwego, niestrawność czynnościowa, pooperacyjna niedrożność porażenna czy gastropareza. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w wiedzę o profilu fitochemicznym i potencjalnej aktywności biologicznej *C. palustre*, wyznaczając kierunek do dalszych, pogłębionych badań.

Summary

Marsh thistle (*Cirsium palustre* (L.) Scop.) is a plant belonging to the *Asteraceae* family, widely distributed across Europe and Asia. Against the backdrop of well-documented composition and uses of other family members, the incomplete chemical characterization and scarce data on the pharmacological properties of *C. palustre* provided the basis for phytochemical studies and assessing its biological activity. The aim of this study was to determine the phytochemical profile and the effect of extracts, fractions, and selected secondary metabolites isolated from *C. palustre* inflorescences on the motor activity of the porcine jejunum and colon. The hypothesis was that the flavonoids present in the plant material may modulate the contractility of intestinal smooth muscle, thus providing a promising basis for the development of new plant-based medicines for gastrointestinal diseases. Marsh thistle flowers, which were harvested from their natural habitats, were employed as source material for the research. Ultrasound-assisted extraction yielded methanolic (CP1), 50% methanolic (CP2), and aqueous (CP3) extracts. Parallel to this, the liquid-liquid partitioning extract, which was obtained after purification in a Soxhlet apparatus, provided fractions of diethyl ether (CP4), ethyl acetate (CP5), and *n*-butanol (CP6). The extracts and fractions were subjected to LC-PDA-HRMS analysis, which revealed the presence of 37 secondary metabolites. The dominant compounds were quinic acid esters of caffeic, ferulic, and *p*-coumaric acids, as well as numerous flavonoids, primarily flavones, which were present both as aglycones and as glycosides. For pharmacological testing, the standout constituents apigenin (API), luteolin (LUT), chrysoeriol (CHRY), and apigenin 7-*O*-glucuronide (A7GLC) were selected. Isolated porcine jejunum and colon specimens were selected as an experimental model for pharmacological studies, considering their high translational potential. It was observed that extracts, fractions, and isolated flavonoids modulated gastrointestinal smooth-muscle (spontaneous or acetylcholine (ACh)-induced) activity in a dose-dependent manner, depending on the type of activity – CP1 exerted a spasmolytic effect on jejunal and colonic smooth muscles in both spontaneous and ACh-induced conditions. CP2 displayed a bidirectional effect, enhancing spontaneous contractility in both intestinal segments while attenuating ACh-evoked contractions. In spontaneous conditions, CP3 enhanced contractility in the colon and jejunal circular smooth muscles, but in the jejunal longitudinal smooth muscles, its prokinetic effect was limited to the lowest dose and then reversed to myorelaxation. Under ACh stimulation responses of the colonic longitudinal smooth muscles were comparable to control, whereas the colonic circular smooth muscles and the jejunum showed a prokinetic

response. Under spontaneous conditions, CP3 enhanced contractility in the colon and in the jejunal circular smooth muscle, whereas in the jejunal longitudinal smooth muscle, its prokinetic effect was confined to the lowest dose and subsequently shifted to myorelaxation. Under ACh stimulation, responses of the colonic longitudinal smooth muscle were comparable to the control, whereas the colonic circular smooth muscle and the jejunum exhibited a prokinetic response. CP4 exhibited procontractile effect on the jejunum and colon, except for ACh-evoked contractions of colon longitudinal smooth muscle, where it exerted a spasmolytic effect. CP5 and CP6 exerted a prokinetic effect in both intestinal segments for both spontaneous and induced contractility. API increased spontaneous contractility of the jejunum and colon, while under ACh-induced conditions, it acted prokinetically only on colon longitudinal smooth muscle and spasmolytically in the remaining specimens. A7GLC increased both spontaneous and ACh-induced contractility of both intestinal segments in a dose-dependent manner. LUT exhibited a strong myorelaxant effect, except for a prokinetic effect on the jejunum longitudinal smooth muscle. CHRY exerted a spasmolytic effect, reducing both spontaneous and ACh-induced contractility across the model. The conclusions from the conducted studies indicate that *C. palustre* is a rich source of bioactive secondary metabolites capable of significantly modulating gastrointestinal motility. The dose-dependence of the effect opens up the prospect of personalized therapy. In addition, literature-documented properties of its constituents, i.e., anti-inflammatory, immunomodulatory, neuroprotective, and intestinal barrier supporting rationale for further research on the use of this species in disorders characterized by dysmotility, such as irritable bowel syndrome, functional dyspepsia, postoperative ileus, and gastroparesis. These results significantly expand our knowledge of the phytochemical profile and potential biological activity of *C. palustre*, setting the direction for further in-depth research.

Wykaz skrótów

ACh	chlorek acetylocholiny
DMSO	dimetylosulfotlenek
M K-HS	modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita
ABTS	sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)
CP1	surowy wyciąg metanolowy z kwiatostanów <i>Cirsium palustre</i>
CP2	surowy 50% wyciąg metanolowy z kwiatostanów <i>Cirsium palustre</i>
CP3	surowy wyciąg wodny z kwiatostanów <i>Cirsium palustre</i>
CP4	frakcja eterowa z kwiatostanów <i>Cirsium palustre</i>
CP5	frakcja octanowa z kwiatostanów <i>Cirsium palustre</i>
CP6	frakcja <i>n</i> -butanolowa z kwiatostanów <i>Cirsium palustre</i>
API	apigenina
LUT	luteolina
A7GLC	7- <i>O</i> -glukuronid apigeniny
CHRY	chrysoeriol
TAS	całkowita pojemność antyoksydacyjna (ang. <i>total antioxidant status</i>)
MIC	minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
DGBI	zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego (ang. <i>disorders of gut-brain interaction</i>)
IBS	zespół jelita drażliwego (ang. <i>irritable bowel syndrome</i>)

FD	niestrawność czynnościowa (ang. <i>functional dyspepsia</i>)
IBD	nieswoiste zapalenie jelit (ang. <i>inflammatory bowel disease</i>)
FDr	biegunka czynnościowa (ang. <i>functional diarrhea</i>)
CIC	czynnościowe zaparcie idiopatyczne (ang. <i>chronic idiopathic constipation</i>)
STC	inercja jelita grubego (ang. <i>slow transit constipation</i>)
POI	pooperacyjna niedrożność porażenna jelit (ang. <i>postoperative ileus</i>)
GA	gastropareza (ang. <i>gastroparesis</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
UPW	woda ultra czysta
MeOH	metanol
50% MeOH	50% roztwór metanolu
Et₂O	eter dietylowy
EtOAc	octan etylu
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
FA	kwask mrówkowy (ang. <i>formic acid</i>)
LC-PDA-HRMS	chromatografia cieczowa sprzężona z detektorami fotodiodowym i wysokorozdzielczym masowym

1. Wstęp

1.1. Rośliny lecznicze w medycynie, w tym weterynaryjnej

1.1.1. Medycyna tradycyjna

Według oficjalnej definicji przedstawionej przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) medycyna tradycyjna jest to „suma wiedzy, umiejętności i praktyk opartych na teoriach, przekonaniach i doświadczeniach właściwych różnym kulturom, niezależnie od tego, czy można je wytłumaczyć, czy nie, stosowanych w utrzymaniu zdrowia oraz zapobieganiu, diagnozowaniu, poprawie lub leczeniu chorób fizycznych i psychicznych” (WHO, 2023). Należy przez to rozumieć, że medycyna tradycyjna to zbiór różnorodnych praktyk zdrowotnych, podejść, wiedzy i przekonań, które obejmują stosowanie leków pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mineralnego, terapie duchowe, techniki manualne oraz ćwiczenia fizyczne w celu diagnozowania, leczenia i zapobiegania chorobom oraz ogólnej poprawy samopoczucia (WHO, 2001). Wśród najczęściej stosowanych obecnie systemów medycyny tradycyjnej znajdują się m.in. tradycyjna medycyna chińska, tradycyjna medycyna indyjska (ajurweda) oraz tradycyjna medycyna afrykańska (Che i in., 2017).

Najwcześniejsze dowody na istnienie tradycyjnej medycyny chińskiej (TCM) datowane są na VIII wiek p.n.e. (Pan i in., 2014). TCM obejmuje szeroki zakres praktyk terapeutycznych, w tym akupunkturę, moksybucję (rodzaj termopunktury polegający na wypalaniu stożków z suszonych liści, najczęściej bylicy pospolitej, na punktach akupunkturowych), fitoterapię, terapie manualne, ćwiczenia fizyczne, techniki oddechowe oraz interwencje dietetyczne (James i in., 2020). Tradycyjna medycyna chińska stanowi najczęściej stosowaną formę medycyny tradycyjnej na świecie, znajdując szerokie zastosowanie w praktykach medycznych na różnych kontynentach (WHO, 2001). Ajurweda jest jednym z najstarszych i najbardziej znanych systemów medycyny tradycyjnej na świecie. Ma swoje korzenie w północnych Indiach i szacuje się, że jej początki sięgają X wieku p.n.e. Jej współczesna forma wykrystalizowała się w okresie od V wieku p.n.e. do V wieku n.e. (Adhikari i Paul, 2018). Ajurweda to termin pochodzący z sanskrytu, który oznacza „naukę o życiu” lub „praktyki długowieczności”. Tradycyjna medycyna indyjska promuje określone zmiany stylu życia oraz stosowanie naturalnych środków mających na celu przywrócenie równowagi między ciałem, umysłem, duchem, a środowiskiem. Fundamentem tej praktyki jest założenie, że choroby wynikają z braku równowagi lub stresu w świadomości człowieka (Dhale i Bhagwat, 2024). Tradycyjna medycyna afrykańska była dominującym systemem opieki zdrowotnej na kontynencie

afrykańskim przed przybyciem europejskich kolonizatorów, którzy wprowadzili medycynę opartą na dowodach naukowych (Abdullahi, 2011). Z uwagi na historię kontynentu jest prawdopodobnie jednym z najstarszych najbardziej zróżnicowanych systemów terapeutycznych na świecie (Mahomoodally, 2013). Tradycyjna medycyna afrykańska obejmuje trzy główne obszary specjalizacji: wróżbiarstwo, spirytyzm i ziołarstwo (Chaitanya i in., 2022). Według badań, medycyna tradycyjna wciąż zaspokaja podstawowe potrzeby zdrowotne 80% ludności kontynentu afrykańskiego (WHO, 2022).

Światowa Organizacja Zdrowia od wielu lat prowadzi badania i działalność w zakresie medycyny tradycyjnej. Celem tej działalności jest integracja medycyny tradycyjnej z medycyną konwencjonalną. W 1976 roku WHO zainicjowało program dotyczący medycyny tradycyjnej, który zaowocował utworzeniem dwóch długoterminowych strategii w tej dziedzinie z trzecią planowaną na lata 2025-2034. W 2022 roku WHO we współpracy z rządem Indii rozpoczęło budowę Global Traditional Medicine Centre, którego głównym celem jest opracowanie międzynarodowych standardów zapewniających bezpieczeństwo, jakość oraz dostępność produktów medycyny tradycyjnej. Według danych WHO 170 (ze 194) krajów członkowskich raportuje stosowanie medycyny tradycyjnej przez swoich obywateli (WHO, 2023).

1.1.2. Fitoterapia

Wspólnym elementem nurtów medycyny tradycyjnej z całego świata jest wykorzystanie roślin leczniczych. Od tysiącleci leki ziołowe były szeroko stosowane w tradycyjnych praktykach medycznych. Użycie roślin jako środków leczniczych przez ludzi sięga co najmniej 60 000 lat, o czym świadczą dowody paleobotaniczne znalezione w miejscach pochówku neandertalczyków na terenie dzisiejszego północnego Iraku (Solecki, 1975). Fitoterapia to dziedzina medycyny zajmująca się odpowiednim wykorzystaniem roślin leczniczych oraz ich pochodnych do celów profilaktycznych i terapeutycznych, opierając się na farmakologicznych właściwościach zawartych w nich substancji chemicznych, będącym wtórnymi metabolitami roślin (Allegra i in., 2023). Współcześnie, aż połowa populacji światowej nadal korzysta z leków roślinnych (Vishwakarma i in., 2024). Rośliny lecznicze mają znaczenie nie tylko w medycynie tradycyjnej, lecz także w przemyśle farmaceutycznym, pełniąc rolę istotnego źródła substancji leczniczych. Około 80% wszystkich leków syntetycznych czerpie swoje pochodzenie z substancji wyizolowanych lub zainspirowanych substancjami pochodzenia naturalnego (Bauer i Brönstrup, 2014). Za przykład można podać m.in. kwas acetylosalicylowy (zmodyfikowana cząsteczka występującego m.in. w korze

wierzby *Salicis cortex* kwasu salicylowego), morfinę (która jest składnikiem opium pozyskiwanego z maku lekarskiego *Papaver somniferum* L.) czy winkrystynę (alkaloid barwnika różowego *Catharanthus roseus* (L.) G. Don) (Rates, 2001). Globalny przemysł fitoterapeutyczny rozwija się dynamicznie, z uwagi na wzrastające zapotrzebowanie konsumentów na naturalne oraz alternatywne formy opieki zdrowotnej. Trend ten wynika z rosnącego zainteresowania społecznego bezpiecznymi (za jakie powszechnie uważa się fitoterapię), niekonwencjonalnymi metodami terapeutycznymi, które są postrzegane jako mniej inwazyjne i bardziej zgodne z filozofią zdrowego stylu życia (Bhattacharjee i in., 2023; Sitohang i in., 2024). Fitoterapia odnotowuje największą popularność wśród pacjentów zmagających się z chorobami przewlekłymi, takimi jak np. nadciśnienie, cukrzyca, artretyzm, nowotwory oraz astma (Abdelmola i in., 2021; Bishop i Lewith, 2000; Rashrash i in., 2017). Rosnąca prewencja chorób przewlekłych na świecie (Hacker, 2024; van Oostrom i in., 2016) podkreśla potrzebę poszukiwania nowych surowców o potencjalnym zastosowaniu w fitoterapii.

1.1.3. Fitoterapia w weterynarii

Historia fitoterapii w medycynie weterynaryjnej jest równie długa jak w medycynie ludzkiej, sięgając starożytnych cywilizacji, kiedy rośliny lecznicze były jednym z głównych środków stosowanych zarówno w leczeniu ludzi, jak i zwierząt (Wynn i Fougere, 2006). Pierwsze dowody na stosowanie roślin leczniczych w weterynarii stanowią zachowane do dziś teksty medyczne z różnych kultur. W starożytnych Indiach, już w „Rygwedzie” (ok. 1500-1200 p.n.e.), w jednym z najstarszych tekstów religijnych i filozoficznych, można znaleźć wzmianki o wykorzystaniu roślin w leczeniu zwierząt (Chakraborty, 2023). Jako przykłady przytoczyć można wykorzystanie ostryżu długiego (*Curcuma longa*) i sezamu indyjskiego (*Sesamum indicum*) w leczeniu zatrzymania łożyska u bydła (Kumar i in., 2015). W starożytnym Egipcie dowody na stosowanie roślin leczniczych w weterynarii można znaleźć w Papirusie z Kahun (ok. 1800 p.n.e.), który zawiera przepisy medyczne dotyczące leczenia zwierząt, zwłaszcza bydła i owiec, za pomocą naturalnych składników (Abdellaah i in., 2019). Historia tradycyjnej chińskiej medycyny weterynaryjnej, obejmującej takie metody jak akupunktura i ziołolecznictwo, sięga kilku tysięcy lat (Xie i Preast, 2013). Leczenie zwierząt w tradycyjnej medycynie chińskiej było uważane za równie istotne, co leczenie ludzi, co odzwierciedlało holistyczne podejście do zdrowia i harmonii w naturze (Lin i Panzer, 1994). Również w innych starożytnych cywilizacjach, takich jak Mezopotamia, antyczna Grecja i Rzym, istniały

rozbudowane systemy medycyny, które obejmowały także leczenie zwierząt przy użyciu roślin (Wynn i Fougere, 2006). Fitoterapia była jednym z głównych filarów leczenia zwierząt przez wiele stuleci i dopiero wraz rozwojem nowoczesnej weterynarii na przełomie XIX i XX wieku zaczęła tracić na znaczeniu na rzecz nowych, syntetycznych leków (Lees i in., 2013). Kamieniem milowym w rozwoju weterynarii stało się wprowadzenie antybiotyków do leczenia zwierząt, które miało miejsce tuż po zakończeniu II wojny światowej (Prescott, 2017). Jednak w ostatnich dekadach obserwuje się odrodzenie zainteresowania medycyną tradycyjną i fitoterapią w weterynarii, zarówno w kontekście leczenia zwierząt towarzyszących, jak i gospodarskich. Z przeprowadzonego w 2022 roku badania wynika, że liczba wzmianek o tradycyjnej medycynie chińskiej w literaturze weterynaryjnej w latach 2011-2020 wzrosła o ponad 1000% w porównaniu do dekady poprzedzającej ten okres (Domingues i in., 2022). Preparaty ziołowe w weterynarii są najczęściej stosowane w leczeniu dużych zwierząt, takich jak bydło, konie, owce, kozy i świnie (Romero i in., 2022). Fitoterapia znajduje również zastosowanie w medycynie innych zwierząt gospodarskich, w tym drobiu (Hartady i in., 2021) i akwakulturze (Ng i in., 2023). W kontekście profilaktyki i leczenia zwierząt gospodarskich, wzrost zainteresowania alternatywnymi metodami, wynika z kilku kluczowych czynników. Po pierwsze, nadmierne stosowanie antybiotyków, leków odrobaczających, pestycydów i środków odkażających wywiera negatywny wpływ na środowisko oraz zdrowie ludzi i zwierząt (Mestorino i Reeve-Johnson, 2023). Po drugie, narastający problem antybiotykoodporności, czy też szerzej oporności przeciw lekom przeciwdrobnoustrojowym i przeciwpasożytniczym stanowi poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego i wymaga poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych (Tamminen i in., 2018). Po trzecie, zmieniająca się świadomość społeczna związana z bezpieczeństwem żywności, dobrostanem zwierząt oraz kwestiami środowiskowymi przyczyniają się do szybko zwiększającego się popytu na produkty żywności ekologicznej (Aitken i in., 2020; Peng, 2019). Ponadto zmieniające się, nie tylko w konkretnych państwach, ale też na arenie międzynarodowej przepisy, mają wpływ na zwiększone zainteresowanie lekami ziołowymi. Nowe polityki i strategie Unii Europejskiej, jak np. Europejski Zielony Ład i związana z nim strategia „od pola do stołu”, wyznaczają takie cele jak zmniejszenie o 50% sprzedaży środków przeciwdrobnoustrojowych dla zwierząt gospodarskich i akwakultury do 2030 r. Powoduje to intensyfikację wysiłków na rzecz zwalczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz poprawy dobrostanu zwierząt (KE, 2020). Realizacja strategii w ramach wspólnej polityki rolnej (WPR), dążenie do objęcia 25% powierzchni gruntów rolnych rolnictwem ekologicznym oraz wdrażanie planu działania na rzecz zerowego poziomu zanieczyszczeń (EEA, 2022) i strategicznego podejścia do

farmaceutyków w środowisku (KE, 2018) promują przejście na bardziej zrównoważone systemy produkcji zwierzęcej. Jednocześnie, nowe podejście „Jedno zdrowie” (OHHLEP, 2022) podkreśla zintegrowane działania na rzecz zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska, które mogą stymulować dalszy rozwój i akceptację metod takich jak fitoterapia. W ciągu ostatnich lat fitoterapia zyskuje na popularności również w medycynie weterynaryjnej małych zwierząt, odzwierciedlając rosnące oczekiwania właścicieli, którzy poszukują alternatywnych metod leczenia dla swoich zwierząt (Russo i in., 2009). Coraz więcej opiekunów zwierząt domowych oczekuje, aby w terapii stosowano naturalne preparaty ziołowe, które są powszechnie uważane za bezpieczniejsze, mniej obciążające dla organizmu, a także bardziej przystępne cenowo niż tradycyjne leki syntetyczne (Quintavalla, 2024). Ta zmiana w podejściu wynika z rosnącej świadomości na temat zdrowia i dbałości o dobrostan zwierząt, a także z trendów przenikających z medycyny ludzkiej, gdzie fitoterapia odgrywa coraz większą rolę. Wielu właścicieli zwierząt decyduje się na samodzielne stosowanie fitoterapeutyków, często bez wcześniejszej konsultacji z lekarzem weterynarii (Russo i in., 2009). Także wśród lekarzy weterynarii obserwuje się coraz większe zainteresowanie fitoterapią (Romero i in., 2022; Stanossek i Wehrend, 2022). Coraz chętniej sięgają oni po preparaty ziołowe jako element uzupełniający konwencjonalne metody leczenia, widząc w nich potencjał do wspierania zdrowia zwierząt w sposób bardziej holistyczny (Pesch, 2014). Fitoterapia weterynaryjna znajduje szczególne zastosowanie w takich dziedzinach jak: geriatria (Kidd, 2012), pediatria (Pesch, 2014; Quintavalla, 2024), dermatologia (Budgin i Flaherty, 2013) i urologia (Raditic, 2015). Ponadto, fitoterapeutyki zyskują uznanie w terapii zaburzeń behawioralnych, gdzie mogą wspierać równowagę emocjonalną zwierząt (Ağan i in., 2022). Największą popularnością cieszy się natomiast, podobnie jak w medycynie ludzkiej, w terapii chorób przewlekłych (Debnath i Hazarika, 2023; Meineri i in., 2022) oraz we wspomaganiu odporności (Biazar i in., 2018; Thacker, 2010).

1.1.4. Stosowanie roślin leczniczych w medycynie człowieka i weterynaryjnej - obecny status prawny

Przepisy dotyczące stosowania roślin leczniczych w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej różnią się w zależności od kraju, odzwierciedlając lokalne tradycje, podejście do regulacji zdrowotnych oraz standardy bezpieczeństwa. Na poziomie międzynarodowym, Światowa Organizacja Zdrowia promuje zasady dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności medycyny tradycyjnej, w tym fitoterapii. WHO opracowała wytyczne dla rejestracji

i monitorowania tradycyjnych produktów leczniczych, co ma na celu harmonizację regulacji w różnych krajach.

Regulacje dotyczące stosowania roślin leczniczych w Polsce są zgodne z przepisami Unii Europejskiej. Jednym z kluczowych aktów prawnych regulujących stosowanie roślin leczniczych w UE jest Dyrektywa 2004/24/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 roku. Wprowadza ona przepisy dotyczące tradycyjnych produktów leczniczych roślinnych (ang. *Traditional Herbal Medicinal Products*, THMP). Zgodnie z dyrektywą, produkty te mogą być dopuszczone do obrotu na rynku unijnym, jeśli spełniają określone kryteria, takie jak długotrwałe stosowanie (minimum 30 lat, z czego 15 lat na terenie UE), bezpieczeństwo oraz ustalona skuteczność. Produkty muszą również spełniać standardy jakościowe, co obejmuje kontrolę surowców, procesu produkcji i gotowego produktu. W Polsce implementacja dyrektywy 2004/24/WE nastąpiła poprzez odpowiednie przepisy krajowe, głównie w ramach Ustawy o produktach leczniczych z dnia 6 września 2001 roku, z późniejszymi zmianami. Ustawa ta reguluje kwestie związane z rejestracją, produkcją, dystrybucją i nadzorem nad produktami leczniczymi, w tym ziołowymi. Organem odpowiedzialnym za nadzór nad produktami leczniczymi roślinnymi jest Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPLW MiPB). W chwili obecnej brak jest jednolitych przepisów regulujących rejestrację i wprowadzanie do obrotu weterynaryjnych roślinnych produktów leczniczych na terenie Unii Europejskiej. W praktyce oznacza to, że preparaty oparte na tradycyjnych produktach roślinnych są wprowadzane na rynek przede wszystkim jako dodatki paszowe lub karmy uzupełniające, co ogranicza ich formalne uznanie jako środków leczniczych. Zgodnie z Artykułem 157 rozporządzenia KE 2019/6 Komisja Europejska jest zobowiązana do przedstawienia do 29 stycznia 2027 r. sprawozdania na temat tradycyjnych produktów roślinnych stosowanych w leczeniu zwierząt. Sprawozdanie to, opracowane w oparciu o dane dostarczone przez państwa członkowskie, może stać się podstawą dla wprowadzenia uproszczonego systemu rejestracji tych produktów, co przyczyniłoby się do ich szerszego zastosowania w weterynarii.

Medycyna tradycyjna, z bogatym dorobkiem i różnorodnością systemów leczniczych, odgrywa wciąż znaczącą rolę w kontekście współczesnych terapii. Fitoterapia jako jedna z kluczowych gałęzi medycyny tradycyjnej, wykorzystuje rośliny lecznicze zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej, bazując na wiedzy zgromadzonej przez wieki. Obecnie, pomimo intensywnego rozwoju i nowoczesnych technologii, fitoterapia cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Rosnąca popularność w społeczeństwie oraz aspekty ekonomiczne przemawiają za intensywnym rozwojem tej gałęzi lecznictwa. W świetle rosnącej

potrzeby odkrywania nowych, skutecznych środków terapeutycznych, niezbędne jest dalsze poszukiwanie nowych surowców roślinnych, które mogłyby wzbogacić arsenał fitoterapeutyczny.

Znaczna część problemów zdrowotnych u różnych gatunków zwierząt wynika z dysfunkcji przewodu pokarmowego. Zjawisko to dotyczy zarówno zwierząt domowych, takich jak psy i koty (Maliuk i in., 2024), oraz małych ssaków egzotycznych (Huynh i Pignon, 2013), jak i zwierząt gospodarskich, w tym bydła (Khalphallah i in., 2021), małych przeżuwaczy (Bayne i Edmondson, 2021), wielbłądowatych (Cebra, 2014), trzody chlewnej (Thomson i Friendship, 2019) oraz drobiu (Morishita i Porter, 2021). Znaczną część tych schorzeń stanowią choroby zakaźne, w tym pasożytnicze (Gunathilaka i in., 2018; Schmid i in., 2024). Badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych w latach 2019-2022 wykazały, że u psów z objawami ze strony przewodu pokarmowego najczęstszą przyczyną choroby były zakażenia pasożytnicze, stanowiące 17% przypadków (Schmid i in., 2024). W przypadku zwierząt hodowlanych zaburzenia przewodu pokarmowego są jedną z kluczowych przyczyn śmiertelności (Wilson i in., 2022), co generuje znaczne straty ekonomiczne. Wiele patogenów wywołujących zaburzenia przewodu pokarmowego u zwierząt wykazuje potencjał zoonotyczny. Przykładowo, bakterie z rodzaju *Salmonella*, często przenoszone poprzez spożycie mięsa drobiowego, odpowiadają za około 93,8 miliona zakażeń i 155 tysięcy zgonów rocznie na świecie (Peng i in., 2024). Biorąc pod uwagę ewoluujące się wśród właścicieli zwierząt i konsumentów preferencje oraz zmieniające się przepisy prawa dotyczące leków stosowanych u zwierząt wyłania się pilna potrzeba poszukiwania nowych rodzajów leków do zastosowania w tym obszarze.

1.2. Charakterystyka ostrożenia błotnego (*Cirsium palustre*)

1.2.1. Biologia i występowanie *Cirsium palustre*

Ostrożeń błotny (*Cirsium palustre* (L.) Scop., ang. *marsh thistle*) jest rośliną zielną należącą do rodziny Astrowatych (łac. *Asteraceae*). Gatunek ten rodzimy jest dla Europy oraz zachodniej i wschodniej Syberii. Został także wprowadzony w północnych Stanach Zjednoczonych i Kanadzie (Invasive Species Council of BC, 2021; Tohver, 1998). W niektórych regionach (np. Wisconsin, USA) jest uznawany za gatunek inwazyjny (Cao i in., 2024). Występuje na różnorodnych siedliskach, takich jak pastwiska, łąki kośne, a czasami także w wilgotnych lasach olszowych (Pons i During, 1987). Ostrożeń błotny zaliczany jest do bylin dwuletnich oraz roślin monokarpicznych - zakwita jedynie raz, a następnie zamiera

(Rutkowski, 2008). W pierwszym roku wegetacji wyrasta w formie rozety o wąskich, kolczastych liściach z fioletowymi krawędziami. W kolejnym roku tworzy wysoką, silnie kolczastą łodygę, równomiernie pokrytą liśćmi, której szczyt zakończony jest koszyczkami ciemnofioletowych kwiatów. Osiąga od 30-50 do 120-250 cm wysokości (Tutin i in., 1964). Okres kwitnienia przypada od czerwca do września. Pojedyncza roślina może wyprodukować do 2000 nasion, które są następnie rozprzestrzeniane przez wiatr i wodę lub wraz z odchodami zwierząt. Żywotność nasion w glebie wynosi do 3 lat (Rada ds. Gatunków Inwazyjnych BC, 2021). Ostrożeń błotny może tworzyć spontaniczne hybrydy w obrębie rodzaju *Cirsium* (Stace, 1975).

1.2.2. Właściwości farmakologiczne *Cirsium palustre*

Jednym z obszarów badań poświęconych aktywności biologicznej ostrożenia błotnego była ocena działania antyoksydacyjnego. W modelu *in vitro* z użyciem metody spektrofotometrycznej zbadano ekstrakty z pięciu gatunków *Cirsium spp.* (*C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare* oraz *C. vulgare*). Ekstrakt metanolowy oraz frakcje (chloroformowa, eterowa, octanowo-etylowa i *n*-butanolowa) z liści *C. palustre* wykazywały najwyższą wśród wszystkich gatunków aktywność przeciwutleniającą, wyrażoną jako całkowity status antyoksydacyjny (TAS), w zakresie od 1,75 do 2,7 mmol/l. Najwyższą aktywność zaobserwowano dla frakcji octanowo-etylowej oraz *n*-butanolowej, których działanie było zbliżone do wartości uzyskanej dla próby kontrolnej z kwercetyną (3,5 mmol/l). Ocenę przeprowadzono z wykorzystaniem testu z rodnikiem kationowym ABTS (sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)) (Nazaruk, 2008). Badania z użyciem surowych ekstraktów wodnych z liści *C. palustre* potwierdziły ich potencjał antyoksydacyjny (TAS=2,78 mmol/l) (Nazaruk i in., 2008). W późniejszych badaniach *in vitro* metodą spektrofotometryczną oceniono zdolność redukcji wolnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) do oceny aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów metanolowych i heksanowych z owoców *C. palustre* i *C. rivulare* (ostrożenia łąkowego). Aktywność przeciwutleniającą wyrażono jako % usuniętego rodnika DPPH. Dla ekstraktów heksanowego i metanolowego z *C. palustre* aktywność wynosiła odpowiednio 35,56% i 91,36% - była wyższa niż *C. rivulare* (14,22% ekstrakt heksanowy i 88,55% ekstrakt metanolowy) (Nazaruk i in., 2012b). Analiza przeciwutleniaczy zawartych w liściach *C. palustre* wykazała przewagę flawonoidów: 7-*O*-glukozydu eriodykcjolu, 7-*O*-glukozydu luteoliny i 7-*O*-glukozydu 6-hydroksyluteoliny, a także kwasu chlorogenowego (Nalewajko-Sieliwoniuk i in., 2015).

Innym kierunkiem badań były prace mające na celu ustalenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów pozyskanych z *C. palustre*. Badania dowiodły, że etanolowe wyciągi *C. palustre* wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec szczepów *Staphylococcus aureus* (minimalne stężenie hamujące, MIC = 500 µg/ml), *S. aureus* oporny na metycylinę, MRSA (MIC = 375 µg/ml) i *Bacillus cereus* (MIC = 500 µg/ml) (Kenny i in., 2014). Wodny ekstrakt z liści *C. palustre* wykazał najwyższą aktywność przeciwbakteryjną spośród badanych gatunków (*C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare* oraz *C. vulgare*) wobec badanych mikroorganizmów z wartością MIC: 3,12 mg/ml (*S. aureus*), 25 mg/ml (*Pseudomonas aeruginosa*) i 25 mg/ml (*Bacillus subtilis*) oraz działanie przeciwgrzybicze MIC = 0,78 mg/ml (wobec *Candida albicans*) (Nazaruk i in., 2008). Kolejne doświadczenie badające działanie ekstraktów metanolowych z liści i kwiatów *Cirsium palustre* przeciwko *S. aureus*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* również potwierdziło przeciwbakteryjny potencjał tej rośliny. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa na *B. subtilis* wynosiła MIC = 6,25 mg/ml (ekstrakt z kwiatów) i MIC = 1,56 mg/ml (ekstrakt z liści). MIC wobec *P. aeruginosa* wyniósł 25 mg/ml (ekstrakty z kwiatów) i 50 mg/ml (ekstrakt z liści). W przypadku *S. aureus* MIC określono na 6,25 mg/ml zarówno dla ekstraktu z liści, jak i kwiatów. Stwierdzono również, że dodatek pikolinianu sodu (PS) do ekstraktów zwiększa ich działanie przeciwbakteryjne na *S. aureus* (MIC = 1,25-5,00 mg/ml w zależności od stężenia PS) (Borawska i in., 2010).

Ponadto wyniki badań opublikowanych w 2012 roku potwierdziły antyproliferacyjne działanie olejku eterycznego *C. palustre* na komórki gruczolakoraka piersi (MCF-7 i MDA-MBA-231). Dowiedziono, że olejki eteryczne z korzeni *C. palustre* wykazują umiarkowane działanie antyproliferacyjne wobec gruczolakoraka, przy wartościach IC₅₀ w zakresie od 110 do 140 µg/ml. Badane stężenia były poniżej poziomu zdolnego do hamowania proliferacji prawidłowych komórek - CRL 1474 (normal skin fibroblasts) (Nazaruk i in., 2012a). Co więcej, inne badania dowiodły, że flawonoidy (7-*O*-glukozyd eriodykcjolu, 7-*O*-glukozyd skutelareiny, 7-*O*-glukozyd 6-hydroksyluteoliny oraz pedalityna) wyizolowane z metanolowego ekstraktu z liści *C. palustre* zwiększają ekspresję kolagenu typu I i III w mRNA w zależności od swojego stężenia (Nazaruk i Galicka, 2014).

1.2.3. Charakterystyka fitochemiczna *Cirsium palustre*

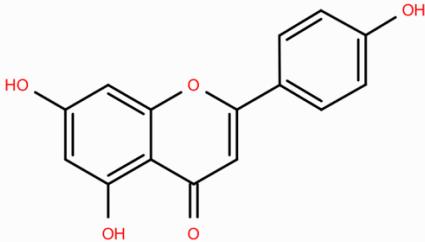
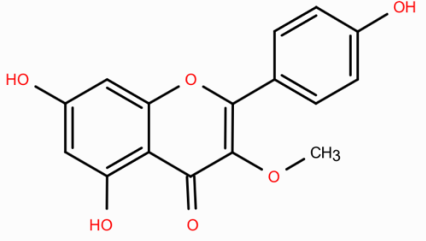
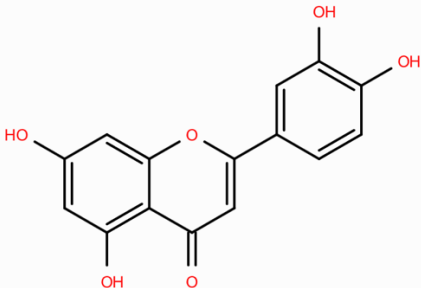
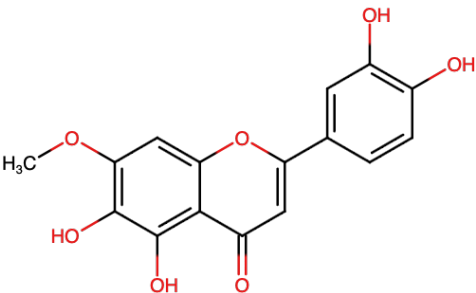
1.2.3.1. Flawonoidy

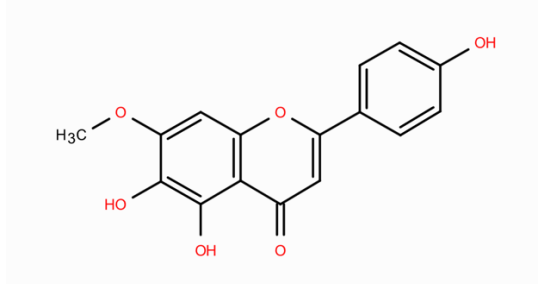
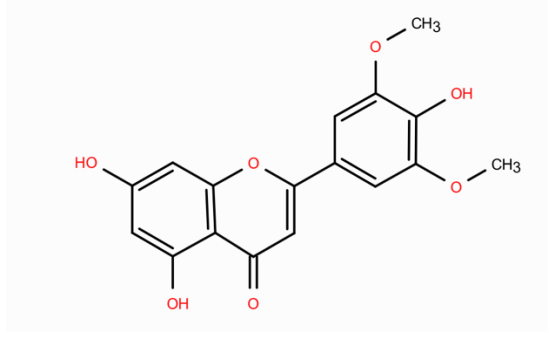
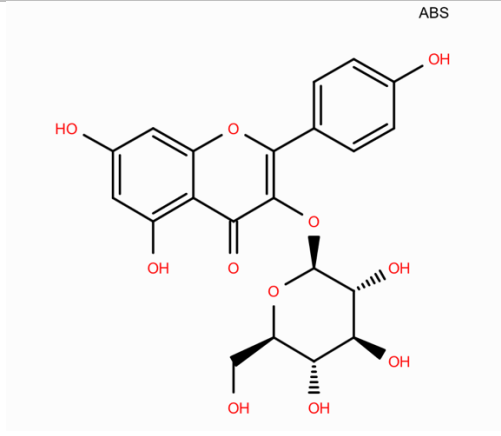
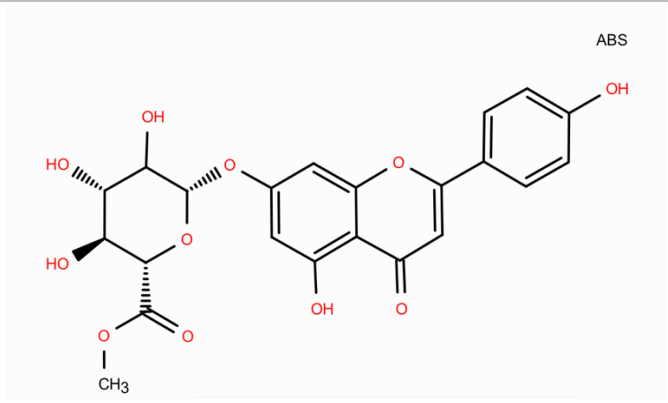
Flawonoidy stanowią istotną grupę metabolitów wtórnych roślin należącą do polifenoli. Występują w dużych ilościach w owocach, nasionach, liściach i innych częściach roślin, nadając im charakterystyczną barwę, aromat i smak. Pełnią one także szereg innych funkcji, takich jak regulacja wzrostu i rozwoju roślin oraz ochrona przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi (Dias i in., 2021). Są one wykorzystywane jako kluczowe składniki wielu produktów nutraceutycznych, farmaceutycznych i kosmetycznych ze względu na ich właściwości przeciwutleniające (Firuzi i in., 2005; Szewczyk i in., 2020), przeciwzapalne (Maleki i in., 2019; Yahfoufi i in., 2018), przeciwmutagenne (Matsumoto i in., 2017; Snijman i in., 2007) i przeciwnowotworowe (Mir i in., 2024; Chirumbolo i in., 2018) oraz zdolność do modulowania kluczowych funkcji enzymów komórkowych (Panche i in., 2016). Dodatkowo flawonoidy charakteryzują się działaniem neuroprotekcyjnym (Bellavite, 2023) i kardioprotekcyjnym (Xie i in., 2018), co podkreśla ich szeroki potencjał terapeutyczny w zapobieganiu i leczeniu chorób przewlekłych oraz degeneracyjnych (Ullah i in., 2020).

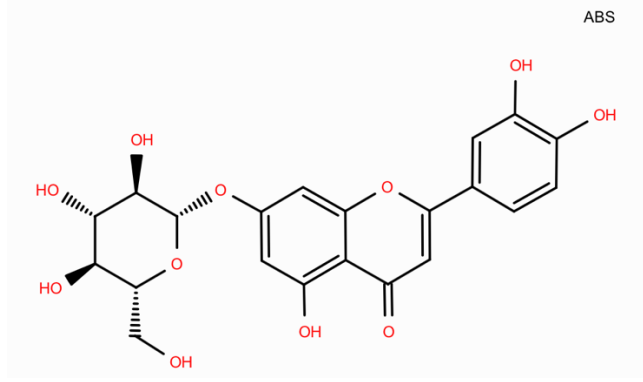
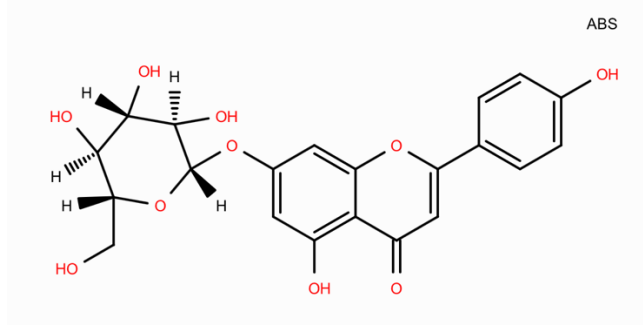
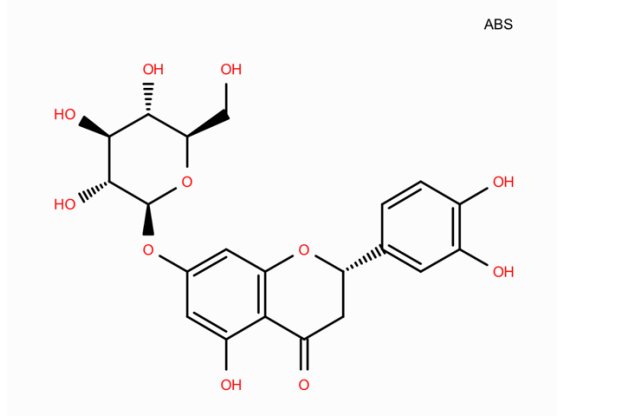
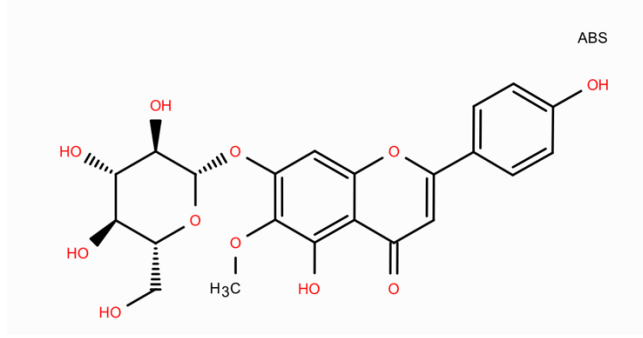
Dotychczasowe badania wykazały, powszechne występowanie flawonoidów w różnych organach *Cirsium palustre*, zarówno w postaci wolnych aglikonów jak ich pochodnych (Nalewajko-Sieliwoniuk i in., 2015; Nazaruk i Galicka, 2014; Nazaruk i Gudej, 2003). Ponadto wykazano, że ilościowa zawartość tych związków różni się pomiędzy poszczególnymi częściami rośliny (Nazaruk, 2008). Do wolnych aglikonów obecnych w tym gatunku należą flawony t.j.: apigenina, luteolina, trycyna, pedalityna oraz sorbifolina. Wśród form związanych w *C. palustre* wykryto glikozydy i glukuronidy które są powszechnymi formami koniugacyjnymi flawonoidów. Obserwuje się obecność izokemferydu w postaci wolnego aglikonu, jak i 7-*O*-glukozydu. Apigeninę reprezentuje w surowcu postać niezwiązana, jak i pochodne: 7-*O*-glukozyd apigeniny, 7-*O*-(6"-metyloglukuronid) apigeniny oraz 7-*O*-glukuronid apigeniny, co wskazuje na jej wysoką zdolność do koniugacji. Podobnie luteolina występuje zarówno jako wolny aglikon, jak i w postaci 7-*O*-glukozydu luteoliny. Ponadto, wśród glikozydów flawonoidowych obecnych w *C. palustre* wyróżniono 7-*O*-glukozyd hispiduliny, 3-*O*-glukozyd kemferolu, 7-*O*-glukozyd eriodykcjolu, 7-*O*-glukozyd 6-hydroksyluteoliny, 7-*O*-glukozyd naryngeniny, 7-*O*-glukozyd 6-hydroksyluteoliny oraz 7-*O*-glukozyd skutelareiny, które mogą mieć istotne znaczenie w kontekście ich właściwości farmakologicznych.

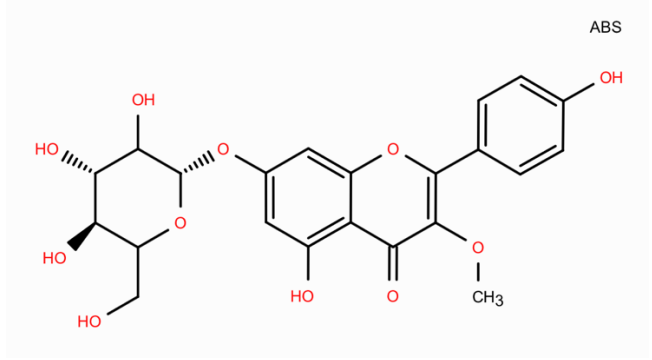
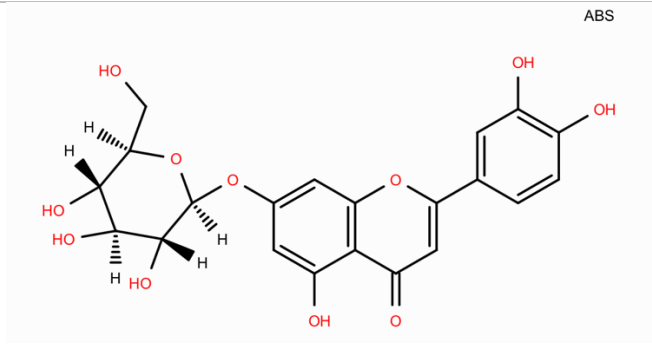
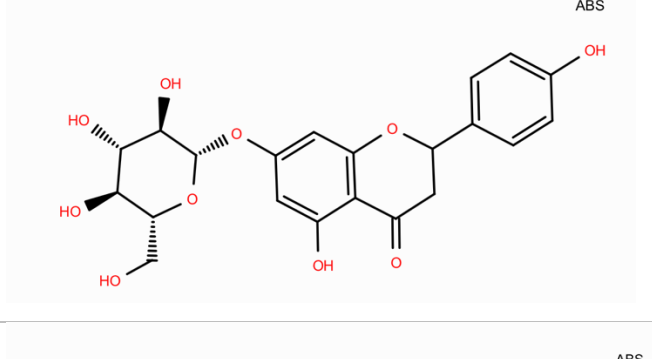
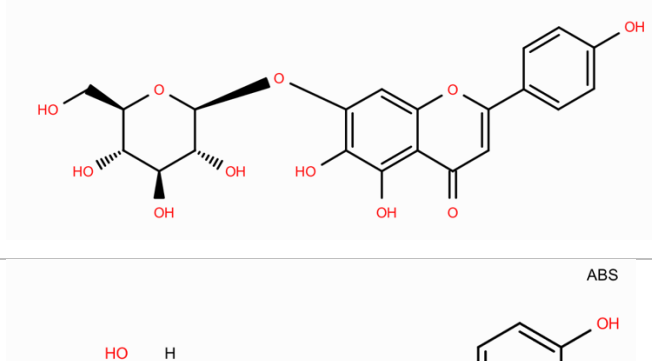
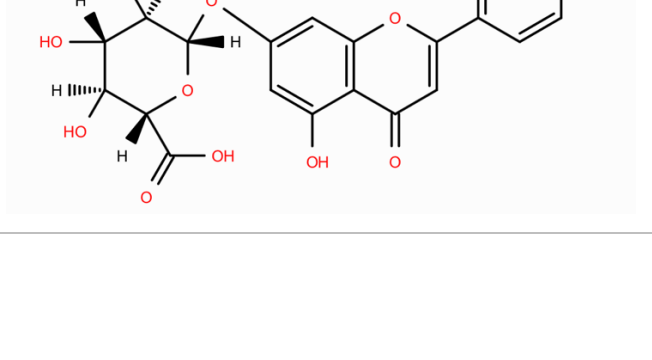
Dokładną reprezentację flawonoidów zawartych w *C. palustre* zawarto w Tabeli 1.

Tabela 1. Flawonoidy wyizolowane z *C. palustre*

Nazwa związku	Wzór sumaryczny	Struktura chemiczna
apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	
izokemferyd	$C_{16}H_{12}O_6$	
luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	
pedalityna	$C_{16}H_{12}O_7$	

sorbifolina	$C_{16}H_{12}O_6$	
trycyna	$C_{17}H_{14}O_7$	
3-O-glukozyd kemferolu	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ABS 
7-O-(6"- metyloglukuronid) apigeniny	$C_{22}H_{20}O_{11}$	ABS 

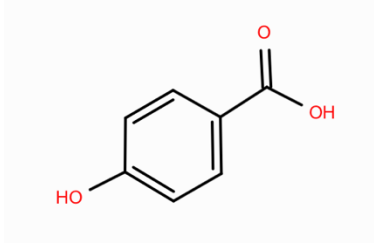
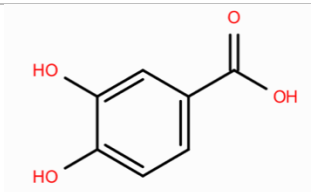
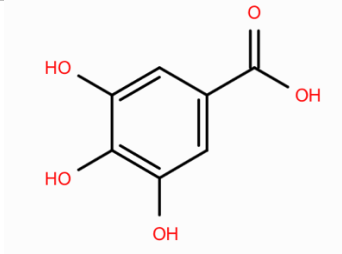
7- <i>O</i> -glukozyd 6-hydroksyluteoliny	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	ABS 
7- <i>O</i> -glukozyd apigeniny	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	ABS 
7- <i>O</i> -glukozyd eriodykcjolu	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	ABS 
7- <i>O</i> -glukozyd hispiduliny	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	ABS 

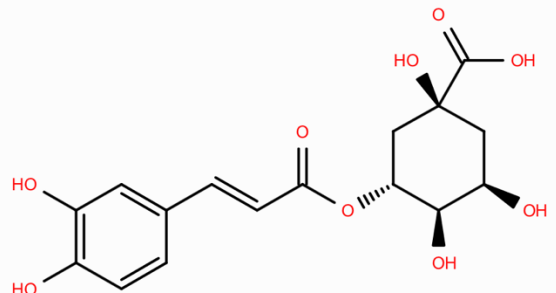
7- <i>O</i> -glukozyd izokemferydu	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	
7- <i>O</i> -glukozyd luteoliny	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	
7- <i>O</i> -glukozyd naryngeniny	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	
7- <i>O</i> -glukozyd skutelareiny	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	
7- <i>O</i> -glukuronid apigeniny	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	

1.2.3.2. Kwasy fenolowe

Kwasy fenolowe, podobnie jak flawonoidy należące do polifenoli, są grupą związków organicznych obecnych w różnych częściach wielu gatunków roślin. Są to aromatyczne metabolity wtórne, pełniące rolę barwników i nadające roślinom unikalne cechy sensoryczne, takie jak barwa, smak, odczucia w jamie ustnej (cierpkość, szorstkość) oraz zapach (Rashmi i Negi, 2020). Kwasy fenolowe wykazują szerokie spektrum działania biologicznego, obejmujące właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwalergiczne, przeciwmiażdżycowe, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzakrzepowe, kardioprotekcyjne, przeciwnowotworowe oraz przeciwcukrzycowe (Kiokias i in., 2020). Dotychczas opisane w *Cirsium palustre* kwasy fenolowe to wyizolowane z liści i zidentyfikowane metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej: kwas chlorogenowy, kwas galusowy, kwas protokatechowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy (Nazaruk i in., 2008).

Tabela 2. Kwasy fenolowe wyizolowane z *C. palustre*

Struktura chemiczna	Wzór sumaryczny	Struktura chemiczna
kwas 4-hydroksybenzoesowy	$C_7H_6O_3$	
kwas protokatechowy	$C_7H_6O_4$	
kwas galusowy	$C_7H_6O_5$	

kwas chlorogenowy	$C_{16}H_{18}O_9$	ABS 
-------------------	-------------------	--

1.2.3.3. Triterpeny

Triterpeny, jako liczna grupa metabolitów wtórnych roślin, są szeroko rozpowszechnione w różnych tkankach roślinnych, takich jak liście, kora, owoce i korzenie (Jäger i in., 2009). Różnorodność strukturalna tej grupy związków jest znaczna, co odzwierciedla się w liczbie ponad 20 000 opisanych do tej pory triterpenów (Thimmappa i in., 2014). Liczne badania wskazują na szeroki zakres aktywności biologicznej triterpenów, obejmujący między innymi działanie przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne (Renda i in., 2021). Przeprowadzone analizy fitochemiczne owoców i kwiatów *C. palustre* potwierdziły obecność reprezentantów tej klasy związków: 24-metylenocykloartanolu, a-amyriny, b-amyriny, octanu a-amyriny, octanu b-amyriny, octanu lupeolu oraz faradiolu w tym gatunku rośliny (Nazaruk i Jablonski, 2011; Nazaruk i in., 2012b).

1.2.3.4. Fitosterole

Fitosterole, organiczne związki zaliczane do steroidów, są naturalnie występującymi składnikami różnych części roślin (w tym korzeni, łodyg, liści, kwiatów, owoców i całych traw) (Li i in., 2022). Wykazują znaczące podobieństwo strukturalne do cholesterolu, będąc jego roślinnymi odpowiednikami. Zlokalizowane są głównie w błonach komórkowych oraz w cytoplazmie roślin, pełniąc istotne funkcje w utrzymaniu integralności i funkcjonowania komórki. Różnorodność gatunków roślin przekłada się na zróżnicowany skład fitosteroli, wśród których zidentyfikowano już ponad 250 różnych związków (Salehi i in., 2021). Na podstawie stopnia nasycenia wiązaniami podwójnymi w cząsteczce, fitosterole dzieli się na sterole (nienasycone) oraz stanole (nasycone) (Piironen i in., 2000). Najwięcej fitosteroli znajduje się

w tłustych owocach, nasionach oleistych oraz w olejach pozyskiwanych z tych surowców (Jiménez-Escrig i in., 2006). Coraz liczniejsze badania naukowe potwierdzają szerokie spektrum działania farmakologicznego fitosteroli i ich pochodnych. Wśród najbardziej istotnych właściwości wymienia się zdolność do obniżania poziomu cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL, jak również działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwwrzodowe, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe i hipoglikemiczne (Salehi i in., 2021). Przeprowadzona analiza składu fitosteroli w *C. palustre* wykazała obecność sześciu różnych związków z tej grupy (Nazaruk i Jablonski, 2011; Nazaruk i in., 2012b) wśród których β -sitosterol występował w największym stężeniu (Nazaruk i in., 2012b). Szczegółowe dane dotyczące zawartości poszczególnych fitosteroli przedstawiono w Tabeli 3.

1.2.3.5. Kwasy tłuszczowe

Kwasy tłuszczowe jako podstawowe składniki lipidów, pełnią kluczową rolę w funkcjonowaniu komórek roślinnych. Występują głównie w formie estrów gliceryny, budując struktury błon komórkowych, chloroplastów i mitochondriów (Harborne i Baxter, 1993). Wśród kwasów tłuszczowych roślin dominują związki nasycone oraz proste nienasycone o długości łańcucha C16 i C18. Coraz więcej badań wskazuje na szeroki zakres aktywności biologicznej tych związków, obejmujący między innymi działanie przeciwdrobnoustrojowe (McGaw i in., 2002; Skalicka-Woźniak i in., 2010), przeciwzapalne (Hanh i in., 2011; Micallef i Garg, 2009), neuroprotektoryjne (Eckert i in., 2010) oraz kardioprotekcyjne (Micallef i Garg, 2009). W przypadku *C. palustre*, dominują nienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak linolowy (18:2) i oleinowy (18:1), co potwierdzają wyniki przeprowadzonych analiz (Nazaruk i in., 2012b). Szczegółowy profil kwasów tłuszczowych przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Pozostałe fitoskładniki wyizolowane z *C. palustre*

Triterpeny	Fitosterole	Kwasy tłuszczowe
24-metylenocykloartanol	b-sitosterol	kwasy mirystynowy (14:0)
a-amyryna	kampesterol	kwasy pentadekanowy (15:0)
b-amyryna	kampestanol	kwasy oleopalmitynowy (16:1(9))
octan a-amyryny	stigmasterol	kwasy palmitynowy (16:0)
octan b-amyryny	ergost-8(14)-en-3-ol	kwasy margarynowy (17:0)
octan lupeolu	sitostanol	kwasy linolowy (18:2(9,12))
faradiol		kwasy oleinowy (18:1(9))
		kwasy stearynowy (18:0)
		kwasy gadoleinowy (20:1(11))
		kwasy arachidowy (20:0)
		kwasy behenowy (22:0)
		kwasy lignocerynowy (24:0)

1.2.4. Olejki eteryczne zawarte w *C. palustre*

Oleje eteryczne jako złożone mieszaniny lotnych związków organicznych, są produktami metabolizmu wtórnego roślin aromatycznych. Ich biosynteza i akumulacja odbywają się w wyspecjalizowanych strukturach anatomicznych, takich jak gruczoły, włoski wydzielnicze czy przewody żywiczne (Djilani i Dicko, 2012). Różnorodność chemiczna olejków eterycznych przejawia się szerokim spektrum aktywności biologicznej, obejmującym właściwości antybakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciwbólowe, uspokajające, przeciwzapalne, spazmolityczne i miejscowo znieczulające (Bakkali i in., 2008). Nazaruk i wsp. (2012a) wykazali znaczne różnice w składzie chemicznym olejków eterycznych izolowanych z różnych organów *C. palustre*. Korzenie tego gatunku charakteryzowały się wysoką zawartością aplotaksenu i jego pochodnych, podczas gdy w liściach dominowały β -damascenon i β -jonon. Ponadto, przeprowadzone badania wykazały umiarkowaną aktywność cytotoksyczną olejków eterycznych z korzeni *C. palustre* wobec komórek nowotworowych (Nazaruk i in., 2012a).

1.2.5. *Cirsium* jako roślina lecznicza

Rośliny z rodzaju *Cirsium* mają bogatą historię stosowania w medycynie tradycyjnej w wielu regionach świata. Ostrożeń były stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej już kilkaset lat temu, a pierwsze wzmianki na ten temat pochodzą z czasów dynastii Han (206 p.n.e.-220 n.e.), kiedy to używano ich w leczeniu różnych dolegliwości, w tym krwawych wymiotów, chrapania, otyłości i krwawień (Luo i in., 2021). Popularny w medycynie chińskiej jest ostrożeń japoński (*Cirsium japonicum*) występujący w Japonii, Korei i Chinach. Ze względu na swoje właściwości roślina ta była wykorzystywana w tradycyjnej medycynie chińskiej do leczenia nadciśnienia, krwotoków oraz zapalenia wątroby (Ishida i in., 1987). *Cirsium japonicum* znalazł również zastosowanie w leczeniu cukrzycy, zwłaszcza na obszarach wiejskich Chin (Liao i in., 2010). Ponadto w medycynie ludowej używano go w walce z nowotworami, takimi jak rak wątroby, rak macicy czy białaczka (Liu i in., 2007).

W Ameryce północnej oraz Meksyku *C. mexicanum* było powszechnie stosowane do leczenia chorób układu oddechowego oraz pokarmowego, takich jak zapalenie wątroby, biegunka, czerwotka czy bóle żołądka (CABI, 2017). Rdzenne ludy Ameryki wykorzystywały także *Cirsium arvense* ze względu na jego silne właściwości przeciwzapalne do leczenia dolegliwości jamy ustnej, takich jak ból zębów, wrzody czy afty oraz do leczenia gruźlicy (Ul i in., 2013).

Cirsium arvense znajduje szerokie zastosowanie w medycynie ludowej na całym świecie. Roślina ta jest wykorzystywana w terapii problemów z wątrobą, takich jak marskość, stłuszczenie i rak wątroby. Pomaga także w łagodzeniu zaburzeń żołądkowo-jelitowych, w tym biegunek i wrzodów, a także w leczeniu nadciśnienia. Stosowana jest również przy chorobach płuc, schorzeniach krwotocznych, problemach układu moczowo-płciowego, dnie moczanowej oraz w przypadku chorób skóry, ran i infekcji ropnych (Balkrishna i in., 2024).

W tradycyjnej medycynie ludowej w Polsce gatunki z rodzaju *Cirsium* znajdowały szerokie zastosowanie. *Cirsium rivulare*, ze względu na swoje właściwości anksjolityczne, było tradycyjnie używane w leczeniu zaburzeń lękowych (Nazaruk i Gudej, 2003). Podobne zastosowanie miały inne gatunki, takie jak *Cirsium oleraceum* oraz *Cirsium vulgare* (Nazaruk, 2008). Dodatkowo, w polskiej medycynie ludowej *Cirsium arvense* i *Cirsium oleraceum* wykorzystywano jako środki moczopędne, przeciwzapalne i ściągające (Ożarowski i in., 1987). Wartym podkreślenia jest fakt, że w tradycyjnym lecznictwie rośliny z rodzaju *Cirsium* były również wykorzystywane do łagodzenia dolegliwości żołądkowo-jelitowych, szczególnie biegunek i czerwotki (Aggarwal i in., 2022; Chakraborty i in., 2017). Wśród ludów

słowiańskich rośliny te znalazły zastosowanie w terapii kolki oraz problemów trawiennych (Kolossova, 2010; Kujawska i in., 2016).

Niewiele jest informacji na temat zastosowania *Cirsium palustre* w medycynie ludowej. Jak podaje literatura, Huculi wykorzystywali ostrożeń błotny w celu leczenia gorączki (Wdowiak, 2013).

Cirsium palustre jest interesującym obiektem badań pod kątem potencjalnego zastosowania w fitoterapii, nie tylko ze względu na szeroką gamę udokumentowanych dotychczas właściwości biologicznych, ale również z uwagi na długą tradycję stosowania innych roślin z tego rodzaju w medycynie ludowej w wielu obszarach. Ponadto skład fitochemiczny wyciągów z *C. palustre* daje podstawę to spekulacji o możliwych działaniach farmakologicznych rośliny.



Ryc. 1 *Cirsium palustre* (Sturm i in., 1905)

1.3. Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego

Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego (ang. *disorders involving gut-brain interaction*, DGBI) są powszechnym problemem zdrowotnym na całym świecie i stanowią najczęściej stawianą diagnozę w dziedzinie gastroenterologii (Gubert i in., 2022). Według ogólnosiwiatowego badania przeprowadzonego przez Rome Foundation, DGBI są problemem dotyczącym ponad 40% populacji na świecie (Sperber i in., 2021). Wśród nich najczęściej występującymi są zespół jelita drażliwego (IBS) i dyspepsja czynnościowa (FD). Zaburzenia te są klasyfikowane w oparciu o występowanie przewlekłych objawów dotyczących przewodu pokarmowego, takich jak ból w obszarze jamy brzusznej, dyskomfort, wzdęcia czy zmiany w rytmie wypróżnień, przy jednoczesnym braku wykrywalnych stanów zapalnych lub widocznych nieprawidłowości strukturalnych w obrębie układu pokarmowego (Drossman, 2016; Drossman i Tack, 2022; Sperber i in., 2021). Skomplikowana i nie w pełni zrozumiała patofizjologia stanowi istotną barierę w terapii DGBI. Na podstawie aktualnie powszechnie przyjętego modelu przedstawiającego mechanizm rozwoju choroby, uważa się, że patofizjologia jest związana z połączeniem zaburzeń motoryki, nadwrażliwości trzewnej, zmienionej funkcji błony śluzowej i układu odpornościowego, zmienionego mikrobiomu jelitowej i zmienionego przetwarzania w ośrodkowym układzie nerwowym (Black i in., 2020; Drossman, 2016). Terapia zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego jest procesem złożonym, który obejmuje zarówno terapię farmakologiczną jak i behawioralną. Dodatkowo często stosowane są terapie dietetyczne oraz leczenie uzupełniające i alternatywne, takie jak fizjoterapia, hipnoterapia, akupunktura czy suplementy ziołowe (Atkins i in., 2023; Tome i in., 2023). W niektórych przypadkach (np. zaawansowane IBD) wymagane jest nawet zastosowanie zabiegu chirurgicznego (Hwang i Varma, 2008). Z uwagi na złożoną etiologię problemu, istniejące metody terapeutyczne nie prowadzą do całkowitego wyleczenia choroby, co skutkuje ograniczoną skutecznością i niepełnym zadowoleniem pacjentów. W związku z tym, istnieje intensywne dążenie do poszukiwania nowych opcji terapeutycznych (Mearin i Malfertheiner, 2017).

1.3.1. Wykorzystanie roślin leczniczych w terapii zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego

Opisy procesów trawiennych, ich patologii oraz metod terapeutycznych znajdują swoje odzwierciedlenie już w tekstach starożytnych, takich jak egipski Papirus Ebersa (ok. 1550

r. p.n.e.), Biblia, pisma tradycyjnej medycyny chińskiej i ajurwedy, a także w dziełach klasycznych medyków greckich i rzymskich (Śródka, 2003). Pomimo znacznego postępu w medycynie, współczesne farmakopee oraz kompendia fitoterapeutyczne nadal uwzględniają szeroki wachlarz roślin leczniczych stosowanych w terapii czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego (DGBI). Rośliny te mogą stanowić aż 34% wszystkich uwzględnionych w nich gatunków o właściwościach terapeutycznych (Kelber i in., 2017). Badania wskazują, że bardzo wysoki odsetek pacjentów zmagających się z funkcjonalnymi zaburzeniami przewodu pokarmowego decyduje się na korzystanie z alternatywnych metod leczenia, takich jak fitoterapia, co świadczy o rosnącym zainteresowaniu naturalnymi rozwiązaniami w leczeniu tego rodzaju schorzeń (Babelghaith i in., 2024; Chiarioni i in., 2017). W wielu krajach produkty lecznicze pochodzenia roślinnego są integralnym elementem standardowego postępowania terapeutycznego i są uwzględniane w krajowych wytycznych dotyczących leczenia (Holtmann i in., 2020). Wśród fitoterapeutyków oraz złożonych preparatów ziołowych szczególną uwagę zwracają STW-5, rikkunshito, a także olejek z mięty pieprzowej (*Mentha × piperita*), które należą do najczęściej stosowanych w terapii zaburzeń przewodu pokarmowego (Gwee i in., 2020) (Tabela 4).

STW-5, powszechnie znany pod nazwą handlową Iberogast[®], jest szeroko stosowanym preparatem roślinnym, uznawanym zarówno przez pacjentów, jak i lekarzy w wielu krajach. Składa się z dziewięciu wyciągów roślinnych o zróżnicowanych właściwościach farmakologicznych. Preparat ten odgrywa istotną rolę w terapii funkcjonalnych zaburzeń przewodu pokarmowego dzięki wielokierunkowemu mechanizmowi działania. Dowiedziono, że STW-5 działa bezpośrednio na mięśniówkę żołądka, dwunastnicy, jelita czczego i okrężnicy, powodując efekt spazmolityczny lub toniczny, w zależności od podstawowego napięcia mięśnia (Ammon i in., 2006). Poza tym preparat wykazuje właściwości przeciwzapalne w obrębie przewodu pokarmowego (Khayyal i in., 2006; Michael i in., 2009). Liczne badania naukowe potwierdziły jego skuteczność i bezpieczeństwo w leczeniu tych schorzeń, co przyczyniło się do jego popularności w praktyce klinicznej (Braden i in., 2009; Madisch i in., 2004; von Arnim i in., 2007).

Rikkunshito (RKT) to ziołowy preparat leczniczy, powszechnie stosowany w krajach azjatyckich w łagodzeniu objawów żołądkowo-jelitowych. Jest to złożona formuła oparta na ośmiu surowych wyciągach roślinnych, będąca jedną z najpopularniejszych receptur medycyny tradycyjnej, stosowana w lecznictwie od setek lat (Suzuki i in., 2014). Z uwagi na złożony skład i zawartość wielu różnych substancji czynnych preparat wykazuje kilka różnych mechanizmów działania. Jednym z tych mechanizmów jest poprawa funkcji

barierowej błony śluzowej przełyku poprzez hamowanie rozszerzania przestrzeni międzykomórkowych (Kim i in., 2020). Oprócz tego RKT wykazuje działanie stymulujące wydzielanie greliny i hamujące jej inaktywację, co wpływa pobudzająco na apetyt (Masuy i in., 2019). W badaniu przeprowadzonym na żołądkach świnek morskich dowiedziono, że preparat wykazuje działanie zwiększające adaptacyjną zdolność do relaksacji mięśniówki (Hayakawa i in., 1999). Ponad to RKT charakteryzuje się wysoką zdolnością do wiązania soli żółciowych, co może chronić błonę śluzową przełyku przed uszkodzeniami spowodowanymi ekspozycją na kwasy żółciowe. (Tominaga i Arakawa, 2015). Badania sugerują, że Rikkunshito wykazuje działanie synergiczne poprzez złożone interakcje pomiędzy poszczególnymi składnikami (Kitagawa i in., 2015).

Olejek miętowy, powszechnie znany ze swojego charakterystycznego zapachu i smaku, od wieków znajduje zastosowanie jako naturalny środek na różne dolegliwości, w tym nudności, niestrawność oraz bóle głowy (Kligler i Chaudhary, 2007). Jednym z efektów działania olejku z mięty pieprzowej (a dokładnie zawartego w nim mentolu) jest łagodzenie bólu trzewnego (Adam i in., 2006; Liu i in., 2013). Oprócz tego olejek miętowy oraz jego składniki wykazują właściwości rozluźniające mięśnie gładkie i działanie przeciwskurczowe na dolny zwieracz przełyku, żołądek, dwunastnicę oraz jelito grube (Scarpellini i in., 2023). Ponad to badania wskazują, że zawarte w olejku miętowym składniki wykazują działanie przeciwlękowe i zmniejszające zmęczenie psychiczne (Silveira i in., 2014; Umezu, 2009), co może być bardzo przydatnym efektem w leczeniu DGBIs.

Rośliny lecznicze odgrywają istotną rolę w terapii zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego, oferując skuteczne i stosunkowo bezpieczne rozwiązania terapeutyczne. Kontynuacja badań nad mechanizmami działania i optymalnymi dawkami umożliwi lepsze wykorzystanie ich potencjału w praktyce klinicznej. Rozwój preparatów roślinnych, opartych na naukowych dowodach, może przyczynić się do wzbogacenia arsenału terapeutycznego w leczeniu tych schorzeń.

Tabela 4. Przykłady leków roślinnych i suplementów diety stosowanych w zaburzeniach funkcjonowania przewodu pokarmowego

Nazwa	Skład	Wskazania do zastosowania
STW-5 (Iberogast®)	- ubiorek gorzki (<i>Iberis amara totalis recens</i>) - korzeń arcydzięgla (<i>Angelicae radix</i>) - owoc ostropestu plamistego (<i>Cardui mariae fructus</i>) - ziele glistnika (<i>Chelidonii herba</i>) - korzeń lukrecji (<i>Liquiritiae radix</i>) - kwiat rumianku (<i>Matricariae flos</i>) - liść melisy (<i>Melissae folium</i>) - owoc kminku (<i>Carvi fructus</i>) - liść mięty pieprzowej (<i>Menthae piperitae folium</i>) (Ottillinger i in., 2012)	- dyspepsja czynnościowa - zespół jelita drażliwego (Allescher i Abdel-Aziz, 2017; Bayer, 2022)
Rikkunshito	- kłącze atraktylodesu chińskiego (<i>Atractylodis lanceae rhizoma</i>) - korzeń żeńszenia (<i>Ginseng radix</i>) - bulwa pinelli (<i>Pinelliae tuber</i>)	- dyspepsja czynnościowa - choroba refluksowa przełyku - dyspepsja po chemioterapii - dyspepsja po operacjach przewodu pokarmowego (Takeda i in., 2012) - anoreksja (Saegusa i in., 2015)

	- sklerocjum porii kokosowej (<i>Poriae cocos sclerotium</i>) - owoc głożyny pospolitej (<i>Zizyphi fructus</i>) - skórka pomarańczy satsuma (<i>Citri unshiu pericarpium</i>) - korzeń lukrecji (<i>Glycyrrhizae radix</i>) - kłącze imbiru (<i>Zingiberis rhizoma</i>) (Tominaga i Arakawa, 2015)	- zapalenie błony śluzowej żołądka - atonia żołądka, - gastropptoza - ból brzucha i wymioty (Yamada i in., 2021)
Olejek z mięty pieprzowej	liść mięty pieprzowej (<i>Menthae piperitae folium</i>)	- choroby układu pokarmowego, w tym zaparcia lub biegunka związana z zespołem jelita drażliwego, w celu zmniejszenia ogólnych objawów bólu i wzdęć (Babelghaith i in., 2024) - choroba wrzodowa - działanie przeciwskurczowe - wzdęcia - działanie przeciw peroksydacji lipidów - leczenie otyłości - działanie przeciwnowotworowe - działanie przeciwcukrzycowe - immunomodulacja

		- bóle głowy - zmniejszenie powikłań żołądkowo-jelitowych (Loolaie i in., 2017)
Dyspep - Intercell®	- ekstrakt z karczocha (<i>Cynara cardunculus</i>) - ekstrakt z imbiru (<i>Zingiber officinale</i>)	- wspomaganie procesów trawienia - usprawnienie motoryki przewodu pokarmowego (Mito Pharma, b.d.)
Apetizer senior	- ekstrakt z owocu anyżu (<i>Pimpinella anisum</i>) - ekstrakt z mięty pieprzowej (<i>Mentha × piperita</i>) - ekstrakt z korzenia cykorii (<i>Cichorium intybus</i>) - ekstrakt z owocu kopru (<i>Foeniculum vulgare</i>)	- wspomaganie apetytu - ułatwianie trawienia - wzmacnianie wydzielania soków trawiennych (Aflofarm Farmacja Polska Sp. z o.o., 2025)
Amol®	- mentol (<i>Mentholum</i>) - olejek cytronelowy (<i>Citronellae aetheroleum</i>) - olejek goździkowy (<i>Caryophylli floris aetheroleum</i>) - olejek cynamonowy (<i>Cinnamomi zeylanici corticis aetheroleum</i>) - olejek cytrynowy (<i>Limonis aetheroleum</i>) - olejek mięty pieprzowej (<i>Menthae piperitae aetheroleum</i>) - olejek lawendowy (<i>Lavandulae aetheroleum</i>)	- niestrawność - wzdęcia (Orifarm Healthcare Sp. z o.o., 2024)

1.4. Izolowane wycinki jelita świni jako model badawczy

Spośród modeli zwierzęcych wykorzystywanych do badań funkcjonowania przewodu pokarmowego przez wiele lat preferowane były modele wykorzystujące gryzonie. Związane jest to ze spełnianiem przez nie kryteriów takich jak niski koszt zakupu i utrzymania, szybki rozród czy szeroka dostępność specyficznych odczynników laboratoryjnych przeznaczonych dla gryzoni. Liczne różnice (Tab. 5) w anatomii i fizjologii pomiędzy gryzoniami, a człowiekiem ograniczają jednak ich zastosowanie jako wiarygodny model w badaniach przedklinicznych związanych z przewodem pokarmowym (Kararli, 1995). Zjawisko to prowadzi do odnowienia zainteresowania modelami badawczymi opartymi na gatunkach ssaków innych niż gryzonie, ze szczególnym uwzględnieniem dużych zwierząt (Gonzalez i in., 2015). Wśród różnych modeli zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach nad przewodem pokarmowym, na szczególne zainteresowanie zasługuje świnia z uwagi na istnienie licznych analogii (Tab. 6) z anatomią i fizjologią ludzkiego przewodu pokarmowego (Rose i in., 2022). Z powodu tych podobieństw model przewodu pokarmowego świni jest wykorzystywany do wielu rodzajów badań, w tym dotyczących zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego (Yin i in., 2017).

Zasadniczym podobieństwem między świnia a człowiekiem jest ich wszystkożerny charakter, co oznacza zdolność obu gatunków do spożywania zarówno pokarmów roślinnych, jak i zwierzęcych. Współczynnik proporcji całkowitej długości jelit do masy ciała, osiągający wartość około 0,1, jest obserwowany zarówno u ludzi, jak i u świń. Oznacza to, że oba gatunki charakteryzują się zbliżoną długością względną przewodu pokarmowego (Hatton i in., 2015). U obu gatunków, zarówno ludzi jak i świń, jelita cienkie i grube prezentują podobne cechy makroskopowe. Ponadto, u obu gatunków obserwuje się obecność taśm i wypukleń na przebiegu okrężnicy, które tworzą zbliżone fizjologiczne i anatomiczne środowisko dla komensalnych mikroorganizmów jelitowych (Rose i in., 2022). Mikrobiota przewodu pokarmowego u świń wykazuje aż 96% podobieństwo w szlakach funkcjonalnych z mikroflorą ludzką (Xiao i in., 2016). Te podobieństwa przyczyniają się do porównywalnego czasu pasażu treści pokarmowej oraz analogicznego przebiegu procesów trawienia i wchłaniania.

Izolowane wycinki przewodu pokarmowego świń pozyskiwane od zwierząt rutynowo poddawanych ubojowi, stanowią przydatny model eksperymentalny, który już był

wykorzystywany w wielu badaniach mających na celu ocenę wpływu różnych substancji na perystaltykę tych narządów (Mendel i in., 2020; Metzler-Zebeli i in., 2022; Posłuszny i in., 2021). Model ten stanowi bardzo dobrą alternatywę dla badań *in vivo*, przyczyniając się do ograniczenia cierpienia zwierząt, skrócenia czasu trwania eksperymentu oraz redukcji kosztów związanych z utrzymaniem zwierząt laboratoryjnych. Dodatkowo, perystaltyka w obrębie tych wycinków jest reprezentatywna dla naturalnych procesów, co pozwala na precyzyjne badanie czynników wpływających na ruchy perystaltyczne. Bardzo istotnym jest fakt licznych podobieństw pomiędzy anatomią i fizjologią układu pokarmowego ludzkiego i świni, co nadaje modelowi charakter translacyjny. W rezultacie, wykorzystanie izolowanych wycinków przewodu pokarmowego świń stanowi cenne narzędzie w badaniach nad perystaltyką i może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących funkcję układu pokarmowego oraz do opracowania nowych terapii dla chorób układu pokarmowego.

Tabela 5. Anatomiczne i fizjologiczne podobieństwa i różnice między układem pokarmowym człowieka i myszy - wady i zalety myszy jako modelu badawczego

Podobieństwa pomiędzy przewodem pokarmowym człowieka i myszy	Różnice pomiędzy przewodem pokarmowym człowieka i myszy
Ogólna anatomia przewodu pokarmowego (złożony z tych samych organów)	Sposób odżywiania odbiegający od ludzkiego, dodatkowo koprofagia
Taka sama budowa warstwowa ścian jelit (Nguyen i in., 2015)	Średni stosunek długości jelita cienkiego do długości okrężnicy - 2,5 u myszy, 7 u ludzi (Treuting i in., 2017) Stosunek powierzchni jelita cienkiego do okrężnicy - 18 u myszy, 400 u ludzi (Casteleyn i in., 2010)
	Skład ilościowy mikroflory odbiegający od ludzkiej - różna liczebność określonych typów i gatunków bakterii mimo podobnego jakościowo składu (Krych i in., 2013) Tylko ok. 4% genów drobnoustrojów jelitowych myszy wspólnych w ludzkimi (Xiao i in., 2015)
	Żołądek podzielony na część gruczołową i bezgruczołową u myszy (Kararli, 1995)
	Wyższe pH żołądka (ok. 3-4) u myszy w porównaniu do ludzkiego
	Mniej niż ludzki złożony jelitowy układ nerwowy u myszy (Timmermans i in., 2001)
	Fermentacja u myszy zachodząca w kątnicy (Rose i in., 2022)
Zalety myszy jako modelu doświadczalnego	Wady myszy jako modelu doświadczalnego
Niskie koszty utrzymania	Długość życia uniemożliwiająca prowadzenie długotrwałych badań

Wysoka dostępność niezbędnych do badań odczynników specyficznych dla gatunku	Narządy niewielkich rozmiarów
Obfitość danych referencyjnych	Najczęściej brak manifestacji objawów klinicznych takich jak u człowieka (Zhang i in., 2013)
Szybkie dojrzewanie	
Łatwa obsługa zwierząt	

Tabela 6. Anatomiczne i fizjologiczne podobieństwa i różnice między układem pokarmowym człowieka i świni - wady i zalety świni jako modelu badawczego

Podobieństwa pomiędzy przewodem pokarmowym człowieka i świni	Różnice pomiędzy przewodem pokarmowym człowieka i świni
Wszystkożerność	Silnie rozwinięte jelito ślepe u świni (Kararli, 1995)
Zbliżona długość względna przewodu pokarmowego (Hatton i in., 2015)	Brak wyrostka robaczkowego u świni (Kararli, 1995)
Skład mikroflory w 96% ten sam (Xiao i in., 2016)	Obecność okrężnicy spiralnej u świni (Kararli, 1995)
Żołądek typu gruczołowego (Kararli, 1995)	
Zbliżone cechy makroskopowe jelit (Rose i in., 2022)	
Taśmy i wypuklenia na przebiegu okrężnicy (Rose i in., 2022)	
Jelitowy układ nerwowy porównywalny do człowieka (Timmermans i in., 2001)	
Zbliżony czas pasaży treści (Graham i Åman, 1987)	
Okrężnica głównym miejscem fermentacji (Rose i in., 2022)	

Zalety świni jako modelu doświadczalnego	Wady świni jako modelu doświadczalnego
Długość życia umożliwiającą prowadzenie długotrwałych badań	Wysokie koszty utrzymania zwierząt
Duży rozmiar narządów	Konieczne zapewnienie dużej ilości przestrzeni oraz wzbogacenie środowiska (ang. <i>enrichment</i>)
Dobrze poznane warunki hodowli	Mniej (w porównaniu do gryzoni) dostępnych na rynku odczynników specyficznych dla gatunku (Schaaf i Gonzalez, 2022)
Podobna do ludzi reakcja na wiele rodzajów leków (Schelstraete i in., 2019)	Dłuższy niż u gryzoni cykl reprodukcyjny i późniejsze osiągnięcie dojrzałości
Podobne jak u ludzi dawkowanie wielu rodzajów leków, w tym doustnych (Walters i Prather, 2013)	Trudniejsza obsługa zwierząt z uwagi na ich rozmiar

2. Cele badań

Celami pracy było:

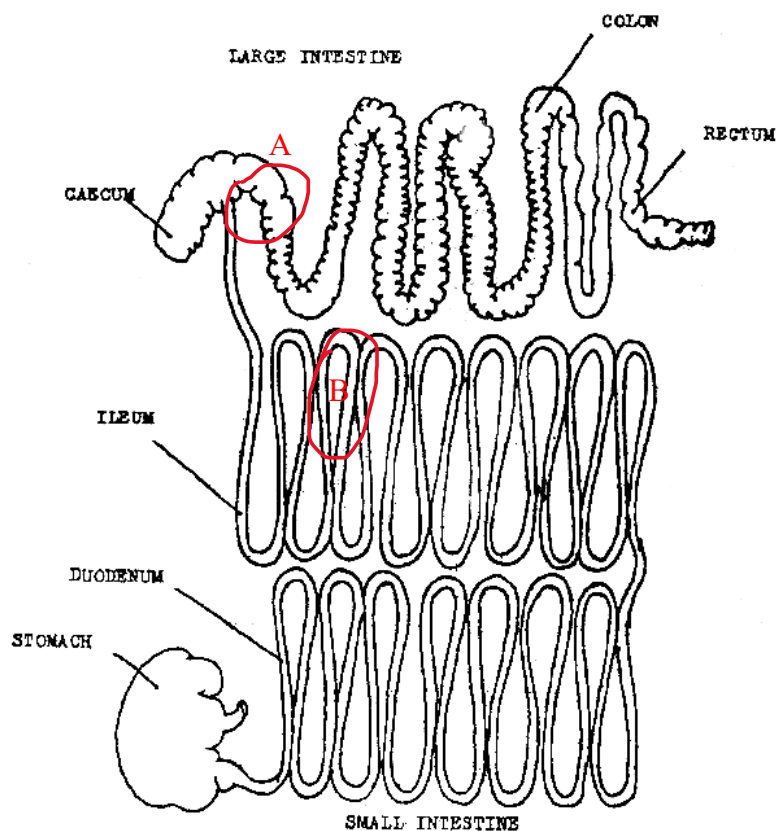
1. Opracowanie metody pozyskiwania wyciągów i frakcji z kwiatów *Cirsium palustre* różnymi metodami ekstrakcyjnymi
2. Określenie profilu fitochemicznego poszczególnych wyciągów i frakcji pozyskanych z kwiatów *Cirsium palustre*
3. Ocena wpływu wyciągów, frakcji i głównych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na spontaniczną aktywność motoryczną mięśniówki okrężnej i podłużnej jelita czczego i okrężnicy świni
4. Ocena wpływu wyciągów, frakcji i głównych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na indukowaną farmakologicznie aktywność motoryczną mięśniówki okrężnej i podłużnej jelita czczego i okrężnicy świni

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Zwierzęta

Materiał pobierano od dorosłych, zdrowych w badaniu przed- i poubojowym świń, które poddane były rutynowemu ubojowi w zakładzie uboju zwierząt. Pobierany materiał stanowiły: fragment okrężnicy wstępującej umiejscowiony zaraz za jelitem ślepym oraz fragment jelita czczego umiejscowiony ok. 1m za zgięciem dwunastniczo-czczym (Ryc. 2). Wycinki obejmowały fragment jelita wzdłuż jego przebiegu z zachowaniem pełnej grubości jego ściany. Fragmenty jelit były pobierane starannie, możliwie najszybciej po uboju świni (w ciągu maksymalnie około 15 minut). Każdorazowo fragmenty jelit pobierane były od co najmniej pięciu różnych zwierząt. Pozyskane wycinki w celu transportu do laboratorium (max. 45 min), zanurzano w schłodzonym (0-4°C) modyfikowanym roztworze Krebsa-Henseleita (M K-HS). Zwierzęta nie były zabijane na potrzeby tego badania.



Ryc. 2 Lokalizacja wycinków jelit pobieranych do badań: A - okrężnica, B - jelito czcze (Azzolin, 2021)

3.1.2. Materiał roślinny

Do badań wykorzystano kwiaty ostrożeńa błotnego *C. palustre* (Podlaskie, Polska; GPS: 53°15'19.4 "N 23°27'57.3 "E). W celu potwierdzenia tożsamości surowca została przeprowadzona ocena morfologiczna materiału roślinnego w oparciu o literaturę naukową (Broda i Mowszowicz, 1996). Zielnik Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska, posiadał okaz wzorcowy (nr CP 06014). Materiał roślinny został wysuszony natychmiast po zbiorze, w zacienionym, dobrze wentylowanym pomieszczeniu.

3.1.3. Odczynniki chemiczne i aparatura

Do przeprowadzenia procesu ekstrakcji wykorzystano metanol (MeOH) cz.d.a. zakupiony w P.P.H. Stanlab (Lublin, Polska). Standaryzowany kwas 4-*O*-kawoilochinowy oraz kwas 3,5-*O*-dikawoilochinowy, użyte do analizy LC-PDA-HRMS zostały zakupione od Biokom (Janki, Polska). W doświadczeniach wykorzystano wzorce flawonoidów: apigeninę (API), 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC), luteolinę (LUT), kwas 5-*O*-kawoilochinowy, 7-*O*-glukozyd eriodykcjolu, 7-*O*-glukozyd luteoliny, 7-*O*-glukozyd izokemferydu, 7-*O*-(6"-metyloglukuronid) apigeniny i kemferolu wcześniej wyizolowane z liści i kwiatów *C. palustre* i *Arctium tomentosum* w Zakładzie Biologii i Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Nazaruk, 2009; Nazaruk i Galicka, 2014; Strawa i in., 2020).

Chrysoeriol (CHRY) został zakupiony w Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Woda ultraczysta (UPW), stosowana jako faza ruchoma w analizie fitochemicznej metodą LC-PDA-HRMS, została świeżo przygotowana przy użyciu urządzenia POLWATER DL3-100 (Labopol, Polska). W analogicznym celu wykorzystano acetonitryl Optima (klasa LC/MS), zakupiony od firmy Fisher Scientific (Loughborough, Wielka Brytania). Kwas mrówkowy (FA), stosowany jako dodatek do dwóch poprzednich składników, został zakupiony od firmy Avantor (Gliwice, Polska).

Analiza LC-PDA-HRMS została przeprowadzona przy użyciu systemu Agilent 1260 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA) wyposażonego w detektor fotodiodowy (PDA) oraz spektrometr masowy 6230 MS/TOF ze źródłem jonów typu elektrosprej (ESI) tej samej firmy. Rozdział chromatograficzny wykonano na kolumnie Kinetex XB-C18 (150 × 2,1 mm, 1,7 μm; nr serii: 5605-0180) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), zabezpieczonej przedkolumną ochronną. Analizę MS prowadzono w trybie jonizacji ujemnej. Parametry pracy obejmowały:

ciśnienie nebulizatora 60 psi, przepływ gazu suszącego 1 l/min, temperaturę gazu 350°C oraz napięcie kapilary 2,5 kV. Zakres analizy obejmował przedział od 100 do 3000 m/z.

Substancjami referencyjnymi zastosowanymi w doświadczeniach były chlorek acetylocholiny (ACh) i dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Flawonoidy oraz wszystkie wyciągi i frakcje *C. palustre*, z wyjątkiem ekstraktu wodnego, rozpuszczono w DMSO, którego końcowe stężenie w badaniach nad motoryką nie przekraczało 0,5%. Wyciąg wodny (CP3) rozpuszczony został w medium inkubacyjnym. W kontekście analizy reakcji mięśniówki gładkiej jelit, w eksperymencie wykorzystano chlorek acetylocholiny (ACh) jako środek kurczliwy. Roztwór podstawowy ACh oraz jego szereg kolejnych rozcieńczeń zostały rozpuszczone w medium inkubacyjnym.

Medium inkubacyjnym wykorzystywanym podczas badań był modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita (M K-HS). Skład buforu stanowią: NaCl -123,76 mM, KCl - 5 mM, CaCl₂ - 2,5 mM, MgSO₄ - 1,156 mM, NaHCO₃ - 14,5 mM, KH₂PO₄ - 2,75 mM oraz glukoza -12,5mM. M K-HS wykorzystywany był jako medium transportowe na czas przewozu próbek z rzeźni do laboratorium. Był wówczas schłodzony do temperatury ok. 0-4°C. W trakcie inkubacji wycinków jelit oraz podczas trwania doświadczenia temperatura buforu utrzymywana była na poziomie 38,5 °C. Przez całe doświadczenie utrzymywano pH MK-HS na poziomie 7,35 - 7,45, poprzez ciągły dopływ karbogenu (95% O₂ i 5% CO₂).

W części farmakologicznej badań, fragmenty jelit umieszczano w komorach przeznaczonych do inkubacji i badania narządów izolowanych (Organ Schuler Bath, Hugo Sachs Elektronik, Niemcy). Każdy wycinek był mocowany z jednej strony do metalowych haczyków, a z drugiej do izometrycznego przetwornika siły (F30, typ 372, Hugo Sachs Elektronik, Niemcy). Przetworniki te podłączano do systemu rejestracji analogowo-cyfrowej (PowerLab, ADInstruments, Australia) poprzez wzmacniacz mostkowy (DBA, typ 660, Hugo Sachs Elektronik, Niemcy).

3.2. Metody

3.2.1. Przygotowanie surowych wyciągów (CP1-CP3) i frakcji (CP4-CP6)

Wysuszony i rozdrobniony materiał roślinny został wstępnie oczyszczony w aparacie Soxhleta, a następnie poddany wyczerpującej ekstrakcji przy użyciu metanolu (MeOH) oraz 50% roztworu metanolu (50% MeOH) stosując ekstrakcję pod chłodnicą zwrotną. Otrzymane ekstrakty połączono, a następnie usunięto z nich pozostałości rozpuszczalników organicznych za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem.

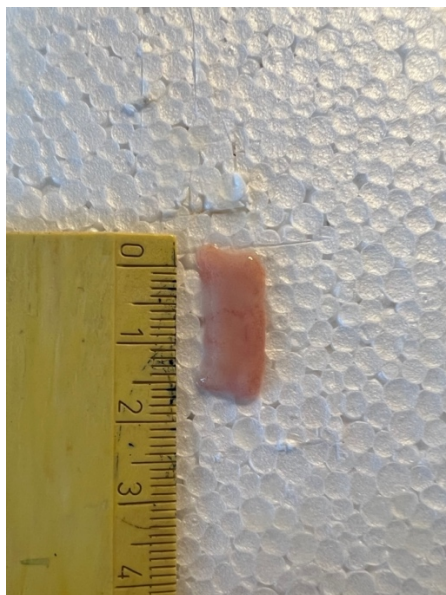
W kolejnym kroku pozostałość została poddana liofilizacji. Następnie przygotowany roztwór wodny uzyskanego ekstraktu wykorzystano do frakcjonowania metodą ekstrakcji ciecz-ciecz, stosując rozpuszczalniki o stopniowo rosnącej polarności. W tym celu zastosowano kolejno: eter dietylowy (Et₂O, 100 ekstrakcji po 100 ml), octan etylu (EtOAc, 100 ekstrakcji po 250 ml) oraz *n*-butanol (*n*-BuOH, 110 ekstrakcji po 250 ml). W przypadku każdego rozpuszczalnika, połączone warstwy organiczne zostały odparowane do sucha, zawieszone w wodzie, zamrożone i zliofilizowane. Pozwoliło to uzyskać frakcję eterową (CP4), frakcję octanową (CP5) oraz frakcję butanolową (CP6). Równolegle przygotowano surowe ekstrakty z kwiatów ostrożeń. Każdorazowo użyto 30 g materiału roślinnego. Przeprowadzono ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami. Proces ten wykonano pięciokrotnie po 30 minut w temperaturze 40°C, stosując świeżą porcję 100 ml rozpuszczalnika. Ekstrakcję przeprowadzono stosując metanol, 50% metanol oraz wodę, co umożliwiło uzyskanie trzech surowych ekstraktów, które zostały poddane procesowi destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizacji. Ostatecznie uzyskano: ekstrakt metanolowy (CP1), ekstrakt 50% metanolowy (CP2) oraz ekstrakt wodny (CP3). Wydajność tych procesów opisano z podrozdziale 4.1.

3.2.2. Analiza fitochemiczna wyciągów i frakcji metodą LC-PDA-HRMS

W niniejszym badaniu, w celu rozdzielenia metabolitów, zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) połączoną z detekcją UV-Vis i wysokorozdzielczym spektrometrem masowym MS-TOF. Warunki chromatograficzne oparto na wcześniej opublikowanej metodzie, wprowadzając pewne modyfikacje (Strawa i in., 2022). Jako fazę ruchomą zastosowano wodę ultra czystą (UPW) (A) oraz acetonitryl (B). Obie fazy wzbogacono 0,1% kwasem mrówkowym. Zastosowano następujący gradient elucyjny: 0-1,5 min - 5% B; 20 min - 20% B; 30 min - 22% B; 60 min - 55% B; a po 70 minutach gradient osiągnął 75% B i utrzymano go przez 10 minut. Przepływ przez kolumnę wynosił 0,2 ml/min, a temperatura w termostacie kolumn była utrzymywana na poziomie 25 °C. Detektor fotodiodowy rejestrował widma w zakresie długości fal od 190 do 600 nm oraz chromatogramy UV-Vis przy długościach fal 280, 340 i 360 nm, odpowiadających charakterystycznym maksimum absorpcji polifenoli, flawonów i flawonoli. Analizę MS prowadzono w trybie jonizacji ujemnej. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie porównania czasów retencji oraz widm UV i MS z substancjami wzorcowymi oraz danymi dostępnymi w literaturze.

3.2.3. Pobranie i preparacja wycinków jelit

W laboratorium Zakładu Farmakologii i Toksykologii Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW, fragmenty jelit, które w tym momencie miały jeszcze kształt rurki, rozcięto wzdłuż nożyczkami i przypięto do styropianowej podkładki w celu podzielenia ostrzem skalpela na mniejsze, cienkie, płaskie paski o kształcie prostokąta (5 x 15 mm) równoległe do włókien mięśniowych, zarówno podłużnych, jak i okrężnych. W ten sposób uzyskano wyniki jelita czczego i okrężnicy pozwalające na ocenę aktywności odpowiednio mięśniówki podłużnej i okrężnej. Do doświadczeń wykorzystano jedynie odcinki jelit bez widocznych makroskopowo patologicznych zmian na błonie śluzowej, podśluzówkowej, mięśniowej i przydane



Ryc. 3 Wycinek jelita czczego świni na styropianowej podkładce świeżo po wypreparowaniu

3.2.4. Rejestracja aktywności motorycznej mięśniówki gładkiej wycinków

Po wypreparowaniu każdy wycinek mięśniówki niezwłocznie umieszczano w osobnej komorze do inkubacji i badania narządów izolowanych wypełnionej 5 ml modyfikowanego roztworu Krebsa-Henseleita (M K-HS). Temperaturę w komorach utrzymywano na poziomie 38,5°C, ze stałym dostępem karbogenu (95% O₂ i 5% CO₂) w celu utrzymania wystarczającego dopływu tlenu dla inkubowanych tkanek i utrzymania stałej wartości pH buforu. Wycinki mocowano z jednej strony do metalowych haczyków, a z drugiej do izometrycznego przetwornika siły. Doświadczenia przeprowadzono w warunkach izometrycznych pod

obciążeniem 0,01 N, tj. odpowiadającym wielkości próbek. Przetworniki siły izometrycznej podłączono do analogowo-cyfrowego zestawu rejestracyjnego za pomocą wzmacniacza mostkowego. Następnie zapisywano aktywność motoryczną izolowanych wycinków jelita czczego za pomocą programu Chart v 7.0. Obliczenia na uzyskanych danych przeprowadzono przy użyciu programu LabChart Reader 8.1.30, a następnie poddano analizie statystycznej.



Ryc. 4

Zestaw do badania aktywności motorycznej mięśni gładkich izolowanych narządów (Schuler Organ Bath, HSE, Harvard Apparatus, Niemcy)



Ryc. 5

Zbliżenie na wycinek jelita zawieszony w komorze wypełnionej M K-HS

3.2.5. Przebieg doświadczeń

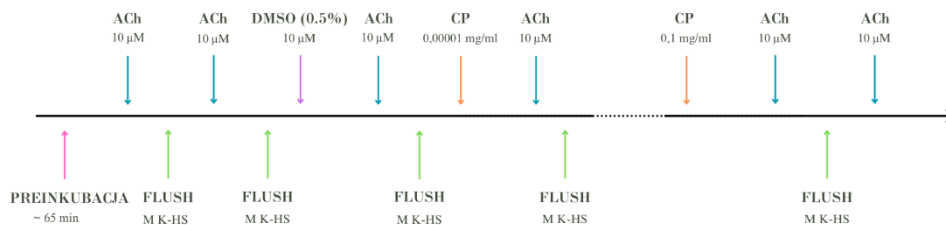
3.2.5.1. Preinkubacja

Po umieszczeniu w komorach wycinki jelit poddawane były ok. 65-minutowej preinkubacji w celu adaptacji tkanek do warunków *in vitro* i stabilizacji aktywności spontanicznej mięśniówki. Przez pierwsze 45 minut wycinki zawieszone były w sposób nie powodujący ich naprężenia. W tym czasie komory co 15 minut przepłukiwano świeżym, ciepłym M K-HS oraz uważnie monitorowano spontaniczną kurczliwość mięśniówki gładkiej wycinków. Następnie na tkanki ostrożnie zastosowano napięcie 0,005 N, a po 15-minutowej przerwie napięcie zwiększono do 0,01 N. Gdy spontaniczna praca mięśniówki gładkiej uległa stabilizacji do każdej z komór przy użyciu szklanej strzykawki mikrolitrowej (Hamilton

Company, USA) zaaplikowano acetylocholinę (ACh) w stężeniu 10 μ M. Po 3 minutach komory przepłukano świeżym, ciepłym M K-HS, a po stabilizacji kurczliwości spontanicznej ponownie dodano ACh w stężeniu 10 μ M. Jedynie wycinki, które wyraźnie i powtarzalnie zareagowały na podwójne podanie referencyjnej substancji kurczliwej (ACh) oraz wykazywały zauważalną, miarową aktywność spontaniczną, zostały zakwalifikowane do dalszych etapów eksperymentu.

3.2.5.2. Ocena wpływu wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność motoryczną mięśniówki okrężnej i podłużnej jelita czczego i okrężnicy świni

Każde doświadczenie poprzedzone było ok. 65-minutową preinkubacją, której przebieg opisany jest w paragrafie 3.2.5.1. Po ustabilizowaniu się spontanicznej aktywności w każdej komorze zawierającej zawieszony wycinek, zastosowano DMSO (0,5%), a po 3 minutach ponownie dodano ACh (10 μ M). Reakcje na DMSO oraz ACh + DMSO zostały wykorzystane jako odpowiedź kontrolna do oceny wpływu flawonoidów oraz wyciągów i frakcji na odpowiednio spontaniczną i indukowaną kurczliwość mięśni gładkich jelit. W przypadku surowego wyciągu wodnego (CP3) rolę substancji referencyjnej, zamiast DMSO, odgrywał M K-HS - reakcja na ten roztwór była wykorzystywana jako kontrolna. Po ustabilizowaniu się aktywności spontanicznej, wyciągi/frakcje (oznaczone jako CP1-CP6) zostały stosowane w sposób niekumulacyjny w zakresie stężeń od 0,00001 do 0,1 mg/ml. Po upływie 5 minut wstępnej inkubacji w obecności badanego wyciągu/frakcji, podawano do komory inkubacyjnej ACh (10 μ M). Przed zastosowaniem kolejnego stężenia badanej substancji, przeprowadzono dokładne płukanie świeżym buforem M K-H. Na zakończenie eksperymentu zastosowano ACh (10 μ M) w celu oceny reaktywności preparatów. Każdy ekstrakt/frakcję pochodzący z *C. palustre* poddano badaniom na co najmniej pięciu odcinkach okrężnicy i jelita czczego, pochodzących od co najmniej pięciu różnych osobników. Schemat doświadczenia jest zaprezentowany na Ryc. 6.



Ryc. 6 Schemat doświadczenia mającego na celu ocenę wpływu wyciągu/frakcji z *C. palustre* na aktywność motoryczną mięśniówki gładkiej jelita świni

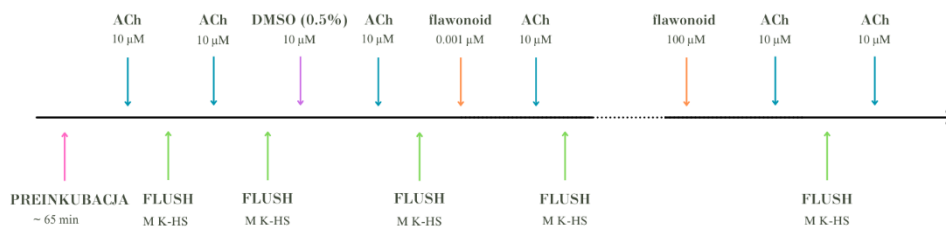
ACh - acetylocholina

CP - wyciąg/frakcja z *C. palustre*

FLUSH - płukanie świeżym M K-HS

3.2.5.3. Ocena wpływu głównych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na aktywność motoryczną mięśniówki okrężnej i podłużnej jelita czczego i okrężnicy świni

W kolejnej serii eksperymentów przeprowadzono analizę wpływu głównych flawonoidów obecnych w *C. palustre* na motorykę jelita czczego i okrężnicy u świń. Flawonoidy wybrane do doświadczenia to: apigenina (API), luteolina (LUT), chrysoeriol (CHRY) i 7-*O*-glukuronid apigeniny. Każde doświadczenie rozpoczynano zawsze od ok. 65-minutowej wstępnej inkubacji w M K-HS, po której następowało dodanie substancji referencyjnych w celu sprawdzenia reaktywności wycinków, a następnie podanie DMSO (0,5%) (zgodnie z opisem przedstawionym w sekcji 3.2.5.2). Właściwa część doświadczenia polegała na podawaniu flawonoidów w dawkach: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 i 100 μM . Po zastosowaniu każdej dawki następowało ok. 5-minutowa obserwacja i rejestracja aktywności motorycznej wycinków, a następnie podanie ACh (10 μM). Po upływie 3 minut komory przepłukiwano świeżym M K-H, a po stabilizacji pracy mięśniówki przystępowano do badania wpływu kolejnego stężenia. Każdy z analizowanych flawonoidów został przetestowany na co najmniej pięciu fragmentach okrężnicy i jelita czczego, pochodzących od co najmniej pięciu różnych zwierząt.



Ryc. 7 Schemat doświadczenia mającego na celu ocenę wpływu flawonoidów na aktywność motoryczną mięśniówki gładkiej jelita świni

ACh - acetylocholina

FLUSH - płukanie świeżym M K-HS

3.2.6. Analiza i prezentacja wyników

Przez cały czas trwania eksperymentu reaktywność mięśni gładkich jelit była rejestrowana jako wynik zmiany napięcia wycinków. Reakcje wywołane przez DMSO (0,5%), M K-HS (w przypadku CP3) i ACh (10 μ M) określono jako 100% i wykorzystano jako reakcje kontrolne. Działanie wszystkich badanych flawonoidów, wyciągów i frakcji oparto na zmianach napięcia mięśni gładkich mierzonych 5 minut przed i 5 minut po zastosowaniu dowolnej substancji i obliczonych jako pole pod krzywą (AUC). Wszystkie wyniki są wyrażone jako procent odpowiedzi kontrolnej, tj. odpowiedzi mięśniówki na podanie DMSO (0,5%), (M K-HS w przypadku CP3) oraz ACh (10 μ M). Ostateczne wyniki przedstawiono jako średnie wartości eksperymentów przeprowadzonych niezależnie dla wycinków od pięciu różnych zwierząt. Jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) przeprowadzono przy użyciu oprogramowania TIBCO StatSoft, Inc. (2019), STATISTICA (system oprogramowania do analizy danych) w wersji 13.3, www.statsoft.com. Test Dunnetta został użyty do porównania parami przy użyciu efektu DMSO (0,5%) lub ACh (10 μ M) rozpuszczonego w DMSO (0,5%) jako odniesienia. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną.

4. Wyniki

4.1. Otrzymywanie ekstraktów

Z uprzednio oczyszczonych kwiatostanów *Cirsium palustre* (120 g suchej masy (s.m.)) pozyskano surowy ekstrakt metanolowy, który po odparowaniu i liofilizacji poddano frakcjonowaniu metodą ciecz-ciecz. W procesie frakcjonowania uzyskano 0,79 g frakcji eterowej (CP4), 1,8 g frakcji octanowej (CP5) oraz 4,41 g frakcji *n*-butanolowej (CP6), co stanowiło odpowiednio 0,66%, 1,5% oraz 3,68% suchej masy surowca. Całkowita wydajność procesu ekstrakcji wyniosła więc ok. 5,8%.

Niezależnie 30 g suchego materiału poddano ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami otrzymując trzy surowe wyciągi: metanolowy (CP1), 50% metanolowy (CP2) oraz wodny (CP3). Po liofilizacji ich masy wynosiły odpowiednio: 3,92 g, 5,9 g oraz 6 g co stanowiło 13,1%, 19,7% oraz 20% całkowitej suchej masy surowca (Tabela 7).

Tabela 7. Wydajność pozyskiwania wyciągów i frakcji z kwiatostanów *C. palustre*

Wyciąg/frakcja	Masa surowca [g]	Uzysk [g]	Wydajność [% s.m.]
Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami			
CP1	30	3,92	13,1
CP2	30	5,90	19,7
CP3	30	6,00	20,0
Ekstrakcja klasyczna + frakcjonowanie ciecz-ciecz			
CP4	120	0,79	0,66
CP5	120	1,80	1,50
CP6	120	4,41	3,68

4.2. Profilowanie

Do analizy jakościowej metabolitów wtórnych badanych ekstraktów (CP1-3) i frakcji (CP4-6) użyto danych doświadczalnych jak wartości czasów retencji, widma UV-Vis oraz widma wysokorozdzielcze MS. Analizę uzupełniono o pozyskane z użyciem oprogramowania MassHunter wzory sumaryczne i otrzymane na ich podstawie różnice wyrażone wielkością błędu (Δ [ppm]). Ostateczne przypisanie prawdopodobnych tożsamości związków lub

wskazanie metabolitów wykonano uwzględniając dane doświadczalne z analiz substancji wzorcowych (s) oraz dane literaturowe. W metanолоwym ekstrakcie z kwiatów ostrożeńca bagiennego *Cirsium palustre* (CP1) zidentyfikowano szereg związków należących do grupy polifenoli. W początkowych minutach analizy ($R_t < 10$ min) eluowały związki o charakterze polarnym, w tym dominująca pochodna kwasów organicznych (**1**). Związki o charakterze średniopolarnym (R_t 10 - 30 min) reprezentowały pochodne kwasu kawowego, głównie kwas chlorogenowy (kwas 5-*O*-kawoilochinowy, **6**) i jego izomery (**7**, **8**, **9**), a także pochodne flawonoidowe, wśród których dominuje 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC; **25**). Następnie eluowały związki o charakterze niepolarnym i wysokiej sile retencji do fazy stacjonarnej ($R_t > 30$ min). Zaobserwowano obecność flawonoidów w formie wolnej oraz ich metylowanych pochodnych. Do głównych związków należą apigenina (API; **34**), kemferol (**35**) oraz chrysoeriol (CHRY; **36**). Jako ostatni eluował związek oznaczony numerem **37**, którego przy dostępnych metodach nie udało się jednoznacznie zidentyfikować.

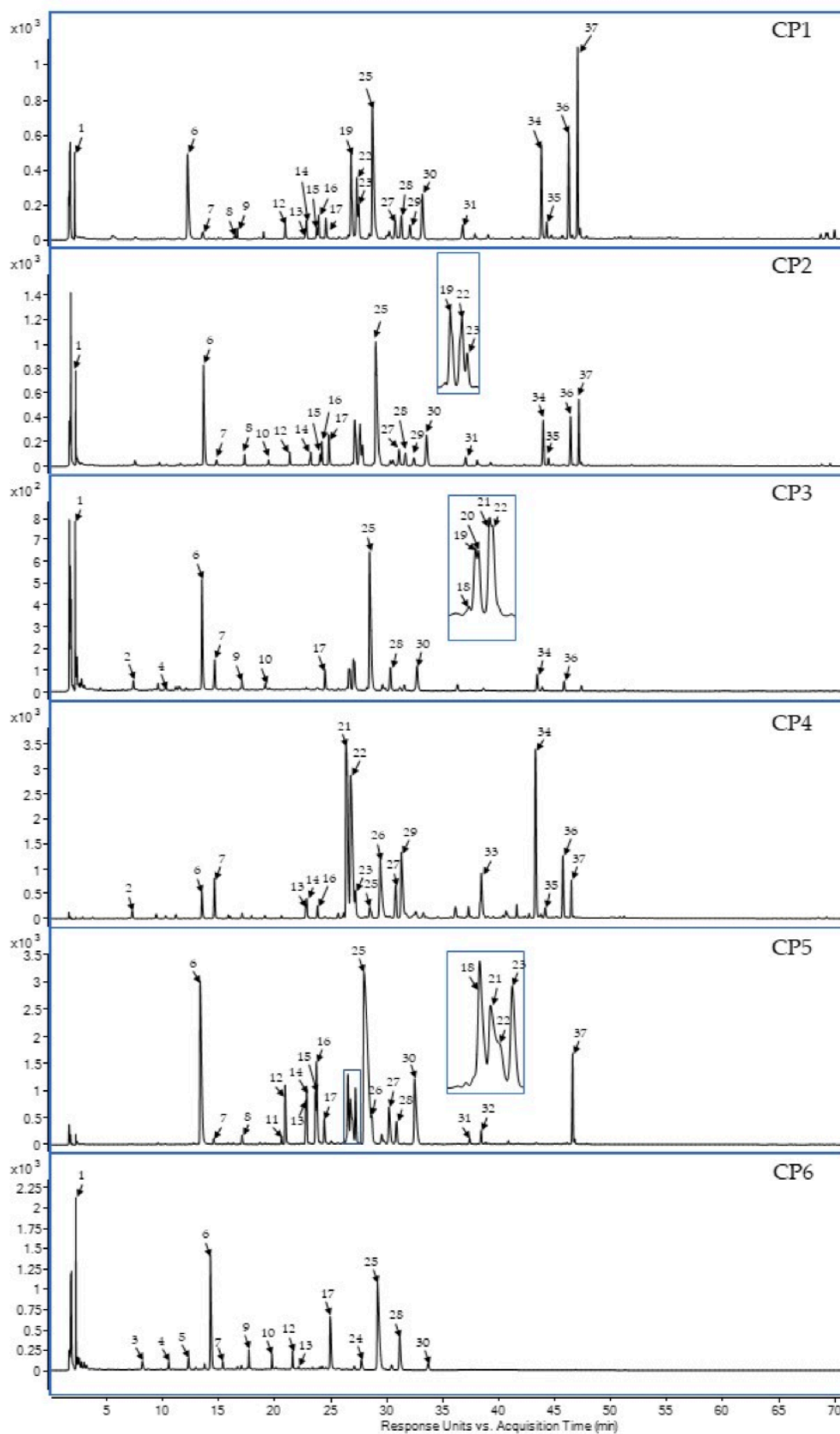
Podobnie jak w przypadku CP1, analiza składu surowego 50% wyciągu metanолоwego (CP2), wykazała obecność pochodnej kwasów organicznych (**1**), obecność kwasu 5-*O*-kawoilochinowego (**6**) oraz 7-*O*-glukuronidu apigeniny (A7GLC). Następnie można zaobserwować aglikony flawonoidowe - apigeninę (API; **34**), kemferol (**35**) oraz chrysoeriol (CHRY; **36**) oraz nieznany związek oznaczony numerem **37**.

Analiza surowego wyciągu wodnego (CP3), zarejestrowanego przy długości fali 280 nm, ujawnia złożony skład, z przewagą estrów kwasu chinowego oraz flawonoidów. W przypadku CP3 również obserwujemy pochodne kwasów organicznych (**1**) oraz związki **2** (pochodne kwasów fenolowych) i **4** (kwas 3-*O*-kawoilochinowy). Następnie obserwujemy izomery kwasu kawoilochinowego - kwas 5-*O*-kawoilochinowy (**6**) oraz kwas 4-*O*-kawoilochinowy (**7**). Zwracają również uwagę związki **19-22** odpowiadające pochodnym kwasu dikawoilochinowego, skoncentrowane w charakterystycznym klastrze między $R_t = 26,58$ min, a $R_t = 26,92$ min. Ponadto zaobserwowano obecność glukuronidu 7-*O*-apigeniny (A7GLC; **25**) oraz aglikony takie jak apigenina (API; **34**) czy chrysoeriol (CHRY; **36**).

Profil fitochemiczny frakcji eterowej (CP4) z kwiatów *C. palustre* ujawnia dominację pochodnych kwasu dikawoilochinowego oraz aglikonów flawonoidowych. Początkowo obserwujemy ($R_t < 10$ min) nieliczne, mało intensywne sygnały, m.in. odpowiadające pochodnym kwasów fenolowych (**2**). Następnie (R_t 10-30 min) izomery kwasu dikawoilochinowego (**21**, **22**). Pod koniec analizy eluuje ($R_t > 30$ min) szereg związków odpowiadających aglikonom: luteolinie (LUT; **33**), apigeninie (API; **34**), kemferolowi (**35**) oraz chrysoeriolowi (CHRY; **36**).

Analiza chromatograficzna frakcji octanowej (CP5) wskazuje na obecność licznych metabolitów wtórnych o zróżnicowanej polarności, w tym pochodnych kwasu chinowego oraz flawonoidów w formie glukuronidów i niezwiązanej. Obserwujemy nieznaczną reprezentację związków skrajnie polarnych. Kolejne eluują kwas 5-*O*-kawoilochinowy (**6**) oraz glukuronid 7-*O*-apigeniny (A7GLC; **25**), szereg koniugowanych flawonów (**15-17**; **23**) oraz pochodne kwasu dikawoilochinowego (**21**, **22**). Ostatni zarejestrowany eluuje związek oznaczony numerem **37**.

Wyniki analizy dla frakcji *n*-butanolowej (CP6) z kwiatostanów ostrożenia błotnego ujawniają obecność związków o wysokiej polarności z dominacją pochodnych kwasu chinowego oraz pochodnych glukuronidowych flawonów. Podobnie jak w przypadku CP1-CP3 w początkowym zakresie czasu retencji analizy ($R_t < 10$ min) dominują pochodne kwasów organicznych (**1**, $R_t = 2,29$) jak również sygnał odpowiadający pochodnym kwasów fenolowych (**3**). W zakresie R_t 10 - 30 min obecne są sygnały odpowiadające kwasowi 5-*O*-kawoilochinowemu (**6**), glukuronidowi 7-*O*-apigeniny (A7GLC; **25**) oraz glikozydom flawonoidowym (**17**, **28**, **30**).



Ryc. 8 Chromatogram UV z oznaczeniem głównych metabolitów analizowanych wyciągów i frakcji (CP1-CP6), zarejestrowany przy użyciu fali o długości 280 nm.

Tabela 8. Najważniejsze związki zidentyfikowane metodą LC-PDA-HRMS w wyciągach i frakcjach pozyskanych z kwiatostanów *C. palustre*

Nr	Rt [min]	Widma UV [$\lambda_{\max}$ nm]	Obserwowany Δ jon ^A	Δ [ppm] ^B	Wzór	Fragmentacja ^C	Nazwa związku	Obecność w wyciągu/frakcji					
								CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
1	2.29	248 , 270, 345	191.01957	-0.65	C ₆ H ₈ O ₇	191	pochodne kwasów organicznych ^F	x	x	x			x
2	7.23	260 , 295	153.02000	3,66	C ₇ H ₆ O ₄	153	pochodne kwasów fenolowych			x	x		
3	8.13	280	315.10854	1.22	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	203, 315	pochodne kwasów fenolowych						x
4	10.5	245 ^{sh} , 295 ^{sh} , 325	353.08918	3.85	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353 , 134	kwas 3- <i>O</i> -kawoilochinowy ^R			x			x
5	12.39	270	443.19227	0.66	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	215, 443	pochodne kwasów fenolowych						x
6	14.32	245 ^{sh} , 295 ^{sh} , 325	353.08833	1.5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353 , 191	kwas 5- <i>O</i> -kawoilochinowy ^S	x	x	x	x	x	x
7	15.32	245 ^{sh} , 295 ^{sh} , 325	353.08930	4.14	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353 , 179	kwas 4- <i>O</i> -kawoilochinowy _{S,R}	x	x	x	x	x	x
8	17.04	290, 312	337.09462	3.33	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337 , 191	kwas 5- <i>O-p</i> - kumaroilochinowy ^R	x	x			x	
9	17.66	265, 345	623.12809	4.21	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	284, 447, 623	pochodna flawonu ^F	x		x			x
10	19.72	264 , 343	607.13046	3.76	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆	607	nieznany		x	x			x

11	20.57	245 ^{sh} , 295 ^{sh} , 327	367.10349	4.62	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	367, 179, 135	kwasy 4- <i>O</i> -feruloilochinowy ^R					x	
12	21.55	255, 282, 344	463.08820	3.62	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	300, 463	<i>O</i> -heksoz flawonu ^F	x	x			x	x
13	22.74	283 , 335	449.11088	4.64	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	287, 449	izomer <i>O</i> -heksoz eriodykcjolu ^F	x			x	x	x
14	22.82	283 , 335	449.10894	4.32	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	287, 449	7- <i>O</i> -glukozyd eriodykcjolu ^S	x	x		x	x	
15	22.63	255, 267 ^{sh} , 348	447.09329	4.57	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	283, 447	7- <i>O</i> -glukozyd luteoliny ^S	x	x			x	
16	23.67	255, 267 ^{sh} , 348	447.09329	4.57	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	283, 447	izomer <i>O</i> -heksoz luteoliny ^F	x	x		x	x	
17	24.39	255, 267 ^{sh} , 342	461.07255	6.55	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	285, 461	pochodne flawonu <i>O</i> - uronidu ^F	x	x	x		x	x
18	26.49	264 , 347	491.08311	5.73	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	315, 447	4'- <i>O</i> -glukozyd cirsymarytyny ^F			x		x	
19	26.58	246, 296, 327	515.12266	5.05	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191, 353, 515	3,4- <i>O</i> - kwas dikawoilochinowy ^F	x	x	x			
20	26.67	246, 296, 327	515.12240	6.03	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191, 353, 515	3,5- <i>O</i> - kwas dikawoilochinowy ^{S,F}			x			
21	26.72	246, 296, 327	515.11950	5.09	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191, 353, 515	izomer kwasu dikawoilochinowego ^F				x	x	x
22	26.92	246, 296, 327	515.12212	5.31	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191, 353, 515	izomer kwasu dikawoilochinowego ^F	x	x	x	x	x	
23	27.18	266, 336	431.10043	4.79	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	268, 431	izomer <i>O</i> -heksoz flawonu ^F	x	x		x	x	

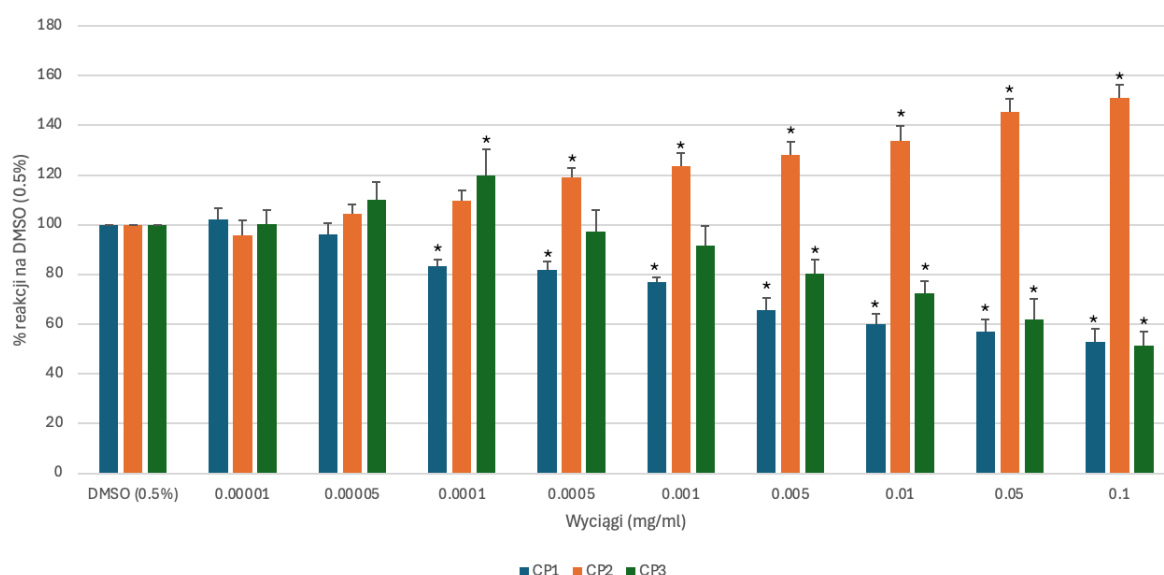
4.3. Wpływ wyciągów, frakcji oraz flawonoidów *C. palustre* na motorykę jelit

4.3.1. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej jelita czczego

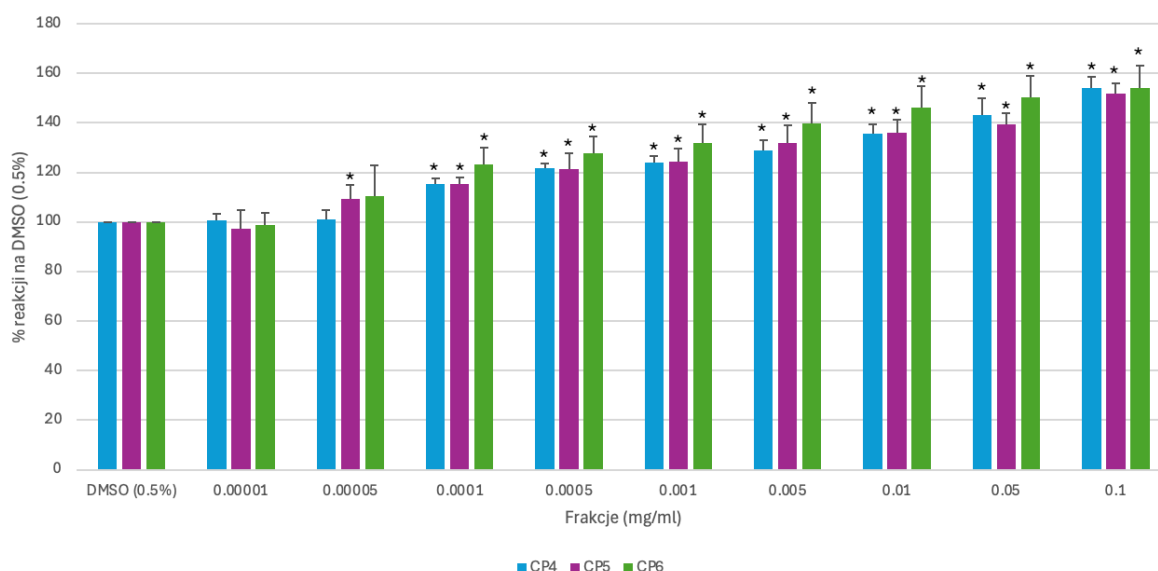
Spontaniczna aktywność skurczowa mięśniówki jelit w odpowiedzi na badane wyciągi była każdorazowo porównywana z reakcją kontrolną, uwzględniającą jedynie obecność odpowiedniego rozpuszczalnika. W przypadku wyciągu wodnego (CP3) zastosowano modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita (M K-HS), natomiast dla pozostałych wyciągów, frakcji oraz izolowanych flawonoidów użyto dimetylosulfotlenku (DMSO). Nie zaobserwowano, aby którykolwiek z zastosowanych rozpuszczalników wpływał na kurczliwość mięśniówki jelit.

Wszystkie badane wyciągi i frakcje wywierały istotny statystycznie wpływ na spontaniczną aktywność skurczową warstwy podłużnej mięśniówki gładkiej jelita czczego w sposób zależny od dawki. W przypadku wyciągów metanolowego (CP1) i wodnego (CP3) obserwowano efekt miorelaksacyjny, natomiast ekstrakt 50% metanolowy (CP2) oraz frakcje eterowa (CP4), octanowa (CP5) i *n*-butanolowa (CP6) powodowały nasilenie kurczliwości mięśni w bardzo porównywalnym stopniu (Ryc. 9 i Ryc. 10). Wyciąg CP1 wykazywał efekt spazmolityczny w zakresie dawek od 0,0001 do 0,1 mg/ml. Efekt był zależny od dawki i wynosił od $83,45 \pm 2,43\%$ do $52,96 \pm 5,36\%$ w porównaniu do reakcji kontrolnej na DMSO (0,5%) odpowiednio dla stężeń 0,0001 i 0,1 mg/ml (Ryc. 9). Pobudzające kurczliwość mięśniówki działanie CP2 rozpoczynało się przy zastosowaniu dawki 0,0005 mg/ml osiągając $119,09 \pm 3,61\%$ reakcji kontrolnej. Najsilniejszy efekt zmierzono po podaniu dawki 0,1 mg/ml, a odpowiedź wyniosła wówczas $151,12 \pm 5,22\%$ odpowiedzi na kontrolne podanie rozpuszczalnika (Ryc. 9). Wyciąg CP3 wykazywał działanie dwufazowe, tj. w stężeniu 0,0001 mg/ml powodował pobudzenie aktywności spontanicznej mięśniówki podłużnej jelita czczego ($119,99 \pm 10,50\%$ reakcji kontrolnej), natomiast w wyższych stężeniach hamował kurczliwość. Efekt miorelaksacyjny uzyskano w najniższej zastosowanej dawce wynoszącej 0,05 mg/ml ($80,30 \pm 5,83\%$ odpowiedzi na DMSO). Dawka 0,1 mg/ml powodowała obniżenie kurczliwości mięśniówki w stopniu wynoszącym $51,51 \pm 5,56\%$ kontroli (Ryc. 9). Frakcja CP4 powodowała zależny od dawki wzrost kurczliwości podłużnej mięśniówki gładkiej w zakresie stężeń 0,0001 - 0,1 mg/ml. Najsilniejszy efekt, stanowiący $154,00 \pm 4,62\%$ reakcji kontrolnej, osiągnięto przy zastosowaniu dawki 0,1mg/ml (Ryc. 10). Dodanie frakcji CP5 również powodowało nasilenie kurczliwości mięśniówki w sposób zależny

od dawki. Reakcja mieściła się w zakresie od $109,38 \pm 5,65\%$ do $151,78 \pm 4,00\%$ wartości kontrolnej przy zastosowaniu odpowiednio $0,00005$ i $0,1$ mg/ml (Ryc. 10). CP6, podobnie jak pozostałe frakcje, nasilała spontaniczną kurczliwość mięśni gładkich warstwy podłużnej jelita czczego świni. Najniższym znacząco zmieniającym aktywność stężeniem było $0,0001$ mg/ml ($123,08 \pm 7,03\%$ reakcji na DMSO). Przy zastosowaniu najwyższej badanej dawki ($0,1$ mg/ml) uzyskano odpowiedź wynoszącą $154,23 \pm 8,97\%$ odpowiedzi kontrolnej (Ryc. 10).



Ryc. 9 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na spontaniczną aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

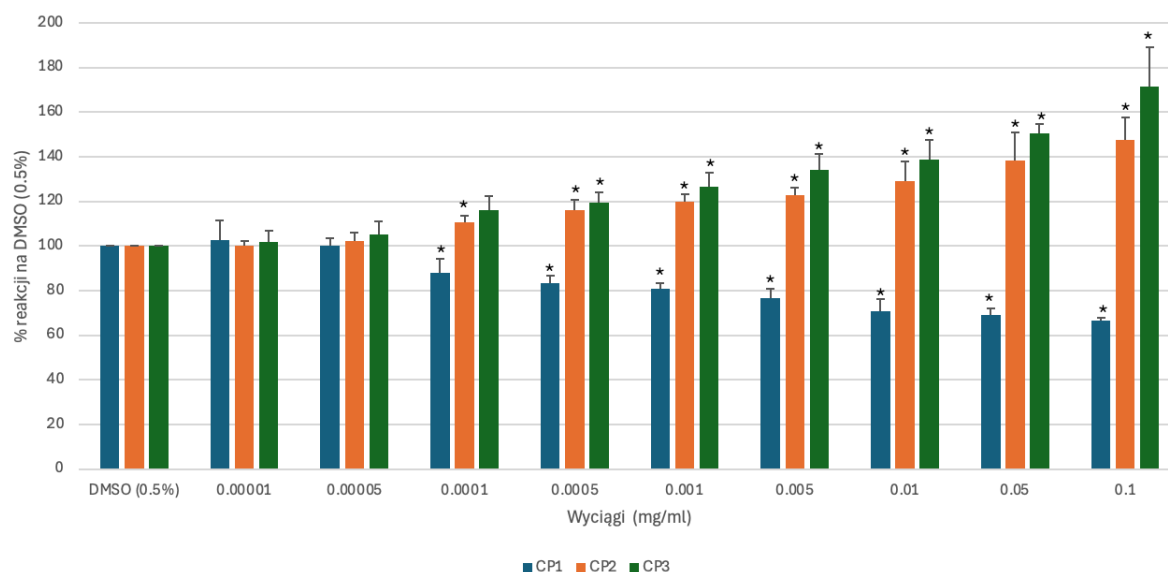


Ryc. 10 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na spontaniczną aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni in vitro. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

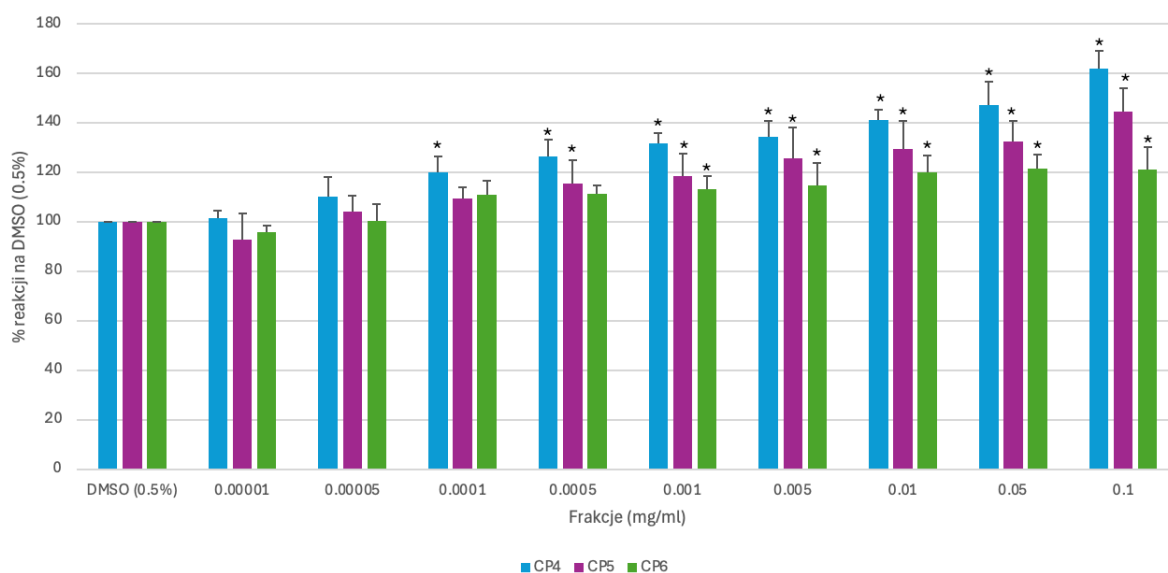
4.3.2. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej jelita czczego

Spośród wszystkich badanych wyciągów i frakcji uzyskanych z *C. palustre* jedynie wyciąg metanolowy (CP1) wykazywał działanie hamujące spontaniczną aktywność motoryczną warstwy okrężnej mięśniówki gładkiej jelita czczego. Pozostałe wyciągi i frakcje wykazywały natomiast efekt prokinetyczny, zależny od dawki (Ryc. 11 i Ryc. 12). Działanie rozkurczowe CP1 obserwowano w zakresie stężeń od 0,0001 mg/ml do 0,1 mg/ml, przy czym efekt ten był zależny od dawki. Redukcja aktywności skurczowej wynosiła od $88,09 \pm 6,00\%$ (dla 0,0001 mg/ml) do $66,76 \pm 1,19\%$ (dla 0,1 mg/ml) w odniesieniu do reakcji kontrolnej na DMSO (0,5%) (Ryc. 11). Wyciąg 50% metanolowy (CP2) wykazywał działanie pobudzające kurczliwość już od najniższego testowanego stężenia (0,0001 mg/ml), zwiększając kurczliwość do $110,74 \pm 2,72\%$ wartości kontrolnej. Najsilniejszy efekt zaobserwowano przy podaniu ekstraktu w stężeniu 0,1 mg/ml, kiedy to odpowiedź osiągnęła $147,38 \pm 10,24\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 11). Podanie wyciągu wodnego (CP3) również doprowadzało do nasilenia aktywności motorycznej mięśniówki okrężnej jelita czczego świni, a obserwowany efekt był zależny od zastosowanej dawki. Najniższe stężenie wywołujące istotną zmianę w spontanicznej kurczliwości wynosiło 0,0005 mg/ml, a odpowiedź skurczowa mieściła się w zakresie od

119,29 ± 4,97% (dla 0,0005 mg/ml) do 171,54 ± 1,61% (dla 0,1 mg/ml) w odniesieniu do kontroli (Ryc. 11). Frakcja eterowa (CP4) nasilała kurczliwość w zakresie stężeń 0,0001-0,1 mg/ml, wzmacniając aktywność skurczową od 115,30 ± 9,58% do 144,36 ± 9,47% w porównaniu do wartości kontrolnej (Ryc. 12). Podobnie frakcja octanowa (CP5) intensyfikowała kurczliwość w zakresie 0,0005-0,1 mg/ml, zwiększając ją od 115,30 ± 9,58% do 144,36 ± 9,47% w porównaniu do wartości kontrolnej (Ryc. 12). Analogicznie do innych frakcji, frakcja *n*-butanolowa (CP6) również nasilała spontaniczne skurcze mięśniówki okrężnej jelita czczego. Najniższa dawka doprowadzająca do statystycznie znaczących zmian w kurczliwości wynosiła 0,001 mg/ml, wywołując odpowiedź na poziomie 113,09 ± 5,32% wartości kontrolnej, natomiast najwyższa badana dawka (0,1 mg/ml) zwiększała aktywność skurczową do 121,09 ± 8,88% (Ryc. 12).



Ryc. 11 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na spontaniczną aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów (±SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

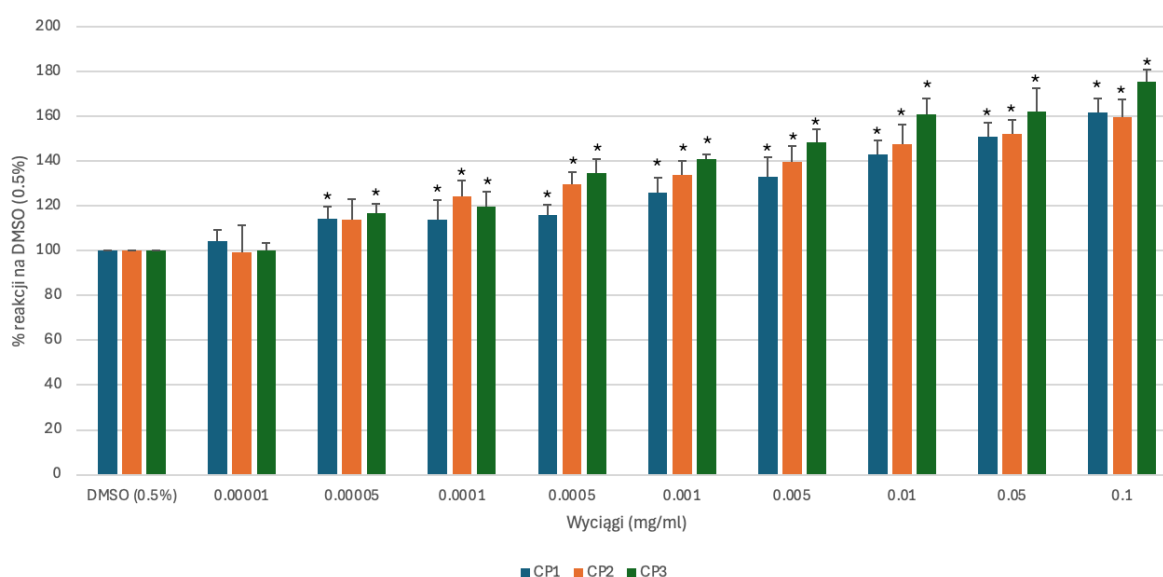


Ryc. 12 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji *n*-butanolowej (CP6) *C. palustre* na spontaniczną aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

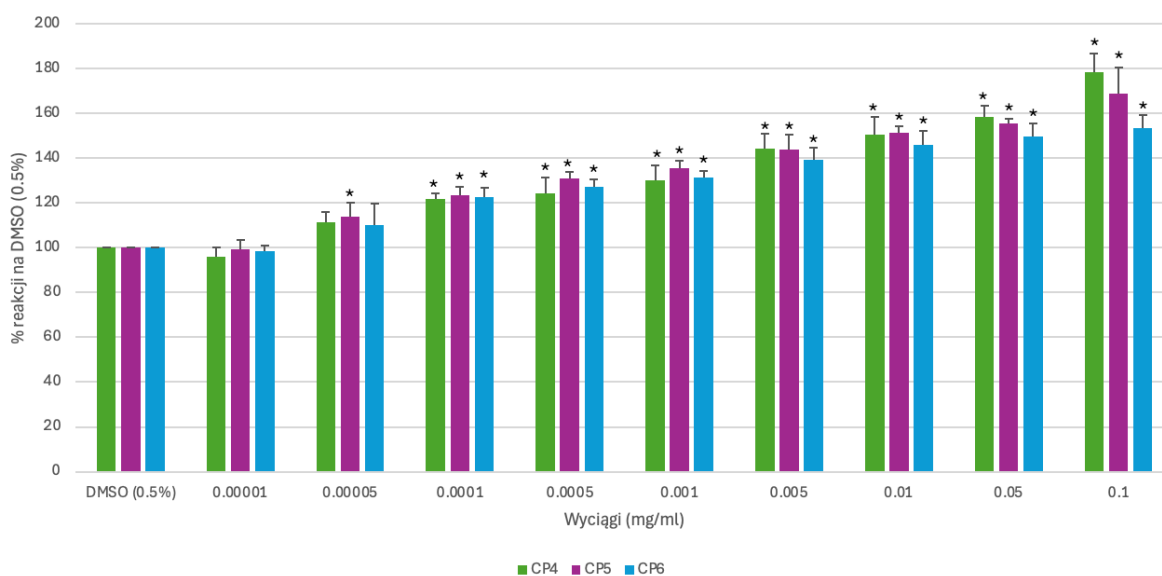
4.3.3. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej okrężnicy

Wszystkie badane wyciągi i frakcje, tj. surowy wyciąg metanolowy (CP1), surowy 50% wyciąg metanolowy (CP2), surowy wyciąg wodny (CP3), frakcja eterowa (CP4), frakcja octanowa (CP5) i frakcja *n*-butanolowa (CP6), powodowały zwiększenie spontanicznej kurczliwości warstwy mięśniówki podłużnej okrężnicy świni w sposób zależny od dawki (Ryc. 13 i Ryc. 14). Surowy wyciąg metanolowy (CP1) wykazywał istotne działanie zwiększające kurczliwość w zakresie dawek 0,00005-0,1 mg/ml, powodując odpowiednio wzrost reakcji od $114,42 \pm 5,08\%$ do $161,62 \pm 6,21\%$ w stosunku do reakcji kontrolnej na DMSO (0,5%) (Ryc. 13). Surowy wyciąg metanolowy (CP2) również zwiększał spontaniczną aktywność mięśniową w sposób zależny od dawki, jednak jego znaczącą zmianę aktywności motorycznej obserwowano w nieco wyższym stężeniu - 0,0001 mg/ml. Najsilniejszy efekt skurczowy uzyskano przy dawce 0,1 mg/ml, osiągając $159,67 \pm 7,93\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 13). Wyciąg wodny (CP3) wywoływał najsilniejszy skurcz mięśni gładkich warstwy podłużnej okrężnicy spośród wszystkich badanych ekstraktów. Reakcja mieściła się w zakresie od $116,95 \pm 5,38\%$ do $175,39 \pm 5,38\%$ wartości kontrolnej przy zastosowaniu odpowiednio 0,00005 i 0,1 mg/ml (Ryc. 13). Frakcja eterowa (CP4) wykazywała efekt kurczliwy w sposób zależny od dawki, w zakresie stężeń 0,0001-0,1 mg/ml, a reakcja wynosiła od $121,68 \pm$

2,77% do $178,37 \pm 8,29\%$ wartości odpowiedzi kontrolnej. Frakcja octanowa (CP5) również zwiększała spontaniczną aktywność mięśniową, przy czym najniższa skuteczna dawka wynosiła 0,00005 mg/ml. Reakcje mieściły się w zakresie od $113,97 \pm 6,09\%$ do $168,69 \pm 11,90\%$ wartości kontrolnej odpowiednio dla 0,00005 i 0,1 mg/ml (Ryc. 14). Dla frakcji *n*-butanolowej (CP6) najniższą dawką wywołującą istotny efekt prokinetyczny było 0,0001 mg/ml, przy czym reakcja osiągnęła $122,57 \pm 4,14\%$ wartości kontrolnej. Największy efekt skurczowy, wynoszący $153,58 \pm 5,62\%$ reakcji kontrolnej na podanie DMSO, odnotowano przy podaniu frakcji w stężeniu 0,1 mg/ml.



Ryc. 13 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na spontaniczną aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

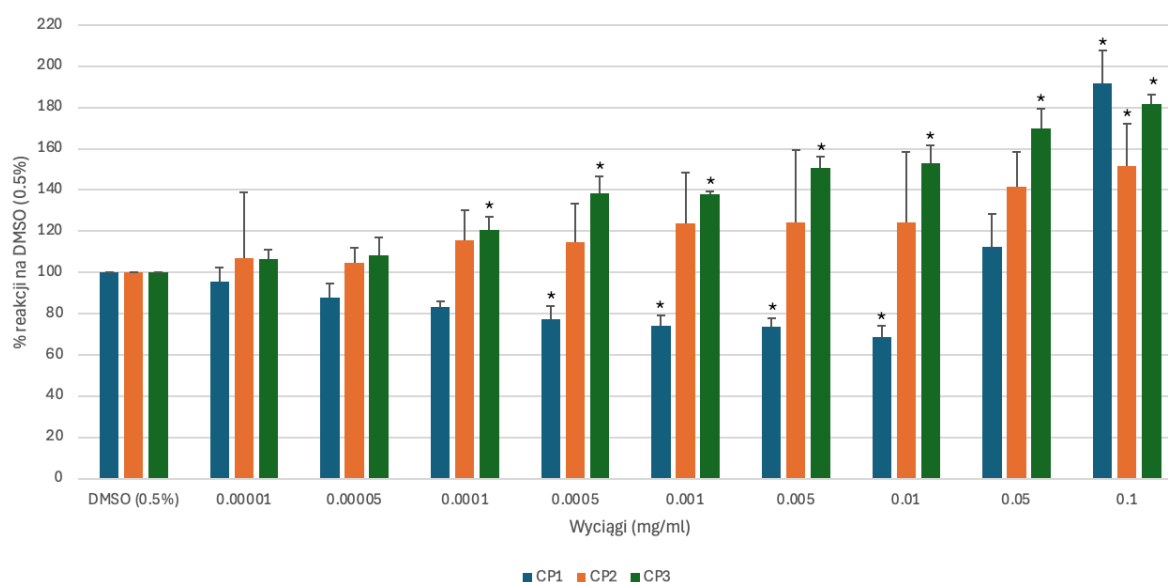


Ryc. 14 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na spontaniczną aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

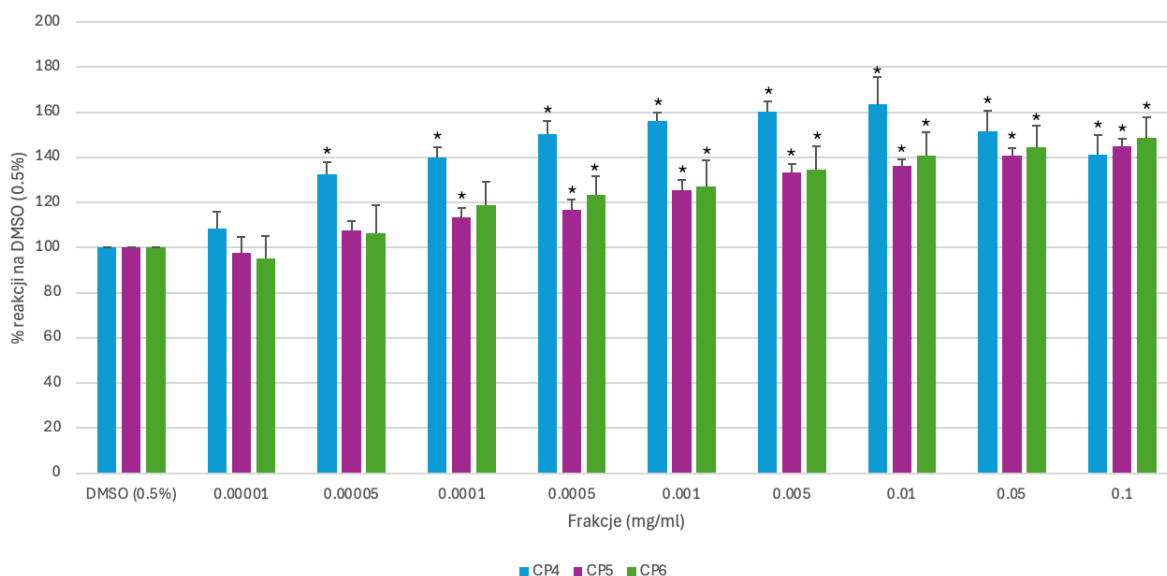
4.3.4. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej okrężnicy

Niemal wszystkie wyciągi i frakcje zwiększały spontaniczną kurczliwość mięśniówki okrężnej okrężnicy świni w sposób zależny od dawki. W przypadku wyciągu metanolowego (CP1) niskie stężenia wykazywały działanie spazmolityczne, natomiast najwyższa dawka pobudzała kurczliwość, osiągając najsilniejszy efekt prokinetyczny spośród wszystkich badanych substancji. W zakresie stężeń 0,0005 do 0,01 mg/ml CP1 powodował wyraźne osłabienie spontanicznej kurczliwości warstwy okrężnej mięśni gładkich okrężnicy. Reakcja wynosiła odpowiednio $77,33 \pm 6,23\%$ i $68,68 \pm 5,62\%$ wartości kontrolnej. W najwyższym zastosowanym stężeniu (0,1 mg/ml) wyciąg ten wykazywał natomiast działanie prokinetyczne, osiągając $191,92 \pm 15,69\%$ reakcji na DMSO (0,5%) (Ryc. 15). Wyciąg 50% metanolowy (CP2) wykazywał statystycznie istotne działanie prokinetyczne wyłącznie przy najwyższym zastosowanym stężeniu (Ryc. 15), osiągając wówczas siłę $151,74 \pm 20,20\%$ reakcji kontrolnej (Ryc. 15). Wyciąg wodny (CP3) wywoływał silny skurcz mięśni gładkich okrężnicy w sposób zależny od dawki. Reakcja mieściła się w zakresie od $120,57 \pm 6,24\%$ do $181,86 \pm 4,39\%$ wartości kontrolnej przy zastosowaniu odpowiednio 0,0001 i 0,1 mg/ml (Ryc. 15). Frakcja eterowa (CP4) również zwiększała spontaniczną aktywność motoryczną w sposób zależny od

dawki, a jej skuteczność rozpoczynała się od stężenia 0,00005 mg/ml. Najsilniejszy efekt skurczowy uzyskano przy dawce 0,1 mg/ml, osiągając $140,98 \pm 8,98\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 16). Frakcja octanowa (CP5) wykazywała wyraźne działanie prokinetyczne na okrężną warstwę mięśniówki gładkiej okrężnicy w zakresie stężeń 0,0001 do 0,1 mg/ml. Efekt ten był zależny od dawki i nasilał się wraz ze wzrostem stężenia substancji. Zakres odpowiedzi wynosił od $113,34 \pm 4,03\%$ do $144,76 \pm 3,53\%$ reakcji na DMSO (0,5%) (Ryc. 16). Podobnie frakcja *n*-butanolowa (CP6) wykazywała działanie prokinetyczne na warstwę okrężną mięśniówki gładkiej okrężnicy w sposób zależny od dawki. Najniższe stężenie wywołujące istotną zmianę w spontanicznej kurczliwości wynosiło 0,0005 mg/ml. Zakres odpowiedzi wynosił od $123,17 \pm 8,41\%$ do $148,46 \pm 9,41\%$ reakcji mięśniówki na DMSO (0,5%) w stężeniach CP6 wynoszących odpowiednio 0,0005 i 0,1 mg/ml (Ryc. 16).



Ryc. 15 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na spontaniczną aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

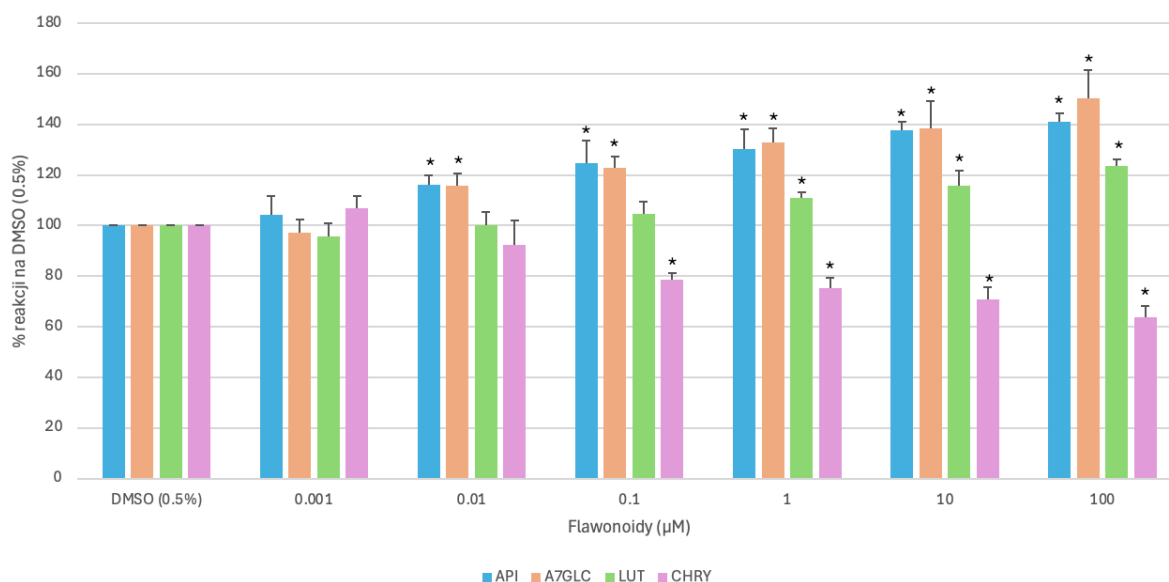


Ryc. 16 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na spontaniczną aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

4.3.5. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej jelita czczego

Większość flawonoidów wybranych do badania wykazywała zależny od dawki efekt pobudzający spontaniczną kurczliwość mięśniówki podłużnej jelita czczego. Spośród nich najsilniejsze działanie wykazywał 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC), powodując największy wzrost siły spontanicznej aktywności motorycznej. Wyjątek stanowił chrysoeriol (CHRY), który jako jedyny z testowanych flawonoidów hamował spontaniczną kurczliwość w sposób zależny od dawki (Ryc. 17). Apigenina (API) wykazywała wyraźne działanie proskurczowe względem mięśniówki podłużnej jelita czczego podczas stosowania w stężeniach od 0,01 do 100 μ M. Efekt ten wzrastał wraz ze zwiększaniem dawki i mieścił się w zakresie od $116,27 \pm 3,63\%$ (0,01 μ M) do $140,92 \pm 3,45\%$ (dla 100 μ M) w odniesieniu do reakcji kontrolnej na DMSO (0,5%) (Ryc. 17). A7GLC również wykazywał działanie prokinetyczne w sposób zależny od dawki. Najniższe efektywne stężenie wynosiło 0,01 μ M, a odpowiedź skurczowa mieściła się w zakresie od $115,89 \pm 4,55\%$ do $150,14 \pm 11,32\%$ (100 μ M) w porównaniu do kontroli (Ryc. 17). Podobnie luteolina (LUT) zwiększała kurczliwość mięśniówki w sposób zależny od dawki, choć zakres efektywnych stężeń dla tego flawonoidu był najwęższy (1-100 μ M). Po podaniu LUT w stężeniu 1 μ M zaobserwowano wzrost kurczliwości do $110,95 \pm 2,29\%$ wartości reakcji kontrolnej, natomiast najsilniejsza odpowiedź,

wynosząca $123,39 \pm 2,92\%$, wystąpiła przy $100 \mu\text{M}$ (Ryc. 17). CHRY działał hamująco na aktywność spontaniczną mięśniówki gładkiej w sposób zależny od dawki. Po zastosowaniu dawki $0,01 \mu\text{M}$ CHRY zaobserwowano efekt zmniejszający kurczliwość, osiągający $78,46 \pm 2,67\%$ wartości reakcji kontrolnej. Najsilniejszą odpowiedź odnotowano przy stężeniu $100 \mu\text{M}$, wynoszącą $63,85 \pm 4,17\%$ reakcji na DMSO (Ryc. 17).

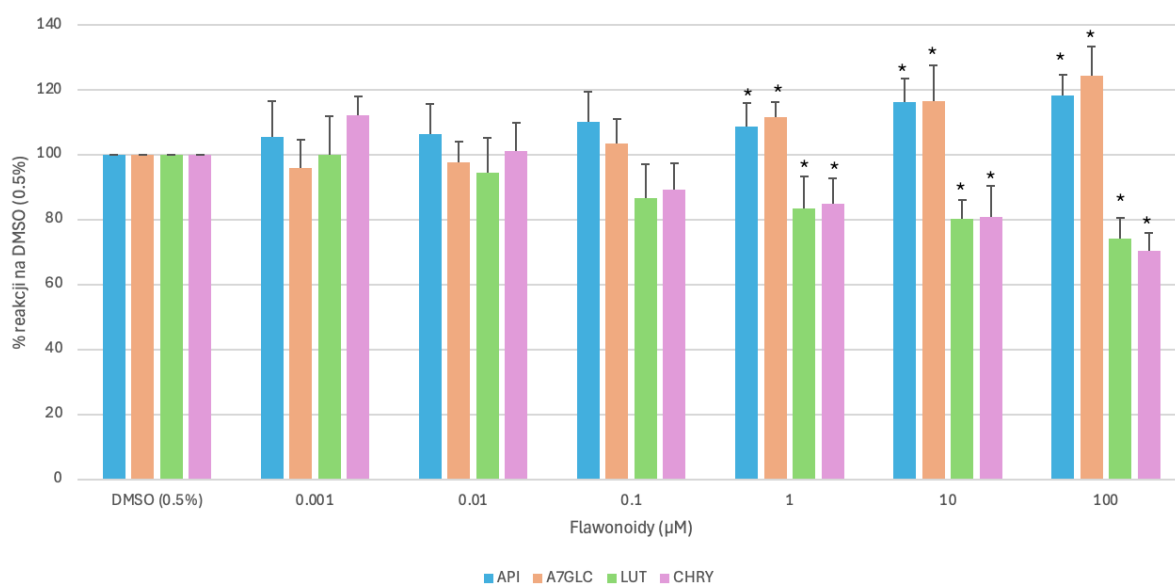


Ryc. 17 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na spontaniczną aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

4.3.6. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej jelita czczego

W badaniach okrężnej mięśniówki gładkiej jelita czczego apigenina (API) i 7-O-glukuronid apigeniny glukuronid (A7GLC) wykazywały zależny od dawki efekt pobudzający aktywność spontaniczną, natomiast chrysoeriol (CHRY) i luteolina (LUT) działały spazmolitycznie. A7GLC wykazywał nieco silniejsze działanie prokinetyczne niż API, podczas gdy efekt hamujący LUT i CHRY był porównywalny (Ryc. 18). API zwiększało aktywność skurczową jedynie podczas stosowania dwóch najwyższych stężeń (10 i $100 \mu\text{M}$), osiągając odpowiednio $116,26 \pm 7,08\%$ oraz $118,14 \pm 6,47\%$ wartości reakcji kontrolnej wywołanej przez DMSO (Ryc. 18). A7GLC działał pobudzająco na warstwę okrężną mięśniówki w zakresie stężeń 1 - $100 \mu\text{M}$. Efekt ten

wzrastał wraz ze zwiększaniem dawki, osiągając od $111,64 \pm 4,60\%$ ($1 \mu\text{M}$) do $124,33 \pm 9,00\%$ ($100 \mu\text{M}$) w porównaniu do kontroli (Ryc. 18). LUT wykazywała działanie spazmolityczne w sposób zależny od dawki. Po zastosowaniu LUT stężeniu $1 \mu\text{M}$ kurczliwość mięśniówki spadła do $83,37 \pm 9,89\%$ wartości kontrolnej, a przy $100 \mu\text{M}$ efekt był najsilniejszy, osiągając $74,20 \pm 6,36\%$ (Ryc. 18). Podobne działanie hamujące obserwowano w przypadku CHRY, którego efekt spazmolityczny wynosił $84,99 \pm 7,76\%$ dla stężenia $1 \mu\text{M}$ i wzrastał do $70,33 \pm 5,56\%$ przy najwyższym badanym stężeniu ($100 \mu\text{M}$) w odniesieniu do kontroli (Ryc. 18).

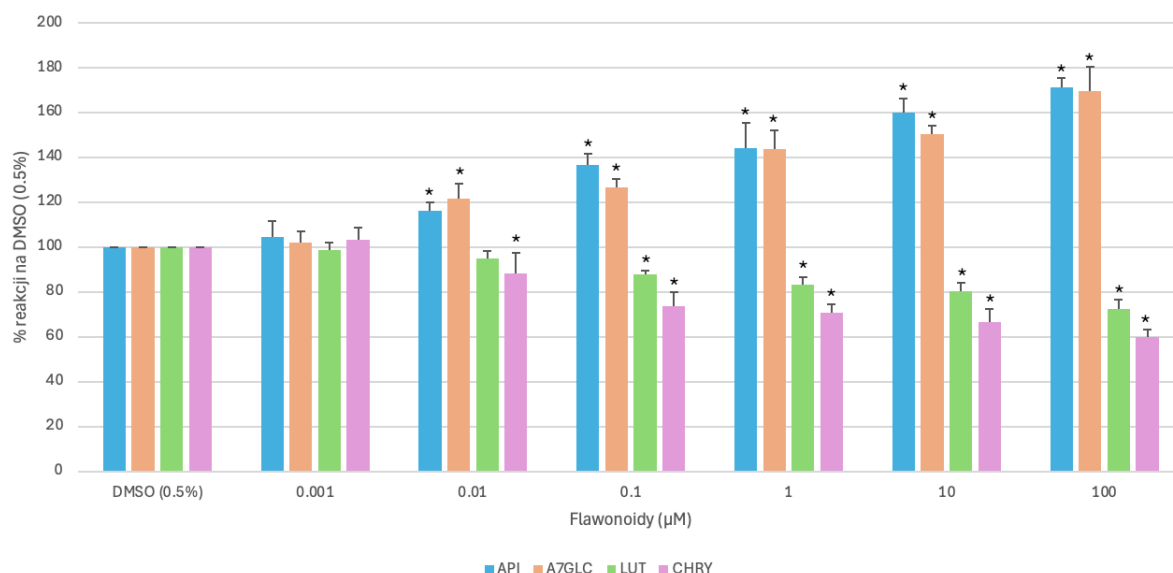


Ryc. 18 Wpływ apigeniny (API), 7-O- glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na spontaniczną aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

4.3.7. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki podłużnej okrężnicy

Wszystkie flawonoidy uwzględnione w doświadczeniu miały znaczący wpływ na spontaniczną aktywność motoryczną mięśniówki podłużnej okrężnicy, a wywołany przez nie efekt był zależny od zastosowanej dawki substancji. Luteolina (LUT) i chrysoeriol (CHRY) działały rozkurczowo, zmniejszając napięcie mięśni, natomiast apigenina (API) i 7-O-glukuronid apigeniny (A7GLC) powodowały wzrost spontanicznej aktywności

motorycznej. Działanie API było nieznacznie silniejsze niż A7GLC. Z kolei CHRY miał znacznie silniejsze właściwości spazmolityczne w porównaniu z LUT (Ryc. 19). API znacząco zwiększała siłę spontanicznych skurczów mięśni w sposób zależny od dawki, znaczący wzrost kurczliwości notowany był już przy zastosowaniu flawonoidu w najniższym stężeniu. Po zastosowaniu 0,01 μM apigeniny zaobserwowano istotny efekt pobudzający kurczliwość, osiągający $116,27 \pm 3,63\%$ wartości reakcji kontrolnej. Najwyższą odpowiedź skurczową odnotowano przy stężeniu 100 μM , wynoszącą $171,43 \pm 4,0\%$ reakcji na DMSO (Ryc. 19). 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC) w stężeniach od 0,01 do 100 μM znacząco, i w sposób zależny od dawki, wzmacniał spontaniczną aktywność mięśniową (Ryc. 19). Co ciekawe, już najniższe stężenie, 0,01 μM , wywołało silniejszą odpowiedź skurczową niż porównywalne stężenie apigeniny (API). W przypadku A7GLC, odpowiedź skurczowa osiągnęła poziom $121,52 \pm 6,74\%$ w stosunku do kontroli. Maksymalny efekt skurczowy zaobserwowano przy stężeniu 100 μM , kiedy to siła skurczu osiągnęła $171,43 \pm 4,0\%$ w porównaniu z reakcją wywołaną przez DMSO (0,5%). LUT wykazywała wyraźne działanie rozkurczowe na mięśniówkę podłużną okrężnicy w zakresie stężeń 0,1-100 μM . Efekt ten był zależny od dawki i nasilał się wraz ze wzrostem stężenia substancji. Zakres odpowiedzi wynosił od $87,81 \pm 1,65\%$ (w dawce 0,1 μM) do $72,44 \pm 4,4\%$ (przy stężeniu 100 μM) reakcji na DMSO (0,5%) (Ryc. 19). CHRY również wykazywał działanie miorelaksacyjne na podłużną mięśniówkę okrężnicy, jednak jego efekt był wyraźnie silniejszy niż w przypadku luteoliny (LUT). Działanie to zależało od dawki, a najniższe stężenie wywołujące istotną zmianę w spontanicznej kurczliwości wynosiło 0,01 μM . Odpowiedź mieściła się w zakresie od $88,08 \pm 9,15\%$ do $59,91 \pm 3,31\%$ reakcji mięśniówki na DMSO (0,5%) dla CHRY w stężeniach wynoszących odpowiednio 0,01 i 100 μM (Ryc. 19).

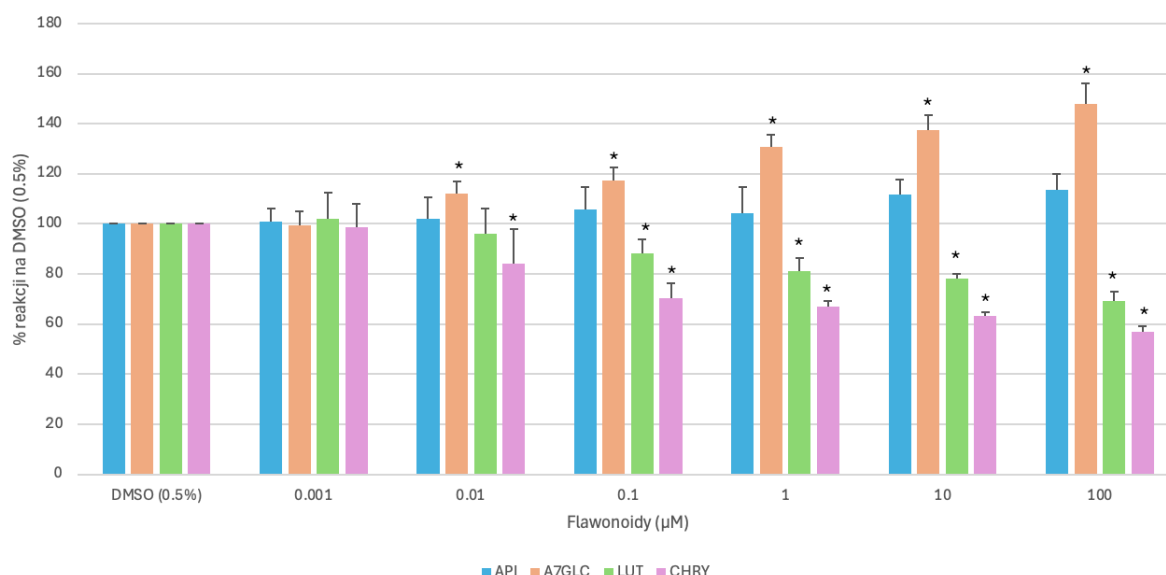


Ryc. 19 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na spontaniczną aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

4.3.8. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na aktywność spontaniczną mięśniówki okrężnej okrężnicy

Siła skurczów spontanicznych mięśniówki okrężnej okrężnicy nie wykazała statystycznie istotnych zmian w odpowiedzi na podanie apigeniny (API). Pozostałe badane flawonoidy miały wyraźny wpływ na kurczliwość spontaniczną, a efekt był zależny od dawki. W przypadku 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC) działanie to było pobudzające, natomiast luteolina (LUT) i chrysoeriol (CHRY) działały rozkurczająco. Podobnie jak w przypadku mięśniówki podłużnej działanie spazmolityczne CHRY było silniejsze niż LUT (Ryc. 20). A7GLC wykazywał działanie prokinetyczne na warstwę okrężną mięśniówki gładkiej okrężnicy w sposób zależny od dawki. Najniższe stężenie wywołujące istotną zmianę w spontanicznej kurczliwości wynosiło 0,01 µM. Zakres odpowiedzi wynosił od $112,19 \pm 4,78\%$ do $147,87 \pm 8,37\%$ reakcji mięśniówki na DMSO (0,5%) w stężeniach A7GLC wynoszących odpowiednio 0,01 i 100 µM (Ryc. 20). Luteolina (LUT) wykazywała silne właściwości rozkurczowe względem mięśniówki okrężnej okrężnicy w stężeniach od 0,1 do 100 µM. Działanie to było zależne od dawki, a jego intensywność wzrastała wraz ze zwiększaniem stężenia. Odpowiedzi mieściły się w zakresie od $88,20 \pm 5,71\%$ (przy stężeniu 0,1 µM) do $69,32 \pm 3,75\%$ (dla stężenia 100 µM) w porównaniu z reakcją na DMSO (0,5%) (Ryc. 20). Efekt spazmolityczny

uzyskany po podaniu CHRY również nasilał się wraz ze wzrostem zastosowanej dawki i był silniejszy niż w przypadku LUT. Po zastosowaniu dawki 0,01 μM CHRY zaobserwowano istotny efekt obniżający kurczliwość, osiągający $84,27 \pm 13,65\%$ wartości reakcji kontrolnej. Najwyższą odpowiedź odnotowano przy stężeniu 100 μM , wynoszącą $56,97 \pm 2,05\%$ reakcji na DMSO (Ryc. 20).

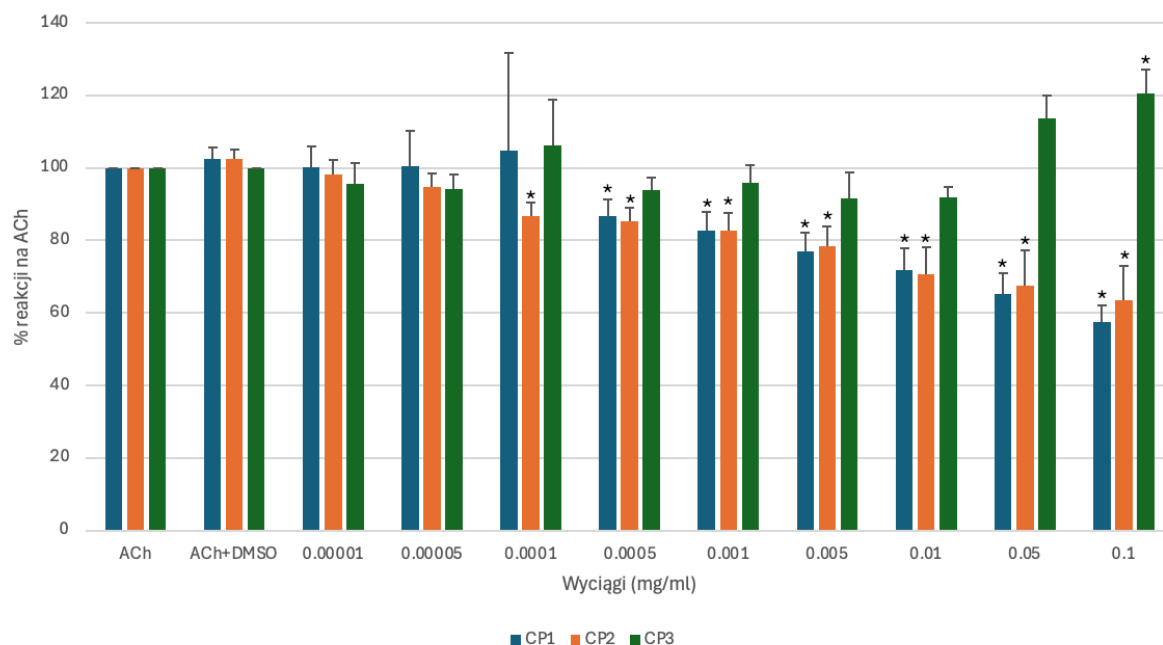


Ryc. 20 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na spontaniczną aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na DMSO (0,5%). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$); $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%); * $p \leq 0,05$ vs. DMSO (0,5%).

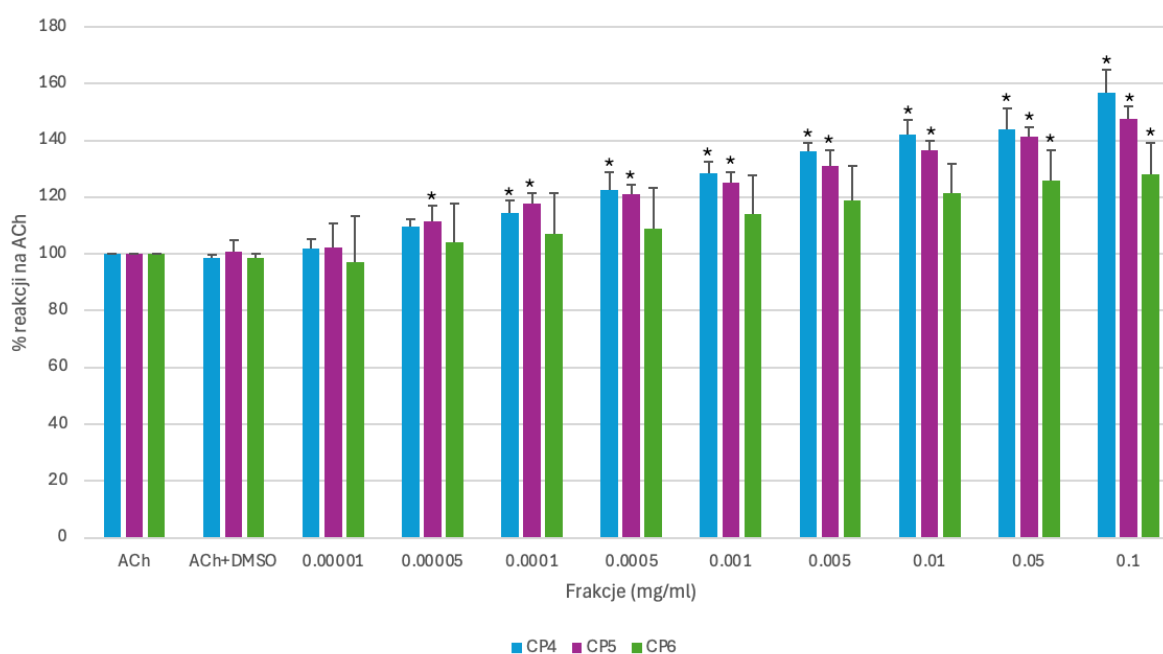
4.3.9. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność mięśniówki podłużnej jelita czczego indukowaną ACh

Wszystkie badane wyciągi i frakcje wywierały istotny statystycznie wpływ na indukowaną ACh aktywność skurczową mięśniówki podłużnej jelita czczego. Wyciągi metanolowy (CP1) i 50% metanolowy (CP2) wykazywały działanie antyspazmodyczne (Ryc. 21), natomiast frakcje eterowa (CP4), octanowa (CP5) i *n*-butanolowa (CP6) zwiększały siłę odpowiedzi mięśniówki na ACh (Ryc. 22). Podobny efekt wzmagający obserwowano w przypadku wyciągu wodnego (CP3), jednak był on statystycznie istotny jedynie przy najwyższym zastosowanym stężeniu (Ryc. 21). CP1 wykazywał silne działanie rozkurczowe w zakresie stężeń 0,0005-0,1 mg/ml, a efekt ten był zależny od

dawki i wzrastał wraz ze zwiększaniem stężenia. Odpowiedzi mieściły się w przedziale od $86,66 \pm 4,66\%$ do $57,53 \pm 4,60\%$ reakcji na kontrolne podanie ACh (Ryc. 21). Wyciąg CP2 również działał spazmolitycznie w zakresie stężeń 0,0001-0,1 mg/ml, redukując aktywność skurczową od $86,70 \pm 3,72\%$ (0,0001 mg/ml) do $63,53 \pm 9,43\%$ (0,1 mg/ml) w porównaniu do kontroli (Ryc. 21). Wyciąg wodny CP3 zwiększał aktywność mięśniówki jedynie podczas podania w dawce 0,1 mg/ml, osiągając $120,57 \pm 6,54\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 21). Frakcja CP4 nasilała kurczliwość mięśniówki, gdy stosowana była w zakresie stężeń 0,0001-0,1 mg/ml, zwiększając odpowiedź na ACh do $114,60 \pm 4,18\%$ i $156,84 \pm 8,16\%$ w porównaniu do wartości kontrolnej (Ryc. 22). Frakcja CP5 wykazywała zależne od dawki działanie prokinetyczne w zakresie 0,0005-0,1 mg/ml, powodując wzrost kurczliwości od $111,33 \pm 7,80\%$ (przy zastosowaniu najniższego stężenia) do $147,47 \pm 4,61\%$ (0,1 mg/ml) (Ryc. 22). CP6, podobnie jak pozostałe frakcje, nasilała skurcze wywołane ACh, jednak efekt ten był zauważalny jedynie przy podaniu wyższych dawek substancji. Najniższe stężenie, w którym CP6 wywołała znaczącą zmianę kurczliwości wynosiło 0,05 mg/ml ($125,69 \pm 10,83\%$ reakcji na ACh), a maksymalna odpowiedź uzyskana przy zastosowaniu stężenia 0,1 mg/ml osiągnęła $127,90 \pm 11,06\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 22).



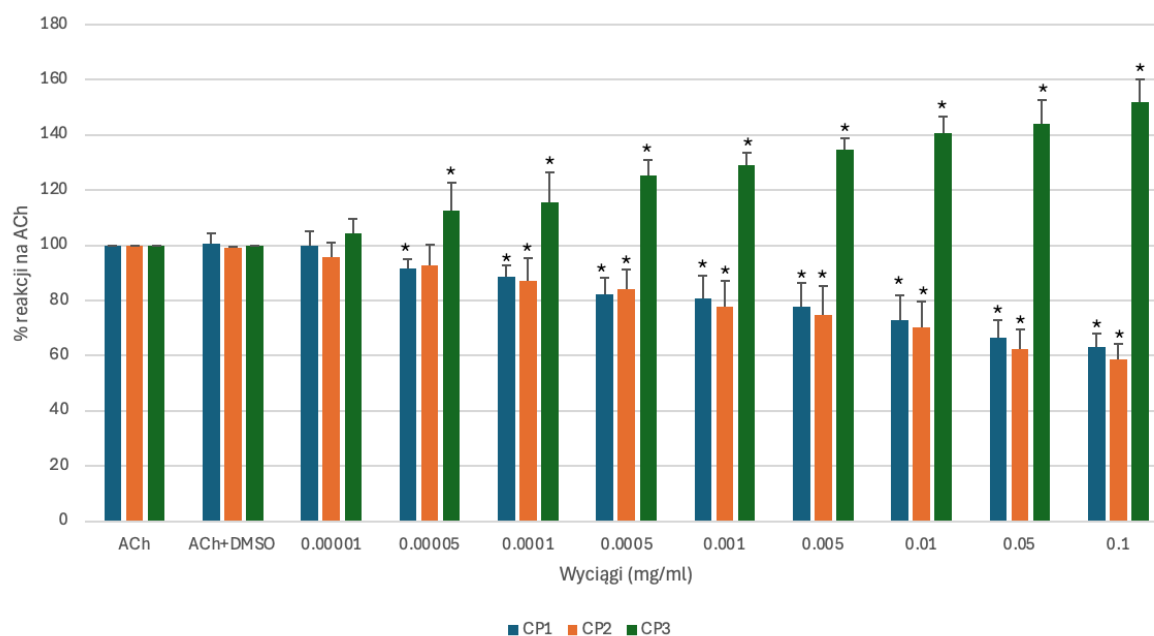
Ryc. 21 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).



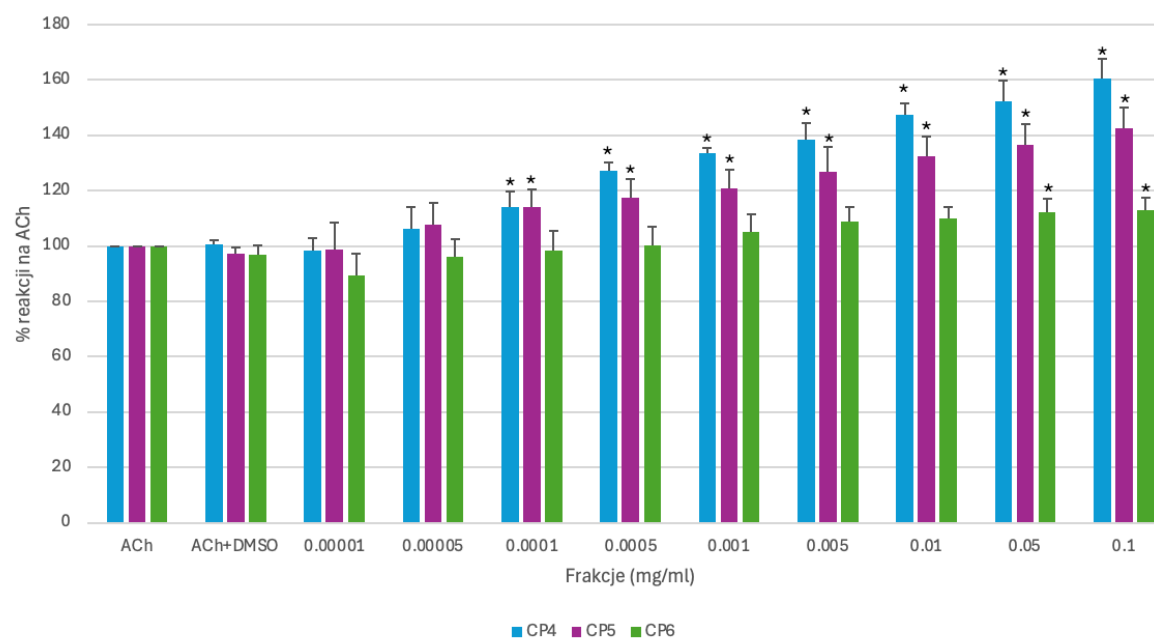
Ryc. 22 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).

4.3.10. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność mięśniówki okrężnej jelita czczego indukowaną ACh

Podobnie jak w przypadku warstwy podłużnej, wyciągi metanolowy (CP1) i 50% metanolowy (CP2) wykazywały działanie spazmolityczne również wobec warstwy okrężnej mięśniówki gładkiej jelita czczego świni, osłabiając skurcze indukowane ACh (Ryc. 23). Z kolei wyciąg wodny (CP3) oraz frakcje CP4-CP6 nasilały aktywność skurczową wywołaną acetylocholiną (Ryc. 24). Wyciąg CP1 wykazywał statystycznie istotne działanie rozkurczowe w zakresie stężeń 0,00005-0,1 mg/ml, powodując zależne od dawki hamowanie aktywności skurczowej od $91,75 \pm 3,10\%$ do $63,07 \pm 5,01\%$ w stosunku do reakcji kontrolnej (Ryc. 23). Podobny efekt obserwowano dla CP2, jednak w nieco węższym zakresie dawek (0,0001-0,1 mg/ml). Wyciąg ten redukował kurczliwość od $87,03 \pm 8,19\%$ do $58,58 \pm 5,78\%$ w odniesieniu do kontroli (Ryc. 23). CP3 wykazywał wyraźne działanie prokinetyczne w zakresie 0,00005-0,1 mg/ml, przy czym efekt ten był zależny od dawki i nasilał się wraz ze wzrostem stężenia. Odpowiedzi mieściły się w przedziale od $112,66 \pm 9,86\%$ do $151,94 \pm 7,18\%$ reakcji na kontrolne podanie ACh (Ryc. 23). Po zastosowaniu frakcji eterowej (CP4) w stężeniu 0,0001 mg/ml zaobserwowano wzrost kurczliwości do $114,21 \pm 5,31\%$ wartości kontrolnej, natomiast najwyższą odpowiedź uzyskano wskutek podania CP4 w stężeniu 0,1 mg/ml ($160,34 \pm 7,47\%$) (Ryc. 24). Frakcja octanowa (CP5) wykazywała zależne od dawki działanie prokinetyczne w przedziale 0,0001-0,1 mg/ml, osiągając maksymalnie $142,69 \pm 7,18\%$ odpowiedzi kontrolnej na ACh przy najwyższym stężeniu (Ryc. 24). Frakcja *n*-butanolowa (CP6) znacząco nasilała skurcze mięśni gładkich jelita czczego jedynie przy dwóch najwyższych stężeniach (0,05 i 0,1 mg/ml), powodując wzrost odpowiednio do $112,17 \pm 4,74\%$ i $112,98 \pm 4,56\%$ w porównaniu do wartości kontrolnej (Ryc. 24).



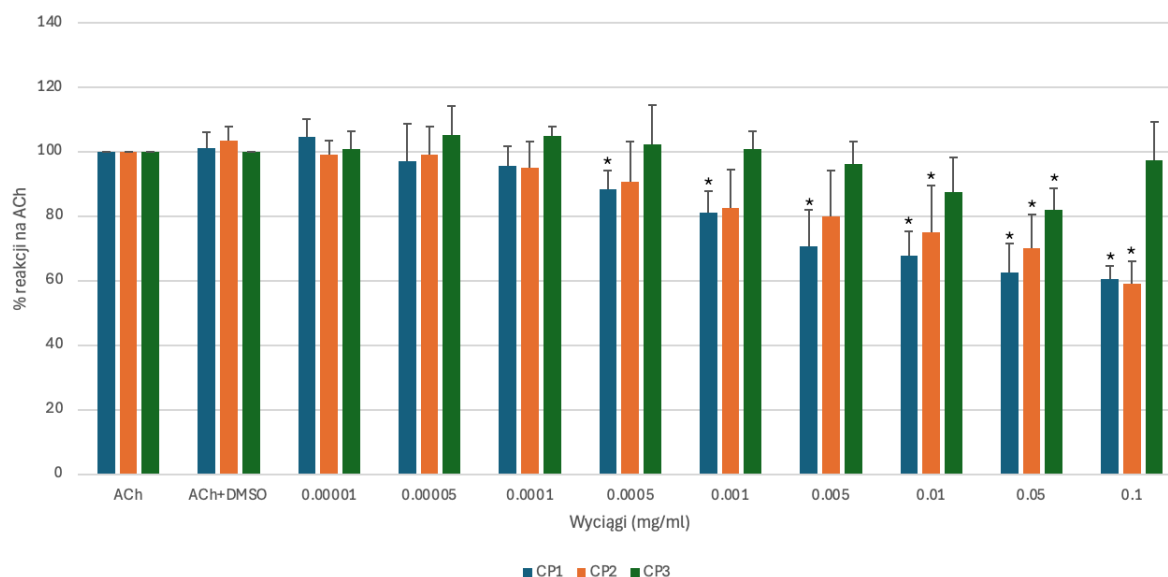
Ryc. 23 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).



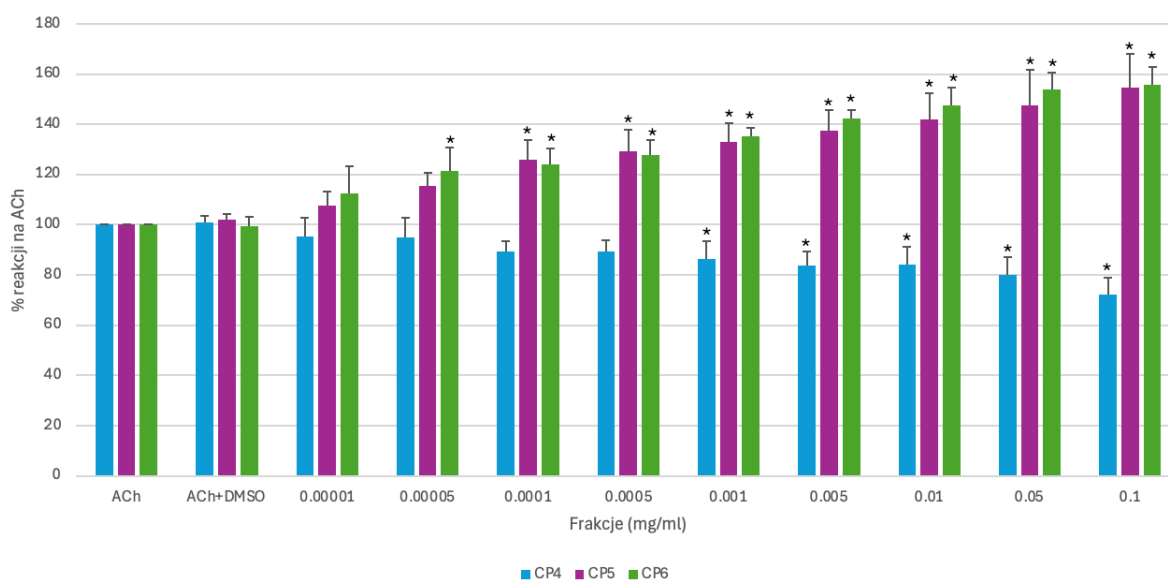
Ryc. 24 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).

4.3.11. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność mięśniówki podłużnej okrężnicy indukowaną ACh

Warto zauważyć, że wpływ wyciągów i frakcji z *C. palustre* na indukowaną acetylocholiną aktywność mięśniówki podłużnej okrężnicy był odwrotny do ich działania na aktywność spontaniczną. Wyciąg metanolowy (CP1) i 50% metanolowy (CP2) wykazywały efekt spazmolityczny (Ryc. 25), podobnie jak frakcja eterowa (CP4). Natomiast frakcja octanowa (CP5) i frakcja *n*-butanolowa (CP6) działały przeciwnie, tj. nasilały skurcze mięśni okrężnicy w sposób zależny od dawki w obecności ACh (Ryc. 26). W przypadku wyciągu wodnego (CP3) efekt był niejednoznaczny zarówno pod względem charakteru, jak i intensywności, a wywołany efekt nie odbiegał znacząco od reakcji kontrolnej wywołanej przez ACh (Ryc. 25). Spośród wszystkich badanych wyciągów CP1 wykazywało najszerszy zakres dawek o znaczącym działaniu spazmolitycznym (0,0005-0,1 mg/ml). Efekt był zależny od dawki i nasilał się od $88,32 \pm 5,88\%$ do $60,39 \pm 4,04\%$ w porównaniu do reakcji kontrolnej na ACh odpowiednio podczas stosowania wyciągu w stężeniu od 0,0005 do 0,1 mg/ml (Ryc. 25). CP2 również osłabiał skurcze mięśni gładkich okrężnicy wywołane przez ACh, jednak w węższym zakresie dawek (0,01-0,1 mg/ml), redukując reakcję do poziomu od $74,92 \pm 14,59\%$ do $58,93 \pm 7,05\%$ odpowiedzi kontrolnej na podanie ACh (Ryc. 25). Frakcja CP4 wykazywała działanie spazmolityczne w zakresie 0,001-0,1 mg/ml, obniżając odpowiedź skurczową odpowiednio do $86,45 \pm 6,85\%$ i $72,03 \pm 6,97\%$ w porównaniu do wartości kontrolnej (Ryc. 26). Podanie CP5 powodowało wzrost kurczliwości mięśni w sposób zależny od dawki w zakresie 0,0001-0,1 mg/ml. Reakcja wynosiła od $126,06 \pm 7,80\%$ do $154,55 \pm 13,53\%$ wartości kontrolnej dla najniższego i najwyższego zastosowanego stężenia (Ryc. 26). Frakcja CP6 wyraźnie nasilała skurcze mięśni gładkich okrężnicy wywołane acetylocholiną w szerokim zakresie dawek (0,00005-0,1 mg/ml), a reakcja wzrastała od $121,32 \pm 9,37\%$ do $155,80 \pm 7,15\%$ w porównaniu do wartości kontrolnej dla CP6 zastosowanego odpowiednio w stężeniach 0,00005 i 0,1 mg/ml (Ryc. 26).



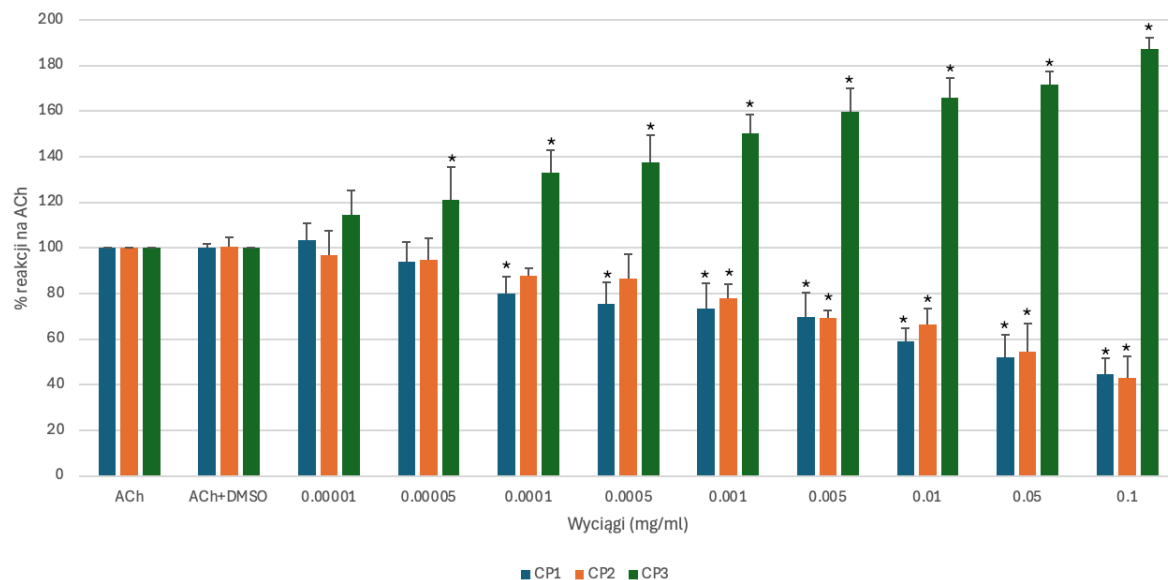
Ryc. 25 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).



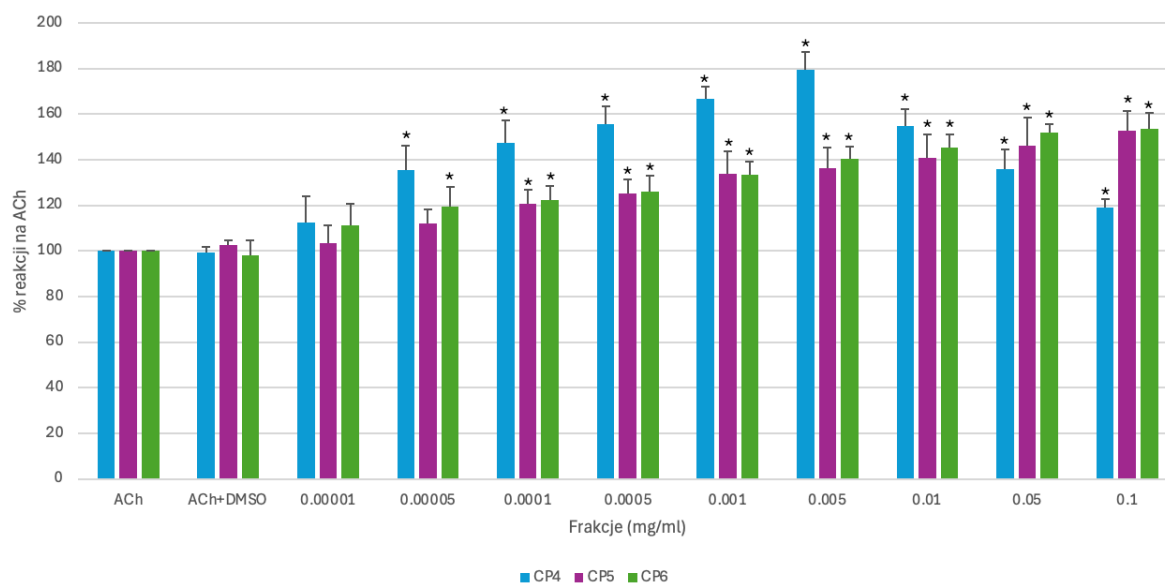
Ryc. 26 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).

4.3.12. Wpływ wyciągów i frakcji pozyskanych z *C. palustre* na aktywność mięśniówki okrężnej okrężnicy indukowaną ACh

Wszystkie badane wyciągi i frakcje wykazywały wyraźny wpływ na indukowaną przez ACh aktywność skurczową mięśniówki okrężnej okrężnicy świni. Wyciągi metanolowy (CP1) i 50% metanolowy (CP2) działały spazmolitycznie, natomiast wyciąg wodny (CP3) oraz frakcje CP4-6 zwiększały aktywność skurczową (Ryc. 27 i Ryc. 28). CP1 znacząco osłabiał skurcze mięśni w sposób zależny od dawki, w zakresie stężeń od 0,0001 mg/ml do 0,1 mg/ml, redukując aktywność skurczową odpowiednio do $79,89 \pm 7,57\%$ i $44,76 \pm 6,72\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 27). Wyciąg CP2 wykazywał podobny efekt spazmolityczny, jednak w węższym zakresie dawek (0,01-0,1 mg/ml). Skuteczność działania była zbliżona do CP1 i wynosiła od $77,76 \pm 6,37\%$ (0,01 mg/ml) do $42,83 \pm 9,65\%$ (0,1 mg/ml) względem reakcji kontrolnej wywołanej ACh (Ryc. 27). Ekstrakt CP3 wykazywał najsilniejsze działanie pobudzające kurczliwość spośród wszystkich badanych substancji, w zakresie stężeń 0,00005-0,1 mg/ml. Największą odpowiedź skurczową zaobserwowano przy 0,1 mg/ml, osiągając $187,20 \pm 14,34\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 27). Działanie proskurczowe frakcji CP4 wzrastało wraz z dawką w zakresie 0,00005-0,005 mg/ml, osiągając maksymalnie $179,27 \pm 7,88\%$ kontrolnej reakcji na podanie ACh. Zastosowanie frakcji eterowej (CP4) powyżej 0,005 mg/ml powodowało, że efekt stopniowo malał, osiągając ostatecznie $119,04 \pm 3,70\%$ odpowiedzi na ACh (Ryc. 28). Frakcja octanowa (CP5) powodowała wzrost kurczliwości w sposób zależny od dawki. Odpowiedź skurczowa mieściła się w zakresie od $120,88 \pm 6,17\%$ (0,0001 mg/ml) do $152,74 \pm 8,66\%$ (0,1 mg/ml) względem wartości kontrolnej (Ryc. 28). Podobnie jak inne frakcje również frakcja n-butanolowa (CP6) nasilała skurcze indukowane przez ACh. Najniższa dawka doprowadzająca do istotnej zmiany wynosiła 0,00005 mg/ml ($119,63 \pm 8,59\%$ reakcji na ACh), natomiast najwyższa badana dawka (0,1 mg/ml) wywołała odpowiedź na poziomie $153,68 \pm 6,90\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 28).



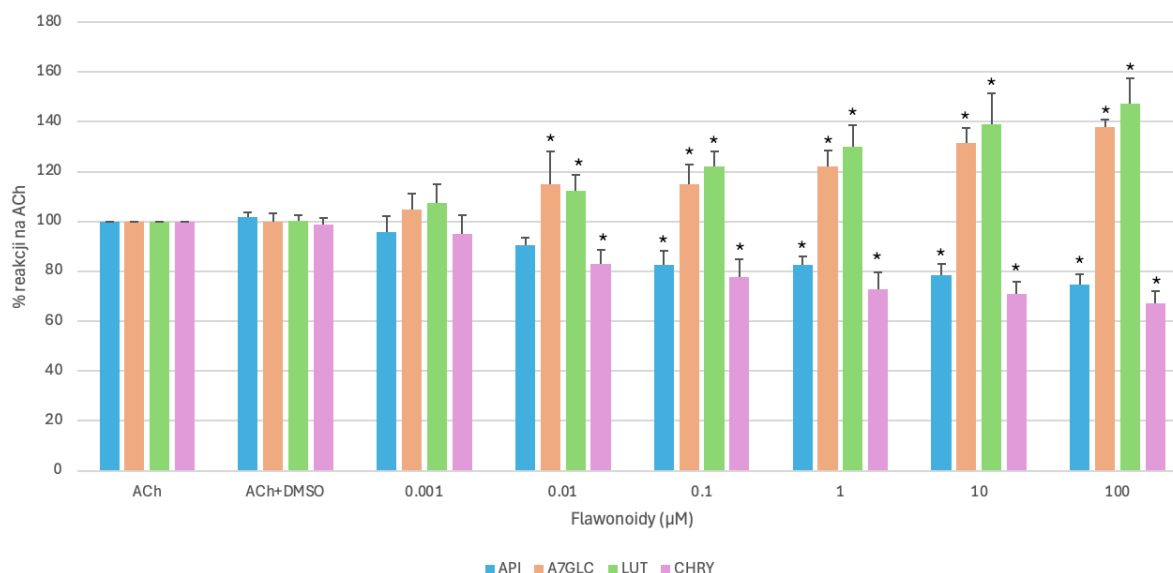
Ryc. 27 Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2) i wyciągu wodnego (CP3) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).



Ryc. 28 Wpływ frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5) i frakcji n-butanolowej (CP6) *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μ M).

4.3.13. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność mięśniówki podłużnej jelita czczego

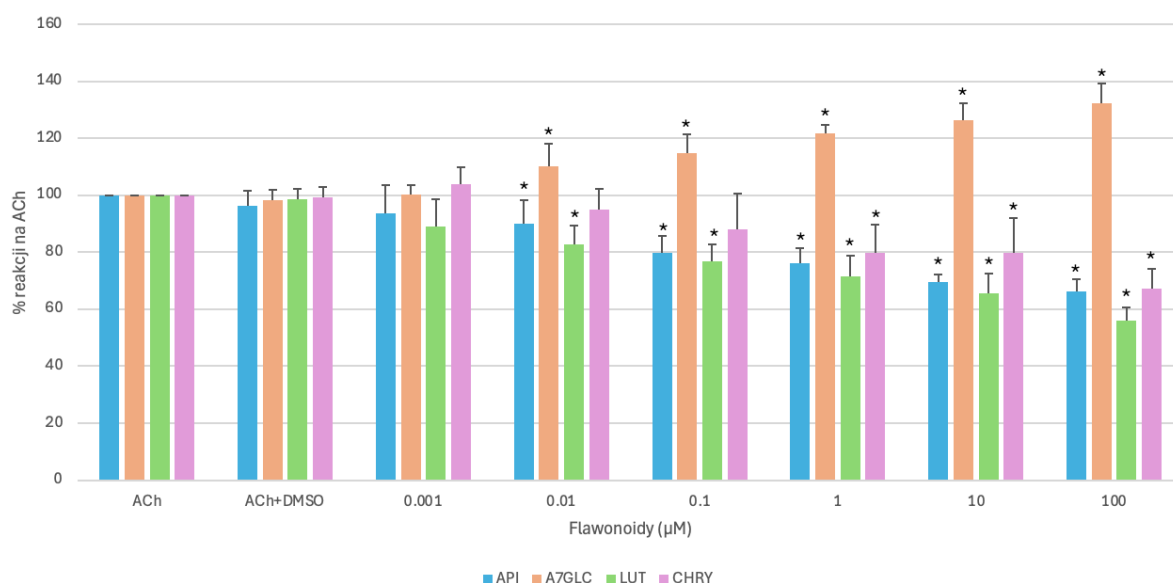
Wszystkie flawonoidy wybrane do badania wykazywały zależny od dawki wpływ na indukowaną kurczliwość mięśniówki podłużnej jelita czczego. Apigenina (API) i chrysoeriol (CHRY) działały spazmolitycznie, przy czym efekt hamujący CHRY był nieco bardziej wyraźny. Natomiast 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC) i luteolina (LUT) w sposób zależny od dawki nasilały odpowiedź na podanie ACh (Ryc. 29). API wykazywała wyraźne działanie spazmolityczne w zakresie stężeń 0,1-100 μM , a efekt ten wzrastał wraz ze zwiększaniem dawki. Odpowiedź na ACh zmniejszała się od $82,61 \pm 5,56\%$ (0,1 μM) do $74,51 \pm 4,37\%$ (100 μM) w odniesieniu do reakcji kontrolnej na ACh (Ryc. 29). A7GLC wykazywał działanie prokinetyczne, które również było zależne od dawki. Najniższe efektywne stężenie wynosiło 0,01 μM , a nasilenie skurczów mieściło się w zakresie od $115,05 \pm 13,15\%$ (0,01 μM) do $137,70 \pm 3,07\%$ (100 μM) w porównaniu do wartości kontrolnej (Ryc. 29). Luteolina także zwiększała kurczliwość mięśniówki podłużnej w sposób zależny od dawki. Podczas zastosowania LUT w stężeniu 0,01 μM reakcja na podanie ACh wzrastała do $112,35 \pm 6,24\%$ wartości kontrolnej, natomiast najwyższa odpowiedź, wynosząca $147,12 \pm 10,20\%$, wystąpiła przy podaniu flawonoidu w stężeniu 100 μM (Ryc. 29). CHRY działał hamująco na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej, a efekt ten był zależny od dawki. Już przy podaniu 0,01 μM zaobserwowano osłabienie kurczliwości do $83,12 \pm 5,31\%$ wartości kontrolnej, natomiast przy najwyższym badanym stężeniu (100 μM) odpowiedź na podanie ACh spadła do $67,19 \pm 4,84\%$ reakcji kontrolnej (Ryc. 29).



Ryc. 29 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na indukowaną ACh aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μM). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów (±SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μM).

4.3.14. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność mięśniówki okrężnej jelita czczego

W odniesieniu do warstwy okrężnej mięśniówki gładkiej jelita czczego świni jedynie 7-O-glukuronid apigeniny wykazywał działanie wzmacniające skurcze wywołane podaniem ACh. Pozostałe flawonoidy działały spazmolitycznie w sposób zależny od dawki, przy czym najsilniejszy efekt hamujący zaobserwowano po podaniu luteoliny (LUT) (Ryc. 30). Apigenina osłabiała aktywność skurczową podczas podawania w zakresie stężeń 0,01-100 μM, zmniejszając kurczliwość do $89,92 \pm 8,36\%$ (0,01 μM) i $66,22 \pm 4,30\%$ wartości kontrolnej (Ryc. 30). A7GLC nasilał skurcze warstwy okrężnej w sposób zależny od dawki, osiągając wartości od $110,13 \pm 8,02\%$ (0,01 μM) do $132,30 \pm 6,85\%$ (100 μM) w porównaniu do odpowiedzi na kontrolne podanie ACh (Ryc. 30). LUT wykazywała wyraźne działanie spazmolityczne, którego intensywność rosła wraz ze wzrostem dawki. Użycie LUT w stężeniu 0,01 μM doprowadzało do spadku odpowiedzi na ACh do poziomu $82,87 \pm 6,57\%$ wartości kontrolnej, natomiast przy 100 μM do poziomu $55,97 \pm 4,60\%$ (Ryc. 30). CHRY działał antyspazmodycznie w stosunkowo wąskim zakresie stężeń (1-100 μM). Odpowiedź mięśniówki na podanie ACh wynosiła odpowiednio $79,76 \pm 9,96\%$ (1 μM) i $67,09 \pm 7,07\%$ (100 μM) w odniesieniu do reakcji kontrolnej (Ryc. 30).

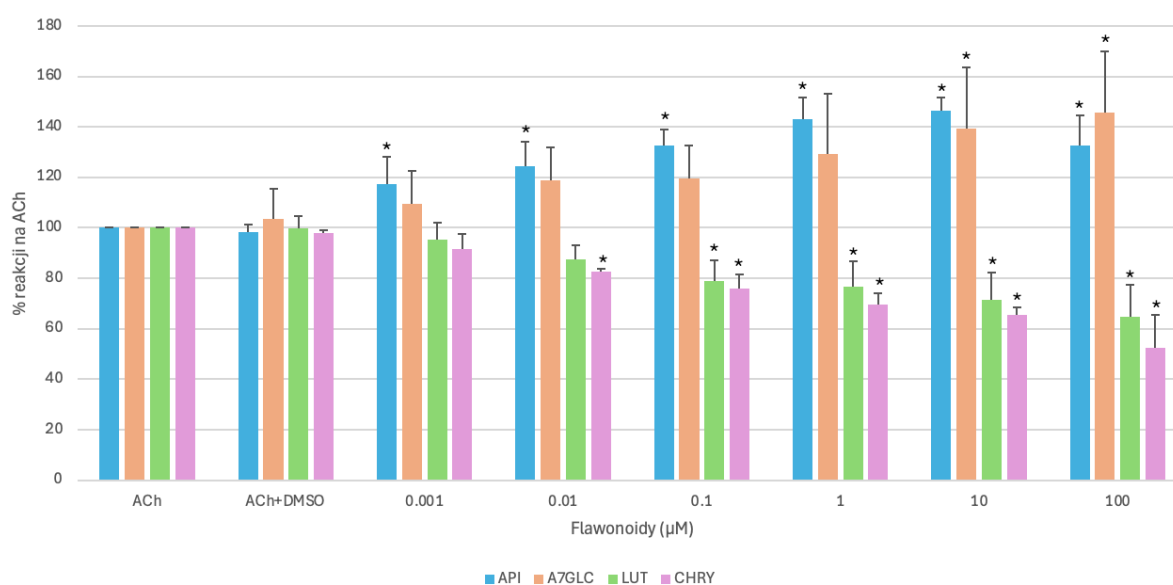


Ryc. 30 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na indukowaną ACh aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich jelita czczego świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μM). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów (±SD); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μM).

4.3.15. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność mięśniówki podłużnej okrężnicy

Podobnie jak w przypadku wpływu apigeniny (API) oraz jej glukuronidu (A7GLC) na spontaniczną aktywność skurczową mięśniówki podłużnej okrężnicy, również w przypadku aktywności indukowanej przez acetylocholinę zaobserwowano efekt nasilający kurczliwość. Zakres dawek A7GLC, w obecności których dochodziło do znaczących zaburzeń reaktywności mięśniówki był natomiast znacznie węższy. Luteolina (LUT) i chrysoeriol (CHRY) wywoływały efekt rozkurczowy, jednak znacznie silniej niż miało to miejsce w przypadku aktywności spontanicznej mięśniówki (Ryc. 31). API wywoływała efekt skurczowy w sposób zależny od dawki w zakresie stężeń 0,001-10 μM, z odpowiedzią wzrastającą do $117,32 \pm 10,85\%$ (0,001 μM) i $146,44 \pm 5,24\%$ (10 μM) w odniesieniu do reakcji na ACh. API w stężeniu 100 μM również zwiększała skurcz mięśni, jednak efekt ten był słabszy (podobny do dawki 0,1 μM) i wynosił $132,62 \pm 12,12\%$ odpowiedzi wywołanej przez kontrolne podanie ACh (Ryc. 31). A7GLC znacząco wzmacniał siłę reakcji indukowanej ACh jedynie w wyższych dawkach, tj. 10 i 100 μM, osiągając odpowiednio $139,48 \pm 24\%$ oraz $145,50 \pm 24,34\%$ reakcji kontrolnej (Ryc. 31). LUT wyraźnie osłabiała skurcze indukowane ACh w sposób zależny od dawki. Działanie rozkurczowe występowało w zakresie stężeń 0,1-100 μM i nasilało się wraz ze

wzrostem stężenia. Efekt ten był wyraźnie silniejszy w porównaniu do działania na spontaniczną kurczliwość mięśniówki i wynosił od $78,92 \pm 8,39\%$ ($0,1 \mu\text{M}$) do $64,73 \pm 12,78\%$ ($100 \mu\text{M}$) w odniesieniu do reakcji kontrolnej wywołanej przez ACh (Ryc. 31). CHRY również wykazywał zależne od dawki działanie rozkurczowe w zakresie stężeń $0,001$ - $100 \mu\text{M}$. Odpowiedź wynosiła od $82,51 \pm 1,43\%$ ($0,001 \mu\text{M}$) do $52,53 \pm 12,92\%$ ($100 \mu\text{M}$) w porównaniu do reakcji mięśniówki gładkiej na ACh (Ryc. 31).

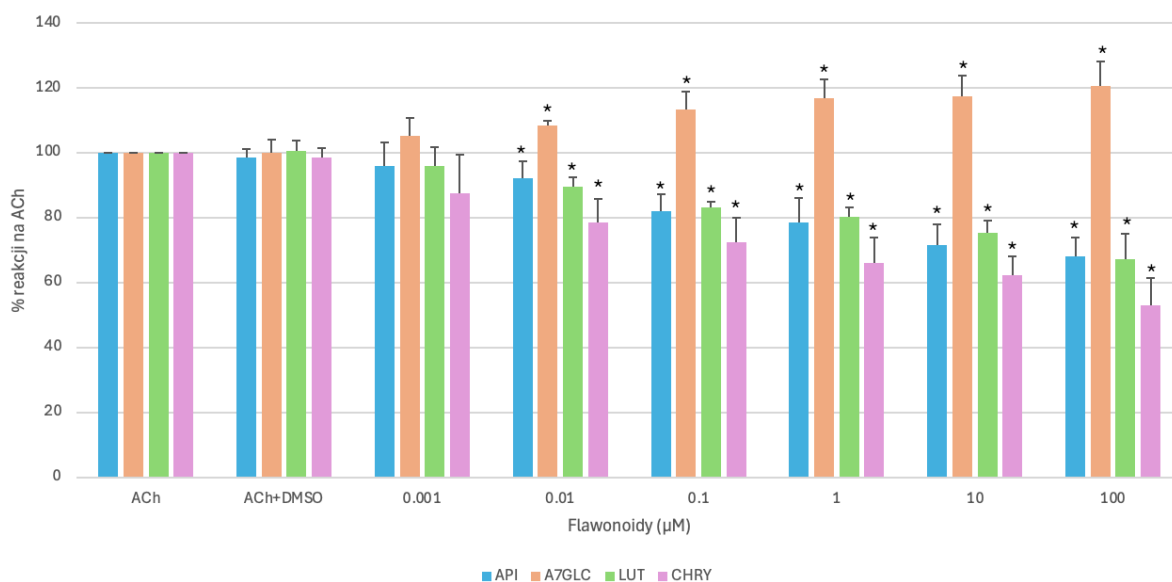


Ryc. 31 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na indukowaną ACh aktywność podłużnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh ($10 \mu\text{M}$). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh ($10 \mu\text{M}$).

4.3.16. Wpływ wybranych flawonoidów pozyskanych z *C. palustre* na indukowaną ACh aktywność mięśniówki okrężnej okrężnicy

Wszystkie badane flawonoidy wykazały wpływ na indukowaną ACh aktywność skurczową warstwy okrężnej mięśniówki okrężnicy w zakresie stężeń $0,01$ - $10 \mu\text{M}$. W przypadku luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) obserwowano, podobnie jak w przypadku mięśniówki podłużnej, działanie spazmolityczne. 7-O-glukuronid apigeniny (A7GLC) w sposób zależny od dawki zwiększał siłę skurczu mięśniówki, podczas gdy API wykazała działanie przeciwne do tego obserwowanego w mięśniówce podłużnej, zmniejszając siłę skurczu (Ryc. 32). Działanie rozkurczowe apigeniny (API)

występowało w zakresie dawek 0,1-100 μM i nasilało się wraz ze wzrostem stężenia flawonoidu. Efekt ten wynosił od $92,18 \pm 5,09\%$ (0,1 μM) do $68,12 \pm 5,64\%$ (100 μM) w odniesieniu do reakcji kontrolnej wywołanej przez ACh (Ryc. 32). Podanie A7GLC wzmacniało siłę skurczu indukowanego ACh warstwy okrężnej mięśniówki w sposób zależny od dawki. Odpowiedzi mieściły się w zakresie od $108,34 \pm 1,44\%$ (0,1 μM) do $120,46 \pm 7,66\%$ (100 μM) w porównaniu z reakcją kontrolną (Ryc. 32). Efekt spazmolityczny po podaniu LUT również był zależny od dawki, a jego nasilenie porównywalne do efektu osiągniętego po podaniu API. Zastosowanie LUT w stężeniu 0,01 μM doprowadzało do obniżenia kurczliwości, osiągając $89,45 \pm 3,11\%$ wartości reakcji kontrolnej. Największą redukcję skurczu indukowanego przez ACh odnotowano przy stężeniu 100 μM , a zmierzona reakcja wynosiła wówczas $67,23 \pm 7,68\%$ odpowiedzi kontrolnej na ACh (Ryc. 32). Najsilniejszy, zależny od dawki, efekt spazmolityczny osiągnięto po dodaniu CHRY. Odpowiedź mieściła się w zakresie od $78,47 \pm 7,31\%$ do $53,00 \pm 8,48\%$ reakcji mięśniówki na podanie ACh dla stężeń wynoszących odpowiednio 0,01 i 100 μM (Ryc. 32).



Ryc. 32 Wpływ apigeniny (API), 7-O-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na indukowaną ACh aktywność okrężnej warstwy mięśni gładkich okrężnicy świni *in vitro*. Wyniki wyrażono jako % odpowiedzi na ACh (10 μM). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$); $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%); * $p \leq 0.05$ vs. ACh (10 μM).

Tabela 9. Wpływ wyciągu metanolowego (CP1), wyciągu 50% metanolowego (CP2), wyciągu wodnego (CP3) frakcji eterowej (CP4), frakcji octanowej (CP5), frakcji *n*-butanolowej (CP6), apigeniny (API), 7-*O*-glukuronidu apigeniny (A7GLC), luteoliny (LUT) i chrysoeriolu (CHRY) na aktywność mięśni gładkich jelita świni *in vitro*.

	Aktywność spontaniczna				Aktywność indukowana ACh			
	JL	JC	CL	CC	JL	JC	CL	CC
CP1	-	-	+	-/+	-	-	-	-
CP2	+	+	+	+	-	-	-	-
CP3	+/-	+	+	+	+	+	=	+
CP4	+	+	+	+	+	+	-	+
CP5	+	+	+	+	+	+	+	+
CP6	+	+	+	+	+	+	+	+
API	+	+	+	=	-	-	+	-
A7GLC	+	+	+	+	+	+	+	+
LUT	+	-	-	-	+	-	-	-
CHRY	-	-	-	-	-	-	-	-

CL - mięśniówka podłużna okrężnicy, CC - mięśniówka okrężna okrężnicy, JL - mięśniówka podłużna jelita czczego, JC - mięśniówka okrężna jelita czczego, + nasilenie kurczliwości, - osłabienie kurczliwości, = brak istotnego statycznie wpływu na kurczliwość

5. Dyskusja

Choć ostrożeń błotny *Cirsium palustre* (L.) Scop. (*Asteraceae*) jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w Europie, Azji i Ameryce Północnej to jedynie nieliczne publikacje opisują jego skład fitochemiczny i potencjał farmakologiczny. W dostępnej literaturze brak jest doniesień na temat wpływu ostrożenia błotnego na motorykę przewodu pokarmowego. Ta luka badawcza stała się impulsem do podjęcia oceny wpływu wyciągów i frakcji uzyskanych w kwiatostanów *C. palustre* na aktywność skurczową jelit, określenia ich profilu fitochemicznego oraz identyfikacji związków determinujących obserwowane działanie. Materiał roślinny poddano ekstrakcji i frakcjonowaniu dobierając warunki procesów tak, aby możliwie najwydajniej pozyskać i rozdzielić związki obecne w surowcu poprzez wykorzystanie różnic w ich charakterze fizykochemicznym. W efekcie otrzymano wyciągi: metanolowy (CP1), 50% metanolowy (CP2) i wodny (CP3) oraz frakcje: eterową (CP4), octanową (CP5) i *n*-butanolową (CP6). Następnie wyciągi i frakcje poddano szczegółowej analizie chromatograficznej metodą LC-PDA-HRMS, stwierdzając obecność 37 metabolitów wtórnych. Profil fitochemiczny wskazuje na wysoką różnorodność związków fenolowych, w tym estrów kwasu chinowego (min. kwas 4-*O*-kawoilochinowy, kwas 5-*O*-kawoilochinowy, czyli kwas chlorogenowy) oraz flawonoidów w formie aglikonów (luteolina, apigenina, kemferol, chrysoeriol) i glikozydów (np. glukuronid 7-*O*-apigeniny, glukozyd 7-*O*-luteoliony, pochodne 7-*O*-glukozyd izokemferydu) typową dla rodzaju *Cirsium* (Kong i in., 2024; Kozyra i in., 2015; Nazaruk, 2008).

Profile fitochemiczne CP1 i CP2 są do siebie zbliżone. W początkowych minutach analizy dominują pochodne kwasów organicznych (**1**), a następnie pojawia się sygnał o zbliżonej intensywności odpowiadający kwasowi chlorogenowemu (**6**). W obu ekstraktach obserwujemy intensywny sygnał glukuronidu 7-*O*-apigeniny (A7GLC, **25**), który przyjmując jako miarę intensywność sygnału w CP2 dominuje. Następnie pojawiają się aglikony - API (**34**), kemferol (**35**) i CHRY (**36**), których w CP1 sygnały są bardziej wyraźne, co znajduje uzasadnienie w użytym ekstrakcie - metanolu. W obu wyciągach notuje się obecność związku **37**, przy czym w CP1 sygnał ten bardzo wyraźnie dominuje nad pozostałymi związkami, wyróżniając się na tle pozostałych wyciągów i frakcji. Wyciąg wodny CP3 różni się od dwóch pozostałych wyciągów. Pochodne kwasów organicznych stanowią dominujący

składnik. Podobnie jak w przypadku CP1 i CP2 kwas chlorogenowy (CP6) występuje w znaczącej ilości, natomiast CP3 wyróżnia się większą zawartością izomerów 4-*O*-/5-*O*-/di-kawoilochinowych (7-9, 19-22). A7GLC (25) pozostaje głównym flawonoidem; aglikony (API, 34; CHRY, 36) są reprezentowane słabiej, natomiast związek 37 nie występuje - co jest zgodne z charakterystyką ekstrahowalności związków wodą i przewagą komponentów hydrofilowych w tym ekstrakcie. Frakcja CP4 charakteryzuje się profilem związków o niskiej polarności zgodnym z użytym ekstrahentem - eterem dietylowym. Związki bardzo polarne występują śladowo, a dominują aglikony flawonoidowe i pochodne dikawoilochinowe. Wśród flawonoidów dominuje API (34). Dodatkowo odnotowuje się obecność LUT (33), co wyróżnia CP4 od pozostałych wyciągów i frakcji. Może to sugerować, że ekstrakcja ciecz-ciecz eterem dietylowym pozwoliło zatężyć frakcję i wzmocnić sygnał pozwalając na wykazanie obecności tego flawonu. A7GLC (25) utrzymuje się na niskim poziomie, co również jest charakterystyczne jedynie dla CP4. We frakcji CP5 dominują związki o średniej polarności. Wyraźnie dominują tu kwas chlorogenowy (6) i A7GLC (25). Obecne są także glikozydy i glukuronidy flawonoidów (15-17, 23) oraz pochodne kwasu dikawoilochinowego (21, 22). Nie odnotowuje się obecności aglikonów flawonoidowych. Natomiast uwagę zwraca wysoka intensywność metabolitu oznaczonego numerem 37. Ostatnia otrzymana frakcja CP6 poprzez zastosowanie *n*-butanolu do jej uzyskania i wysokiej ekstrahowalności charakteryzuje się korespondującą z nim selektywnością. Dominują w niej pochodne kwasów organicznych (1) oraz kwas 5-*O*-kawoilochinowy (6) i A7GLC (25); brak jest natomiast aglikonów (LUT, API, CHRY). Wnioski z tego porównania są spójne z oczekiwaną selektywnością procesu ekstrakcji: Preparatyka otrzymania ekstraktów i frakcji znalazła potwierdzenie w analizie chromatograficznej. Selektywność wody i *n*-butanolu pozwoliła uzyskać próbki bogate w polarne związki - koniugaty flawonoidów i kwasu chinowego. Natomiast frakcja eterowa CP4 okazała się selektywna dla silnie niepolarnych związków pozwalając jednocześnie na koncentrację aglikonów przez wyczerpujące frakcjonowanie ekstraktu wyjściowego. Metanol zastosowany do otrzymania CP1 wykazał podobne działanie. Kwas chlorogenowy, A7GLC oraz związek 37 może pełnić rolę markera chemicznego dla wyciągów i frakcji o średniej i wysokiej polarności (CP2, CP3, CP5, CP6), natomiast obecność luteoliny wyraźnie odróżnia CP4.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że *C. palustre* jest wartościowym źródłem polifenolowych metabolitów wtórnych, które oprócz funkcji potencjalnych markerów

chemotaksonomicznych, mogą stanowić cenne źródło aktywnych farmakoforów. Zarejestrowana w niniejszych badaniach zdolność do modulacji motoryki jelit w badaniach *ex vivo* w połączeniu z udokumentowaną w literaturze aktywnością tych metabolitów pozwala uznać *C. palustre* za obiecujący obiekt dalszych badań w kontekście terapii zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego. Warto nadmienić, że choć nie została wykonana analiza ilościowa to użyte ekstrakty i frakcje w tych samych stężeniach i objętościach nastrzyku, jak również ujednoliconą długość fali, przy której zarejestrowane zostały chromatogramy pozwala na szacunkową i relatywną ocenę stosunku poszczególnych składników oraz estymację zmian zawartości w badanych ekstraktach i frakcjach. Co więcej, należy podkreślić, że badania farmakologiczne wybranych flawonoidów uwzględniały zastosowanie stężeń mieszczących się w zakresie stężeń analizowanych wyciągów i frakcji. Nie jest możliwe jednoznaczne przypisanie udziału poszczególnych metabolitów w oddziaływaniu wyciągów i frakcji ze względu na brak ilościowej analizy fitochemicznej, ale zarówno badania jak i szacunkowa ocena intensywności, będąca konsekwencją proporcjonalnej odpowiedzi detektora na obecność metabolitu, umożliwia estymację takiego udziału.

Patogeneza zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego (DGBI) u ludzi pozostaje złożonym i nie do końca wyjaśnionym zagadnieniem, choć liczne dane wskazują na istotny udział zaburzeń motoryki w ich rozwoju (Black i in., 2020; Drossman, 2016). Obraz kliniczny tych schorzeń jest zróżnicowany i obejmuje zarówno objawy wynikające z obniżonej aktywności skurczowej, jak i z nadmiernej pobudliwości mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego (Camilleri, 2023). Z tego względu w farmakoterapii DGBI istotne miejsce zajmują leki modulujące motorykę - zarówno środki prokinetyczne, jak i spazmolityczne, które pozwalają na łagodzenie objawów i poprawę jakości życia pacjentów (Brenner i Lacy, 2021; Camilleri i Atieh, 2021). Coraz większy nacisk kładzie się również na poszukiwanie nowych substancji czynnych o lepszym profilu skuteczności i bezpieczeństwa, co stanowi jeden z kluczowych kierunków współczesnych badań farmakologicznych.

Jednym z priorytetów badawczych nad nowymi strategiami terapeutycznymi w DGBI jest fitoterapia. Leki ziołowe od wieków stanowią istotny element systemów medycyny tradycyjnej, a współczesne badania coraz częściej potwierdzają ich przydatność w leczeniu wielu chorób. W kontekście DGBI na szczególną uwagę zasługują ich wielokierunkowe mechanizmy działania, obejmujące zarówno bezpośredni wpływ na motorykę mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego (Simmen i in., 2006), modulację

transmisji nerwowej w obrębie osi jelitowo-mózgowej oraz pośrednio jelitowego układu nerwowego (ENS) (Evans i Kalman, 2024; Xiao i in., 2015), jak i właściwości przeciwzapalne (Maleki i in., 2019) oraz wpływ na skład mikrobiomu (Lu i in., 2019; Nagpal i in., 2012). W odróżnieniu od wielu leków syntetycznych, które działają selektywnie na pojedyncze receptory lub szlaki sygnałowe, leki roślinne często wykazują działanie wielokierunkowe (tzw. *multi-target drugs*), co jest pożądane w leczeniu DGBI z uwagi na ich złożoną patogenezę. Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują, że preparaty roślinne są używane wspomagająco w terapii niektórych zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego, takich jak zespół jelita drażliwego (IBS) (Rahimi, 2012), niestrawność czynnościowa (FD) (Lacy i in., 2022), kolka niemowlęca (Salvatore i in., 2024) czy biegunka czynnościowa (Czigle i in., 2022). Warto podkreślić, że w niektórych krajach leki ziołowe zostały ujęte w zaleceniach jako opcje uzupełniające w terapii DGBI, co potwierdza rosnące znaczenie tej grupy leków w praktyce klinicznej (Gwee i in., 2019; Malfertheiner i in., 2001; Miwa i in., 2012). Przykłady leków i suplementów roślinnych stosowanych w zaburzeniach funkcjonowania przewodu pokarmowego przedstawiono w Tabeli 4.

Wśród DGBI szczególne miejsce zajmuje zespół jelita drażliwego (IBS), będący jednym z najczęściej diagnozowanych zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego (Jaafari i in., 2023). Choroba ta charakteryzuje się przewlekłym, nawrotowym przebiegiem oraz zróżnicowanym obrazem klinicznym, w którym obok bólu brzucha często występują wzdęcia, uczucie parcia na stolec oraz zaburzenia rytmu wypróżnień (Saha, 2014). Zgodnie z kryteriami opracowanymi przez Rome Foundation, IBS dzieli się na cztery podtypy na podstawie dominującej konsystencji stolca: postać biegunkowa (IBS-D), zaparciowa (IBS-C), mieszana (IBS-M) oraz niesklasyfikowana (IBS-U). W podtypach biegunkowym i mieszanym istotną rolę w patogenezie odgrywa nadmierna aktywność skurczowa jelit oraz nadwrażliwość trzewna, prowadzące do nasilenia percepcji bodźców bólowych (Lacy i in., 2016).

W terapii IBS, szczególnie w podtypach charakteryzujących się wzmożoną aktywnością skurczową jelit, istotną rolę odgrywają leki spazmolityczne. Spazmolityki stosowane w terapii zespołu jelita drażliwego zalicza się do dwóch grup farmakologicznych: środków rozkurczających mięśnie gładkie i leków antycholinergicznym. Pierwsza grupa obejmuje substancje działające bezpośrednio na mięśniówkę gładką przewodu pokarmowego, powodując jej rozluźnienie poprzez wpływ na mechanizmy kurczliwości komórkowej (takie jak np. blokowanie kanałów

wapniowych). Cholinolityki, działają głównie poprzez blokowanie receptorów muskarynowych układu przywspółczulnego, co prowadzi do zmniejszenia pobudzenia nerwów odpowiedzialnych za inicjowanie i podtrzymywanie skurczów jelit. Oba mechanizmy skutkują redukcją częstotliwości i siły skurczów mięśniówki, łagodząc ból i dyskomfort u pacjentów oraz poprawiając ich ogólne samopoczucie i jakość życia (Annaházi, 2014; Brenner i Lacy, 2021; Martínez-Vázquez i in., 2012).

Biegunka czynnościowa (FDr) stanowi odrębną jednostkę kliniczną w obrębie zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego i należy ją różnicować z zespołem jelita drażliwego (IBS). Podczas gdy IBS charakteryzuje się współwystępowaniem bólu brzucha oraz zmian rytmu wypróżnień, w czynnościowej biegunce dominującym objawem jest przewlekła lub nawracająca biegunka o charakterze czynnościowym, która nie jest powiązana z istotnymi dolegliwościami bólowymi, choć te mogą występować w jej przebiegu (Lacy i in., 2016). Podobnie jak w przypadku innych DGBI nie istnieje jedna uniwersalna nieprawidłowość patofizjologiczna, która mogłaby tłumaczyć występowanie biegunki czynnościowej. Obecnie przyjmuje się, że w jej rozwoju uczestniczy wiele współdziałających mechanizmów, takich jak zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego, zaburzenia osi jelitowo-mózgowej, uwarunkowania genetyczne i środowiskowe, następstwa przebytych infekcji oraz czynniki psychospołeczne (Kim i Lim, 2021; Tack, 2012). Mimo, że bóle brzucha nie stanowią głównego objawu, obecność nadmiernej aktywności skurczowej mięśniówki gładkiej może nasilać dyskomfort pacjentów i pogłębiać problem biegunki. W tym kontekście zastosowanie leków spazmolitycznych jest zasadne, ponieważ redukują one nadmiernie przyspieszony pasaż oraz sekrecję w jelitach i poprawiają konsystencję stolca (Dellon i Ringel, 2006). Przyczynia się to nie tylko do złagodzenia objawów, ale również do poprawy funkcji jakości życia pacjentów.

Zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego, w tym nasilenie ich perystaltyki, nie są zjawiskiem ograniczonym wyłącznie do zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego. Stany skurczowe jelit, mogące objawiać się w postaci bolesnych kolek jelitowych, towarzyszą wielu innym jednostkom chorobowym. Występują m.in. w przebiegu nietolerancji pokarmowych, zaburzeń czynnościowych wywołanych stresem, stanów zapalnych, a także w okresie rekonwalescencji po zabiegach chirurgicznych w obrębie jamy brzusznej (Cann i in., 1983; Flasar i Goldberg, 2006; Maev i in., 2018; Nowak-Węgrzyn i in., 2016). Dolegliwości te mogą znacząco obniżać komfort życia pacjenta i zaburzać jego codzienne funkcjonowanie (American Gastroenterological

Association, 2015; Enck i in., 2017). W wielu przypadkach wymagają one szybkiej i celowanej interwencji farmakologicznej, ukierunkowanej na rozluźnienie mięśniówki i przywrócenie prawidłowej perystaltyki. W leczeniu bólu wynikającego ze stanów skurczowych jelit istotną rolę odgrywają leki spazmolityczne, które należą do bardzo często stosowanych preparatów farmakologicznych w tej grupie dolegliwości. Ich działanie prowadzi do rozluźnienia mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego, a w konsekwencji do redukcji odczuwanego bólu oraz poprawy komfortu pacjenta (Mousavi i in., 2023; Müller-Lissner i in., 2011; Storr i in., 2022)

Choć stosowanie leków syntetycznych przynosi zakładane rezultaty to pacjenci zgłaszają występowanie skutków ubocznych podczas ich przyjmowania (Nam i in., 2018; Trinkley i Nahata, 2014). Niezadowalająca skuteczność części stosowanych terapii oraz występowanie działań niepożądanych przyczyniają się do wzrostu zainteresowania terapiami alternatywnymi (Tillisch, 2006). W związku z tym oprócz leków syntetycznych w leczeniu IBS wykorzystuje się również preparaty pochodzenia roślinnego. Pełnią one rolę uzupełniającą, zwłaszcza w regulowaniu zaburzeń motoryki, łagodzeniu bólu trzewnego czy wzdęć. (Wal i in., 2022).

Do najczęściej stosowanych w terapii dolegliwości żołądkowo-jelitowych preparatów należy olejek z mięty pieprzowej (*Mentha ×piperita*). Jego skuteczność i profil bezpieczeństwa oceniono w licznych badaniach klinicznych, w tym również z udziałem pacjentów cierpiących na IBS. Badania wykazały istotne zmniejszenie nasilenia objawów, zwłaszcza dolegliwości bólowych (Cappello i in., 2007; Merat i in., 2009) oraz zmniejszenie amplitudy skurczy jelit (Shulman i in., 2021). Przeprowadzono również analizę ekonomiczną stosowania olejku z mięty pieprzowej i wykazano opłacalność stosowania tego preparatu w kontekście społecznym, co wzmacnia argumenty za jego włączeniem do postępowania terapeutycznego (Weerts i in., 2021). Kolejnym, z powszechnie wykorzystywanych w łagodzeniu dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, surowców roślinnych jest rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla* L.). Badania wskazują na jego wyraźne właściwości spazmolityczne, związane głównie z modulacją przepływu jonów K^+ i Ca^{2+} w mięśniówce gładkiej przewodu pokarmowego (García-Giménez i in., 2022; Karim i in., 2010; Mehmood i in., 2015). Wykazano ponadto jego skuteczność w redukcji częstości występowania wzdęć i oddawania gazów jelitowych w okresie pooperacyjnym (Salimi Zadak i in., 2023). Oprócz wpływu na motorykę przewodu pokarmowego, rumianek wykazuje również właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, antyseptyczne oraz uspokajające

(Chauhan i in., 2021), co wspiera jego zastosowanie w terapii zaburzeń ze strony układu pokarmowego. Innymi przykładami roślin o potwierdzonym działaniu przeciwskurczowym na mięśniówkę gładką jelit są m.in. kminek zwyczajny (*Carum carvi*), karczoch zwyczajny (*Cynara scolymus*) czy nagietek lekarski (*Calendula officinalis*) (Bashir i in., 2006; Emendörfer i in., 2005; Micklefield i in., 2003).

Skuteczność obecnie stosowanych preparatów nie eliminuje jednak potrzeby poszukiwania nowych kandydatów na leki roślinne. Najistotniejszym argumentem jest zwiększenie bezpieczeństwa ich stosowania, zwłaszcza biorąc pod uwagę tendencje pacjentów do przyjmowania ich bez konsultacji z lekarzem. Choć fitoterapeutyki są powszechnie uważane za bezpieczne to podobnie jak leki syntetyczne mogą wykazywać działania niepożądane, min. hepatotoksyczność (Quan i in., 2020). Ponad to ich składniki mogą indukować farmakokinetyczne i farmakodynamiczne interakcje z lekami syntetycznymi przyjmowanymi przez pacjenta (Fatima i Nayeem, 2016). Nowe leki mogą potencjalnie zaoferować zwiększony profil bezpieczeństwa, nowe mechanizmy działania czy skuteczność w leczeniu przypadków opornych na dotychczas stosowaną terapię.

Wartość i przydatność uzyskanych w niniejszej pracy wyników należy rozpatrywać w świetle różnych zaburzeń perystaltyki przewodu pokarmowego. Zaczynając od stanów hipermotoryki (np. IBS-D, FDr czy bóle skurczowe jelit), w których pożądanym jest działanie spazmolityczne, przywracające prawidłową kurczliwość mięśniówki bez ryzyka nadmiernej hipotonii. W tym kontekście szczególnie obiecujące wydają się wyciąg metanolowy (CP1) i wyciąg 50% metanolowy (CP2) z kwiatostanów *Cirsium palustre*. W przeprowadzonych badaniach obydwa wyciągi wykazywały istotny, zależny od dawki i powtarzalny efekt rozkurczowy dla indukowanej ACh kurczliwości jelita czczego i okrężnicy świni *ex vivo*. Uzyskane wartości maksymalnego efektu rozkurczowego CP1 i CP2 w odpowiedzi na ACh wynoszą: do ok. 60% w warstwie podłużnej i okrężnej mięśniówki jelita czczego i warstwie podłużnej mięśniówki okrężnicy oraz nawet do ok. 45% dla mięśniówki okrężnej okrężnicy względem reakcji kontrolnej. Ponadto CP1 wykazywał działanie spazmolityczne w warstwie podłużnej i okrężnej jelita czczego oraz podczas stosowania w niskich stężeniach w mięśniówce okrężnej okrężnicy. Silniejsza odpowiedź okrężnicy przy relatywnie słabszym efekcie ze strony jelita czczego sugeruje potencjał łagodzenia skurczów mięśniówki okrężnicy przy zmniejszonym ryzyku hipomotoryki jelita czczego. Brak pełnej blokady skurczów w badaniach *ex vivo* sugeruje niewielkie ryzyko kliniczne paraliżu motoryki.

Wśród badanych flawonoidów *C. palustre* chrysoeriol (CHRY) wykazywał najsilniejsze działanie spazmolityczne, zarówno w warunkach kurczliwości spontanicznej jak i indukowanej ACh. Efekt rozkurczowy przy zastosowaniu stężenia 100 μ M (co odpowiada stężeniu ok. 0,03 mg/ml) był silniejszy w przypadku okrężnicy (ok. 50% reakcji kontrolnej) niż jelita czczego (ok. 70% reakcji kontrolnej). W doświadczeniach z chrysoeriolem wyizolowanym z *Artemisia copa* Phil. (należącej do rodziny *Asteraceae*) wykazano jego spazmolityczne działanie na mięśniówkę gładką jelita czczego u szczura (Gorzalczany i in., 2013). Z kolei prace innych autorów przy użyciu CHRY wyizolowanego z aspalatu prostego (*Aspalathus linearis*; pot. Rooibos) wykazały jego działanie rozkurczowe na jelito czcze i tętnicę główną królika oraz tchawicę i przedsionki serca kawii domowej, wskazując jako główny mechanizm działania rozkurczowego aktywację kanałów potasowych (K^+) (Gilani i in., 2006; Khan i Gilani, 2006;). Doniesienia literaturowe pokrywają się zatem z uzyskanymi wynikami, potwierdzając spazmolityczne działanie CHRY wobec mięśniówki gładkiej jelit.

W przeprowadzonych badaniach apigenina (API) wykazywała działanie spazmolityczne wobec skurczów indukowanych ACh w mięśniówce podłużnej i okrężnej jelita czczego oraz mięśniówce okrężnej okrężnicy osiągające w najwyższym zastosowanym stężeniu (100 μ M, co stanowi ok. 0,027mg/ml) ok. 150% reakcji kontrolnej. Działanie prokinetyczne API wykazywała również w warunkach aktywności spontanicznej, pogłębiając siłę skurczów najsilniej w mięśniówce podłużnej okrężnicy - ok. 170% względem reakcji kontrolnej w stężeniu 100 μ M (ok. 0,027mg/ml). Szereg doniesień opublikowanych na przestrzeni lat potwierdza rozkurczowe działanie apigeniny względem mięśniówki przewodu pokarmowego (Gharzouli i Holzer, 2003; Rotondo i in., 2009; Sadraei i in., 2019). Badanie z wykorzystaniem izolowanych odcinków jelita czczego kawii domowej wykazało, że API działa rozkurczowo zarówno w warunkach aktywności spontanicznej, jak i indukowanej ACh, działając głównie poprzez blokadę kanałów wapniowych (Ca^{2+}) typu L (Lemmens-Gruber i in., 2011). W badaniu przeprowadzonym przy użyciu wycinków jelita krętego szczurów odnotowano spazmolityczne działanie API wobec skurczów indukowanych KCl i ACh poprzez hamowanie aktywności kinazy białkowej C (Sadraei i in., 2018). Dodatkowo jako nieselektywny i kompetycyjny inhibitor fosfodiesteraz, luteolina może wzmacniać obserwowaną aktywność spazmolityczną (Yu i in., 2010). Z kolei w badaniach na wycinkach trawieńca i dwunastnicy była wykazano dwukierunkowe działanie apigeniny. W zależności od dawki i rodzaju tkanki wykazywała ona efekt zarówno

rozkurczający jak i proskurczowy (Mendel i in., 2017). Wyniki te są spójne z obserwacjami przedstawionymi w niniejszej pracy. Podkreśla to potrzebę dalszej weryfikacji z wykorzystaniem szerszego panelu modeli zwierzęcych, zwłaszcza z myślą o translacji do leczenia ludzi.

Kolejnym flawonoidem, który w toku niniejszych badań charakteryzował się istotnym działaniem spazmolitycznym jest luteolina (LUT). Zarówno w warunkach aktywności spontanicznej jak i kurczliwości indukowanej ACh luteolina wykazywała działanie miorelaksacyjne na mięśniówkę okrężną jelita czczego oraz mięśniówkę podłużną i okrężną okrężnicy. Efekt ten był zależny od dawki i osiągał w najwyższym zastosowanym stężeniu (100 μ M, ok. 0,029 mg/ml) dla aktywności spontanicznej wartości do ok. 70% względem reakcji kontrolnej. W przypadku skurczów indukowanych ACh efekt ten był nieco silniejszy. Wyjątek stanowiła mięśniówka podłużna jelita czczego, wobec której LUT działała silnie prokinetycznie, osiągając ok. 120% (praca spontaniczna) oraz ok. 150% (aktywność indukowana) reakcji kontrolnej. Dostępne doniesienia literaturowe potwierdzają właściwości luteoliny wykazane w niniejszej pracy. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem fragmentów jelita czczego kawii domowej i szczurów, a także okrężnicy myszy jednoznacznie wskazują na spazmolityczne działanie LUT na mięśniówkę gładką jelit poprzez blokowanie kanałów wapniowych (Ca^{2+}) typu L (Fleer i Verspohl, 2007; Sadraei i in., 2018; Yang i in., 2020). Z kolei doświadczenie przeprowadzone z użyciem wycinków jelita czczego świni opisuje prokinetyczny wpływ LUT na mięśniówkę w warunkach aktywności spontanicznej oraz indukowanej ACh (Mendel i in., 2020). W świetle różnic zależnych od gatunku wskazane jest poszerzenie zakresu badań o inne modele zwierzęce przed podjęciem prób translacji na człowieka.

Zestawienie działania farmakologicznego z profilem fitochemicznym badanych wyciągów wskazuje, że to prawdopodobnie CHRY jest w największym stopniu odpowiedzialny za spazmolityczne działanie CP1 i CP2 na skurcze indukowane ACh, szczególnie w okrężnicy. API wydaje się pełnić rolę modulującą - współtworzy efekt spazmolityczny w jelicie czczym i mięśniówce okrężnej okrężnicy, natomiast osłabia go w mięśniówce podłużnej okrężnicy. Analiza składu wyciągów metodą LC-PDA-HRMS wykluczyła zawartość LUT w CP1 i CP2, w związku z czym nie można przypisywać jej udziału w aktywności tych wyciągów. Wyższa zawartość CHRY w CP1 teoretycznie wskazuje na silniejsze działanie tego wyciągu, jednak porównywalna lub miejscami wyższa skuteczność CP2 sugeruje udział innych składników wyciągu i/lub różnic w ich

biodostępności tkankowej. Porównanie siły działania miorelaksacyjnego wyciągów CP1 i CP2 z aktywnością CHRY w porównywalnych stężeniach wykazało, że w zależności od rodzaju mięśniówki oraz warunków aktywności, wyciągi mogą osiągać silniejszy efekt rozkurczowy niż czysty CHRY. Uzyskane wyniki wskazują więc, że aktywność biologiczna CP1 i CP2 nie może być tłumaczona jedynie obecnością CHRY. Można za tym przyjąć, że charakter aktywności jest wieloskładnikowy i obejmuje współdziałanie obecnych w wyciągach metabolitów wtórnych, które wspólnie modulują kurczliwość mięśni gładkich. Na tle innych przebadanych preparatów roślinnych, stosowanych w leczeniu dolegliwości przebiegających z nasiloną perystaltyką jelit, wyciąg metanolowy (CP1) oraz 50% metanolowy (CP2) z *C. palustre* wypadają obiecująco i mogą być rozpatrywane jako perspektywiczni kandydaci w terapii.

Poza problemami wynikającymi ze wzmożeniem perystaltyki jelit warto wspomnieć także zaburzenia przebiegające ze zwolnieniem pasażu jelitowego, które obserwuje się w przypadku czynnościowych zaparć idiopatycznych (ang. *chronic idiopathic constipation*, CIC), na skutek działania niektórych leków (np. opioidów) czy neuropatii cukrzycowej. Jednym z podtypów CIC jest inercja jelita grubego (ang. *slow transit constipation*, STC), która charakteryzuje się obniżeniem efektywności skurczów, skutkujące redukcją siły propulsywnej okrężnicy i spowolnieniem pasażu stolca (Waluga, 2021). Choć jest to najrzadziej występujący rodzaj wśród CIC to szacuje się, że z problemem tym zmagają się aż ok. 2-4% populacji (Vlismas i in., 2024). Tak jak w przypadku pozostałych zaburzeń czynnościowych etiologia STC pozostaje nie w pełni wyjaśniona, choć wśród mechanizmów jego powstawania podaje się zaburzenia immunologiczne (Törnblom i in., 2007) oraz hormonalne (Sharma i Rao, 2016). O ile w zaparciach wynikających z nadmiernej kurczliwości jelit uzasadnione jest stosowanie leków spazmolitycznych, o tyle w STC, charakteryzującym się spowolnieniem motoryki okrężnicy, postępowanie to jest niewskazane. Terapia inercji jelita grubego opiera się przede wszystkim na zmianie diety i stylu życia (Włodarczyk i in., 2021). Leczenie farmakologiczne ukierunkowane jest na różne cele, w tym czynność wydzielniczą okrężnicy, modyfikację składu mikrobiomu jelitowego oraz poprawę funkcji motorycznej mięśniówki, przy czym stosowanie leków prokinetycznych jest uznawane za najskuteczniejszą formę terapii farmakologicznej STC (Vlismas i in., 2024). W przypadku niepowodzenia leczenia farmakologicznego konieczne staje się przeprowadzenie ingerencji chirurgicznej, która polega na wycięciu całkowitym okrężnicy (kolektomia) bądź wyprowadzeniu stomii (Vriesman i in., 2019). W leczeniu zaparć czynnościowych stosuje się również preparaty

ziołowe, takie jak róża damasceńska (*Rosa × damascena*), ślaz dziki (*Malva sylvestris* L.) czy figowiec pospolity (*Ficus carica* L.). Choć badania wykazały łagodne działanie prokinetyczne figowca to skuteczność terapeutyczna omawianych preparatów roślinnych wynika przede wszystkim z ich działania przeczyszczającego (Lalitha i in., 2021; Lellis i in., 2024; Sadeghi Mansoorkhani i in., 2021).

Wśród zaburzeń przebiegających ze spowolnieniem perystaltyki na szczególną uwagę zasługuje pooperacyjna niedrożność porażenna jelit (ang. *postoperative ileus*, POI). Stan ten polega na zahamowaniu bądź całkowitym zatrzymaniu motoryki jelit po operacjach w obrębie jamy brzusznej (Venara i in., 2019). Patofizjologia POI ma charakter wieloczynnikowy, obejmuje dysfunkcje układu nerwowego, powstawanie reakcji zapalnej, zaburzenia elektrolitowe oraz spazmolityczny wpływ anestetyków i analgetyków (głównie opioidów). W konsekwencji dochodzi do spadku napędu propulsywnego i opóźnienia pasażu treści (Buscail i Deraison, 2022; Mannava i in., 2024). Komplikacja ta jest częsta i szacuje się, że może dotyczyć ona aż do 25% pacjentów po laparotomiach (Chapman i in., 2018). POI zwiększa zachorowalność pooperacyjną i poprzez wydłużenie konieczności hospitalizacji pacjenta znacząco zwiększa koszty opieki, co stanowi istotny problemem dla zdrowia publicznego (Asgeirsson i in., 2010). Pooperacyjna niedrożność porażenna jelit stanowi również wyzwanie w medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza w przypadku koni, u których prewalencja POI wynosi do 62% stwarzając istotne zagrożenie życia pacjentów (Lisowski i in., 2018). W leczeniu POI dużą rolę odgrywają strategie nefarmakologiczne, głównie wczesna rehabilitacja pacjenta obejmująca szybką mobilizację i odpowiednie zarządzanie płynami (Khawaja i in., 2022). Wartą wspomnienia jest również potwierdzona badaniami wysoka skuteczność żucia gumy do żucia w celu stymulacji motoryki jelit po zabiegach (Cui i in., 2024). W postępowaniu farmakologicznym głównymi kierunkami są działanie przeciwzapalne oraz prokinetyczne, a do najczęściej stosowanych w terapii POI leków należy antagonistę receptorów dopaminowych D₂ - metoklopramid (Buscail i Deraison, 2022). Oprócz leków syntetycznych w leczeniu pooperacyjnej niedrożności porażennej jelit stosuje się również fitoterapeutyki. Za szczególnie interesujący uznać można wywodzący się z tradycyjnej japońskiej medycyny preparat Daikenchuto (DKC), w którego skład wchodzi suszony imbir (*Zingiber Boehm.*), korzeń żeń-szenia (*Panax ginseng*) i owoce zanthoxylum (*Zanthoxylum piperitum*) (Shimada i in., 2014). Liczne badania naukowe oraz opisane przypadki kliniczne potwierdzają pobudzający wpływ na perystaltykę jelit i skuteczność stosowania tego preparatu w leczeniu POI (Akamaru i in.,

2015; Kogo i in., 2025; Kono i in., 2019). Poza DKC w terapii POI stosuje się: rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla* L.), fenkuł włoski (*Foeniculum vulgare* Mill.) z uwagi na ich właściwości przeciwzapalne (Ghorat i in., 2018; Jourshari i in., 2024) oraz strączyniec oskrzydłony (*Senna alata*) wykorzystując jego działanie przeczyszczające (Phutsisen i in., 2019).

Coraz więcej danych wskazuje na korelację pomiędzy dysfunkcją motoryki górnego i dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Zaobserwowano, że u chorych ze spowolnionym pasażem okrężniczym i dyssynergią defekacyjną istotnie częściej stwierdza się upośledzoną akomodację żołądka oraz opóźnione opróżnianie żołądka (Abdelnaem i in., 2025). Przykład zaburzenia, w którym opóźnienie opróżniania żołądka przekłada się na wtórne zaburzenia pasażu jelitowego stanowi gastropareza (ang. *gastroparesis*, GA) (Bekkelund i in., 2021; Parkman i in., 2022). Jest to stan, w którym opóźnione jest opróżnianie żołądka z pokarmów stałych przy braku niedrożności mechanicznej. Klinicznie manifestuje się uczuciem pełności po posiłku, wczesnym uczuciem sytości, nudnościami, wymiotami i bólem w górnej części brzucha (Camilleri i in., 2022). Z uwagi na przewlekłość choroby oraz charakter objawów u pacjentów dotkniętych gastroparezą stwierdza się istotne pogorszenie jakości życia (Parkman i in., 2021). Wykazano również, że zaburzenie to stanowi wyraźne obciążenie finansowe dla systemu opieki zdrowotnej (Lacy i in., 2018). GA charakteryzuje się złożonym, wieloczynnikowym mechanizmem patofizjologicznym, wynikającym z interakcji zaburzeń motoryki, dysfunkcji neuromięśniowej, osiami hormonalnymi oraz odpowiedzią immunologiczną (Dimino i Kuo, 2025). Leczenie gastroparezy jest trudne i wymaga kompleksowego podejścia, które obejmuje postępowanie dietetyczne, leczenie objawowe oraz przyczynowe (Zheng i Camilleri, 2021). Lekami rekomendowanymi przez American College of Gastroenterology jako terapia pierwszego rzutu w leczeniu GA są prokinetyki (Camilleri i in., 2023). Wspomniany wcześniej metoklopramid, będący antagonistą receptorów dopaminowych jest w tym momencie jedynym lekiem zatwierdzonym przez Agencję ds. Żywności i Leków w terapii gastroparezy. Jego stosowanie jest natomiast zalecane przez okres maksymalnie 12 tygodni z uwagi na objawy niepożądane (Camilleri i in., 2022). Wśród fitoterapeutyków stosowanych w celu łagodzenia objawów GA wymienia się STW-5 (skład przedstawiony w Tab. 4), Rikkunshito (skład przedstawiony w Tab. 4) i wyciąg z imbiru (*Zingiber* Boehm.). Doniesienia naukowe potwierdzają ich skuteczność w łagodzeniu objawów dyspepsji czynnościowej (FD), jednak dotychczas nie przeprowadzono badań u pacjentów z

gastroparezą, w konsekwencji wnioski dotyczące ich przydatności w tym wskazaniu mają charakter pośredni i powinny być interpretowane ostrożnie (Arai i in., 2011; Oude Nijhuis i in., 2023; Panda i in., 2020).

W kontekście zaburzeń związanych ze spowolnieniem bądź całkowitym zatrzymaniem perystaltyki jelit dalsze hamowanie kurczliwości mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego jest niewskazane, gdyż może przedłużać powrót czynności motorycznej. Choć prokinetyki o zróżnicowanych mechanizmach działania są powszechnie stosowane i wykazują dość wysoką skuteczność w terapii tych schorzeń, to analiza literatury wskazuje towarzyszące im szerokie spektrum działań niepożądanych (Usai-Satta i in., 2022). Stwarza to zatem potrzebę poszukiwania nowych, skutecznych, a jednocześnie bezpieczniejszych leków. W tym ujęciu wyniki uzyskane w niniejszej pracy wydają się wartościowe i dostarczają przesłanki do dalszych badań. Wszystkie przebadane frakcje (CP4-6) oraz wyciąg wodny (CP3) z *C. palustre* wywoływały istotny efekt prokinetyczny na mięśniówkę gładką jelita czczego i okrężnicy świni w warunkach *ex vivo*, zarówno w przypadku aktywności spontanicznej jak i indukowanej ACh (Tabela 9). Wśród izolowanych flawonoidów najwyższy potencjał prokinetyczny wykazywał 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC). Efekt jego działania był homogeny, tj. zarówno w warunkach aktywności spontanicznej jak i indukowanej ACh oraz niezależnie od odcinka jelita i orientacji mięśniówki powodował nasilenie kurczliwości. Zaobserwowano, że A7GLC silniej wzmacniał aktywność spontaniczną niż skurcze wywołane ACh; efekt ten był wyraźniejszy w okrężnicy niż w jelicie czczym oraz w warstwie podłużnej niż w okrężnej. Maksymalną wartość (ok. 170% reakcji kontrolnej przy zastosowaniu stężenia 100 μ M, co odpowiada ok. 0,045 mg/ml) osiągnął w stosunku do mięśniówki podłużnej okrężnicy w warunkach aktywności spontanicznej. W literaturze natomiast, z wyjątkiem opublikowanych wyników niniejszego badania, brak jest doniesień na temat wpływu A7GLC na motorykę przewodu pokarmowego (Szadkowska i in., 2023).

CP3 w dawce 0,0001 mg/ml powodował pobudzenie aktywności spontanicznej mięśniówki podłużnej jelita czczego, natomiast w wyższych stężeniach hamował jej kurczliwość (do ok. 50% kontroli). W pozostałych przypadkach powodował wzmożenie kurczliwości spontanicznej - silniej dla okrężnicy niż jelita czczego oraz dla mięśniówki okrężnej niż podłużnej. Wyjątek stanowiła mięśniówka podłużna okrężnicy, dla której nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w sile skurczu. Różnica działania pomiędzy warstwami może wynikać z ich odmiennej reaktywności cholinergiczej, spowodowanej różnicami w rozmieszczeniu receptorów muskarynowych w obrębie

warstw (Harrington i in., 2010). Analiza składu CP3 metodą LC-PDA-HRMS wykazała, że jednym z jego dominujących metabolitów jest A7GLC. API i CHRY również zidentyfikowano w CP3, jednak w istotnie mniejszych ilościach. Taki profil składu sugeruje, że prokinetyczne działanie CP3 w dużej mierze wynika z obecności A7GLC. Uzyskane wyniki sugerują, że obecność A7GLC ma istotny udział w prokinetycznym działaniu wyciągu CP3, jednak nie w pełni tłumaczy jego aktywność. Silniejszy efekt CP3 w stosunku do mięśniówki okrężnej w porównaniu z czystym A7GLC wskazuje, że w działaniu wyciągu uczestniczą również inne metabolity o zbliżonym profilu farmakologicznym. Z kolei słabsze działanie CP3 względem A7GLC na mięśniówkę podłużną może świadczyć o obecności związków modulujących efekt A7GLC w sposób osłabiający. Wskazuje to, że aktywność CP3 jest wynikiem złożonego współdziałania wielu metabolitów. Jednocześnie w przypadku spontanicznej aktywności mięśniówki podłużnej jelita czczego oraz indukowanej ACh aktywności mięśniówki podłużnej okrężnicy obserwacje wskazują, że CHRY, mimo niższej zawartości, może częściowo przeciwdziałać prokinetycznemu efektowi A7GLC, modulując odpowiedź w kierunku rozkurczu.

Frakcja eterowa (CP4) wykazywała istotne działanie prokinetyczne na mięśniówkę jelita czczego i okrężnicy. Efekt w warunkach pracy spontanicznej osiągał ok. 150% reakcji kontrolnej odpowiednio dla jelita czczego oraz ok. 180% dla mięśniówki podłużnej i 140% dla mięśniówki okrężnej okrężnicy. Kurczliwość indukowaną ACh wzmacniał do ok. 160% (jelito czcze) i 180% (mięśniówka okrężna okrężnicy) względem reakcji kontrolnej na ACh. Wyjątek stanowiło rozkurczowe działanie względem mięśniówki podłużnej okrężnicy w przypadku skurczów indukowanych ACh, wynoszące do ok. 70% reakcji kontrolnej. Analogicznie do obserwacji dla CP3, silniejszy efekt frakcji CP4 wobec mięśniówki okrężnej w porównaniu z czystym A7GLC sugeruje udział dodatkowych metabolitów wzmacniających działanie głównego składnika. Natomiast słabsza aktywność CP3 względem A7GLC w odniesieniu do mięśniówki podłużnej może wynikać z obecności związków o działaniu modulującym, które częściowo znoszą lub maskują efekt pobudzający A7GLC. Profil fitochemiczny CP4 wyróżniał się na tle pozostałych wyciągów i frakcji. Frakcja eterowa jako jedyna zawiera LUT, natomiast A7GLC występuje w niej w bardzo niewielkiej ilości. Niewielka zawartość A7GLC potwierdza więc, że prokinetyczny efekt CP4 wynika z udziału innych składników o działaniu pobudzającym, szczególnie API.

Zarówno frakcja octanowa (CP5) jak i *n*-butanolowa (CP6) wyraźnie nasilały amplitudę skurczów spontanicznych i indukowanych ACh jelita czczego i okrężnicy, przy czym siła działania obu frakcji była porównywalna wynosząc ok. 150% względem kontroli. Efekt działania obu frakcji był nieco silniejszy w stosunku do mięśniówki podłużnej niż okrężnej. Ich profile fitochemiczne charakteryzowały się wysoką zawartością A7GLC, przy jednoczesnym braku API, LUT i CHRY. W większości przypadków siła działania czystego A7GLC była większa niż obserwowana dla frakcji CP3 i CP4, co wspiera hipotezę o dominującej roli A7GLC, choć nie można wykluczyć udziału innych współwystępujących metabolitów w modulowaniu jego efektu.

Jak wspomniano wcześniej - w warunkach aktywności spontanicznej CP2 powodowało nasilenie siły skurczów jelita czczego i okrężnicy. Analiza składu wyciągu wykazała, że A7GLC jest jego dominującym metabolitem. Prawdopodobnie to właśnie glukuronid 7-*O*-apigeniny, wraz z API odpowiada w znacznym stopniu za prokinetyczny potencjał CP2 względem spontanicznych skurczów mięśniówki. Wyniki sugerują również większy potencjał CHRY do modulacji motoryki mięśniówki jelit w warunkach kurczliwości indukowanej ACh.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy - szczególnie dotyczące frakcji eterowej (CP4), octanowej (CP5) i butanolowej (CP6) pozyskanych z kwiatostanów ostrożeń pozwalają hipotetycznie pozycjonować wybrane frakcje jako kandydatów do dalszej walidacji w profilaktyce i leczeniu zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego, przebiegających z obniżeniem kurczliwości. Jednocześnie, choć literatura opisuje liczne preparaty roślinne stosowane w tych schorzeniach to w przeważającej mierze ich działanie nie polega na bezpośredniej modulacji perystaltyki. Nie wyłania się więc realna alternatywa dla syntetycznych leków prokinetycznych, lecz raczej potencjalne uzupełnienie ich działania. Na tym tle frakcje *C. palustre* wyróżniają się jako potencjalny zamiennik dla prokinetyków syntetycznych.

Poza zdolnością do modulacji perystaltyki zidentyfikowane w *C. palustre* metabolity posiadają szereg innych właściwości mogących nieść korzyści w terapii schorzeń przewodu pokarmowego. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają przeciwzapalne działanie flawonoidów. Wielotorowe działanie zapalne API polega min. na ograniczaniu wytwarzania cytokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17) i mediatorów zapalenia (PGE₂, NO), zwiększaniu poziomu przeciwzapalnej IL-10 oraz na zmniejszaniu degranulacji komórek tucznych (Kumar i in., 2018; Lee i in., 2007; Xia i

in., 2023). Głównym mechanizmem działania przeciwzapalnego A7GLC jest ograniczenie wytwarzania TNF- α i NO (Marrassini i in., 2020). LUT ogranicza wytwarzanie interleukin (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17), TNF- α , IFN- β i czynnika GM-CSF, a także niektórych chemokin, w tym prostaglandyn i leukotrienów oraz moduluje degranulację komórek tucznych (Aziz i in., 2018). Również CHRY wykazuje potwierdzone badaniami działanie przeciwzapalne poprzez obniżanie poziomu mediatorów zapalnych i białek (min. COX-1 i COX-2) oraz ograniczenie wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α (Moscatelli i in., 2006; Wu i in., 2020). Obecność kwasu chlorogenowego wykazano we wszystkich badanych wyciągach i frakcjach *C. palustre*. W CP4 jego zawartość była umiarkowana, natomiast w pozostałych stanowił jeden z dominujących metabolitów. W kontekście omawianych chorób zainteresowanie mogą budzić jego właściwości przeciwzapalne oraz immunomodulujące. Dowiedziono, że kwas chlorogenowy hamuje uruchamianie reakcji zapalnej w komórkach (zwłaszcza szlak NF- κ B), co skutkuje zmniejszeniem ekspresji COX-2 i iNOs, a także produkcji cytokin takich jak TNF- α , IL-1 β , i IL-6 (Ruifeng i in., 2014).

Kolejnym atutem, istotnym w terapii zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego, jest udokumentowana w badaniu na myszach zdolność API do skutecznej naprawy uszkodzonej bariery jelitowej i poprawy stanu uszkodzonej tkanki (Lv i in., 2022). Dodatkowo wykazano, że suplementacja API, LUT oraz kwasu chlorogenowego moduluje skład i różnorodność mikrobioty jelitowej kluczowej do prawidłowego funkcjonowania jelit oraz osi jelitowo-mózgowej (Fu i in., 2022; Sun i in., 2021; Zheng i in., 2023).

Należący do flawonoidów kemferol, którego zawartość odnotowana została w wyciągach metanolem (CP1), 50% metanolem (CP2) oraz we frakcji eterowej (CP4) także wykazuje działanie miorelaksacyjne na mięśniówkę gładką jelit poprzez blokadę kanałów wapniowych, co potwierdzają badania *in vitro* i *in vivo* (Nigusse i in., 2019; Wahid i in., 2022). Z dużym prawdopodobieństwem może więc przyczyniać się do efektu modulującego kurczliwość wywołwanego przez CP1, CP2 i CP4, natomiast dalsze badania są konieczne by potwierdzić tę hipotezę. Liczne doniesienia wskazują też na przeciwzapalne działanie kemferolu, które podobnie jak w przypadku pozostałych flawonoidów opiera się na złożonym, wielokierunkowym mechanizmie działania (García-Mediavilla i in., 2007; Kim i in., 2010; Palacz-Wrobel i in., 2017). Ponad to udowodniono też inne właściwości kemferolu, takie jak działanie przeciwlękowe

(Aguirre-Hernández i in., 2010; Grundmann i in., 2009), przeciwalergiczne (Lee i in., 2010) czy przeciwbólowe (Zarei i in., 2020) mogące przynosić korzyść w terapii chorób układu pokarmowego.

Uzyskane dane wskazują, że *Cirsium palustre* jest bardzo obiecującym kandydatem w terapii schorzeń przebiegających z zaburzeniami perystaltyki przewodu pokarmowego u ludzi. Badane wyciągi (CP1-3) i frakcje (CP4-6) modulowały kurczliwość jelita czczego i okrężnicy dwukierunkowo, tj. działały spazmolitycznie (zwłaszcza wobec skurczów indukowanych ACh) oraz prokinetycznie wykazując wyraźną selektywność odcinkową i warstwową (Tabela 9). W przypadku aktywności spazmolitycznej brak pełnej blokady skurczów sprzyja korzystnemu profilowi bezpieczeństwa. Zależność siły działania od dawki sprzyja personalizacji potencjalnej terapii. Jednocześnie udokumentowane dodatkowe właściwości metabolitów ostrożeńa błotnego adresują kluczowe składowe patofizjologii DGBI, takie jak przewlekły stan zapalny, dysfunkcja bariery jelitowej czy zaburzenia osi jelitowo-mózgowej. Przeciwwzapalne działanie metabolitów *C. palustre* sprawia, że gatunek ten wypada szczególnie perspektywnie w postępowaniu przeciwko pooperacyjnej niedrożności porażennej jelit. Jego potencjalnie plejotropowy profil działania pozycjonuje ostrożeńa korzystnie na tle innych leków roślinnych wykorzystywanych w terapii POI. Potencjalne działanie anksjolityczne czy przeciwbólowe spowodowane zawartością kemferolu może przyczyniać się do poprawy komfortu życia pacjentów cierpiących z powodu przewlekłych zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego. Całościowy obraz uzasadnia dalszą walidację *C. palustre* jako kandydata fitoterapeutycznego w terapii chorób przewodu pokarmowego przebiegających z zaburzeniami perystaltyki. Konieczne jest natomiast przeprowadzenie dalszych, zaawansowanych badań w celu potwierdzenia stawianych hipotez oraz oceny skuteczności i bezpieczeństwa wyciągów i frakcji z ostrożeńa błotnego.

6. Podsumowanie wyników i wnioski

6.1. Podsumowanie wyników

1. Ze 120 g suchej masy kwiatostanów *Cirsium palustre* uzyskano surowy ekstrakt metanolowy, który po frakcjonowaniu metodą ciecz-ciecz dał 0,79 g CP4 (0,66% s.m.), 1,8 g CP5 (1,5% s.m.) oraz 4,41 g CP6 (3,68% s.m.). Całkowita wydajność procesu wyniosła ok. 5,8% w przeliczeniu na suchą masę surowca.
2. Z 30 g suchej masy materiału roślinnego, w wyniku ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami, uzyskano trzy ekstrakty całkowite: CP1 (3,92 g; 13,1% s.m.), CP2 (5,9 g; 19,7% s.m.) oraz CP3 (6,0 g; 20,0% s.m.).
3. W wyniku analizy LC-PDA-HRMS wyciągów i frakcji z kwiatostanów *C. palustre* zidentyfikowano łącznie 37 związków należących głównie do pochodnych kwasu chinowego oraz flawonoidów (wolnych jak i glikozydowanych):
 - a) CP1 wykazywał zróżnicowany profil fenolowy. W zakresie $R_t < 10$ min dominowały pochodne kwasów organicznych (1). W przedziale R_t 10 - 30 min obserwowano obecność kwasu chlorogenowego (6) oraz jego izomerów (7-9), a także A7GLC (25). W zakresie $R_t > 30$ min obecne były wolne flawonoidy: apigenina (34), kemferol (35) i chrysoeriol (36). Dominującym związkiem był niezidentyfikowana substancja o masie = 785 (37).
 - b) Profil CP2 był zbliżony do CP1, jednak dominującym związkiem był A7GLC (25). Obecny był również kwas 5-O-kawoilochinowy (6), pochodne flawonoidowe oraz aglikony (34-36) w zakresie $R_t > 30$ min. Związek 37 był obecny, choć w niższym stężeniu niż w CP1.
 - c) Wyciąg CP3 charakteryzował się wysoką zawartością pochodnych kwasów organicznych (1) oraz estrów kwasu kawowego (6,7) i dikawoilochinowego (19-22). Dominującym związkiem był A7GLC (25). Flawonoidy aglikonowe (34,36) występowały w śladowych ilościach, a niezidentyfikowany związek 37 był nieobecny.

- d) Frakcja CP4 zawierała wysokie stężenie pochodnych kwasu dikawoilochinowego (21,22) oraz flawonoidów w formie aglikonów: luteoliny (33), apigeniny (34), kemferolu (35) i chrysoeriolu (36). Zawartość A7GLC (25) była śladowa. Zawartość LUT odróżnia CP4 od pozostałych wyciągów i frakcji.
 - e) CP5 charakteryzowała się obecnością metabolitów o zróżnicowanej polarności. W zakresie Rt 10-30 min dominowały: kwas 5-*O*-kawoilochinowy (6), pochodne kwasu dikawoilochinowego (21,22), flawonoidy glikozyłowane (15-17,23) oraz A7GLC (25), który osiągał tu najwyższą intensywność. W zakresie Rt > 30 min wyróżniał się intensywny pik nieznanego metabolitu (37).
 - f) Frakcja CP6 była najbogatsza w związki o wysokiej polarności. Dominujące były pochodne kwasów organicznych (1). Obecne były również kwas 5-*O*-kawoilochinowy (6), A7GLC (25) oraz inne flawonoidy glikozyłowane. Nie wykryto aglikonów (33-36).
4. Przeprowadzone badania wykazały, że wyciągi, frakcje oraz wybrane, wyizolowane flawonoidy z kwiatostanów *Cirsium palustre* istotnie wpływały na spontaniczną aktywność skurczową mięśniówki gładkiej wyizolowanych fragmentów jelita czczego i okrężnicy świni w warunkach *in vitro*:
- a) Surowy wyciąg metanolowy (CP1) wykazywał istotne, zależne od dawki działanie proskurczowe na mięśniówkę podłużną okrężnicy. W przypadku mięśniówki okrężnej okrężnicy wyciąg CP1 działał spazmolitycznie w niższych stężeniach, natomiast w najwyższym zastosowanym stężeniu (0,1 mg/ml) wzmacniał spontaniczną aktywność skurczową.
 - b) Wyciąg CP1 wykazywał zależny od dawki efekt spazmolityczny na mięśniówkę podłużną i okrężną jelita czczego.
 - c) Surowy wyciąg metanolowy (CP2) wykazywał jako jedyny z badanych wyciągów zawsze działanie proskurczowe. Prokinetyczne działanie CP2 było zależne od dawki i dotyczyło mięśniówki podłużnej i okrężnej okrężnicy oraz mięśniówki podłużnej i okrężnej jelita czczego.
 - d) Wyciąg wodny (CP3) powodował silne, zależne od dawki działanie proskurczowe na mięśniówkę podłużną i okrężną okrężnicy.

- e) CP3 jedynie w dawce 0,0001 mg/ml wykazywał znaczące działanie proskurczowe, natomiast w wyższych dawkach uzyskano efekt miorelaksacyjny w stosunku do mięśniówki podłużnej jelita czczego. CP3 w sposób zależny od dawki nasilał spontaniczną aktywność motorycznej mięśniówki okrężnej jelita czczego.
 - f) Wszystkie poddane analizie frakcje, tj. frakcja eterowa (CP4), frakcja octanowa (CP5) oraz frakcja *n*-butanolowa (CP6), w sposób zależny od dawki powodowały wzrost spontanicznej kurczliwości mięśniówki podłużnej i okrężnej okrężnicy oraz mięśniówki podłużnej i okrężnej jelita czczego.
 - g) Apigenina (API) znacząco zwiększała siłę spontanicznych skurczów mięśniówki podłużnej okrężnicy oraz mięśniówki podłużnej i okrężnej jelita czczego. W przypadku mięśniówki okrężnej okrężnicy nie odnotowano statystycznie istotnego wpływu na motorykę.
 - h) 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC) istotnie nasilał spontaniczną kurczliwość mięśniówki gładkiej okrężnicy i jelita czczego, w sposób zależny od dawki.
 - i) Luteolina (LUT) wykazywała zależne od dawki, znaczące działanie miorelaksacyjne na mięśniówkę podłużną i okrężną okrężnicy oraz mięśniówkę okrężną jelita czczego. W przypadku warstwy podłużnej mięśni gładkich jelita czczego LUT nasilała jej spontaniczną kurczliwość.
 - j) Po podaniu chrysoeriolu (CHRY) uzyskano zależny od dawki, silnie spazmolityczny efekt zarówno w przypadku fragmentów okrężnicy, jak i jelita czczego.
5. Przeprowadzone badania wykazały, że wyciągi, frakcje oraz wybrane flawonoidy wyizolowane z kwiatostanów *Cirsium palustre* istotnie wpływały na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej wyizolowanych fragmentów jelita czczego i okrężnicy świni w warunkach *in vitro*, modulując jej kurczliwość indukowaną ACh:
- a) CP1 w sposób zależny od dawki znacząco zmniejszał indukowaną ACh kurczliwość mięśniówki podłużnej i okrężnej okrężnicy oraz jelita czczego świni, co świadczy o dużym potencjale działania antyspasmodycznego.

- b) Podobnie podanie CP2 powodowało osłabienie odpowiedzi na ACh, zarówno w przypadku mięśniówki podłużnej i okrężnej okrężnicy jak i jelita czczego świni.
- c) Działanie CP3 na kurczliwość mięśniówki podłużnej okrężnicy świni indukowaną ACh miało charakter niespecyficzny i nie różniło się istotnie od reakcji kontrolnej. W przypadku mięśniówki okrężnej osiągnięto działanie wzmacniające kurczliwość wywołaną podaniem ACh
- d) CP3 nasilał skurcze mięśniówki podłużnej jelita czczego indukowane ACh wyłącznie przy najwyższym zastosowanym stężeniu (0,1 mg/ml), natomiast w przypadku mięśniówki okrężnej efekt ten obserwowano w szerszym zakresie dawek (0,00005-0,1 mg/ml), przy czym jego intensywność wzrastała wraz ze stężeniem wyciągu.
- e) Frakcja CP4 zmniejszała odpowiedź mięśniówki podłużnej okrężnicy na podanie ACh, co może być rozumiane jako działanie antyspazmodyczne. Jednocześnie frakcja CP4 wykazywała działanie proskurczowe względem mięśniówki okrężnej okrężnicy oraz obu warstw mięśniówki (podłużnej i okrężnej) jelita czczego.
- f) Frakcja CP5 powodowała istotne nasilenie indukowanej ACh motoryki mięśniówki podłużnej i okrężnej okrężnicy oraz jelita czczego.
- g) Frakcja CP6 wzmacniała skurcze indukowane ACh zarówno w okrężnicy, jak i w jelicie czczym, przy czym w przypadku jelita czczego działanie to było obserwowane wyłącznie przy zastosowaniu najwyższych stężeń (0,05 i 0,1 mg/ml).
- h) Podanie API nasilało indukowaną ACh aktywność jedynie dla warstwy podłużnej mięśniówki gładkiej okrężnicy. W przypadku mięśniówki okrężnej okrężnicy oraz obu warstw mięśni gładkich jelita czczego uzyskano efekt spazmolityczny.
- i) A7GLC nasilał w sposób zależny od dawki skurcze mięśniówki okrężnicy oraz jelita czczego, niezależnie od orientacji włókien mięśniowych względem osi długiej jelita.
- j) LUT wyraźnie osłabiała indukowane ACh skurcze mięśni gładkich okrężnicy oraz mięśniówki okrężnej jelita czczego w sposób zależny od dawki. W przypadku mięśniówki podłużnej jelita czczego wykazywała efekt prokinetyczny, potęgując siłę skurczu indukowanego przez ACh.

- k) CHRY wykazywał zależne od dawki działanie antyspazmodyczne, osłabiając siłę skurczu indukowanego przez ACh, na mięśnie gładkie okrężnicy i jelita czczego.

6.2. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:

1. *Cirsium palustre* charakteryzuje się wysoką różnorodnością metabolitów wtórnych, w szczególności pochodnych kwasu chinowego i flawonoidów, co potwierdza jego bogaty i złożony skład chemiczny.
2. We wszystkich wyciągach i frakcjach zidentyfikowano glukuronid 7-O-apigeniny, co może świadczyć o jego roli jako markera chemotaksonomicznego.
3. Różnice w składzie fitochemicznym poszczególnych wyciągów i frakcji potwierdzają skuteczność zastosowanej metody frakcjonowania.
4. Zarówno wyciągi i frakcje *Cirsium palustre*, jak i badane flawonoidy istotnie modyfikują kurczliwość wycinków jelit świni, co czyni je kandydatami na dodatki paszowe/suplementy diety lub leki, które mogą być wykorzystane w leczeniu lub zapobieganiu zaburzeniom motoryki przewodu pokarmowego.
5. Najbardziej obiecujące związki o potencjalnym terapeutycznym działaniu spazmolitycznym:
 - a) Chrysoeriol (CHRY) wykazywał silne, zależne od dawki działanie spazmolityczne zarówno względem spontanicznej, jak i indukowanej ACh aktywności skurczowej mięśni gładkich jelita czczego oraz okrężnicy. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na jego wysoki potencjał jako kandydata na lek spazmolityczny.
 - b) Luteolina (LUT) hamowała skurcze indukowane ACh w mięśniówce gładkiej okrężnicy oraz w warstwie okrężnej mięśniówki jelita czczego w sposób zależny od dawki. Choć wykazywała również efekt prokinetyczny względem mięśniówki podłużnej jelita czczego, wpływ ten wydaje się mieć ograniczone znaczenie dla ogólnego działania spazmolitycznego.

- c) CP1 (surowy wyciąg metanolowy) istotnie hamował indukowaną ACh kurczliwość obu warstw mięśniówki gładkiej w jelicie czczym i okrężnicy. Szczególnie wyraźny efekt obserwowano w niższych stężeniach, co może świadczyć o potencjalnie bezpieczniejszym profilu działania spazmolitycznego.
 - d) Pomimo wysokiej zawartości apigeniny (API) i 7-*O*-glukuronidu apigeniny (A7GLC), wykazujących działanie prokinetyczne, zarówno CP1, jak i CP2 powodowały wyraźny efekt spazmolityczny względem indukowanej ACh aktywności skurczowej mięśniówki gładkiej jelita czczego i okrężnicy. Może to wskazywać na dominującą aktywność chrysoeriolu (CHRY) w generowaniu działania spazmolitycznego w modelu skurczów indukowanych ACh.
6. Najbardziej obiecujące związki o potencjalnym terapeutycznym działaniu prokinetycznym:
- a) Apigenina (API) istotnie zwiększała siłę spontanicznych skurczów mięśniówki podłużnej okrężnicy oraz obu warstw mięśniówki jelita czczego, a także nasilała skurcze mięśniówki podłużnej okrężnicy indukowane acetylocholimą. Uzyskane wyniki wskazują na jej potencjał jako związku wartego dalszych badań w kontekście rozwoju leków o działaniu prokinetycznym.
 - b) 7-*O*-glukuronid apigeniny (A7GLC) wykazywał wyraźne, zależne od dawki działanie prokinetyczne, nasilając zarówno spontaniczną, jak i indukowaną acetylocholimą aktywność skurczową mięśni gładkich jelita czczego oraz okrężnicy. Uzyskane wyniki wskazują na jego istotny potencjał jako kandydata do dalszych badań nad substancjami wzmagającymi motorykę przewodu pokarmowego.
 - c) Frakcje octanowa (CP5) i butanolowa (CP6) istotnie wzmagają zarówno spontaniczną jak i indukowaną ACh motorykę obu warstw mięśniówki gładkiej w jelicie czczym i okrężnicy. Wysoka zawartość A7GLC w obu frakcjach potwierdza hipotezę o jego dominującej roli w pobudzaniu kurczliwości mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego.
 - d) Frakcja eterowa (CP4) w sposób wyraźny, zależny od dawki zwiększała spontaniczną aktywność skurczową jelita czczego i okrężnicy oraz indukowaną ACh aktywność skurczową jelita czczego (obu warstw) i

mięśniówki okrężnej okrężnicy, pomimo niskiej zawartości A7GLC. Wskazuje to na prokinetyczny potencjał API, której odnotowano wysokie stężenie w CP4.

7. Biorąc pod uwagę podobieństwo zastosowanego modelu badawczego do warunków *in vivo* oraz zbliżoną budowę anatomiczną i fizjologię przewodu pokarmowego świni i człowieka - uzyskane wyniki można ostrożnie ekstrapolować na ludzi, a następnie wykorzystać do projektowania przyszłych badań weryfikujących przydatność *Cirsium palustre* jako suplementów diety i/lub leków w medycynie.

Piśmiennictwo

1. Abdelmola, A. O., Bahri, A., Abuallut, I., Refaei, B. A., Hakami, W. K., Abutaleb, A. K., Mahzari, S. M., Mashragi, M. A., Es'haq, S. A., Aldarbi, K. F. (2021). Prevalence, knowledge, and perception about the use of herbal medicines jazan - Saudi Arabia. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 10(6), 2386. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_2475_20
2. Abdelnaem, N., Damianos, J. Camilleri, M. (2025). Cologastric inhibition: upper gastrointestinal dysfunction with slow colonic transit. *Neurogastroenterology & Motility*, e70145. <https://doi.org/10.1111/nmo.70145>
3. Abdullahi, A. (2011). Trends and challenges of traditional medicine in Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5S). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i5s.5>
4. Abedellaah, B. A., Elkadragy, M., Sharsher, A., Rashed, R., Elbaz, H. T. (2019). Veterinary surgery and gynecology in the Ancient Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 65(162), 129-134. <https://doi.org/10.21608/avmj.2019.168980>
5. Adam, B., Liebrechts, T., Best, J., Bechmann, L., Lackner, C., Neumann, J., Koehler, S., Holtmann, G. (2006). A combination of peppermint oil and caraway oil attenuates the post-inflammatory visceral hyperalgesia in a rat model. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(2), 155-160. <https://doi.org/10.1080/00365520500206442>
6. Adhikari, P. P., Paul, S. B. (2018). History of Indian traditional medicine: a medical inheritance. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(1), 421. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v11i1.21893>
7. Aflofarm Farmacja Polska Sp. z o.o. (2025). Apetizer Senior. <https://apetizersenior.pl/apetizer-senior-klasyczny/>
8. Ağan, U. B., Raouf, S., Uzun, B., Meral, Y. (2022). The hidden potential of herbal remedies and nutraceuticals in canine and feline behavioural disorders. *Van Veterinary Journal*, 33(1), 36-41. <https://doi.org/10.36483/vanvetj.955081>
9. Aggarwal, G., Kaur, G., Bhardwaj, G., Mutreja, V., Sohal, H. S., Nayik, G. A., Bhardwaj, A., Sharma, A. (2022). Traditional uses, phytochemical composition, pharmacological properties, and the biodiscovery potential of the genus *Cirsium*. *Chemistry*, 4(4), 1161-1192. <https://doi.org/10.3390/chemistry4040079>
10. Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, Ma. E., Martínez, A. L., Moreno, J., Kite, G., Terrazas, T., Soto-Hernández, M. (2010). HPLC/MS analysis and

- anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.044>
11. Aitken, R., Watkins, L., Williams, J., Kean, A. (2020). The positive role of labelling on consumers' perceived behavioural control and intention to purchase organic food. *Journal of Cleaner Production*, 255, 120334. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120334>
 12. Akamaru, Y., Takahashi, T., Nishida, T., Omori, T., Nishikawa, K., Mikata, S., Yamamura, N., Miyazaki, S., Noro, H., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. (2015). Effects of Daikenchuto, a Japanese herb, on intestinal motility after total gastrectomy: a prospective randomized trial. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 19(3), 467-472. <https://doi.org/10.1007/s11605-014-2730-y>
 13. Allegra, S., De Francia, S., Turco, F., Bertaggia, I., Chiara, F., Armando, T., Storto, S., Mussa, M. V. (2023). Phytotherapy and drugs: can their interactions increase side effects in cancer patients? *Journal of Xenobiotics*, 13(1), 75-89. <https://doi.org/10.3390/jox13010007>
 14. Allescher, H.-D., Abdel-Aziz, H. (2017). Mechanism of action of STW 5 in functional dyspepsia and IBS: the origin of multi-target. *Digestive Diseases*, 35(Suppl. 1), 18-24. <https://doi.org/10.1159/000485456>
 15. American Gastroenterological Association (AGA). (2015). *IBS in America survey summary findings*. <https://www.multivu.com/players/English/7634451-aga-ibs-in-america-survey/docs/survey-findings-pdf-635473172.pdf>
 16. Ammon, H. P. T., Kelber, O., Okpanyi, S. N. (2006). Spasmolytic and tonic effect of Iberogast® (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine*, 13, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.08.004>
 17. Annaházi, A. (2014). Role of antispasmodics in the treatment of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 20(20), 6031. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i20.6031>
 18. Arai, M., Matsumura, T., Tsuchiya, N., Sadakane, C., Inami, R., Suzuki, T., Yoshikawa, M., Imazeki, F., Yokosuka, O. (2011). Rikkunshito improves the symptoms in patients with functional dyspepsia, accompanied by an increase in the level of plasma ghrelin. *Hepato-Gastroenterology*, 59(113). <https://doi.org/10.5754/hge11246>

19. Asgeirsson, T., El-Badawi, K. I., Mahmood, A., Barletta, J., Luchtefeld, M., Senagore, A. J. (2010). Postoperative ileus: it costs more than you expect. *Journal of the American College of Surgeons*, 210(2), 228-231. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.09.028>
20. Atkins, M., Burton Murray, H., Staller, K. (2023). Assessment and management of disorders of gut-brain interaction in patients with eating disorders. *Journal of Eating Disorders*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40337-022-00731-6>
21. Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. (2016). Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*, 21(10), 1321. <https://doi.org/10.3390/molecules21101321>
22. Aziz, N., Kim, M.-Y., Cho, J. Y. (2018). Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 342-358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.019>
23. Azzolin, A. (2021). The ultimate list of optimal nutrition for pigs on small rural farms. Franco - Ecotech. <https://francosrl.com/news/10-nutrients-for-pigs-in-rural-farms/>
24. Babelghaith, S. D., Sales, I., Syed, W., Al-Arifi, M. N. (2024). The use of complementary and alternative medicine for functional gastrointestinal disorders among the Saudi population. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 32(6), 102084. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2024.102084>
25. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
26. Balkrishna, A., Sharma, H., Kukreti, A., Kumari, A., Saini, P., Arya, V., Kumar, A. (2024). Traditional uses and phytopharmacology of *Cirsium arvense*: bioprospecting potential of a weed from temperate biome. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(05). <https://doi.org/10.7324/japs.2024.168589>
27. Bashir, S., Janbaz, K. H., Jabeen, Q., Gilani, A. H. (2006). Studies on spasmogenic and spasmolytic activities of *Calendula officinalis* flowers. *Phytotherapy Research*, 20(10), 906-910. <https://doi.org/10.1002/ptr.1980>
28. Bauer, A., Brönstrup, M. (2014). Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural Product Reports*, 31(1), 35-60. <https://doi.org/10.1039/c3np70058e>
29. Bayer. (2022). *Iberogast - ulotka*. Iberogast Global. <https://www.iberogast.pl/o-leku-iberogast/nasz-produkt/ulotka>

30. Bayne, J. E., Edmondson, M. A. (2021). Diseases of the gastrointestinal system. W: D.G. Pugh, A.N. Baird, M.A. Edmondson, T. Passler (red.), *Sheep, Goat, and Cervid Medicine* (wyd. 3, s. 63-96). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-62463-3.00014-1>
31. Bekkelund, M., Sangnes, D. A., Søfteland, E., Aabakken, L., Biermann, M., Steinsvik, E. K., Hausken, T., Dimcevski, G., Hatlebakk, J. G. (2021). Gastroparesis symptoms associated with intestinal hypomotility: an explorative study using wireless motility capsule. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 14, 133-144. <https://doi.org/10.2147/ceg.s304854>
32. Bellavite, P. (2023). Neuroprotective potentials of flavonoids: experimental studies and mechanisms of action. *Antioxidants*, 12(2), 280. <https://doi.org/10.3390/antiox12020280>
33. Bhattacharjee, B., Sandhanam, K., Ghose, S., Barman, D., Sahu, S. K. (2023). Market overview of herbal medicines for lifestyle diseases. W: A. K. Dhara, S. C. Mandal (red.), *Role of Herbal Medicines: Management of Lifestyle Diseases* (s. 597-614). Springer Nature.
34. Biazar, Y., Avizeh, R., Ghorbanpour, M., Varzi, H. N., Razijalali, M. (2018). Effects of long term administration of *echinacea* in addition with vaccination on general condition and liver and renal performance in dogs. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 355-361. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2018.10.04.055>
35. Bishop, F. L., Lewith, G. T. (2000). Who uses CAM? A narrative review of demographic characteristics and health factors associated with CAM use. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(1), 11-28. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen023>
36. Black, C. J., Drossman, D. A., Talley, N. J., Ruddy, J., Ford, A. C. (2020). Functional gastrointestinal disorders: advances in understanding and management. *The Lancet*, 396(10263), 1664-1674. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32115-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32115-2)
37. Borawska, M. H., Czechowska, S. K., Markiewicz, R., Socha, K., Nazaruk, J., Pałka, J., Isidorov, V. A. (2010). Enhancement of antibacterial effects of extracts from *Cirsium* species using sodium picolinate and estimation of their toxicity. *Natural Product Research*, 24(6), 554-561. <https://doi.org/10.1080/14786410902770728>

38. Braden, B., Caspary, W., Börner, N., Vinson, B., Schneider, A. R. J. (2009). Clinical effects of STW 5 (Iberogast®) are not based on acceleration of gastric emptying in patients with functional dyspepsia and gastroparesis. *Neurogastroenterology & Motility*, 21(6), 632. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01249.x>
39. Brenner, D. M., Lacy, B. E. (2021). Antispasmodics for chronic abdominal pain: analysis of North American treatment options. *American Journal of Gastroenterology*, 116(8), 1587-1600. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001266>
40. Broda, B., Mowszowicz, J. (1996). *Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
41. Budgin, J. B., Flaherty, M. J. (2013). Alternative therapies in veterinary dermatology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(1), 189-204. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.09.002>
42. Buscail, E., Deraison, C. (2022). Postoperative ileus: a pharmacological perspective. *British Journal of Pharmacology*, 179(13), 3283-3305. <https://doi.org/10.1111/bph.15800>
43. CABI. (2017). *Cedrelopsis grevei*. CABI Compendium. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.11980#tab-citations>
44. Camilleri, M. (2023). Abnormal gastrointestinal motility is a major factor in explaining symptoms and a potential therapeutic target in patients with disorders of gut-brain interaction. *Gut*, 72(12), 2372-2380. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330542>
45. Camilleri, M., Atieh, J. (2021). New developments in prokinetic therapy for gastric motility disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 12, artykuł 711500. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.711500>
46. Camilleri, M., Kuo, B., Nguyen, L., Vaughn, V. M., Petrey, J., Greer, K., Yadlapati, R., Abell, T. L. (2022). ACG clinical guideline: gastroparesis. *American Journal of Gastroenterology*, 117(8), 1197-1220. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001874>
47. Camilleri, M., Parkman, H. P., Shafi, M. A., Abell, T. L., Gerson, L. (2013). Clinical guideline: management of gastroparesis. *American Journal of Gastroenterology*, 108(1), 18-37. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.373>

48. Cann, P. A., Read, N. W., Cammack, J., Childs, H., Holden, S., Kashman, R., Longmore, J., Nix, S., Simms, N., Swallow, K., Weller, J. (1983). Psychological stress and the passage of a standard meal through the stomach and small intestine in man. *Gut*, 24(3), 236-240. <https://doi.org/10.1136/gut.24.3.236>
49. Cao, L., Larson, J., Berent, L., Fusaro, A. (2024). *Cirsium palustre* (L.) Scop.: U.S. Geological Survey (A. Arbor, red.). Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL, and NOAA Great Lakes Aquatic Nonindigenous Species Information System. https://nas.er.usgs.gov/queries/greatlakes/FactSheet.aspx?Species_ID=2702&Potential=N&Type=0&HUCNumber=DGreatLakes
50. Cappello, G., Spezzaferro, M., Grossi, L., Manzoli, L., Marzio, L. (2007). Peppermint oil (Mintoil®) in the treatment of irritable bowel syndrome: A prospective double blind placebo-controlled randomized trial. *Digestive and Liver Disease*, 39(6), 530-536. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.02.006>
51. Casteleyn, C., Rekecki, A., Van Der Aa, A., Simoens, P., Van Den Broeck, W. (2010). Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Laboratory Animals*, 44(3), 176-183. <https://doi.org/10.1258/la.2009.009112>
52. Cebra, C. (2014). Disorders of the digestive system. W: C. Cebra, D. E. Anderson, A. Tibary, R. J. Van Saun, L. W. Johnson (red.), *Llama and Alpaca Care* (s. 477-536). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-2352-6.00040-7>
53. Chaitanya, M. V. N. L., Gebremariam Baye, H., Saad Ali, H., Belayneh Samo, F. (2022). Traditional African Medicine. W: *Natural Medicinal Plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96576>
54. Chakraborty, S. (2023). History of animal keeping in Ancient India and it's socio-economic, scientific applicability in 21st century. *British Journal of Philosophy, Sociology and History*, 3(1), 06-10. <https://doi.org/10.32996/pjpsh.2023.3.1.2>
55. Chakraborty, T., Saha, S., Bisht, N. (2017). First report on the ethnopharmacological uses of medicinal plants by Monpa Tribe from the Zemithang region of Arunachal Pradesh, Eastern Himalayas, India. *Plants*, 6(4), 13. <https://doi.org/10.3390/plants6010013>
56. Chapman, S. J., Pericleous, A., Downey, C., Jayne, D. G. (2018). Postoperative ileus following major colorectal surgery. *British Journal of Surgery*, 105(7), 797-810. <https://doi.org/10.1002/bjs.10781>

57. Chauhan, R., Singh, S., Kumar, V., Kumar, A., Kumari, A., Rathore, S., Kumar, R., Singh, S. (2021). A comprehensive review on biology, genetic improvement, agro and process technology of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Plants*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.3390/plants11010029>
58. Che, C.-T., George, V., Ijinu, T. P., Pushpangadan, P., Andrae-Marobela, K. (2017). Traditional medicine. W: S. Badal, R. Delgoda (red.), *Pharmacognosy* (s. 15-30). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802104-0.00002-0>
59. Chiarioni, G., Pesce, M., Fantin, A., Sarnelli, G. (2017). Complementary and alternative treatment in functional dyspepsia. *United European Gastroenterology Journal*, 6(1), 5-12. <https://doi.org/10.1177/2050640617724061>
60. Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Lysiuk, R., Vella, A., Lenchyk, L., Upyr, T. (2018). Targeting cancer with phytochemicals via their fine tuning of the cell survival signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3568. <https://doi.org/10.3390/ijms19113568>
61. Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2900-2911. <https://doi.org/10.1021/jf026187q>
62. Cui, Y., Zhang, C., Zhang, H., Zhang, X., Tang, Y., Wu, Z., Wang, T., Chen, Q., Meng, Y., Wang, B., Liu, M., Yi, J., Shi, Y., Li, R., Pan, H. (2024). Effect evaluation of different preventive measures for ileus after abdominal operation: a systematic review and network meta-analysis. *Heliyon*, 10(4), artykuł e25412. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25412>
63. Czigle, S., Bittner Fialová, S., Tóth, J., Mučaji, P., Nagy, M. (2022). Treatment of gastrointestinal disorders - plants and potential mechanisms of action of their constituents. *Molecules*, 27(9), artykuł 2881. <https://doi.org/10.3390/molecules27092881>
64. Debnath, S., Hazarika, A. (2023). Review: phytotherapy alternatives in veterinary medicine. *International Journal Of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology*, 3(XI), 27-49. <https://doi.org/http://doi.org/10.29369/ijrbat.2023.011.3.0007>
65. Dellon, E. S., Ringel, Y. (2006). Treatment of functional diarrhea. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 9(4), 331-342. <https://doi.org/10.1007/s11938-006-0015-6>

66. Dhale, D. A., Bhagwat, M. G. (2024). Traditional Ayurveda. W: M.M. Barwant, B. Satyannarayana (red.), *Emerging trends in biochemistry volume I* (s. 92-97). Bhumi Publishing.
67. Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), artykuł 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
68. Dimino, J., Kuo, B. (2025). Current concepts in gastroparesis and gastric neuromuscular disorders - pathophysiology, diagnosis, and management. *Diagnostics*, 15(7), artykuł 935. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15070935>
69. Djilani, A., Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. W: J. Bouayed & T. Bohn (red.), *Nutrition, Well-Being and Health* (s. 15-178). InTech. <https://doi.org/10.5772/25344>
70. Domingues, K., Franco, N. H., Rodrigues, I., Stilwell, G., Magalhães-Sant'Ana, M. (2022). Bibliometric trend analysis of non-conventional (alternative) therapies in veterinary research. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 192-198. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2142318>
71. Drossman, D. A. (2016). Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. *Gastroenterology*, 150(6), 1262-1279.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.032>
72. Drossman, D. A., Tack, J. (2022). Rome Foundation clinical diagnostic criteria for disorders of gut-brain interaction. *Gastroenterology*, 162(3), 675-679. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.019>
73. Eckert, G. P., Franke, C., Nöldner, M., Rau, O., Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M., Müller, W. E. (2010). Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. *Pharmacological Research*, 61(3), 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.005>
74. European Environment Agency. (2022). *Rethinking agriculture*. European Environment Agency. <https://www.eea.europa.eu/publications/rethinking-agriculture>
75. Emendörfer, F., Emendörfer, F., Bellato, F., Noldin, V. F., Cechinel-Filho, V., Yunes, R. A., Monache, F. D., Cardozo, A. M. (2005). Antispasmodic activity of fractions and cynaropicrin from *Cynara scolymus* on guinea-pig ileum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(5), 902-904. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.902>

76. Enck, P., Koehler, U., Weigmann, H., Mueller-Lissner, S. (2017). Abdominal pain, cramping or discomfort impairs quality of life in women: an internet-based observational pilot study focusing on impact of treatment. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 55(03), 260-266. <https://doi.org/10.1055/s-0043-100022>
77. European Commission, Directorate-General for Environment, Kümmerer, K. (2018). *Options for a strategic approach to pharmaceuticals in the environment - Final report*. Publications Office.
78. Evans, C., Kalman, D. (2024). Addressing GI health through the bidirectional modulation of the gut-brain axis with herbal extracts: a narrative review. *Cureus*, 16(8), artkuł: e66698 <https://doi.org/10.7759/cureus.66698>
79. Fatima, N., Nayeem, N. (2016). Toxic effects as a result of herbal medicine intake. W: M. Larramendy S. Soloneski (red.), *Toxicology-new aspects to this scientific conundrum* (s. 193-207). InTech Open.
80. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1721(1-3), 174-184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001>
81. Flasar, M. H., Goldberg, E. (2006). Acute abdominal pain. *Medical Clinics of North America*, 90(3), 481-503. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2005.11.005>
82. Fleer, H., Verspohl, E. J. (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6), 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.05.006>
83. Fu, R., Wang, L., Meng, Y., Xue, W., Liang, J., Peng, Z., Meng, J., Zhang, M. (2022). Apigenin remodels the gut microbiota to ameliorate ulcerative colitis. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1062961>
84. García-Giménez, M. D., Quilez-Guerrero, A., Fernandez-Arche, M. A., Puerta, R. D. la. (2022). *Aromatic plants rich in phenolic compounds as a valuable basis for dietary supplements in intestinal motility disorders*. Research Square Platform LLC. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2202258/v1>
85. García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J., González-Gallego, J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear

- factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, 557(2-3), 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.014>
86. Gharzouli, K., Holzer, P. (2003). Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. *Pharmacology*, 70(1), 5-14. <https://doi.org/10.1159/000074237>
 87. Ghorat, F., Khadem, E., Shirazi, M., Janani, L., Rahimi, R., Amiri, P. (2018). Effect of topical chamomile oil on postoperative bowel activity after cesarean section: a randomized controlled trial. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 7(3), 128-135. https://doi.org/10.4103/jrpp.jrpp_17_103
 88. Gilani, A. H., Khan, A., Ghayur, M. N., Ali, S. F., Herzig, J. W. (2006). Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K⁺-channel activation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 99(5), 365-373. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_507.x
 89. Gonzalez, L. M., Moeser, A. J., Blikslager, A. T. (2015). Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research. *Translational Research*, 166(1), 12-27. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.004>
 90. Gorzalczany, S., Moscatelli, V., Acevedo, C., Ferraro, G. (2013). Spasmolytic activity of *Artemisia copaaqueous* extract and isolated compounds. *Natural Product Research*, 27(11), 1007-1011. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.688049>
 91. Graham, H., Åman, P. (1987). The pig as a model in dietary fibre digestion studies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 22(sup129), 55-61. <https://doi.org/10.3109/00365528709095851>
 92. Grundmann, O., Nakajima, J.-I., Kamata, K., Seo, S., Butterweck, V. (2009). Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine*, 16(4), 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.020>
 93. Gubert, C., Gasparotto, J., H. Morais, L. (2022). Convergent pathways of the gut microbiota-brain axis and neurodegenerative disorders. *Gastroenterology Report*, 10, artykuł goac017. <https://doi.org/10.1093/gastro/goac017>
 94. Gunathilaka, N., Niroshana, D., Amarasinghe, D., Udayanga, L. (2018). Prevalence of gastrointestinal parasitic infections and assessment of deworming program among cattle and buffaloes in Gampaha District, Sri Lanka. *BioMed Research International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/3048373>

95. Gwee, K. A., Gonlachanvit, S., Ghoshal, U. C., Chua, A. S. B., Miwa, H., Wu, J., Bak, Y.-T., Lee, O. Y., Lu, C.-L., Park, H., Chen, M., Syam, A. F., Abraham, P., Sollano, J., Chang, C.-S., Suzuki, H., Fang, X., Fukudo, S., Choi, M.-G., Hou, X., Hongo, M. (2019). Second Asian consensus on irritable bowel syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 25(3), 343-362. <https://doi.org/10.5056/jnm19041>
96. Gwee, K., Holtmann, G., Tack, J., Suzuki, H., Liu, J., Xiao, Y., Chen, M., Hou, X., Wu, D., Toh, C., Lu, F., Tang, X. (2020). Herbal medicines in functional dyspepsia – untapped opportunities not without risks. *Neurogastroenterology & Motility*, 33(2), artykuł e14044. <https://doi.org/10.1111/nmo.14044>
97. Hacker, K. (2024). The burden of chronic disease. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, 8(1), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2023.08.005>
98. Hanh, T. T. H., Hang, D. T. T., Van Minh, C., Dat, N. T. (2011). Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(10), 760-763. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60189-2](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60189-2)
99. Harrington, A. M., Peck, C. J., Liu, L., Burcher, E., Hutson, J. M., Southwell, B. R. (2010). Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. *Neurogastroenterology & Motility*, 22(9), 999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01456.x>
100. Hartady, T., Syamsunarno, M. R. A. A., Priosoeryanto, B. P., Jasni, S., Balia, R. L. (2021). Review of herbal medicine works in the avian species. *Veterinary World*, 14(11), 2889-2906. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2889-2906>
101. Hatton, G. B., Yadav, V., Basit, A. W., Merchant, H. A. (2015). Animal farm: considerations in animal gastrointestinal physiology and relevance to drug delivery in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(9), 2747-2776. <https://doi.org/10.1002/jps.24365>
102. Hayakawa, T., Arakawa, T., Kase, Y., Akiyama, S., Ishige, A., Takeda, S., Sasaki, H., Uno, H., Fukuda, T., Higuchi, K., Kobayashi, K. (1999). Liu-Jun-Zi-Tang, a kampo medicine, promotes adaptive relaxation in isolated guinea pig stomachs. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25(5), 211-218.
103. Holtmann, G., Schrenk, D., Madisch, A., Allescher, H. D., Ulrich-Merzenich, G., Mearin, F., Larrey, D., Malfertheiner, P. (2020). Use of evidence-based herbal

- medicines for patients with functional gastrointestinal disorders: a conceptional framework for risk-benefit assessment and regulatory approaches. *Digestive Diseases*, 38(4), 269-279. <https://doi.org/10.1159/000504570>
104. Hugenholtz, F., de Vos, W. M. (2017). Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 149-160. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2693-8>
 105. Huynh, M., Pignon, C. (2013). Gastrointestinal disease in exotic small mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 22(2), 118-131. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2013.05.004>
 106. Hwang, J. M., Varma, M. G. (2008). Surgery for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(17), artykuł 2678. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2678>
 107. Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K., Kosuge, T. (1987). Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35(2), 861-864. <https://doi.org/10.1248/cpb.35.861>
 108. Jaafari, H., Houghton, L. A., West, R. M., Agrawal, A., Aziz, I., Black, C. J., Corsetti, M., Shuweihdi, F., Eugenicos, M., Paine, P. A., Ford, A. C., Whorwell, P. J., Bangdiwala, S. I., Palsson, O. S., Sperber, A. D., Vasant, D. H. (2023). The national prevalence of disorders of gut brain interaction in the United Kingdom in comparison to their worldwide prevalence: results from the Rome Foundation global epidemiology study. *Neurogastroenterology & Motility*, 35(6), artykuł e14574. <https://doi.org/10.1111/nmo.14574>
 109. James, T. C., Pathak, N., Bhatnagar, A. (2020). *China's policy initiatives for national and global promotion of TCM*. RIS.
 110. Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A. B., & Saura-Calixto, F. (2006). Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3462-3471. <https://doi.org/10.1021/jf053188k>
 111. Jourshari, M. S., Rezasoltani, P., Nazari, M., Maroufizadeh, S., Aski, S. K., Qobadighadikolaei, R., Yousefbeyk, F. (2024). A comparative study of fennel and dimethicone capsule effects on flatulence rate after cesarean section: a double-blind randomized controlled trial. *Journal of Education and Health Promotion*, 13(1), artykuł 251. https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_389_23

- 112.Kararli, T. T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 16(5), 351-380. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>
- 113.Karim, A., Berrabah, M., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Bouali, A., Haloui, B., Amrani, S., Aziz, M. (2010). Effect of essential oil of *Anthemis mauritiana* Maire & Sennen flowers on intestinal smooth muscle contractility. *Journal of Smooth Muscle Research*, 46(1), 65-75. <https://doi.org/10.1540/jsmr.46.65>
- 114.Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., Brunton, N. P. (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the *Asteraceae* family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.126>
- 115.Khalphallah, A., Elsayed, H. K., Elmeligy, E., Bayomi, S. A., Hamed, M. A., Salman, D., Abu-Seida, A. M., Mousa, S. A. (2021). Differential diagnosis of bovine intestinal diseases and their sequelae regarding ultrasonography and other diagnostic tools. *Veterinary World*, 14(6), 1537-1547. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1537-1547>
- 116.Khan, A., & Gilani, A. H. (2006). Selective bronchodilatory effect of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) and its flavonoid, chrysoeriol. *European Journal of Nutrition*, 45(8), 463-469. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0620-0>
- 117.Khawaja, Z. H., Gendia, A., Adnan, N., Ahmed, J. (2022). Prevention and management of postoperative ileus: a review of current practice. *Cureus*, 14(2), artykuł e22652. <https://doi.org/10.7759/cureus.22652>
- 118.Khayyal, M. T., Seif-El-Nasr, M., El-Ghazaly, M. A., Okpanyi, S. N., Kelber, O., Weiser, D. (2006). Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast®) and its components against ulcers and rebound acidity. *Phytomedicine*, 13, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.03.019>
- 119.Kidd, J. R. (2012). Alternative medicines for the geriatric veterinary patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42(4), 809-822. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.009>
- 120.Kim, J. M., Lee, E. K., Kim, D. H., Yu, B. P., Chung, H. Y. (2010). Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-κB activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase. *GeroScience*, 32(2), 197-208. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9124-1>

121. Kim, J. Y., Lim, M. H. (2021). Psychological factors to predict chronic diarrhea and constipation in Korean high school students. *Medicine*, 100(27), artykuł e26442. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000026442>
122. Kim, Y. S., Kim, J.-W., Ha, N.-Y., Kim, J., Ryu, H. S. (2020). Herbal therapies in functional gastrointestinal disorders: a narrative review and clinical implication. *Frontiers in Psychiatry*, 11, artykuł 601. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.00601>
123. Kiokias, S., Proestos, C., Oreopoulou, V. (2020). Phenolic acids of plant origin – a review on their antioxidant activity *in vitro* (O/W Emulsion Systems) along with their *in vivo* health biochemical properties. *Foods*, 9(4), artykuł 534. <https://doi.org/10.3390/foods9040534>
124. Kitagawa, H., Munekage, M., Matsumoto, T., Sadakane, C., Fukutake, M., Aoki, K., Watanabe, J., Maemura, K., Hattori, T., Kase, Y., Uezono, Y., Inui, A., Hanazaki, K. (2015). Pharmacokinetic profiles of active ingredients and its metabolites derived from rikkunshito, a ghrelin enhancer, in healthy Japanese volunteers: a cross-over, randomized study. *PLOS ONE*, 10(7), artykuł e0133159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133159>
125. Kligler, B., Chaudhary, S. (2007). Peppermint oil. *American Family Physician*, 75(7), 1027-1030.
126. Kogo, H., Matsuda, A., Negishi, Y., Morita, R., Yoshida, H. (2025). Is daikenchuto effective for postoperative intestinal dysfunction after gastroenterological cancer surgery? An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Clinical Oncology*, 30(1), 1916-1924. <https://doi.org/10.1007/s10147-025-02854-7>
127. Kolosova, V. B. (2021). Name - text - ritual: the role of plant characteristics in Slavic folk medicine. *Folklorica*, 10(2), 44-61. <https://doi.org/10.17161/folklorica.v10i2.3762>
128. Komisja Europejska (KE). (2020). *Farm to Fork Strategy*. Food Safety. https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
129. Kong, F., Fang, Z., Cui, B., Gao, J., Sun, C., Zhang, S. (2024). Study on the compositional analysis, extraction process, and hemostatic and anti-inflammatory activities of *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.-*Cirsium setosum* (Willd.) MB extracts. *Molecules*, 29(9), artykuł 1918. <https://doi.org/10.3390/molecules29091918>

- 130.Kono, T., Shimada, M., Nishi, M., Morine, Y., Yoshikawa, K., Katsuno, H., Maeda, K., Koeda, K., Morita, S., Watanabe, M., Kusano, M., Sakamoto, J., Saji, S., Sokuoka, H., Sato, Y., Maehara, Y., Kanematsu, T., Kitajima, M. (2019). Daikenchuto accelerates the recovery from prolonged postoperative ileus after open abdominal surgery: a subgroup analysis of three randomized controlled trials. *Surgery Today*, 49(8), 704-711. <https://doi.org/10.1007/s00595-019-01787-9>
- 131.Kozyra, M., Biernasiuk, A., Malm, A., Chowaniec, M. (2015). Chemical compositions and antibacterial activity of extracts obtained from the inflorescences of *Cirsium canum* (L.) all. *Natural Product Research*, 29(21), 2059-2063. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1030341>
- 132.Krych, L., Hansen, C. H. F., Hansen, A. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S. (2013). Quantitatively different, yet qualitatively alike: A meta-analysis of the mouse core gut microbiome with a view towards the human gut microbiome. *PLOS ONE*, 8(5), artykuł e62578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062578>
- 133.Kujawska, M., Łuczaj, Ł., Sosnowska, J., Klepacki, P. (2016). *Rośliny w wierzeniach i zwyczajach ludowych: słownik Adama Fischera*. Polskie Towarzystwo Ludoznawcze.
- 134.Kumar, A. T., Singh, R., Panwar, P. S. (2015). Ancient Indian literature on animal housing and health corroborated by modern literature. *Asian Agri-History*, 19(4), 317-328.
- 135.Kumar, K. S., Sabu, V., Sindhu, G., Rauf, A. A., Helen, A. (2018). Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity. *International Immunopharmacology*, 59, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.04.004>
- 136.Lacy, B. E., Chey, W. D., Epstein, M. S., Shah, S. M., Corsino, P., Zeitzoff, L. R., Cash, B. D. (2022). A novel duodenal-release formulation of caraway oil and L-menthol is a safe, effective and well tolerated therapy for functional dyspepsia. *BMC Gastroenterology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02181-5>
- 137.Lacy, B. E., Crowell, M. D., Mathis, C., Bauer, D., Heinberg, L. J. (2018). Gastroparesis: quality of life and health care utilization. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 52(1), 20-24. <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000000728>
- 138.Lacy, B. E., Mearin, F., Chang, L., Chey, W. D., Lembo, A. J., Simren, M., Spiller, R. (2016). Bowel disorders. *Gastroenterology*, 150(6), 1393-1407.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.031>

- 139.Lalitha, V., Jagadeeswaran, M., Kalpana, K. G., Ramamoothi, M., Sivakumar, T. (2021). Alternation in gut serotonin level induced by ethanolic ripe fruit extract of *Ficus cariaca* and its mechanism against constipation in animal models. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 8(5), 5604-5620.
- 140.Lee, E.-J., Ji, G.-E., Sung, M.-K. (2010). Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells. *Inflammation Research*, 59(10), 847-854. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0196-2>
- 141.Lee, J.-H., Zhou, H. Y., Cho, S. Y., Kim, Y. S., Lee, Y. S., Jeong, C. S. (2007). Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Archives of Pharmacal Research*, 30(10), 1318-1327. <https://doi.org/10.1007/bf02980273>
- 142.Lees, P., Fink-Gremmels, J., Toutain, P. L. (2013). Veterinary pharmacology: history, current status and future prospects. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(2), 105-115. <https://doi.org/10.1111/jvp.12041>
- 143.Lellis, L. F. D., Ullah, H., Morone, M. V., Buccato, D. G., Baldi, A., Minno, A. D., Larsen, D. S., Sacchi, R., Daglia, M. (2024). Efficacy and satisfaction of a chemically characterized *Malva sylvestris* L. extract-based food supplement for functional constipation in healthy consumers: preliminary results of a questionnaire-based survey. *Nutrients*, 17(1), artykuł 77. <https://doi.org/10.3390/nu17010077>
- 144.Lemmens-Gruber, R., Marchart, E., Rawnduzi, P., Engel, N., Benedek, B., Kopp, B. (2011). Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea-pig ilea. *Arzneimittelforschung*, 56(08), 582-588. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296755>
- 145.Li, X., Xin, Y., Mo, Y., Marozik, P., He, T., Guo, H. (2022). The bioavailability and biological activities of phytosterols as modulators of cholesterol metabolism. *Molecules*, 27(2), artykuł 523. <https://doi.org/10.3390/molecules27020523>
- 146.Liao, Z., Chen, X., Wu, M. (2010). Antidiabetic effect of flavones from *Cirsium japonicum* DC in diabetic rats. *Archives of Pharmacal Research*, 33(3), 353-362. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0302-6>

147. Lin, J. H., Panzer, R. (1994). Use of Chinese medicine in veterinary science: history and perspectives. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 13(2), 425-432. <https://doi.org/10.20506/rst.13.2.768>
148. Lisowski, Z. M., Pirie, R. S., Blikslager, A. T., Lefebvre, D., Hume, D. A., Hudson, N. P. H. (2018). An update on equine post-operative ileus: definitions, pathophysiology and management. *Equine Veterinary Journal*, 50(3), 292-303. <https://doi.org/10.1111/evj.12801>
149. Liu, B., Fan, L., Balakrishna, S., Sui, A., Morris, J. B., Jordt, S.-E. (2013). TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain*, 154(10), 2169-2177. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.043>
150. Liu, S., Zhang, J., Li, D., Liu, W., Luo, X., Zhang, R., Li, L., Zhao, J. (2007). Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Natural Product Research*, 21(10), 915-922. <https://doi.org/10.1080/14786410701494686>
151. Loolaie, M., Moasefi, N., Rasouli, H., Adibi, H. (2017). Peppermint and its functionality: a review. *Archives of Clinical Microbiology*, 8(4), 1-16. <https://doi.org/10.4172/1989-8436.100053>
152. Lu, Q.-Y., Rasmussen, A. M., Yang, J., Lee, R.-P., Huang, J., Shao, P., Carpenter, C. L., Gilbuena, I., Thames, G., Henning, S. M., Heber, D., Li, Z. (2019). Mixed spices at culinary doses have prebiotic effects in healthy adults: a pilot study. *Nutrients*, 11(6), artykuł 1425. <https://doi.org/10.3390/nu11061425>
153. Luo, W., Wu, B., Tang, L., Li, G., Chen, H., Yin, X. (2021). Recent research progress of *Cirsium* medicinal plants in China. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, artykuł 114475. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114475>
154. Lv, F., Zhang, Y., Peng, Q., Zhao, X., Hu, D., Wen, J., Liu, K., Li, R., Wang, K., Sun, J. (2022). Apigenin-Mn (II) loaded hyaluronic acid nanoparticles for ulcerative colitis therapy in mice. *Frontiers in Chemistry*, 10, artykuł 969962 <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.969962>
155. Madisch, A., Holtmann, G., Plein, K., Hotz, J. (2004). Treatment of irritable bowel syndrome with herbal preparations: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19(3), 271-279. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01859.x>
156. Maev, I. V., Kucheravy, Y. A., Tsukanov, V. V., Eremnia, E. Y., Andreev, D. N., Abdulhakov, S. R., Akhmedov, V. A., Batskov, S. S., Vasyutin, A. V.,

- V'yuchnova, E. S., Ivanchenko, D. N., Luzina, E. V., Krapivnaya, O. V., Onuchina, E. V., Osipenko, M. F., Simanenkova, V. I., Tonkih, Y. L., Khomeriki, N. M., Shklyayev, A. E., Akimov, A. V. Sokolov, K. A. (2018). Effectiveness of mebeverine in patients with post-cholecystectomy gastrointestinal spasm: results of prospective observational program "odyssey." *Terapevticheskiy Arkhiv*, 90(8), 40–47. <https://doi.org/10.26442/terarkh201890840-47>
157. Mahomoodally, M. F. (2013). Traditional medicines in Africa: an appraisal of ten potent African medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2013/617459>
158. Maleki, S. J., Crespo, J. F., Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, artykuł 125124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>
159. Malfertheiner, P., Holtmann, G., Peitz, U., Birkner, B., Arnold, R., Hotz, J., Leodolter, A., Mössner, J., Robra, B.P. (2001). Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zur Behandlung der Dyspepsie [Guidelines of the German Society of Digestive and Metabolic Diseases for treatment of dyspepsia]. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 39(11), 937-956. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18536>
160. Maliuk, M., Tul, O., Kulida, M., Kovalenko, D. (2024). Prevalence and diagnostic methods of surgical pathology in the digestive system of animals. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 15(1), 104-121. <https://doi.org/10.31548/veterinary1.2024.104>
161. Mannava, S., Vogler, A., Markel, T. (2024). Pathophysiology and management of postoperative ileus in adults and neonates: a review. *Journal of Surgical Research*, 297, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2024.02.001>
162. Marrassini, C., Cogoi, L., Sülsen, V., Anesini, C. (2020). Apigenin-7-glucuronide from *Urera aurantiaca* inhibits tumor necrosis factor alpha and total nitrite release in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), artykuł 6638764. <https://doi.org/10.1155/2020/6638764>
163. Martínez-Vázquez, M. A., Vázquez-Elizondo, G., González-González, J. A., Gutiérrez-Udave, R., Maldonado-Garza, H. J., Bosques-Padilla, F. J. (2012). Effect of antispasmodic agents, alone or in combination, in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Revista de*

<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2012.04.002>

164. Masuy, I., Van Oudenhove, L., Tack, J. (2019). Review article: treatment options for functional dyspepsia. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 49(9), 1134-1172. <https://doi.org/10.1111/apt.15191>
165. Matsumoto, T., Nishikawa, T., Furukawa, A., Itano, S., Tamura, Y., Hasei, T., Watanabe, T. (2017). Antimutagenic effects of polymethoxy flavonoids of *Citrus unshiu*. *Natural Product Communications*, 12(1), 23-26. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200108>
166. McGaw, L. J., Jäger, A. K., van Staden, J. (2002). Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany*, 68(4), 417-423. [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(15\)30367-7](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(15)30367-7)
167. Mearin, F., Malfertheiner, P. (2017). Functional gastrointestinal disorders: complex treatments for complex pathophysiological mechanisms. *Digestive Diseases*, 35(Suppl. 1), 1-4. <https://doi.org/10.1159/000485407>
168. Mehmood, M. H., Munir, S., Khalid, U. A., Asrar, M., Gilani, A. H. (2015). Antidiarrheal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K⁺-channels activation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), artykuł 75. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0595-6>
169. Meineri, G., Martello, E., Radice, E., Bruni, N., Saettone, V., Atuahene, D., Armandi, A., Testa, G., Ribaldone, D. G. (2022). Chronic intestinal disorders in humans and pets: current management and the potential of nutraceutical antioxidants as alternatives. *Animals*, 12(7), artykuł 812. <https://doi.org/10.3390/ani12070812>
170. Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Karlik, W. (2017). Interactions between erythromycin, flunixin meglumine, levamisole and plant secondary metabolites towards bovine gastrointestinal motility-*in vitro* study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(2), 281-291. <https://doi.org/10.1111/jvp.12455>
171. Mendel, M., Chłopecka, M., Latek, U., Karlik, W., Tomczykowa, M., Strawa, J., Tomczyk, M. (2020). Evaluation of the effects of *Bidens tripartita* extracts and their main constituents on intestinal motility - an *ex vivo* study. *Journal of*

- Ethnopharmacology*, 259, artykuł 112982.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112982>
172. Merat, S., Khalili, S., Mostajabi, P., Ghorbani, A., Ansari, R., Malekzadeh, R. (2009). The effect of enteric-coated, delayed-release peppermint oil on irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(5), 1385-1390.
<https://doi.org/10.1007/s10620-009-0854-9>
 173. Mestorino, N., Reeve-Johnson, L. (2023). Editorial: Phytotherapeutic alternatives in veterinary medicine, vol II. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, artykuł 1174494. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1174494>
 174. Metzler-Zebeli, B. U., Koger, S., Sharma, S., Sener-Aydemir, A., Ruczizka, U., Kreutzmann, H., Ladinig, A. (2022). Short-chain fatty acids modulate permeability, motility and gene expression in the porcine fetal jejunum *ex vivo*. *Nutrients*, 14(12), artykuł 2524. <https://doi.org/10.3390/nu14122524>
 175. Micallef, M. A., Garg, M. L. (2009). Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis*, 204(2), 476-482.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.020>
 176. Michael, S., Kelber, O., Hauschildt, S., Spanel-Borowski, K., Nieber, K. (2009). Inhibition of inflammation-induced alterations in rat small intestine by the herbal preparations STW 5 and STW 6. *Phytomedicine*, 16(2-3), 161-171.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.10.011>
 177. Micklefield, G., Jung, O., Greving, I., May, B. (2003). Effects of intraduodenal application of peppermint oil (WS® 1340) and caraway oil (WS® 1520) on gastroduodenal motility in healthy volunteers. *Phytotherapy Research*, 17(2), 135-140. <https://doi.org/10.1002/ptr.1089>
 178. Mir, S. A., Dar, A., Hamid, L., Nisar, N., Malik, J. A., Ali, T., Bader, G. N. (2024). Flavonoids as promising molecules in the cancer therapy: an insight. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 6, artykuł 100167.
<https://doi.org/10.1016/j.crphar.2023.100167>
 179. Mito Pharma (b.d.), *Dyspep - Intercell® Karczoch ekstrakt i imbir*. <https://www.mito-pharma.pl/product-pol-161-Dyspep-Intercell-R-Karczoch-ekstrakt-i-imbir.html>
 180. Miwa, H., Ghoshal, U. C., Fock, K. M., Gonlachanvit, S., Gwee, K., Ang, T., Chang, F., Hongo, M., Hou, X., Kachintorn, U., Ke, M., Lai, K., Lee, K. J., Lu,

- C., Mahadeva, S., Miura, S., Park, H., Rhee, P., Sugano, K., Vilaichone, R.-k., Wong, B.C.Y., Bak, Y. (2012). Asian consensus report on functional dyspepsia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(4), 626-641. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07037.x>
181. Morishita, T. Y., Porter, R. E., Jr. (2021). Gastrointestinal and hepatic diseases. W: C. B. Greenacre, T. Y. Morishita (red.), *Backyard Poultry Medicine and Surgery*. John Wiley & Sons, Inc.
182. Moscatelli, V., Hnatyszyn, O., Acevedo, C., Megías, J., Alcaraz, M., Ferraro, G. (2006). Flavonoids from *Artemisia copa* with anti-inflammatory activity. *Planta Medica*, 72(01), 72-74. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873177>
183. Mousavi, T., Sharifnia, M., Nikfar, S., Abdollahi, M. (2023). Pharmacotherapy for gastric and intestinal cramping pain: current and emerging therapies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 24(18), 2021-2033. <https://doi.org/10.1080/14656566.2023.2265830>
184. Müller-Lissner, S., Schäfer, E., Kondla, A. (2011). Symptoms and their interpretation in patients self-treating abdominal cramping and pain with a spasmolytic (butylscopolamine bromide) – a pharmacy-based survey. *Pharmacology & Pharmacy*, 02(02), 82-87. <https://doi.org/10.4236/pp.2011.22010>
185. Nagpal, R., Kaur, V., Kumar, M., Marotta, F. (2012). Effect of *Aloe vera* juice on growth and activities of *Lactobacilli in-vitro*. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*, 83(3), 183-188.
186. Nam, Y., Min, Y. S., Sohn, U. D. (2018). Recent advances in pharmacological research on the management of irritable bowel syndrome. *Archives of Pharmacal Research*, 41(10), 955-966. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1068-5>
187. Nazaruk, J. (2008). Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north-east region of Poland. *Fitoterapia*, 79(3), 194-196. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.008>
188. Nazaruk, J. (2009). Flavonoid compounds from *Cirsium palustre* (L.) Scop. flower heads. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 525–527. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.05.012>
189. Nazaruk, J., Czechowska, S. K., Markiewicz, R., Borawska, M. H. (2008). Polyphenolic compounds and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of

- aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. *Natural Product Research*, 22(18), 1583-1588. <https://doi.org/10.1080/14786410701825053>
190. Nazaruk, J., Galicka, A. (2014). The Influence of selected flavonoids from the leaves of *Cirsium palustre* (L.) Scop. on collagen expression in human skin fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 28(9), 1399-1405. <https://doi.org/10.1002/ptr.5143>
 191. Nazaruk, J., Gudej, J. (2003). Flavonoid compounds from the flowers of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 60(1), 87-89.
 192. Nazaruk, J., Jablonski, J. (2011). Chemical constituents of chloroform and petroleum extracts from *Cirsium palustre* flower heads. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(4), 654-655. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-0023-1>
 193. Nazaruk, J., Karna, E., Kalembe, D. (2012). The chemical composition of the essential oils of *Cirsium palustre* and *C. rivulare* and their antiproliferative effect. *Natural Product Communications*, 7(2), 269-272. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200700242>
 194. Nazaruk, J., Wajs-Bonikowska, A., Bonikowski, R. (2012). Components and antioxidant activity of fruits of *Cirsium palustre* and *C. rivulare*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(1), 8-10. <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0147-y>
 195. Ng, J. J. Y., Yusoff, N. A. H., Elias, N. A., Norhan, N. A.-S., Harun, N. A., Abdullah, F., Ishak, A. N., Hassan, M. (2023). Phytotherapy use for disease control in aquaculture: a review of the last 5 years. *Aquaculture International*, 32(3), 2687-2712. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01292-4>
 196. Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>
 197. Nigussie, T., Zhang, L., Wang, R., Wang, X., Li, J., Liu, C. (2019). Flavonoids in a crude extract of *Catha edulis* inhibit rat intestinal contraction via blocking Ca²⁺ channels. *Neurogastroenterology & Motility*, 31(7). <https://doi.org/10.1111/nmo.13602>
 198. Nowak-Wegrzyn, A., Szajewska, H., Lack, G. (2016). Food allergy and the gut. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(4), 241-257. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.187>
 199. One Health High-Level Expert Panel (OHHLEP), Adisasmito, W. B., Almuhairi, S., Behraves, C. B., Bilivogui, P., Bukachi, S. A., Casas, N., Cediell Becerra, N.,

- Charron, D. F., Chaudhary, A., Ciacchi Zanella, J. R., Cunningham, A. A., Dar, O., Debnath, N., Dungu, B., Farag, E., Gao, G. F., Hayman, D. T. S., Khaita, M., Koopmans, M. P. G., Machalaba, C., Mackenzie, J. S., Markotter, W., Mettenleiter, T. C., Morand, S., Smolenskiy, V., Zhou, L. (2022). One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. *PLOS Pathogens*, 18(6), artykuł e1010537. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010537>
- 200.Orifarm Healthcare Sp. z o.o. (2024), *Amol - stosowanie, działanie, dawkowanie - naturalne zioła od 100 lat*. <https://www.amol.pl/amol/stosowanie>
- 201.Ottillinger, B., Storr, M., Malfertheiner, P., Allescher, H.-D. (2012). STW 5 (Iberogast®)-a safe and effective standard in the treatment of functional gastrointestinal disorders. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 163(3-4), 65-72. <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0169-x>
- 202.Oude Nijhuis, R. A. B., Kuipers, T., Oors, J. M., Herregods, T. V. K., Kessing, B. F., Schuitenmaker, J. M., Smout, A. J. P. M., Bredenoord, A. J. (2023). The effect of STW5 (Iberogast) on reflux symptoms in patients with concurrent dyspeptic symptoms: a double-blind randomized placebo-controlled crossover trial. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 30(1), 54-63. <https://doi.org/10.5056/jnm23014>
- 203.Ożarowski, A., Jaroniewski, W., Muszyński, J. (1987). *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych.
- 204.Palacz-Wrobel, M., Borkowska, P., Paul-Samojedny, M., Kowalczyk, M., Fila-Danilow, A., Suchanek-Raif, R., Kowalski, J. (2017). Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 1205-1212. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.054>
- 205.Pan, S.-Y., Litscher, G., Gao, S.-H., Zhou, S.-F., Yu, Z.-L., Chen, H.-Q., Zhang, S.-F., Tang, M.-K., Sun, J.-N., Ko, K.-M. (2014). Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2014, artykuł 525340. <https://doi.org/10.1155/2014/525340>
- 206.Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, artykuł e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

207. Panda, S. K., Nirvanashetty, S., Parachur, V. A., Krishnamoorthy, C., Dey, S. (2020). A randomized, double-blind, placebo controlled, parallel-group, comparative clinical study to evaluate the efficacy and safety of OLNP-06 versus placebo in subjects with functional dyspepsia. *Journal of Dietary Supplements*, 19(2), 226-237. <https://doi.org/10.1080/19390211.2020.1856996>
208. Parkman, H. P., Sharkey, E., McCallum, R. W., Hasler, W. L., Koch, K. L., Sarosiek, I., Abell, T. L., Kuo, B., Shulman, R. J., Grover, M., Farrugia, G., Schey, R., Tonascia, J., Hamilton, F., Pasricha, P. J. (2022). Constipation in patients with symptoms of gastroparesis: analysis of symptoms and gastrointestinal transit. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 20(3), 546-558.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.10.045>
209. Parkman, H. P., Wilson, L. A., Yates, K. P., Koch, K. L., Abell, T. L., McCallum, R. W., Sarosiek, I., Kuo, B., Malik, Z., Schey, R., Shulman, R. J., Grover, M., Farrugia, G., Miriel, L., Tonascia, J., Hamilton, F., Pasricha, P. J. (2021). Factors that contribute to the impairment of quality of life in gastroparesis. *Neurogastroenterology & Motility*, 33(8), artykuł e14087. <https://doi.org/10.1111/nmo.14087>
210. Peng, J., Xiao, R., Wu, C., Zheng, Z., Deng, Y., Chen, K., Xiang, Y., Xu, C., Zou, L., Liao, M., Zhang, J. (2024). Characterization of the prevalence of *Salmonella* in different retail chicken supply modes using genome-wide and machine-learning analyses. *Food Research International*, 191, artykuł 114654. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114654>
211. Peng, M. (2019). The growing market of organic foods: impact on the US and global economy. W: *Safety and Practice for Organic Food* (s. 3-22). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812060-6.00001-5>
212. Pesch, L. (2014). Holistic pediatric veterinary medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44(2), 355-366. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.11.003>
213. Phutsisen, J., Kietpeerakool, C., Jampathong, N., Chumworathayi, B., Temtanakitpaisan, A., Aue-aungkul, A., Boontasaeng, P. (2019). Effects of *Cassia alata* Linn on bowel function recovery following surgery for gynecological cancer: a randomized controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 47, artykuł 102222. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102222>

214. Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., Lampi, A.-M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 939-966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)
215. Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417-429. <https://doi.org/10.1056/nejmra020831>
216. Pons, T. L., During, H. J. (1987). Biennial behaviour of *Cirsium palustre* in ash coppice. *Ecography*, 10(1), 40-44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1987.tb00736.x>
217. Pośluszny, M., Szadkowska, D., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Benarbia, M. el A., Mendel, M. (2021). *Melissa officinalis* as gut contractility modifier in swine - *ex vivo* study. *Planta Medica*, 87(15): 1260-1261. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0041-1736817>
218. Prescott, J. F. (2017). History and current use of antimicrobial drugs in veterinary medicine. *Microbiology Spectrum*, 5(6), artykuł 10.1128/microbiolspec.arba-0002-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0002-2017>
219. Quan, N. V., Dang Xuan, T., Teschke, R. (2020). Potential hepatotoxins found in herbal medicinal products: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), artykuł 5011. <https://doi.org/10.3390/ijms21145011>
220. Quintavalla, F. (2024). Phytotherapeutic approaches in canine pediatrics. *Veterinary Sciences*, 11(3), artykuł 133. <https://doi.org/10.3390/vetsci11030133>
221. Raditic, D. M. (2015). Complementary and integrative therapies for lower urinary tract diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(4), 857-878. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.02.009>
222. Rahimi, R. (2012). Herbal medicines for the management of irritable bowel syndrome: a comprehensive review. *World Journal of Gastroenterology*, 18(7), artykuł 589. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i7.589>
223. Rashmi, H. B., Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: a review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136, artykuł 109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
224. Rashrash, M., Schommer, J. C., Brown, L. M. (2017). Prevalence and predictors of herbal medicine use among adults in the United States. *Journal of Patient Experience*, 4(3), 108-113. <https://doi.org/10.1177/2374373517706612>

- 225.Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.
[https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00154-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00154-9)
- 226.Renda, G., Gökkaya, İ., Şöhretoğlu, D. (2021). Immunomodulatory properties of triterpenes. *Phytochemistry Reviews*, 21(2), 537-563.
<https://doi.org/10.1007/s11101-021-09785-x>
- 227.Romero, B., Susperregui, J., Sahagún, A. M., Díez, M. J., Fernández, N., García, J. J., López, C., Sierra, M., Díez, R. (2022). Use of medicinal plants by veterinary practitioners in Spain: a cross-sectional survey. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, artykuł 1060738. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1060738>
- 228.Rose, E. C., Blikslager, A. T., Ziegler, A. L. (2022). Porcine models of the intestinal microbiota: the translational key to understanding how gut commensals contribute to gastrointestinal disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, artykuł 834598. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.834598>
- 229.Rotondo, A., Serio, R., Mulè, F. (2009). Gastric relaxation induced by apigenin and quercetin: Analysis of the mechanism of action. *Life Sciences*, 85(1-2), 85-90.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.04.022>
- 230.Ruifeng, G., Yunhe, F., Zhengkai, W., Ershun, Zhou, Yimeng, L., Minjun, Y., Xiaojing, S., Zhengtao, Y., Naisheng, Z. (2014). Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF-κB signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 729, 54-58.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.015>
- 231.Russo, R., Autore, G., Severino, L. (2009). Pharmaco-toxicological aspects of herbal drugs used in domestic animals. *Natural Product Communications*, 4(12), artykuł 1934578X0900401. <https://doi.org/10.1177/1934578x0900401230>
- 232.Rutkowski, L. (2008). *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- 233.Sadeghi Mansoorkhani, H., Alamdari, M., Hasanzadeh, S., Jokar, S., Panahi Kokhdan, E., Malekzadeh, J., Abassi, R. (2021). Effect of *Rosa damascene* Mill. hydroalcoholic extract on the treatment of chronic idiopathic constipation in adults. *Journal of Clinical Care and Skills*, 2(1), 29-34.
<https://doi.org/10.52547/jccs.2.1.29>
- 234.Sadraei, H., Ghanadian, M., Asghari, G., Sekhavati, N. (2018). Antispasmodic activity of apigenin and luteolin, two components of *Dracocephalum kotschy*

- extract, on rat ileum contractions. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 7(2), 100-105. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.17>
- 235.Sadraei, H., Ghanadian, S. M., & Moazeni, S. (2019). Inhibitory effect of hydroalcoholic and flavonoids extracts of *Dracocephalum kotschyi*, and its components luteolin, apigenin and apigenin-4'-galactoside on intestinal transit in mice. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 8(1), 8–13. <https://doi.org/10.15171/jhp.2019.02>
- 236.Saegusa, Y., Hattori, T., Nahata, M., Yamada, C., Takeda, H. (2015). A new strategy using rikkunshito to treat anorexia and gastrointestinal dysfunction. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/364260>
- 237.Saha, L. (2014). Irritable bowel syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 20(22), artykuł 6759. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6759>
- 238.Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., Nigam, M., Mishra, A. P., Konovalov, D. A., Orobinskaya, V., Abu-Reidah, I. M., Zam, W., Sharopov, F., Venneri, T., Capasso, R., Kukula-Koch, W., Wawruszak, A., Koch, W. (2021). Phytosterols: from preclinical evidence to potential clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, artykuł 599959. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.599959>
- 239.Salimi Zadak, R., Khalili, G., Motamedi, M., Bakhtiari, S. (2023). The effect of chamomile on flatulence after the laparoscopic cholecystectomy: a randomized triple-blind placebo-controlled clinical trial. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 14(3), artykuł 100735. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2023.100735>
- 240.Salvatore, S., Carlino, M., Sestito, S., Concolino, D., Agosti, M., Pensabene, L. (2024). Nutraceuticals and pain disorders of the gut-brain interaction in infants and children: a narrative review and practical insights. *Nutrients*, 16(3), artykuł 349. <https://doi.org/10.3390/nu16030349>
- 241.Scarpellini, E., Broeders, B., Schol, J., Santori, P., Addarii, M., Boccuto, L., Carbone, F., Abenavoli, L., Tack, J. (2023). The use of peppermint oil in gastroenterology. *Current Pharmaceutical Design*, 29(8), 576-583. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230328163449>
- 242.Schaaf, C. R., Gonzalez, L. M. (2022). Use of translational, genetically modified porcine models to ultimately improve intestinal disease treatment. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, artykuł 878952. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.878952>

- 243.Schelstraete, W., Clerck, L. D., Govaert, E., Millemcam, J., Devreese, M., Deforce, D., Bocxlaer, J. V., Croubels, S. (2019). Characterization of porcine hepatic and intestinal drug metabolizing CYP450: comparison with human orthologues from a quantitative, activity and selectivity perspective. *Scientific Reports*, 9(1), artykuł 9233. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45212-0>
- 244.Schmid, S. M., Hoffman, J. M., Gould, E. N., Moon, A., Creevy, K. E. (2024). Cross-sectional survey of 43,517 dogs in the Dog Aging Project identifies owner-reported lifetime prevalence and characteristics of gastrointestinal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 262(12), 1-9. <https://doi.org/10.2460/javma.24.05.0306>
- 245.Sharma, A., Rao, S. (2016). Constipation: pathophysiology and current therapeutic approaches. W: B. Greenwood-Van Meerveld (red.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (s. 59-74). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2016_111
- 246.Shimada, M., Morine, Y., Nagano, H., Hatano, E., Kaiho, T., Miyazaki, M., Kono, T., Kamiyama, T., Morita, S., Sakamoto, J., Kusano, M., Saji, S., Kanematsu, T., Kitajima, M. (2014). Effect of TU-100, a traditional Japanese medicine, administered after hepatic resection in patients with liver cancer: a multi-center, phase III trial (JFMC40-1001). *International Journal of Clinical Oncology*, 20(1), 95-104. <https://doi.org/10.1007/s10147-014-0678-2>
- 247.Shulman, R. J., Chumpitazi, B. P., Abdel-Rahman, S. M., Garg, U., Musaad, S., Kearns, G. L. (2021). Randomised trial: peppermint oil (menthol) pharmacokinetics in children and effects on gut motility in children with functional abdominal pain. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(3), 1321-1333. <https://doi.org/10.1111/bcp.15076>
- 248.Silveira, N. S. da, Oliveira-Silva, G. L. de Lamanes, B. de F., Prado, L. C. da S., Bispo-da-Silva, L. B. (2014). The aversive, anxiolytic-like, and verapamil-sensitive psychostimulant effects of pulegone. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(5), 771-778. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00832>
- 249.Simmen, U., Kelber, O., Okpanyi, S. N., Jaeggi, R., Bueter, B., Weiser, D. (2006). Binding of STW 5 (Iberogast®) and its components to intestinal 5-HT, muscarinic M3, and opioid receptors. *Phytomedicine*, 13, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.03.012>

250. Sitohang, N. S., Sabrina, N. N., Ferizon, A. F., Raffi Arrasyid, M., Adenina, S. (2024). Evaluation of herbal medicines and animal experimentation. *International Journal of Islamic and Complementary Medicine*, 5(1), 1-6. <https://doi.org/10.55116/ijicm.v5i1.70>
251. Skalicka-Woźniak, K., Los, R., Głowniak, K., Malm, A. (2010). Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(11), 2748-2754. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000008>
252. Snijman, P. W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, I. R., Gelderblom, W. C. A. (2007). The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(2), 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.03.009>
253. Solecki, R. S. (1975). Shanidar IV, a neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*, 190(4217), 880-881. <https://doi.org/10.1126/science.190.4217.880>
254. Sperber, A. D., Bangdiwala, S. I., Drossman, D. A., Ghoshal, U. C., Simren, M., Tack, J., Whitehead, W. E., Dumitrascu, D. L., Fang, X., Fukudo, S., Kellow, J., Okeke, E., Quigley, E. M. M., Schmulson, M., Whorwell, P., Archampong, T., Adibi, P., Andresen, V., Benninga, M. A., ... Palsson, O. S. (2021). Worldwide Prevalence and Burden of Functional Gastrointestinal Disorders, Results of Rome Foundation Global Study. *Gastroenterology*, 160(1), 99–114.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.014>
255. Stace, C. A. (1975). *Hybridization and the Flora of the British Isles*. Academic Press.
256. Stanossek, I., Wehrend, A. (2022). Application of veterinary naturopathy and complementary medicine in small animal medicine – a survey among German veterinary practitioners. *PLOS ONE*, 17(2), artykuł e0264022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264022>
257. Storr, M., Weigmann, H., Landes, S., Michel, M. C. (2022). Self-medication for the treatment of abdominal cramps and pain – a real-life comparison of three frequently used preparations. *Journal of Clinical Medicine*, 11(21), artykuł 6361. <https://doi.org/10.3390/jcm11216361>
258. Strawa, J. W., Jakimiuk, K., Kita, Z., Tomczyk, M. (2022). *In vitro* screening for anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of *Hottonia palustris* L.

- extracts and their unusual flavonoids. *Molecules*, 27(22), artykuł 8034. <https://doi.org/10.3390/molecules27228034>
259. Strawa, J., Wajs-Bonikowska, A., Jakimiuk, K., Waluk, M., Poślednik, M., Nazaruk, J., Tomczyk, M. (2020). Phytochemical examination of woolly burdock *Arctium tomentosum* leaves and flower heads. *Chemistry of Natural Compounds*, 56(2), 345–347. <https://doi.org/10.1007/s10600-020-03027-w>
 260. Sturm, J., Krause, E. H. L., Lutz, K. G. (1905). *J. Sturms flora von Deutschland in abbildungen nach der natur: phanerogamen. haufenblütige*. K. G. Lutz.
 261. Sun, W.-L., Yang, J.-W., Dou, H.-Y., Li, G.-Q., Li, X.-Y., Shen, L., Ji, H.-F. (2021). Anti-inflammatory effect of luteolin is related to the changes in the gut microbiota and contributes to preventing the progression from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis. *Bioorganic Chemistry*, 112, artykuł 104966. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104966>
 262. Suzuki, H., Matsuzaki, J., Fukushima, Y., Suzaki, F., Kasugai, K., Nishizawa, T., Naito, Y., Hayakawa, T., Kamiya, T., Andoh, T., Yoshida, H., Tokura, Y., Nagata, H., Kobayakawa, M., Mori, M., Kato, K., Hosoda, H., Takebayashi, T., Miura, S., ... Tack, J. (2014). Randomized clinical trial: rikkunshito in the treatment of functional dyspepsia – a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Neurogastroenterology & Motility*, 26(7), 950-961. <https://doi.org/10.1111/nmo.12348>
 263. Szadkowska, D., Chłopecka, M., Strawa, J. W., Jakimiuk, K., Augustynowicz, D., Tomczyk, M., & Mendel, M. (2023). Effects of *Cirsium palustre* extracts and their main flavonoids on colon motility – an *ex vivo* study. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), artykuł 7283. <https://doi.org/10.3390/ijms242417283>
 264. Szewczyk, K., Bogucka-Kocka, A., Vorobets, N., Grzywa-Celińska, A., Granica, S. (2020). Phenolic composition of the leaves of *Pyrola rotundifolia* L. and their antioxidant and cytotoxic activity. *Molecules*, 25(7), artykuł 1749. <https://doi.org/10.3390/molecules25071749>
 265. Śródka, A. (2003). The short history of gastroenterology. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(S3), 9-21.
 266. Tack, J. (2012). Functional diarrhea. *Gastroenterology Clinics of North America*, 41(3), 629-637. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2012.06.007>
 267. Takeda, H., Muto, S., Nakagawa, K., Ohnishi, S., Sadakane, C., Saegusa, Y., Nahata, M., Hattori, T., Asaka, M. (2012). Rikkunshito as a ghrelin enhancer. W:

- Methods in Enzymology* (s. 333-351). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381272-8.00021-0>
268. Tamminen, L.-M., Emanuelson, U., Blanco-Penedo, I. (2018). Systematic review of phytotherapeutic treatments for different farm animals under European conditions. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, artykuł 140. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00140>
 269. Thacker, E. L. (2010). Immunomodulators, immunostimulants, and immunotherapies in small animal veterinary medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(3), 473-483. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.01.004>
 270. Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A. (2014). Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 225-257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
 271. Thomson, J. R., Friendship, R. M. (2019). Digestive system. W: J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, J. Zhang (red.), *Diseases of Swine* (s. 234-263). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch15>
 272. Tillisch, K. (2006). Complementary and alternative medicine for functional gastrointestinal disorders. *Gut*, 55(5), 593-596. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.078089>
 273. Timmermans, J.-P., Hens, J., Adriaensen, D. (2001). Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *The Anatomical Record*, 262(1), 71-78. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<71::aid-ar1012>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<71::aid-ar1012>3.0.co;2-a)
 274. Tome, J., Kamboj, A. K., Loftus, C. G. (2023). Approach to disorders of gut-brain interaction. *Mayo Clinic Proceedings*, 98(3), 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2022.11.001>
 275. Tominaga, K., Arakawa, T. (2015). Clinical application of kampo medicine (rikkunshito) for common and/or intractable symptoms of the gastrointestinal tract. *Frontiers in Pharmacology*, 6, artykuł 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00007>
 276. Törnblom, H., Lang, B., Clover, L., Knowles, C. H., Vincent, A., Lindberg, G. (2007). Autoantibodies in patients with gut motility disorders and enteric

- neuropathy. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(11), 1289-1293.
<https://doi.org/10.1080/00365520701396216>
277. Treuting, P. M., Arends, M. J., Dintzis, S. M. (2017). Lower gastrointestinal tract. W: P. M. Treuting, S. M. Dintzis, K. S. Montine (red.), *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. Academic Press.
278. Trinkley, K. E., Nahata, M. C. (2014). Medication Management of Irritable Bowel Syndrome. *Digestion*, 89(4), 253-267. <https://doi.org/10.1159/000362405>
279. Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. (1964). *Flora Europaea: Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. Cambridge University Press.
280. Ul, Z., Khan, H., Khan, S., Wan, P. (2013). *In vitro* antimicrobial activity of the chemical constituents of *Cirsium arvense* (L). *Scop. Journal of Medicinal Plants Research*, 7(25), 1894-1898. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5090>
281. Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H., Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 25(22), artykuł 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
282. Umezu, T. (2009). Evidence for dopamine involvement in ambulation promoted by menthone in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(3), 315-320. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.07.017>
283. Usai-Satta, P., Lai, M., Oppia, F., Cabras, F. (2022). Effects of prokinetics on the digestive tract. *Current Reviews in Clinical and Experimental Pharmacology*, 17(3), 161-165. <https://doi.org/10.2174/2772432816666210805125813>
284. van Oostrom, S. H., Gijzen, R., Stirbu, I., Korevaar, J. C., Schellevis, F. G., Picavet, H. S. J., Hoeymans, N. (2016). Time trends in prevalence of chronic diseases and multimorbidity not only due to aging: data from general practices and health surveys. *PLOS ONE*, 11(8), artykuł e0160264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160264>
285. Venara, A., Meillat, H., Cotte, E., Ouaisi, M., Duchalais, E., Mor-Martinez, C., Wolthuis, A., Regimbeau, J. M., Ostermann, S., Hamel, J. F., Joris, J., Slim, K., Chapuis, O., Guignard, B., Saint Denis, M., Sirieix, D., Arimont, J., Figuet, S., Milou, F., ... Dileon, S. (2019). Incidence and risk factors for severity of postoperative ileus after colorectal surgery: a prospective registry data analysis.

- World Journal of Surgery*, 44(3), 957-966. <https://doi.org/10.1007/s00268-019-05278-3>
286. Vishwakarma, M., Patel, A., Jain, D. (2024). A review of current research on traditional medicines for the treatment of gastrointestinal and biliary disorders. *Current Traditional Medicine*, 10(3), 129-148.
 287. Vlismas, L., Wu, W., Ho, V. (2024). Idiopathic slow transit constipation: pathophysiology, diagnosis, and management. *Medicina*, 60(1), artykuł 108. <https://doi.org/10.3390/medicina60010108>
 288. von Arnim, U., Peitz, U., Vinson, B., Gundermann, K.-J., Malfertheiner, P. (2007). STW 5, a phytopharmakon for patients with functional dyspepsia: results of a multicenter, placebo-controlled double-blind study. *The American Journal of Gastroenterology*, 102(6), 1268-1275. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.01183.x>
 289. Vriesman, M. H., Koppen, I. J. N., Camilleri, M., Di Lorenzo, C., Benninga, M. A. (2019). Management of functional constipation in children and adults. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(1), 21-39. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0222-y>
 290. Wahid, M., Saqib, F., Qamar, M., Ziora, Z. M. (2022). Antispasmodic activity of the ethanol extract of *Citrullus lanatus* seeds: justifying ethnomedicinal use in Pakistan to treat asthma and diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 295, artykuł 115314. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115314>
 291. Wal, A., Debnath, B., Verma, N., Bhattacharya, S., Shivajirao Solunke, R., Masih Uzzaman Khan, M., Wal, P. (2022). Role of herbal medicine, acupressure and acupuncture in the treatment of irritable bowel syndrome. W: *Medicinal plants - harnessing the healing power of plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108757>
 292. Walters, E. M., Prather, R. S. (2013). Advancing swine models for human health and diseases. *Missouri Medicine*, 110(3), 212-215.
 293. Waluga, M. (2021). Zaparcie - co powinien wiedzieć lekarz. *Medycyna Po Dyplomie*, 30(9).
 294. Wdowiak, L. (2013). Alkohol - panaceum medycyny ludowej dawnych ziem polskich w XIX stuleciu i na początku XX w. Część I. Ograzka, kolera, czerwotka, laksy, bóleści w dołku, żółtaczka, kolki i suchoty. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 19(3), 337-343.

295. Weerts, Z. Z. R. M., Essers, B. A. B., Jonkers, D. M. A. E., Willems, J. I. A., Janssen, D. J. P. A., Witteman, B. J. M., Clemens, C. H. M., Westendorp, A., Masclee, A. A. M., Keszthelyi, D. (2021). A trial-based economic evaluation of peppermint oil for the treatment of irritable bowel syndrome. *United European Gastroenterology Journal*, 9(9), 997-1006. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12134>
296. World Health Organization. (2022). *African Traditional Medicine Day 2022*. WHO | Regional Office for Africa. <https://www.afro.who.int/regional-director/speeches-messages/african-traditional-medicine-day-2022>
297. Wilson, D. J., Kelly, E. J., Gucwa, S. (2022). Causes of mortality of dairy cattle diagnosed by complete necropsy. *Animals*, 12(21), artykuł 3001. <https://doi.org/10.3390/ani12213001>
298. Włodarczyk, J., Waśniewska, A., Fichna, J., Dziki, A., Dziki, Ł., Włodarczyk, M. (2021). Current overview on clinical management of chronic constipation. *Journal of Clinical Medicine*, 10(8), artykuł 1738. <https://doi.org/10.3390/jcm10081738>
299. World Health Organization. (2001). *Legal status of traditional medicine and complementary/alternative medicine: a worldwide review*. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EDM-TRM-2001.2>
300. World Health Organization. (2023). *Traditional medicine*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>
301. Wu, J.-Y., Chen, Y.-J., Bai, L., Liu, Y.-X., Fu, X.-Q., Zhu, P.-L., Li, J.-K., Chou, J.-Y., Yin, C.-L., Wang, Y.-P., Bai, J.-X., Wu, Y., Wu, Z.-Z., Yu, Z.-L. (2020). Chrysoeriol ameliorates TPA-induced acute skin inflammation in mice and inhibits NF- κ B and STAT3 pathways. *Phytomedicine*, 68, artykuł 153173. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153173>
302. Wynn, S. G., Fougere, B. (2006). *Veterinary herbal medicine*. Elsevier Health Sciences.
303. Xia, Y., Peng, S., Lin, M., Duan, H., Yuan, F., Shao, M., Tan, W., Luo, H. (2023). Apigenin attenuates visceral hypersensitivity in water avoidance stress rats by modulating the microbiota-gut-brain axis and inhibiting mast cell activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, artykuł 115562. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115562>
304. Xiao, H.-T., Zhong, L., Tsang, S.-W., Lin, Z.-S., Bian, Z.-X. (2015). Traditional Chinese Medicine formulas for irritable bowel syndrome: from ancient wisdoms

- to scientific understandings. *The American Journal of Chinese Medicine*, 43(01), 1-23. <https://doi.org/10.1142/s0192415x15500019>
305. Xiao, L., Estellé, J., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Xia, Z., Feng, Q., Liang, S., Pedersen, A. Ø., Kjeldsen, N. J., Liu, C., Maguin, E., Doré, J., Pons, N., Le Chatelier, E., Prifti, E., Li, J., Jia, H., Liu, X., Xu, X., ... Wang, J. (2016). A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology*, 1(12), artykuł 16161. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.161>
 306. Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S. B., Xia, Z., Qiu, X., Li, X., Long, H., Zhang, J., Zhang, D., Liu, C., Fang, Z., Chou, J., Glanville, J., Hao, Q., Kotowska, D., Colding, C., Licht, T. R., Wu, D., ... Kristiansen, K. (2015). A catalog of the mouse gut metagenome. *Nature Biotechnology*, 33(10), 1103-1108. <https://doi.org/10.1038/nbt.3353>
 307. Xie, H., Preast, V. (2013). *Traditional Chinese Veterinary Medicine: fundamental principles 2nd edition*. Chi Institute Press.
 308. Xie, J., Xiong, J., Ding, L.-S., Chen, L., Zhou, H., Liu, L., Zhang, Z.-F., Hu, X.-M., Luo, P., Qing, L.-S. (2018). A efficient method to identify cardioprotective components of Astragali Radix using a combination of molecularly imprinted polymers-based knockout extract and activity evaluation. *Journal of Chromatography A*, 1576, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.027>
 309. Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), artykuł 1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
 310. Yamada, C., Hattori, T., Ohnishi, S., Takeda, H. (2021). Ghrelin enhancer, the latest evidence of rikkunshito. *Frontiers in Nutrition*, 8, artykuł 761631. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.761631>
 311. Yang, M., Zhou, Y., Wan, L., Ye, J., Lu, H.-L., Huang, X., Xu, W.-X. (2020). Luteolin suppresses colonic smooth muscle motility via inhibiting L-type calcium channel currents in mice. *General Physiology and Biophysics*, 39(01), 49-58. https://doi.org/10.4149/gpb_2019045
 312. Yin, L., Yang, H., Li, J., Li, Y., Ding, X., Wu, G., Yin, Y. (2017). Pig models on intestinal development and therapeutics. *Amino Acids*, 49(12), 2099-2106. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2497-z>
 313. Yu, M.-C., Chen, J.-H., Lai, C.-Y., Han, C.-Y., Ko, W.-C. (2010). Luteolin, a non-selective competitive inhibitor of phosphodiesterases 1-5, displaced [3H]-rolipram

- from high-affinity rolipram binding sites and reversed xylazine/ketamine-induced anesthesia. *European Journal of Pharmacology*, 627(1-3), 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.031>
- 314.Zarei, M., Izadi Dastenaiei, Z., Jabbari, S. (2020). Pain relief and kaempferol: activation of transient receptors potential vanilloid type 1 in male rats. *Pajouhan Scientific Journal*, 18(2), 81-89. <https://doi.org/10.52547/psj.18.2.81>
- 315.Zhang, Q., Widmer, G., Tzipori, S. (2013). A pig model of the human gastrointestinal tract. *Gut Microbes*, 4(3), 193-200. <https://doi.org/10.4161/gmic.23867>
- 316.Zheng, C., Zhong, Y., Zhang, W., Wang, Z., Xiao, H., Zhang, W., Xie, J., Peng, X., Luo, J., Xu, W. (2023). Chlorogenic acid ameliorates post-infectious irritable bowel syndrome by regulating extracellular vesicles of gut microbes. *Advanced Science*, 10(28). <https://doi.org/10.1002/advs.202302798>
- 317.Zheng, T., Camilleri, M. (2021). Management of gastroparesis. *Gastroenterology and Hepatology (New York)*, 17(11), 515-525.
- 318.Ziegler, A., Gonzalez, L., Blikslager, A. (2016). Large animal models: the key to translational discovery in digestive disease research. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(6), 716-724. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.09.003>