



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Urszula Anna Latek

**Wykorzystanie wycinków jelita cienkiego
brojlerów kurzych do oceny wpływu
substancji roślinnych na wybrane funkcje
przewodu pokarmowego**

The application of broiler chicken small intestine preparations
for assessing the effects of phytochemicals on selected
gastrointestinal functions

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. Marty Mendel, prof. SGGW

Katedra Nauk Przedklinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Promotor pomocniczy:

dr Wojciech Karlik

Katedra Nauk Przedklinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Warszawa, 2025

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 CH. 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 24.10.2025

Czytelny podpis autora rozprawy Jerzy Lata

Serdeczne podziękowania składam

*Pani Prof. Marcie Mendel oraz Panu Dr. Wojciechowi Karlikowi
za przekazaną wiedzę, wsparcie, motywację oraz opiekę naukową
podczas przeprowadzania doświadczeń i pisania pracy doktorskiej*

*Pani Prof. Magdalenie Chłopeckiej- Słomińskiej oraz Panu Prof. Piotrowi Bąsce
za optymizm, cenne rady oraz poświęcony czas*

*wszystkim współpracownikom z Zakładu Farmakologii i Toksykologii
za okazane ciepło i życzliwość*

*Mojej rodzinie – Tomkowi, Rodzicom
za siłę, nieustanną pomoc i wiarę w moje możliwości*

*Moim Przyjaciółkom – Oli, Adzie, Magdzie i Asi
za poczucie humoru i ratunek w momentach kryzysu*

Spis treści

Streszczenie	9
Summary.....	12
Wykaz stosowanych skrótów.....	14
1. Wstęp	16
2. Cele pracy	29
3. Materiały i metody.....	30
3.1. Materiały	30
3.1.1. Materiał zwierzęcy	30
3.1.2. Linie komórkowe.....	30
3.1.3. Roślinne dodatki paszowe - wyciągi roślinne	30
3.1.4. Gatunki i szczepy badanych bakterii	30
3.1.5. Odczynniki chemiczne	31
3.1.6. Pożywki i podłoża hodowlane, bufony inkubacyjne.....	31
3.2. Metody	32
3.2.1. Optymalizacja warunków transportu i charakterystyka modelu z użyciem wycinków jelita czczego.....	35
3.2.2. Ocena wybranych właściwości roślinnych dodatków paszowych - wyciągów roślinnych w warunkach <i>in vitro</i>	43
3.2.3. Ocena aktywności wyciągu z <i>Silybum marianum</i> (L.) w modelach <i>ex vivo</i> opartych na wycinkach jelit pozyskanych z przemysłowego uboju drobiu	54
3.2.4. Obliczenia i analiza statystyczna	60
4. Wyniki	61
4.1. Optymalizacja warunków transportu i charakterystyka modelu z użyciem wycinków jelita czczego	61
4.1.1. Wpływ warunków transportu na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej przez wycinek.....	61
4.1.2. Wpływ temperatury transportu na skuteczność preparacji.....	63

4.1.3. Wpływ preparacji na wartość przeznabłonkowego oporu elektrycznego.....	63
4.1.4 Charakterystyka transportu substancji wskaźnikowych przez eksplanty w komorach Ussinga.....	66
4.1.5. Charakterystyka parametrów elektrofizjologicznych eksplantów inkubowanych w komorze Ussinga	70
4.2. Ocena wybranych właściwości roślinnych dodatków paszowych - wyciągów roślinnych w warunkach <i>in vitro</i>	71
4.2.1. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych wybranych wyciągów roślinnych	71
4.2.2. Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych wyciągów roślinnych...	75
4.2.3. Ocena właściwości przeciwzapalnych wybranych wyciągów roślinnych.....	76
4.2.4. Podsumowanie wybranych właściwości wyciągów roślinnych w warunkach <i>in vitro</i>	77
4.3. Ocena wpływu wyciągu z <i>Silybum marianum</i> (L.) na wybrane funkcje jelita cienkiego brojlerów kurzych w warunkach <i>ex vivo</i>	78
4.3.1. Ocena wpływu wyciągu z <i>Silybum marianum</i> (L.) na żywotność i integralności eksplantów błony śluzowej jelita czczego brojlerów kurzych w komorze Ussinga.....	78
4.3.2. Ocena wpływu wyciągu z <i>Silybum marianum</i> (L.) na żywotność i integralności wycinków jelit podczas inkubacji na płytkach wielodołkowych	81
4.3.3. Ocena wpływu wyciągu z <i>Silybum marianum</i> (L.) na aktywność motoryczną izolowanych wycinków jelita cienkiego brojlerów kurzych	83
5. Dyskusja	89
Bibliografia.....	123
ANEKS.....	140

Streszczenie

Hodowla drobiu stanowi dynamicznie rozwijający się sektor produkcji zwierzęcej, który według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), odpowiada za około 40% światowej produkcji mięsa i przewiduje się, że jego rozwój będzie nadal postępował. W intensywnej hodowli drobiu i wydajności produkcyjnej zwierząt kluczową rolę odgrywa zdrowie jelit, gwarantując prawidłowe trawienie i wchłanianie składników odżywczych. Jednak problemy z funkcjonowaniem przewodu pokarmowego występują powszechnie u wysokowydajnych linii drobiu ze względu na bardzo szybkie przyrosty, którym towarzyszy wysokie pobranie paszy, wywierające presję na funkcjonowanie tego układu. Do czynników mających negatywny wpływ na zdrowie przewodu pokarmowego zalicza się m.in.: wysoką obsadę zwierząt, stres cieplny, zanieczyszczenie pasz mykotoksynami, obecność bakterii patogennych i/lub kokcydiów, a także inne sytuacje prowadzące do zwiększonego poziomu stresu u zwierząt.

W kontekście zdrowia jelit prowadzi to do błędnego koła zaburzeń, będącego kombinacją osłabionej odporności, zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej, a także zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego. Skutkuje to utratą składników odżywczych, sprzyja rozwojowi patogenów oraz ułatwia ich przenikanie przez ścianę jelita. Złożoność opisanych zależności sprawia, że nie istnieje jedno uniwersalne rozwiązanie tego problemu. Dodatkowo w świetle obowiązujących przepisów unijnych, zgodnie z Europejskim Zielonym Ładem oraz strategią „Od pola do stołu” przyjętą w maju 2020, należy dążyć do ograniczenia stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych w hodowli zwierząt gospodarskich i poszukiwać alternatywnych metod leczenia i poprawy zdrowia zwierząt.

Produkty pochodzenia roślinnego, w tym roślinne dodatki paszowe stanowią obiecującą alternatywę w poprawie zdrowia zwierząt, dzięki swoim wielokierunkowym, prozdrowotnym właściwościom. Mogą zatem odegrać ważną rolę w nowoczesnych strategiach hodowlanych. Równocześnie skuteczność ich działania wymaga potwierdzenia poprzez większą liczbę wiarygodnych badań naukowych. Ze względu na skomplikowany układ zależności występujących w przewodzie pokarmowym badania wykorzystujące jedynie modele *in vitro* lub skupiające się wyłącznie na jednej z funkcji przewodu pokarmowego mają wiele ograniczeń. Istnieje zatem uzasadniona potrzeba rozwijania i wdrażania nowych modeli i metod badawczych. Stąd głównymi celami

niniejszej pracy była kompleksowa ocena właściwości wybranych wyciągów roślinnych, poprzez równoczesne wykorzystanie badań przesiewowych w warunkach *in vitro* oraz badań na poziomie tkankowym w modelu *ex vivo*. Wykorzystanie modelu *ex vivo* jest szczególnie istotne ze względu na fakt, że uwzględnia on tkanki pochodzące od gatunku docelowego, pozwala także na zachowanie ich pełnej struktury oraz zbadanie różnych funkcji w warunkach jak najbardziej zbliżonych do panujących *in vivo*.

Pierwszy z głównych celów pracy skupiał się na optymalizacji procedury transportu wycinków jelita czczego brojlerów kurzych pochodzących z przemysłowego uboju drobiu oraz charakterystyce pozyskanych z nich eksplantów błony śluzowej w zakresie parametrów elektrofizjologicznych i transportu wybranych substancji wskaźnikowych w komorach Ussinga. W dostępnych pracach opisujących wykorzystanie wycinków jelit kurcząt brakuje bowiem informacji na temat możliwości i sposobu wykorzystania tkanek zwierząt pobranych w ubojni. Kolejnym z elementów były badania przesiewowe właściwości czterech wyciągów roślinnych: *Taraxacum officinale* (L.) Weber - korzenia mniszka lekarskiego; *Solidago virgaurea* - ziela nawłoci pospolitej; *Silybum marianum* (L.) Gaertn - nasion ostropestu plamistego, zawierającego 80% sylimaryny oraz *Cynara scolymus* - ziela karczocha zwyczajnego, zawierającego 5% cynaryny. Wyciągi zostały uzyskane z roślin, których preparaty zostały dopuszczone do stosowania jako dodatki paszowe u zwierząt produkcyjnych zgodnie z obowiązującym prawodawstwem unijnym. Badania wykonane w warunkach w *in vitro* miały na celu ocenę ich aktywności: przeciwbakteryjnej, przeciwzapalnej i antyoksydacyjnej oraz wybór dodatku paszowego do oceny jego wpływu na wybrane funkcje jelita cienkiego w opracowanym modelu *ex vivo*. Na podstawie wyników badań, najbardziej obiecującym z dodatków okazał się wyciąg z *Silybum marianum* (L.), który wykazał najsilniejsze właściwości przeciwzapalne, przeciwoksydacyjne oraz umiarkowane przeciwbakteryjne względem bakterii patogennych dla przewodu pokarmowego.

W ostatnim z etapów przeprowadzonych badań oceniono wpływ wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na integralność i motorykę jelita cienkiego brojlerów kurzych w modelach *ex vivo*. Wyciąg ten wykazał właściwości cytoprotekcyjne i przeciwzapalne w badanym modelu tkankowym, a także silne właściwości modulujące aktywność motoryczną jelit, których charakter i siła zależne były od badanego odcinka jelita oraz stosowanego stężenia wyciągu. Przeważającą reakcją było nasilenie aktywności spontanicznej mięśniówki gładkiej jelita cienkiego oraz zmniejszenie aktywności skurczowej indukowanej farmakologicznie.

Uzyskane wyniki wskazują, że połączenie modeli *in vitro* i *ex vivo* umożliwia kompleksową analizę właściwości ekstraktów roślinnych oraz ocenę ich potencjalnej przydatności w poprawie zdrowia przewodu pokarmowego brojlerów kurzych. *Silybum marianum* (L.), ze względu na liczne właściwości prozdrowotne może stanowić obiecujący element alternatywnych i nowoczesnych strategii ukierunkowanych na wspieranie zdrowia jelit zwierząt. Jego zastosowanie może być szczególnie korzystne w profilaktyce i terapii zaburzeń przebiegających ze stanem zapalnym oraz nieprawidłową aktywnością motoryczną przewodu pokarmowego.

Summary

Poultry farming is an expanding livestock sector that, according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), accounts for about 40% of global meat production and is expected to continue growing. In intensive poultry farming and animal production, maintaining gut health is essential for proper digestion and nutrient absorption. However, problems with intestinal function are common in high-yielding poultry lines due to their very fast growth rates, accompanied by high feed intake, which puts pressure on the digestive system's functioning. Factors that have a negative impact on the health of the gastrointestinal tract include: high animal density, heat stress, feed contamination with mycotoxins, the presence of pathogenic bacteria and/or coccidia, as well as other situations leading to increased stress levels in animals.

In the context of gut health, this leads to a vicious circle of disease, characterised by weakened immunity, increased intestinal barrier permeability, and gastrointestinal motility disorders. This results in the loss of nutrients, promotes the development of pathogens, and facilitates their penetration through the intestinal wall. The complexity of these processes means that there is no universal solution to this problem. In addition, in the light of existing EU legislation, in line with the European Green Deal and the Farm to Fork Strategy adopted in May 2020, efforts should be made to reduce the use of antimicrobials in livestock farming, and alternative treatment and health improvement strategies should be implemented.

Plant-based products, including phytogetic feed additives, are a promising alternative for improving animal health, thanks to their multidirectional, health-promoting properties, and can play a crucial role in modern breeding strategies. At the same time, their effectiveness needs to be confirmed by a greater number of reliable scientific studies. Due to the complex network of dependencies within the gastrointestinal tract, studies that rely solely on *in vitro* models or focus on only one of its functions have significant limitations. There is, therefore, an urgent need to develop and implement new research models and methods. For this reason, the main objectives of this study are to comprehensively assess the properties of selected plant extracts through the simultaneous use of *in vitro* screening and tissue-level studies in *the ex vivo* model. The use of *the ex vivo* model is particularly important because it utilises tissues from the target species, allowing for the preservation of their full structure and the study of various functions under conditions as close as possible to those prevailing *in vivo*.

The first of the main objectives of the study focused on the optimization of the procedure of transport of jejunum sections of broiler chickens from industrial slaughter of poultry and the characteristics of the mucosal explants obtained from them in terms of electrophysiological parameters and transport of selected indicator substances in Ussing chambers. Additionally, the available studies describing the use of chicken gut sections lack information on the possibilities and methods of utilising animal tissues collected at the slaughterhouse. Another element was the screening of properties of four plant extracts: *Taraxacum officinale* (L.) Weber - dandelion root; *Solidago virgaurea* - goldenrod herb; *Silybum marianum* (L.) Gaertn - milk thistle seeds, containing 80% silymarin, and *Cynara scolymus* - common artichoke herb, containing 5% cynarin. The extracts were obtained from plants whose preparations have been approved for use as feed additives in production animals in accordance with the applicable EU legislation. The studies performed *in vitro* aimed to assess the antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant activity in the *in vitro* model, as well as to select a feed additive to evaluate its effects on selected intestinal functions in the developed *ex vivo* model. Based on the research results, the most promising additive turned out to be the extract of *Silybum marianum* (L.), which showed the strongest anti-inflammatory and antioxidant effects, as well as moderate antibacterial properties against pathogenic bacteria of the gastrointestinal tract.

In the final stage of the study, the effect of *Silybum marianum* (L.) extract on the integrity and motility of the small intestine in *ex vivo* models of broiler chickens was evaluated. This extract demonstrated cytoprotective and anti-inflammatory properties in the studied tissue model, as well as strong modulating effects on intestinal motor activity, which were dependent on the examined section of the intestine and the concentration of the extract used. The predominant response was an increase in spontaneous small intestine smooth muscle activity, accompanied by a decrease in pharmacologically induced contractile activity.

The obtained results indicate that the combination of *in vitro* and *ex vivo* models enables a comprehensive analysis of the properties of plant extracts and the assessment of their potential usefulness in improving the gut health of broiler chickens. *Silybum marianum* (L.), due to the numerous health-promoting properties may be a promising element of alternative and modern strategies aimed at supporting the gut health of animals. Its use may be particularly beneficial in the prevention and treatment of disorders characterised by inflammation and abnormal motor activity of the gastrointestinal tract.

Wykaz stosowanych skrótów

3R – (ang. reduction) zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych do badań,
(ang. replacement) zastępowanie zwierząt przez modele nie odczuwające cierpień,
(ang. refinement) doskonalenie metodyki w celu minimalizowania cierpienia zwierząt

ABTS – kwas 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)

Ach – acetylocholina

AHL – (ang. acyl-homoserine lactones) acylowane laktony homoseryny

AQS – anty-quorum sensing

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – (ang. adenosine triphosphate) adenozy-5'-trifosforan

CVS – (ang. crystal violet staining) test barwienia fioletem krystalicznym

DMEM – (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium) modyfikowane podłoże Eagle'a
Dulbecco

DMSO – (ang. dimethyl sulfoxide) dimetylosulfotlenek

DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

FBS – (ang. fetal bovine serum) płodowa surowica bydlęca

FCR – (ang. feed conversion ratio) współczynnik konwersji paszy

Gc – (ang. cellular conductance) przewodność komórkowa

Gt – (ang. total conductance) przewodność całkowita

HRP – (ang. horseradish peroxidase) peroksydaza chrzanowa

iNOS – (ang. inducible nitric oxide synthase) indukowana syntaza tlenu azotu

INT – (ang. iodonitrotetrazolium) chlorek jodonitrotetrazolinowy

Isc – (ang. short-circuit current) prąd zwarcia

IT – inhibitor trypsyny

jtk – (ang. CFU – colony forming unit) jednostka koloniotwórcza

L15 – (ang. Leibovitz's L-15 Medium) podłoże Leibovitz L-15

LB – (ang. lysogeny broth) bulion lizogeny

LDH – (ang. lactate dehydrogenase, LDH) dehydrogenaza mleczanowa

LOQ – (ang. limit of quantification) limit oznaczalności

LPS – (ang. lipopolysaccharide) lipopolisacharyd

LY – (ang. lucifer yellow) żółć lucyferowa

M K-HS – (ang. modified Krebs–Henseleit buffer) modyfikowany bufor Krebsa–
Henseleita

MEM – (ang. Minimum Essential Medium) podłoże minimalne

MH – bulion Mueller - Hinton

MIC – (ang. Minimal Inhibitory Concentration) minimalne stężenie hamujące

MQSIC – (ang. minimum quorum sensing inhibitory concentration) minimalne stężenie hamujące quorum sensing

MTT – bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu

NO – (ang. nitric oxide) tlenek azotu

OD – (ang. optical density) gęstość optyczna

PBS – (ang. phosphate-buffered saline) sól fizjologiczna buforowana fosforanami

QS – Quorum sensing

RF – (ang. physiological saline) roztwór fizjologiczny

SD – (ang. standard deviation) odchylenie standardowe

Sm – wyciąg z *Silybum marianum* (L.) Gaertn (ostropestu plamistego)

TEER – (ang. transepithelial electrical resistance) przynablonkowy opór elektryczny

TEP – (ang. transepithelial electrical potential) przynablonkowa różnica potencjałów

TJ – (ang. tight junctions) połączenia ścisłe

TSB – (ang. Tryptic Soy Broth) bulion tryptonowo – sojowy

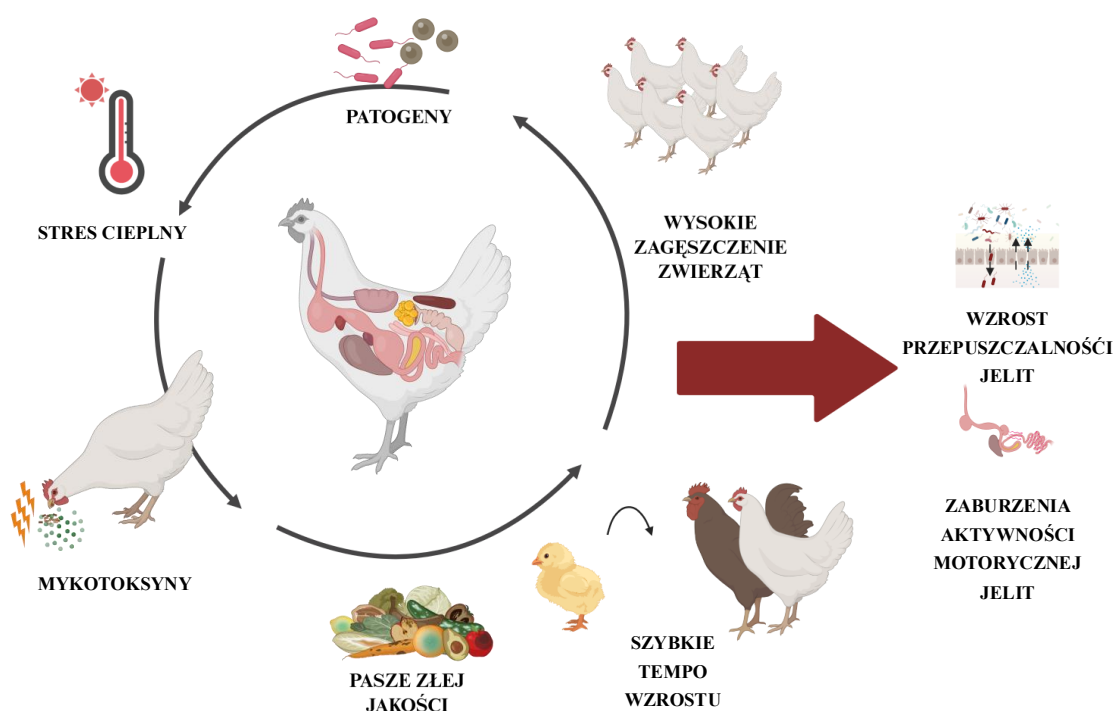
WE – (ang. Williams' E Medium) podłoże Williamsa E

1.WSTĘP

Przewód pokarmowy jest układem, którego prawidłowe funkcjonowanie jest niezbędne do odpowiedniego wchłaniania substancji odżywczych, zapewniające efektywne przyrosty, istotne z punktu widzenia intensywnej produkcji drobiu (Awad i in., 2017; Ducatelle i in., 2023; Wickramasuriya i in.; 2022; Zhu i in., 2021). Jest on również odpowiedzialny za ochronę organizmu przed patogenami i innymi szkodliwymi czynnikami, które trafiają do jego światła ze środowiska zewnętrznego, a także odgrywa istotną rolę w ogólnej odporności organizmu (Awad i in., 2017; John i in., 2011; Turner, 2009). Do prawidłowej pracy przewód pokarmowy musi zachowywać sprawność w zakresie różnych funkcji: wydzielniczej, motorycznej, immunologicznej, a także cechować się integralną i selektywną barierą jelitową. Coraz więcej mówi się również o ważnej roli bezpośredniego oddziaływania między mikrobiotą i składnikami diety, a przewodem pokarmowym, podkreślając ich znaczenie dla ogólnego zdrowia jelit (ang. *gut health*), a także całego organizmu (Bischoff, 2011; Ducatelle i in., 2023; Wickramasuriya i in.; 2022; Zhu i in., 2021). W związku z tym do zapewnienia poprawnego funkcjonowania układu pokarmowego niezbędne jest zachowanie równowagi pomiędzy wieloma dynamicznymi procesami, co może być osiągnięte jedynie przez całościowe podejście do zagadnienia zdrowia przewodu pokarmowego (Bischoff, 2011; Ducatelle i in., 2023; Wickramasuriya i in.; 2022; Zhu i in., 2021).

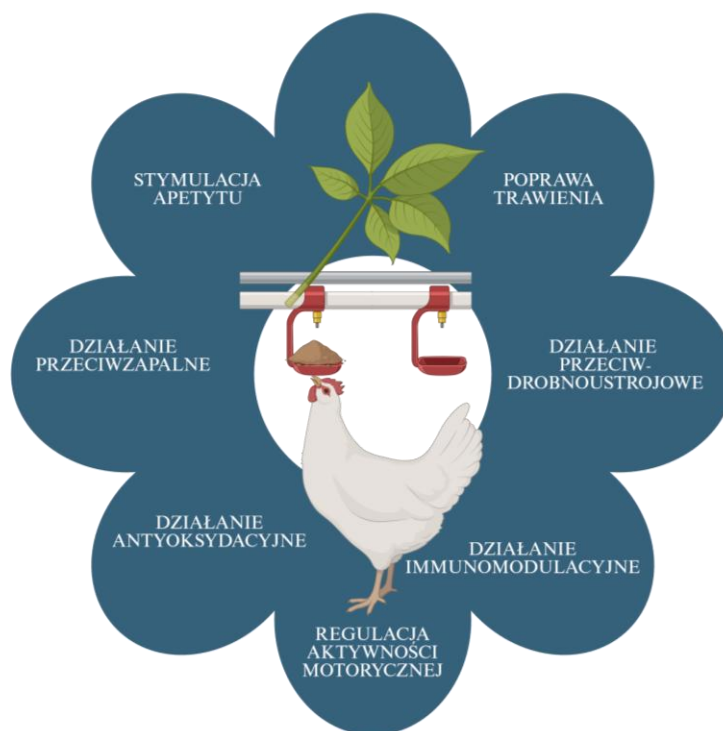
Mimo że szeroko zakrojone działania mające na celu zapobieganie chorobom przewodu pokarmowego oraz poprawę ogólnego zdrowia zwierząt są niezbędne w intensywnej produkcji drobiu, jednocześnie stanowią dla niej bardzo duże wyzwanie (Ducatelle i in., 2023). Według Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. *Food and Agriculture Organization*, FAO), szacuje się, że sektor produkcji drobiarskiej obecnie stanowi około 40% światowej produkcji mięsa (stan na 2020 rok) i przewiduje się, że jego udział będzie stale rosł. Światowa produkcja mięsa drobiowego wzrosła z 9 do 133 milionów ton w latach 1961–2020, a produkcja jaj w ciągu ostatnich trzech dekad wzrosła o 150% (FAO). W związku z tym, stoją przed tym sektorem liczne wyzwania związane z koniecznością osiągnięcia maksymalnej efektywności, przy zachowaniu względnie niskich kosztów i równocześnie zapewnieniu dobrostanu zwierząt, bezpieczeństwa konsumenta, a także dążenia do jak najbardziej zrównoważonej i przyjaznej środowisku produkcji. Jednocześnie system hodowli

nastawiony na wielkotowarową i wysoce wydajną produkcję wiąże się z narażeniem zwierząt na stres cieplny, stres wynikający z dużego zagęszczenia zwierząt oraz stres oksydacyjny i problemy metaboliczne, co może prowadzić do stanu zapalnego jelit, enteropatii oraz zwiększenia przepuszczalności jelit (tzw. „*leaky gut syndrome*”, zespół jelita przeziąkliwego). Zaburzenia te z kolei często prowadzą do osłabionego wchłaniania substancji odżywczych, zmniejszając tym samym przyrosty zwierząt oraz predysponując je do rozwoju zakażeń bakteryjnych, wirusowych bądź pasożytniczych (Awad i in., 2017; Ducatelle i in., 2023). Utrzymanie zdrowia jelit jest zatem jednym z elementów niezbędnych dla optymalnego zdrowia organizmu (Awad i in., 2017; Rath i in., 2018). Zdrowie jelit jest wypadkową wielu wzajemnie oddziałujących ze sobą elementów. Podobnie procesy prowadzące do zaburzenia pracy przewodu pokarmowego też zazwyczaj są wieloczynnikowe, a wystąpienie jednego z problemów prowadzi często do rozwoju błędnego koła wzajemnie napędzających się zaburzeń, które ciężko jest kontrolować (Ryc. 1). Powoduje to więc konieczność pracy nad metodami zapobiegania zaburzeniom oraz sposobami poprawy funkcjonowania przewodu pokarmowego.



Ryc. 1. Główne czynniki negatywnie wpływające na zdrowie przewodu pokarmowego brojlerów kurzych, w konsekwencji prowadzące do wzrostu przepuszczalności jelit oraz zaburzeń ich aktywności motorycznej. Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Istotną rolę w tym zakresie mogą odegrać substancje pochodzenia roślinnego, w tym roślinne dodatki paszowe (Latek i in., 2022; Oni i in., 2025; Zhu i in., 2021). Rośliny lecznicze znane są z różnorodnego i wielokierunkowego działania (Ryc. 2). Wykazują m.in. właściwości: przeciwzapalne, przeciwoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwpasożytnicze, oraz stymulujące aktywność trawienną lub apetyt (Famuyide i in., 2019; Julian-Flores i in., 2025; Latek i in., 2022; Oni i in., 2025; van Wyk i Wink, 2019; Zhu i in., 2021). Połączenie tych działań może poprawić ogólną kondycję i produktywność zwierząt oraz zmniejszyć ryzyko zaburzeń pracy przewodu pokarmowego. Może to także ograniczyć ryzyko infekcji oraz konieczności wprowadzenia antybiotykoterapii w stadzie. Jest to zgodne z aktualną polityką Unii Europejskiej oraz zaleceniami na poziomie światowym (polityka jednego zdrowia „one health”), które dążą do ograniczenia stosowania antybiotyków u zwierząt produkcyjnych i poszukiwania alternatywnych metod profilaktyki i leczenia chorób zwierząt, a także poprawy ogólnego zdrowia zwierząt. Zgodnie z Europejskim Zielonym Ładem oraz strategią „Od pola do stołu” przyjętą w maju 2020 r., do 2030 r. ogólna sprzedaż środków przeciwdrobnoustrojowych w UE dla zwierząt gospodarskich i akwakultury ma być ograniczona o 50% (EC, 2020).



Ryc. 2. Wybrane działania roślinnych dodatków paszowych mogące wpływać pozytywnie na zdrowie przewodu pokarmowego brojlerów kurzych.

Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Zgodnie z zapisami rozporządzenia (WE) 1831/2003, dodatki paszowe to substancje, które są celowo dodawane do paszy lub wody, ale nie są materiałem paszowym ani premiksem. Mogą być stosowane w celu poprawy parametrów: technologicznych, sensorycznych (właściwości organoleptycznych lub barwy paszy), dietetycznych lub zootechnicznych (korzystny wpływ na zdrowie zwierząt lub środowisko). Pomimo że istnieje wiele doniesień o pozytywnym wpływie substancji roślinnych na zdrowie zwierząt, w tym drobiu, a badania naukowe w tym zakresie stale się rozwijają, w większości przypadków dostępne są jedynie dane fragmentaryczne: wiele doświadczeń koncentruje się na jednym lub dwóch aspektach stosowania danego dodatku, np. na parametrach zootechnicznych i ubojowych, bez uwzględnienia wpływu na inne aspekty funkcjonowania organizmu. Istnieje zatem konieczność prowadzenia dalszych badań mogących wnieść nową wiedzę dotyczącą wpływu roślinnych dodatków paszowych na zdrowie przewodu pokarmowego. Jednym z celów niniejszej pracy była ocena właściwości przeciwzapalnych, przeciwoksydacyjnych i przeciwbakteryjnych czterech wybranych dodatków paszowych, a następnie selekcja najbardziej obiecującego z nich do dalszych badań koncentrujących się na funkcjonowaniu przewodu pokarmowego brojlerów kurzych w zakresie aktywności motorycznej jelit oraz przepuszczalności bariery jelitowej. Miało to na celu uzyskanie kompleksowego obrazu przedstawiającego właściwości wybranego dodatku paszowego.

Do badań zostały wybrane cztery wyciągi roślinne, z: *Taraxacum officinale* (L.) Weber - korzenia mniszka lekarskiego; *Solidago virgaurea* - ziela nawłoci pospolitej; *Silybum marianum* (L.) Gaertn - nasion ostropestu plamistego, zawierający 80% sylimaryny oraz *Cynara scolymus* - ziela karczocha zwyczajnego, zawierający 5% cynaryny. Wyciągi zostały uzyskane z roślin, których preparaty zostały dopuszczone do stosowania jako dodatki paszowe u zwierząt produkcyjnych zgodnie z obowiązującym prawodawstwem unijnym (rozporządzenie (WE) 1831/2003 Rejestr dodatków paszowych Unii Europejskiej, Aneks I; z późniejszymi zmianami). Wyciągi roślinne stosowane jako dodatki do paszy nie są czystymi, wyizolowanymi substancjami, ale produktami zawierającymi rozpuszczalną frakcję związków ekstrahowanych wodą lub rozpuszczalnikami organicznymi. Frakcja ta zawiera większość substancji czynnych występujących w materiale roślinnym, co zapewnia wysokie stężenie metabolitów wtórnych w wyciągu i umożliwia jego silne, wielokierunkowe działanie (van Wyk i Wink, 2019). Większość metabolitów wtórnych może działać w sposób wielokierunkowy,

ponieważ wiele z nich zawiera więcej niż jedną farmakologicznie aktywną grupę chemiczną, a sam wyciąg stanowi mieszaninę różnych biologicznie czynnych związków (Heinle i in., 2006; van Wyk i Wink, 2019).

Taraxacum officinale (mniszek lekarski) może być wykorzystywany w żywieniu, jako element pokarmu, bogaty w składniki odżywcze i witaminy, a także jako roślina lecznicza. Tradycyjnie, w kontekście zdrowia przewodu pokarmowego, stosowany był jako środek pobudzający apetyt oraz w leczeniu dolegliwości żołądkowo-jelitowych (Di Napoli i Zuchetti, 2021; Jiang i Cock, 2024; van Wyk i Wink, 2019). Wykazuje, między innymi, działanie moczopędne, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe, żółciopędne, przeciwcukrzycowe i przeciwutleniające (Di Napoli i Zuchetti, 2021; van Wyk i Wink, 2019). Istnieje niewiele badań *in vivo* dotyczących jego wpływu na zdrowie drobiu, jednak dostępne dane literaturowe wskazują na korzystny wpływ preparatów z *Taraxacum officinale* na przyrosty brojlerów kurzych, parametry produkcyjne oraz morfologię błony śluzowej jelit (Arczewska-Włosek i in., 2023).

Solidago virgaurea L. (nawłóć pospolita) jest dobrze znaną rośliną leczniczą w Europie i innych regionach świata. Jej części nadziemne były tradycyjnie wykorzystywane w leczeniu schorzeń dróg moczowych, jako środek przeciwzapalny oraz zewnętrznie do leczenia ran i oparzeń (Paun i in., 2024; Fursenco i in., 2020; van Wyk i Wink, 2019). Doniesienia naukowe wskazują na jej potencjalne, dość liczne, właściwości prozdrowotne, obejmujące: działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbólowe, rozkurczowe, przeciwnadciśnieniowe, moczopędne, przeciwdrobnoustrojowe, cytotoksyczne, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, kardioprotekcyjne oraz przeciwstarzeniowe (Fursenco i in., 2020; van Wyk i Wink, 2019). W większości wypadków brakuje jednak rzetelnych badań naukowych potwierdzających te doniesienia (Fursenco i in., 2020). Nie ma także wielu prac naukowych związanych z wpływem *Solidago virgaurea* L. na zdrowie drobiu.

Silybum marianum (L.) Gaertn (ostropest plamisty) jest dobrze znaną rośliną stosowaną zarówno w żywieniu, jak i w medycynie, przede wszystkim w terapii chorób wątroby i dróg żółciowych, dzięki czemu zyskała ona szerokie zainteresowanie w badaniach naukowych. Obszerna praca przeglądowa autorstwa Wang i wsp. (2020) podsumowuje wysokiej jakości badania naukowe dotyczące właściwości farmakologicznych oraz mechanizmów działania *Silybum marianum* (L.). Według tych badań, *S. marianum* (L.) wykazuje szeroki zakres korzystnych efektów prozdrowotnych, obejmujących działanie:

hepatoprotekcyjne, przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, kardioprotekcyjne, neuroprotekcyjne, ochronne dla skóry oraz przeciwcukrzycowe (van Wyk i Wink, 2019; Wang i in., 2020). Ponadto roślina ta wykazuje działanie przeciwoksydacyjne oraz przeciwzapalne (Khazaei i in., 2022; van Wyk i Wink, 2019; Wang i in., 2020).

Ze względu na szeroki zakres potencjalnych korzyści zdrowotnych związanych ze stosowaniem *S. marianum* (L.), ostropest plamisty stanowi interesującą perspektywę w kontekście alternatywnych metod leczenia oraz wspomagania zdrowia zwierząt, co uzasadnia potrzebę dalszych, pogłębionych badań w tym zakresie.

Cynara scolymus (karczoch zwyczajny) jest szeroko wykorzystywany zarówno w żywieniu, jak i ziołolecznictwie ze względu na swoje prozdrowotne właściwości. Podczas gdy koszyczki kwiatowe karczocha są najczęściej stosowane w celach kulinarnych, preparaty z liści *C. scolymus* są powszechnie wykorzystywane w produktach leczniczych (Ayuso, i in., 2024; Porro, i in., 2024; van Wyk i Wink, 2019). Właściwości terapeutyczne karczocha były znane już w czasach starożytnych, kiedy stosowano go w leczeniu zaburzeń wątroby i przewodu pokarmowego (Ayuso i in., 2024). *C. scolymus* wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające, hepatoprotekcyjne, żółciopędne, przeciwbakteryjne, obniżające poziom lipidów oraz neuroprotekcyjne (Ayuso i in., 2024; Porro i in., 2024; van Wyk i Wink, 2019). Dzięki wysokiej zawartości składników odżywczych i swoim prozdrowotnym właściwościom *Cynara scolymus* uznawany jest za obiecujący składnik wspierający ogólną kondycję organizmu.

Wszystkie z opisanych powyżej roślin były w przeszłości tradycyjnie stosowane w medycynie do leczenia dolegliwości układu pokarmowego i istnieją przesłanki wskazujące na ich korzystne działanie w tym zakresie (European Medicines Agency (EMA), 2008, 2018a, 2018b, 2021). Uzasadnia to celowość badania ich wpływu na funkcjonowanie przewodu pokarmowego brojlerów kurzych.

Ponadto, wszystkie te rośliny, występują powszechnie w Europie, dzięki czemu materiał roślinny jest łatwo dostępny i nie wymaga specjalnej uprawy. Ten aspekt stanowił dodatkowe kryterium wyboru wyciągów do badań, ponieważ spełnia potrzeby zrównoważonej produkcji, eliminując konieczność importu materiału roślinnego z innych regionów świata. Równocześnie, pomimo powszechnego występowania roślin stanowiących źródło do wytwarzania badanych wyciągów roślinnych, stosowanych w produkcji drobiu oraz doniesień na temat ich korzystnego wpływu na zdrowie zwierząt, nawet tak powszechnie stosowane rośliny lecznicze jak ostropest plamisty lub karczoch

nie są w wystarczającym stopniu opisane w kontekście hodowli i zdrowia drobiu. Jednym z celów pracy była więc ocena prozdrowotnych aktywności wybranego (na podstawie przesiewowych badań *in vitro*) dodatku paszowego na przewód pokarmowy brojlerów kurzych.

Brojlery kurze stanowią szczególną grupę zwierząt gospodarskich, charakteryzującą się wyjątkowo szybkim tempem wzrostu oraz metabolizmu (Awad i in., 2017; Ducatelle i in., 2023). Z drugiej strony, w wielu szczególnie starszych w badaniach, te wyjątkowe cechy brojlerów kurzych były często pomijane i omawiano je łącznie z innymi zwierzętami monogastrycznymi, takimi jak świnie, mimo że ptaki, jako gromada, znacząco różnią się od ssaków pod względem anatomicznym i fizjologicznym (Scanes, 2020). Choć różnice te są powszechnie znane, w wielu przypadkach nie uwzględniano ich w wystarczającym stopniu, co prowadziło do uproszczonych założeń dotyczących podobieństw międzygatunkowych (Scanes, 2020). Tymczasem obecny stan wiedzy jednoznacznie wskazuje na konieczność prowadzenia badań z uwzględnieniem specyfiki gatunku docelowego. Takie podejście pozwala na rzetelną ocenę badanego zjawiska oraz minimalizuje ryzyko błędów wynikających z niewłaściwej ekstrapolacji danych międzygatunkowych. W związku z tym celowe i uzasadnione jest stosowanie modeli eksperymentalnych możliwie najlepiej odzwierciedlających warunki panujące u gatunku docelowego, co zwiększa wiarygodność i użyteczność uzyskanych wyników. Z drugiej strony względy etyczne, a także obowiązujące prawodawstwo i oczekiwania opinii publicznej nakładają na badaczy na terenie Unii Europejskiej obowiązek ograniczania wykorzystania zwierząt do doświadczeń do celów naukowych, a także wykorzystywania alternatywnych modeli badawczych spełniających założenia zasad 3R (rozporządzenie (WE) nr 1907/2006; rozporządzenie (WE) nr 1272/2008; dyrektywa 2010/63/UE). Zasady 3R zostały po raz pierwszy opracowane przez Russella i Burcha (1959) i oznaczają zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych do badań (ang. *reduction*), zastępowanie ich przez modele nie odczuwające cierpienia (ang. *replacement*) i doskonalenie metodyki w celu minimalizowania cierpienia zwierząt (ang. *refinement*). W związku z tym, w badaniach naukowych, zwłaszcza przesiewowych, powszechnie wykorzystywane są eksperymentalne modele komórkowe i tkankowe, które pozwalają spełnić wszystkie z zasad 3R (Latek i in., 2020).

W przypadku prac eksperymentalnych skupiających się na procesach wchłaniania i transportu substancji, przepuszczalności bariery jelitowej i metabolizmu ksenobiotyków

powszechnym modelem badawczym są ustalone lub pierwotne linie komórkowe (Lea, 2015; Xu, 2021). Wykorzystywane linie komórkowe mogą wywodzić się z komórek nowotworowych np. Caco-2 (komórki raka jelita cienkiego człowieka), HT-29 (komórki raka jelita grubego człowieka), bądź z prawidłowych komórek przewodu pokarmowego zwierząt np. IEC-6 (komórki jelita cienkiego szczura) czy IPEC-J2 (komórki jelita cienkiego prosiąt). Należy jednak mieć na uwadze, że komórki linii nowotworowych różnią się w zakresie metabolizmu i morfologii od komórek prawidłowych (Yuan i in., 2015). Z drugiej strony, w przypadku kultur pierwotnych często napotymano trudności związane z ich pozyskaniem, co prawdopodobnie wynikało z niedostatecznej znajomości metod izolacji komórek z tkanek danego gatunku, warunków hodowli oraz stosowania pożywek o odpowiednim składzie (Chopra i in., 2010). W efekcie przez wiele lat brakowało sprawdzonych i wystandaryzowanych protokołów do izolacji komórek przewodu pokarmowego drobiu, bądź istniały nieliczne, opracowane jedynie dla wybranych gatunków zwierząt (Chopra i in., 2010; Yuan i in., 2015). Ponadto do niedawna nie było powszechnie dostępnych ustalonych linii komórek pochodzących z przewodu pokarmowego kurcząt, a dopiero w ciągu ostatnich lat pojawiły się prace opisujące protokoły pozyskiwania kultur pierwotnych od tych zwierząt (Rath i in., 2018; Yuan i in., 2015; Velge i in., 2002). Wykorzystanie linii komórkowych pochodzących od innych gatunków zwierząt może powodować problemy z ekstrapolacją wyników, nie tylko wynikające z różnic między warunkami *in vitro* a *in vivo*, ale również z powodu różnic międzygatunkowych. Należy podkreślić, że hodowla pojedynczego rodzaju komórek, np. jedynie enterocytów, nie jest w stanie w pełni odwzorować skomplikowanej struktury oraz zależności występujących w przewodzie pokarmowym. W badaniach analizujących funkcjonowanie bariery jelitowej wykorzystanie wyłącznie enterocytów stanowi znaczące uproszczenie (Lea, 2015). Wprawdzie głównym elementem bariery rzeczywiście jest nabłonek, w którym enterocyty połączone, między innymi, przez połączenia ścisłe (ang. *tight junctions*) stanowią około 80% komórek, to jednak bariera ta obejmuje również warstwę śluzu, mikrobiotę, komórki kubkowe, Panetha, enterochromatofilne, komórki M oraz blaszkę właściwą, zawierającą tkankę limfatyczną, łączną oraz sieć neuronów (Latek i in., 2020; Latek i in., 2022; Turner, 2009; Węgrzyn i in., 2017). Warto również zauważyć, że w hodowlach z dużą liczbą pasażowań komórki nabłonkowe często tracą swoje właściwości funkcjonalne, pomimo że nadal ulegają podziałom (Chopra i in., 2010). Ponadto, choć model hodowli komórek nabłonkowych jest szeroko stosowany do oceny

funkcji bariery jelitowej, posiada on ograniczenia w badaniu interakcji międzykomórkowych, szczególnie dotyczących układu odpornościowego (Lea, 2015; Zhang i in., 2017).

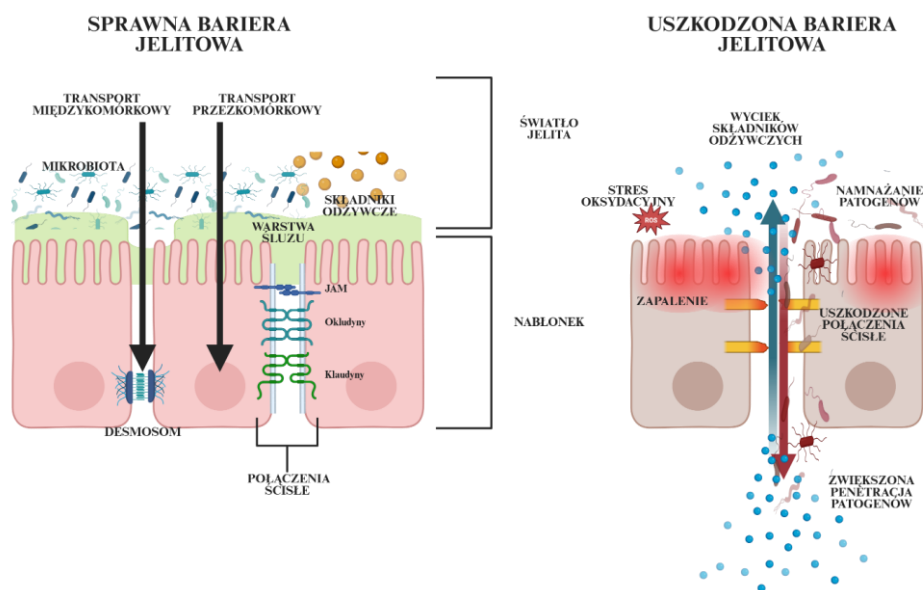
Lepszym narzędziem pozwalającym na odtworzenie warunków doświadczalnych w sposób jak najbardziej zbliżony do panujących w organizmie przyżyciowo jest wykorzystanie modeli tkankowych *ex vivo*, które uznaje się za kompromis pomiędzy modelami *in vitro* a warunkami *in vivo* (Latek i in., 2020; Xu, 2021). Pozwalają one na zachowanie pełnej struktury badanej tkanki, a jednocześnie ścisłej kontroli warunków przeprowadzania doświadczeń w zakresie poszczególnych parametrów inkubacji (czasu trwania, temperatury, rodzaju i składu zastosowanego buforu inkubacyjnego), a także stężenia badanej substancji (Latek i in., 2020; Xu, 2021). W modelach tkankowych, łatwiej niż w modelach komórkowych wykorzystać materiał z gatunku docelowego, a więc wyeliminować trudności wynikające z międzygatunkowej ekstrapolacji uzyskanych wyników.

Jeśli planowane badania mają mieć charakter kompleksowy, to w przypadku doświadczeń wykorzystujących wycinki jelit brojlerów kurzych należy rozważyć dwa główne modele eksperymentalne oparte na tkankach przewodu pokarmowego w warunkach *ex vivo*. Pierwszym z nich są wypreparowane skrawki błony śluzowej jelita czczego (eksplanty), inkubowane w komorach Ussinga, w celu przeprowadzania badań związanych z przepuszczalnością i integralnością bariery jelitowej. Drugi model stanowią segmenty różnych odcinków jelita cienkiego inkubowane w komorach Schulera do badania narządów izolowanych, głównie w celu oceny aktywności motorycznej.

W komorach Ussinga wycinki jelit umieszczone są w komorze w taki sposób, że dzielą ją na dwie części, odpowiadające światłu jelita oraz stronie zewnętrznej (przydane) (Ryc. 8). Wykorzystanie komory Ussinga pozwala na pomiar parametrów elektrofizjologicznych śluzówki, które bezpośrednio związane są z przepływem jonów poprzez warstwę nabłonka jelita, takich jak: przelnabłonkowy opór elektryczny (ang. *transepithelial electrical resistance*, TEER), przewodność całkowita (Gt) i komórkowa (Gc), czy przelnabłonkowa różnica potencjałów (ang. *transepithelial electrical potential*, TEP) oraz prąd zwarcia (Isc) (Clarke, 2009). Wykorzystanie tego modelu pozwala także na ocenę transportu wybranych substancji znacznikowych lub badanych (np. leków) przez tę warstwę jelita. Odpowiedni dobór substancji

wskaźnikowych pozwala na ocenę właściwości nabłonka związanych z transportem drogą międzykomórkową np. przy wykorzystaniu mannitolu lub przezkomórkową, np. przy wykorzystaniu kofeiny. Model ten pozwala także na ocenę efektu biologicznego substancji zarówno działającej bezpośrednio w świetle przewodu pokarmowego poprzez kontakt z błoną śluzową, jak i takiej, która po dystrybucji w organizmie dociera do tkanek układu pokarmowego za pośrednictwem krążenia, wpływając na różne elementy bariery jelitowej (Latek i in, 2020).

Szczególnie ważny dla oceny szczelności bariery jelitowej jest transport międzykomórkowy regulowany głównie przez połączenia ścisłe (Awad i in., 2017; John i in., 2011; Turner, 2009). Rozszczelnienie tych połączeń może być efektem działania różnych czynników takich jak stan zapalny, stres oksydacyjny (John i in., 2011; Turner, 2009) lub bezpośrednia modulacja TJ poprzez patogeny. Zjawiska te zostały szeroko opisane w odniesieniu do brojlerów kurzych przez Awad i współpracowników (2017) w przypadku infekcji indukowanych np. przez enteropatogenną *E. coli* oraz *Salmonella* spp. Utrata szczelności TJ i zwiększenie przepuszczalności bariery jelitowej w opisywanym modelu wiąże się ze spadkiem wartości TEER oraz zwiększeniem transportu substancji wskaźnikowych drogą międzykomórkową (Awad i in., 2017; John i in., 2011). W warunkach *in vivo* jest to związane z wystąpieniem wspomnianego wcześniej zespołu jelita przeziębionego, co prowadzi do stanu zapalnego jelit, stresu oksydacyjnego pogłębiającego występujące uszkodzenia śluzówki, a także pozwala na przenikanie patogenów i toksyn do wnętrza organizmu (Awad i in., 2017; John i in., 2011; Turner, 2009). Zostało to schematycznie przedstawione na rycinie 3.



Ryc. 3. Schemat przedstawiający sprawną barierę jelitową – po lewej stronie oraz uszkodzoną barierę jelitową – po prawej stronie.

Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Drugi z wykorzystanych modeli, oparty na inkubacji wycinków jelita w komorach Schulera, służy głównie do badań aktywności motorycznej mięśniówki jelita, dzięki zapewnianej przez ten układ doświadczalny możliwości odbioru sygnału zmiany napięcia (warunki izometryczne) lub zmiany długości (warunki izotoniczne) kurczącej się i relaksującej mięśniówki. Co istotne, ten model eksperymentalny umożliwia badanie aktywności motorycznej mięśniówki pozbawionej wpływu ośrodkowego układu nerwowego, który w warunkach *in vivo* może być modulowany m.in. przez stres czy działanie hormonów (Latek i in., 2020). Zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego, zwłaszcza przebiegające z przyspieszeniem pasażu jelitowego, często towarzyszą stanom zapalnym i infekcjom w obrębie przewodu pokarmowego. Mogą dodatkowo przyczyniać się do wystąpienia lub pogłębienia zaburzeń dotyczących procesów trawienia, wchłaniania składników odżywczych oraz utrzymania homeostazy mikrobiomu jelitowego (Posłuszny i in., 2023). Wobec tego zapewnienie prawidłowej aktywności motorycznej przewodu pokarmowego, obok szczelnej i selektywnej bariery jelitowej, stanowi ważny element w utrzymaniu zdrowia przewodu pokarmowego, dobrostanu zwierząt oraz ograniczaniu strat ekonomicznych ponoszonych przez hodowcę. Dlatego ocena wpływu wybranego wyciągu roślinnego na aktywność motoryczną jelit stanowiło kolejny istotny cel niniejszej pracy.

W obu przypadkach do doświadczeń wykorzystano wycinki jelita cienkiego, ponieważ stanowi ono najważniejszy odcinek przewodu pokarmowego ze względu na intensywność wchłaniania substancji odżywczych, na przykład aż 63% aminokwasów ulega wchłanianiu tej części (Ducatelle i in., 2023; Kamil i in., 2024; Sohel i in., 2019). Segment ten pełni również kluczową rolę w funkcji ochronnej przewodu pokarmowego, zarówno ze względu na fizyczną barierę nabłonkową, jak i obecność elementów układu odpornościowego (Ducatelle i in., 2023). Ponadto, jak wspomniano wcześniej, szybki wzrost oraz wysokie pobranie paszy wywierają ogromną presję na przewód pokarmowy brojlerów kurzych, a w szczególności na jelito cienkie (Ducatelle i in., 2023).

Opisane powyżej modele doświadczalne były stosowane z powodzeniem w badaniach prowadzonych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW (IMW SGGW), w których wykorzystywano tkanki różnych gatunków zwierząt. W przypadku badań aktywności motorycznej pochodziły one od: szczura (Chłopecka i in. 2007; Mendel i in. 2011), bydła (Mendel i in. 2016a, 2016b), świni (Mendel i in. 2020), owcy (Połuszyński i in., 2025) oraz kury (Połuszyński i in., 2023), a do badań w komorach Ussinga wykorzystywano wycinki jelit świń (Mendel i in. 2019; Mendel i in., 2022). Bardzo ważnym aspektem prowadzonych badań był także fakt, że w przypadku zwierząt gospodarskich – świń, bydła, kur, owiec wycinki pobierane były od zwierząt poddawanych przemysłowemu ubojowi. Dzięki takiemu podejściu możliwe było zachowanie wszystkich zasad 3R oraz prowadzenie doświadczeń w jak najbardziej etyczny sposób, przy zachowanym stałym dostępie do badanego materiału. Dla uprzednio wykorzystywanych w doświadczeniach wycinków narządów, pochodzących od konkretnych gatunków zwierząt, istnieją wobec tego już wcześniej opracowane, odpowiednie protokoły doświadczalne. W odniesieniu do kurcząt brojlerów, w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii SGGW nie prowadzono dotychczas badań z wykorzystaniem wycinków przewodu pokarmowego tych zwierząt w komorach Ussinga. Chociaż w literaturze naukowej dostępne są dane dotyczące zastosowania tego typu modelu (Amat i in., 1999; Awad i in., 2008; Awad i in., 2010; Baskara i in., 2021; Grubb i in., 1986, Metzler-Zebeli i in., 2017; Rehman i in., 2009; Ruhnke i in. (2013), zgodnie z najlepszą wiedzą autorki, nie opisano dotąd badań wykorzystujących tkanki pozyskiwane z przemysłowego uboju drobiu. Dodatkowo, w dotychczas opublikowanych pracach występują znaczne rozbieżności dotyczące warunków eksperymentalnych, takich jak skład podłoża inkubacyjnego, temperatura preparacji i transportu eksplantów,

czy czas trwania doświadczenia. Brak jednoznacznych wytycznych dotyczących postępowania z wycinkami pobranymi poubojowo od kurcząt brojlerów, w połączeniu ze świadomością istotnych różnic gatunkowych w przydatności tkanek do badań (Neirinckx i in., 2011; Nietfeld i in., 1991), stanowi istotne wyzwanie metodologiczne.

W związku z powyższym, w prezentowanej pracy postanowiono szczegółowo opracować metodę pozyskiwania i wykorzystania w komorach Ussinga wycinków jelita kurcząt brojlerów pozyskanych z przemysłowego uboju, a także szczegółowo scharakteryzować ten model pod kątem parametrów elektrofizjologicznych oraz transportu substancji wskaźnikowych. Dopiero uzyskanie stabilnego i powtarzalnego modelu umożliwiło przeprowadzenie dalszych badań, w których oceniono wpływ wybranego dodatku paszowego pochodzenia roślinnego na przepuszczalność i integralność bariery jelitowej.

2. CELE PRACY

Do głównych celów pracy należały:

1. optymalizacja procedury pobierania i transportu wycinków jelita czczego brojlerów kurzych pochodzących z przemysłowego uboju drobiu oraz charakterystyka pozyskanych z nich eksplantów błony śluzowej w zakresie parametrów elektrofizjologicznych i transportu wybranych substancji wskaźnikowych,
2. ocena właściwości czterech powszechnie stosowanych u drobiu dodatków paszowych pochodzenia roślinnego w zakresie ich aktywności: przeciwbakteryjnej, przeciwzapalnej i antyoksydacyjnej w modelu *in vitro* oraz wybór dodatku paszowego do dalszej analizy w modelu *ex vivo*,
3. ocena aktywności wybranego dodatku paszowego w modelach *ex vivo* opartych na wycinkach jelit pozyskanych z przemysłowego uboju drobiu.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał zwierzęcy

Wycinki jelita cienkiego były pozyskiwane od kurcząt brojlerów rasy Ross 308 w zakładzie uboju drobiu (Superdrob Zakłady Drobiarsko-Mięsne Karczew) od dorosłych zwierząt w wieku ubojowym (35-45 dni) oraz o masie ubojowej (2 – 3 kg). Tkanki pochodziły od zwierząt, które poddane zostały przemysłowemu ubojowi, po uznaniu ich za zdrowe podczas rutynowego badania przedubojowego.

3.1.2. Linie komórkowe

Do doświadczeń wykorzystano ustaloną linię komórkową makrofagów mysich RAW 264.7. Linia komórkowa została zakupiona z American Type Culture Collection (ATCC).

3.1.3. Roślinne dodatki paszowe - wyciągi roślinne

Suche wyciągi z:

- *Taraxacum officinale* (L.) Weber, korzenia mniszka lekarskiego (4:1 etanol-woda),
- *Solidago virgaurea*, ziela nawłoci pospolitej (4:1 etanol-woda)
- *Silybum marianum* (L.) Gaertn, nasion ostropestu plamistego (aceton-etanol); zawierający 80% sylimaryny
- *Cynara scolymus*, ziela karczocha zwyczajnego (20:1 woda); zawierający 5% cynaryny

zostały przekazane przez firmę Biofaktor. Wybrane wyciągi są wykorzystywane do produkcji mieszanek paszowych dla zwierząt, w tym dla drobiu. Wyciągi posiadały niezbędne certyfikaty jakości odpowiadające dodatkom paszowym.

3.1.4. Gatunki i szczepy badanych bakterii

Do doświadczeń wykorzystano 7 szczepów bakteryjnych, które pozyskano z American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 51625), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium (ATCC 700720), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43888), *Chromobacterium violaceum* (ATCC12472).

3.1.5. Odczynniki chemiczne

Aceton, amfoterycyna B, bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu (MTT), chlorek acetylocholiny (ACh), chlorek jodonitrotetrazoliowy (ang. iodonitrotetrazolium, INT), D-glukoza, D-mannitol, diklofenak, dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide, DMSO), etanol, fiolet krystaliczny, fumaran disodowy, inhibitor trypsyny (IT), kofeina, kwas 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ATBS), kwas askorbinowy, L-glutaminian, lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide, LPS) *Escherichii coli* 0111:B4, odczynnik Griessa, penicylina, peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase, HRP), pirogallol, pirogronian sodu, płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum, FBS), streptomycyna, Triton X-100, troloks, żółć lucyferowa (ang. lucifer yellow, LY). oraz testy: Cytotoxicity Detection Kit (LDH), D-Mannitol Colorimetric Assay Kit zostały zakupione z firmy Sigma-Aldrich.

Gentamycyna została zakupiona z firmy Virbac, doksorubicyna z Pfizer Laboratories, (South Africa). FBS została zakupiona z Highveld Biotech, (Johannesburg, South Africa). Wszystkie sole niezbędne do przygotowania buforów zostały zakupione od Avantor Performance Materials (POCH, Gliwice), z wyjątkiem chlorku wapnia (CaCl_2) (Merck, Germany), diwodorofosforan sodu (NaH_2PO_4) (Fluka Chemie, Switzerland).

3.1.6. Pożywki i podłoża hodowlane, bufor inkubacyjny

Do doświadczeń zostały wykorzystane następujące pożywki i podłoża: podłoże minimalne (ang. Minimal Essential Medium, MEM; Whitehead Scientific), modyfikowane podłoże Eagle'a Dulbecco (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Gibco TM), bulion tryptonowo-sojowy (ang. Tryptic Soy Broth, TSB), bulion Mueller-Hinton (MH), bulion lizogeny (ang. lysogeny broth, LB; Sigma Aldrich, South Africa), podłoże Williamsa E (ang. Williams' E Medium, WE) z dodatkiem L- glutaminy, oraz wodorowęglanem sodu, który był dodawany podczas rozpuszczania podłoża, zgodnie z instrukcją producenta (Sigma-Aldrich).

W badaniach wykorzystano zmodyfikowany bufor Krebsa – Hanseleita (ang. modified Krebs–Henseleit buffer, M K-HS) w dwóch wariantach, w zależności od tego czy było to doświadczenie wykorzystujące wycinki mięśniówki czy eksplanty śluzówki. Skład buforów podano w tabeli 1.

Tabela. 1. Skład buforów inkubacyjnych: zmodyfikowany bufor Krebsa – Hanseleita wariant do inkubacji eksplantów śluzówki oraz mięśniówki

	Skład buforu – badania w komorach Ussinga [mM]	Skład buforu – badania aktywności motorycznej [mM]
NaCl	105	123,76
KCl	4,7	5,04
Na ₂ HPO ₄	1,8	-
KH ₂ PO ₄	0,4	2,75
NaHCO ₃	15	14,49
MgSO ₄	1,2	1,16
CaCl ₂	1,25	2,49
D-glukoza	11,5	12,51
L-glutaminian	4,9	-
Fumaran disodowy	5,4	-
Pirogronian sodu	4,9	-

Bufory inkubacyjne podczas eksperymentów były utrzymywane w temperaturze 38,0-39,0 °C, zakresie pH 7.35 – 7.45 oraz gazowane karbogenem (95% O₂ + 5% CO₂), co odpowiada warunków fizjologicznym w przewodzie pokarmowym.

3.2. Metody

Badania przebiegały w 3 etapach.

- W etapie 1 przeprowadzono optymalizację procedury pozyskiwania i transportu wycinków jelit pobieranych w zakładzie ubojowym oraz dokonano charakterystyki modelu *ex vivo* uzyskanych z nich eksplantów błony śluzowej jelita czczego w zakresie wybranych parametrów elektrofizjologicznych oraz transportu substancji wskaźnikowych.
- W etapie 2 dokonano oceny i wyboru roślinnego dodatku paszowego do dalszych badań w etapie 3.
- W etapie 3 oceniono wpływ wybranego dodatku paszowego na wycinki i eksplanty jelita w stosowanych modelach *ex vivo*. Schemat każdego z etapów eksperymentu i metody wykorzystywane na poszczególnych etapach przedstawiono na rycinach 4 i 5.

ETAP 1 PROWADZONYCH BADAŃ



Optymalizacja modelu tkankowego wycinków jelita czczego brojerów kurzych pozyskanych z uboju przemysłowego - zakres:

- pobieranie i transport wycinków
- czas trwania doświadczenia

Charakterystyka modelu eksplantów błony śluzowej jelita czczego- zakres:

- wybrane parametry elektrofizjologiczne
- transport wybranych substancji wskaźnikowych



OPRACOWANY MODEL

ETAP 2 PROWADZONYCH BADAŃ



Badania przesiewowe *in vitro* wybranych roślinnych dodatków paszowych wykorzystywanych w żywieniu brojerów kurzych

Ocena właściwości:

- przeciwbakteryjnych
- przeciwzapalnych
- przeciwutleniających

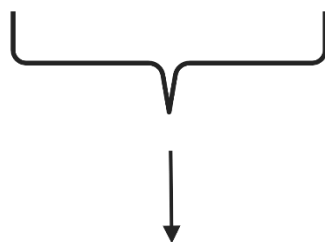
Wyciągi z:

- Taraxacum officinale* (L.) Weber, korzenia mniszka lekarskiego
- Solidago virgaurea*, ziela nawłoci pospolitej
- Silybum marianum* (L.) Gaertn nasion ostropestu plamistego,
- Cynara scolymus*, ziela karczocha zwyczajnego

Selekcja dodatku paszowego do dalszych badań



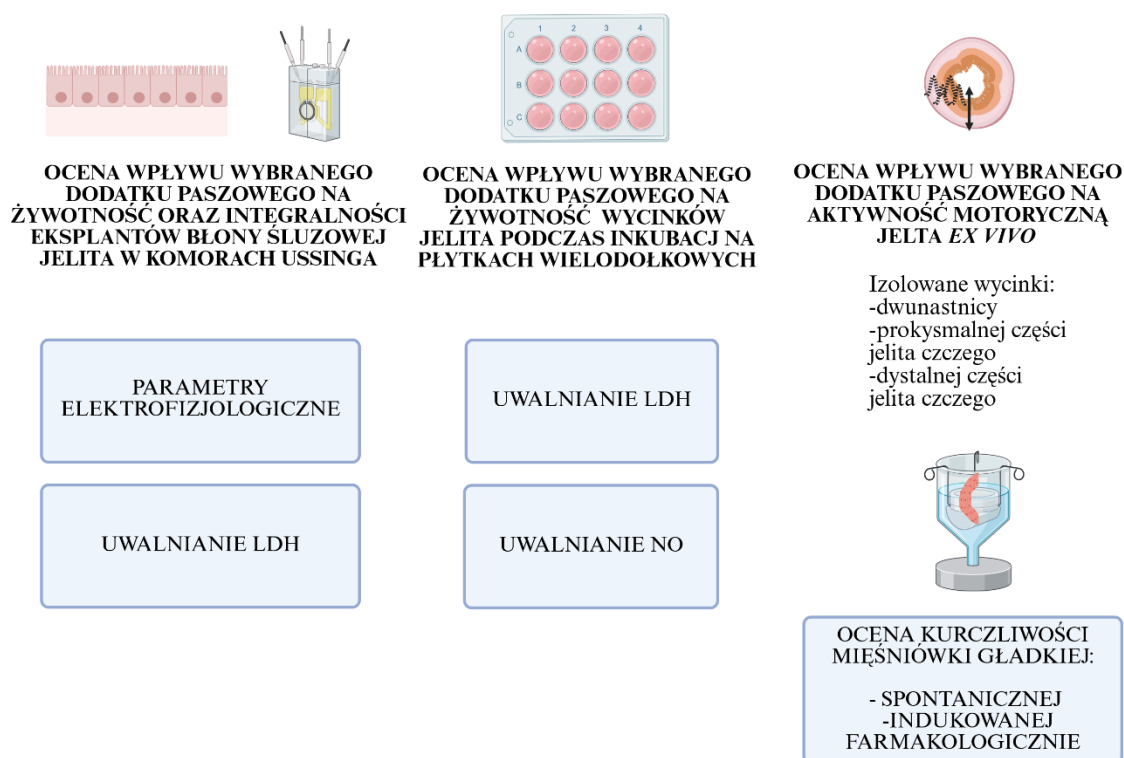
WYBRANY DODATEK PASZOWY



ETAP 3

Ryc. 4. Schemat pierwszego oraz drugiego etapu prowadzonych badań.
Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

ETAP 3 PROWADZONYCH BADAŃ



Ryc. 5. Schemat 3 etapu prowadzonych badań
Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

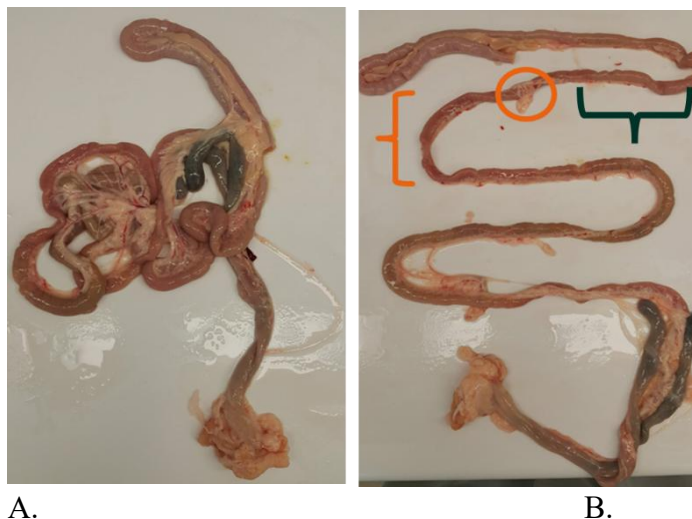
Doświadczenia *in vitro* oceniające właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne oraz przeciwutleniające wybranych wyciągów roślinnych zostały przeprowadzone w Zakładzie Fitomedycyny Wydziału Medycyny Weterynaryjnej na Uniwersytecie w Pretorii (Republika Afryki Południowej), zgodnie z opracowaną i wykorzystywaną w tym Zakładzie metodyką.

Doświadczenia na wycinkach jelit *ex vivo* były przeprowadzone na Uczelni macierzystej.

3.2.1. Optymalizacja warunków transportu i charakterystyka modelu z użyciem wycinków jelita czczego

3.2.1.1. Pobieranie fragmentów jelit oraz transport materiału z ubojni do laboratorium, izolacja i preparacja wycinków jelit

Natychmiast po uboju i wyjęciu narządów wewnętrznych następowała izolacja dziesięciocentymetrowego fragmentu jelita czczego.



Ryc. 6. Przewód pokarmowy brojlera kurzego:

A. po wyjęciu z tuszy, tuż po uboju

B. przygotowany do izolacji odpowiednich wycinków jelita czczego.

W pomarańczowym okręgu zaznaczony jest wyraźnie widoczny uchyłek Meckela. Zielona klamra przed nim schematycznie wyznacza pobieraną część proksymalną, a pomarańczowa za nim część dystalną.

Aby mieć pewność, że fragmenty jelita czczego są pobierane w sposób powtarzalny, za charakterystyczny, widoczny makroskopowo punkt odniesienia przyjęto uchyłek Meckela (*diverticulum Meckeli*, *diverticulum vitellinum*), zaznaczony okręgiem na rycinie 6. Uchyłek ten znajduje się dokładnie w połowie długości jelita cienkiego (Branton i in., 1988), a choć wcześniej uważano, że wyznacza on granicę między jelitem czczym, a jelitem krętym, obecnie jelito kręte definiuje się jako końcową część jelita cienkiego, otoczoną jelitami ślepyimi i połączoną z tymi strukturami więzadłami krętniczko-kątniczymi (Casteleyn i in., 2010). Stąd, wycinki proksymalnej części jelita czczego pobierane były przed uchyłkiem Meckela, a dystalne za nim.

W celu optymalizacji procesu przygotowania i transportu wycinków do laboratorium wykonano szereg doświadczeń weryfikujących warunki, w których przetrzymywano tkanki na etapie przedlaboratoryjnym - do chwili rozpoczęcia inkubacji w konkretnym modelu *ex vivo*.

W celu usunięcia treści jelitowej wycinki po pobraniu były natychmiast płukane:

- A. zimnym ($0-4^{\circ}\text{C}$) roztworem fizjologicznym (ang. physiological saline, RF), a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w lodowatym buforze M K-HS ($0-4^{\circ}\text{C}$) i transportowane w lodówce na lodzie ($0-4^{\circ}\text{C}$).
- B. zimnym ($0-4^{\circ}\text{C}$) RF, a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w lodowatym podłożu WE ($0-4^{\circ}\text{C}$) i transportowane w lodówce na lodzie ($0-4^{\circ}\text{C}$).
- C. zimnym ($0-4^{\circ}\text{C}$) RF, a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w lodowatym podłożu WE z dodatkiem 10% FBS i transportowane w lodówce na lodzie ($0-4^{\circ}\text{C}$).
- D. zimnym ($0-4^{\circ}\text{C}$) RF zawierającym inhibitor trypsyny (IT; 1mg/ml), a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w lodowatym buforze M K-HS zawierającym IT (1 mg/ ml) i transportowane w lodówce na lodzie ($0-4^{\circ}\text{C}$).
- E. ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) RF, a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) buforze M K-HS i transportowane w inkubatorze ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- F. ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) RF, a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) podłożu WE i transportowane w inkubatorze ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- G. ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) RF, a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) podłożu WE z dodatkiem 10% FBS i transportowane w inkubatorze ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- H. ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) RF zawierającym IT (1 mg/ ml), a następnie na czas transportu do laboratorium umieszczane w ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) buforze M K-HS zawierającym IT (1 mg/ ml) i transportowane w inkubatorze ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Czas transportu wyizolowanych wycinków z zakładu uboju drobiu do laboratorium wynosił do 35 minut.

Tabela 2. Zastosowane warunki i parametry płukania oraz transportu wyizolowanych wycinków jelit z zakładu ubojowego do laboratorium

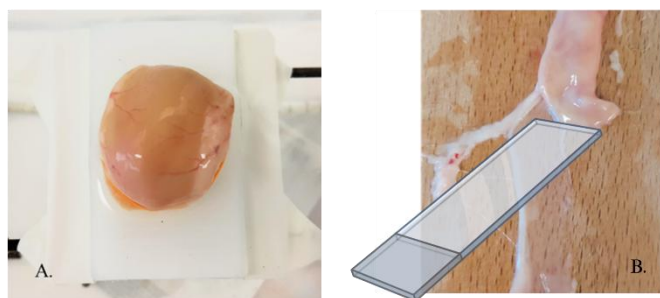
Płukanie jelita w ubojni bezpośrednio po wyjęciu z tuszy		Transport do laboratorium	
Wykorzystano	Temperatura	Bufor / Podłoże	Temperatura
0,9% NaCl	0-4°C	M K-HS	0-4°C
0,9% NaCl	38±1°C	M K-HS	38±1°C
0,9% NaCl	0-4°C	WE	0-4°C
0,9% NaCl	38±1°C	WE	38±1°C
0,9% NaCl	0-4°C	WE + FBS	0-4°C
0,9% NaCl	38±1°C	WE + FBS	38±1°C
0,9% NaCl + IT	0-4°C	M K-HS + IT	0-4°C
0,9% NaCl + IT	38±1°C	M K-HS + IT	38±1°C

3.2.1.2. Preparacja wycinków jelita czczego brojlerów kurzych do doświadczeń w komorach Ussinga

Proksymalne wycinki jelita czczego każdorazowo po przywiezieniu do laboratorium były rozcinane wzdłuż osi podłużnej, następnie powtórnie dokładnie płukane, w celu usunięcia pozostałości treści jelitowej. Wycinki bez widocznych makroskopowo zmian były przeznaczone do kolejnych etapów doświadczenia.

Następnie, w zależności od testowanej procedury (Ryc. 7):

- A. z fragmentów jelit, bez żadnej dodatkowej preparacji, były wycinane niewielkie segmenty 1 x 1,5 cm, które następnie były umieszczane w komorach Ussinga,
- B. przydanka była usuwana poprzez preparację szkiełkiem podstawowym według protokołu opisanego przez Ruhnke i in. (2013) z drobnymi modyfikacjami. Wycinek jelita po przepłukaniu był umieszczony i unieruchomiony słuzówką do góry na drewnianej podkładce, a następnie przydanka była oddzielona jednym sprawnym ruchem szkiełka podstawowego przesuwanego pod odpowiednim kątem. W ten sposób na podkładce pozostawała oddzielona przydanka, a na szkiełku zostawała pozostała część tkanki, którą następnie można było podzielić na mniejsze fragmenty - eksplanty i zamontować w komorach Ussinga.



Ryc. 7. Dwa warianty procedury przygotowania wycinków jelit do doświadczenia w komorze Ussinga

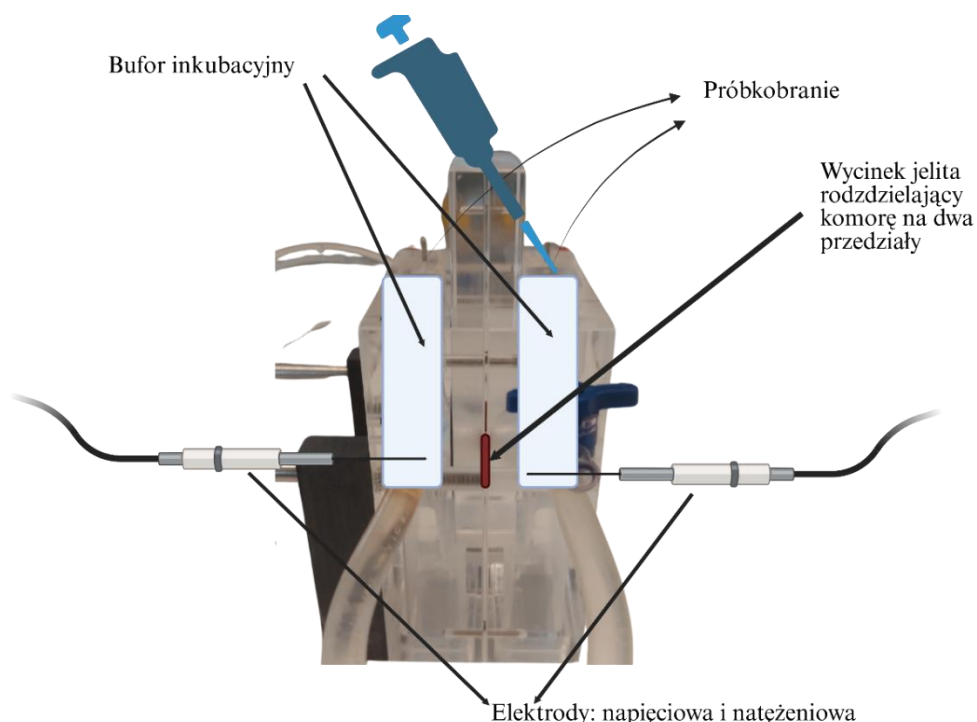
A – wycinek pełnej grubości, niepreparowany;

B wycinek w trakcie preparacji szkiełkiem podstawowym; na zdjęciu widoczny fragment jelita pełnej grubości zwróconego śluzówką do góry oraz fragment przydanki pozostały na podkładce po preparacji.

Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

3.2.1.3. Inkubacja eksplantów w komorze Ussinga

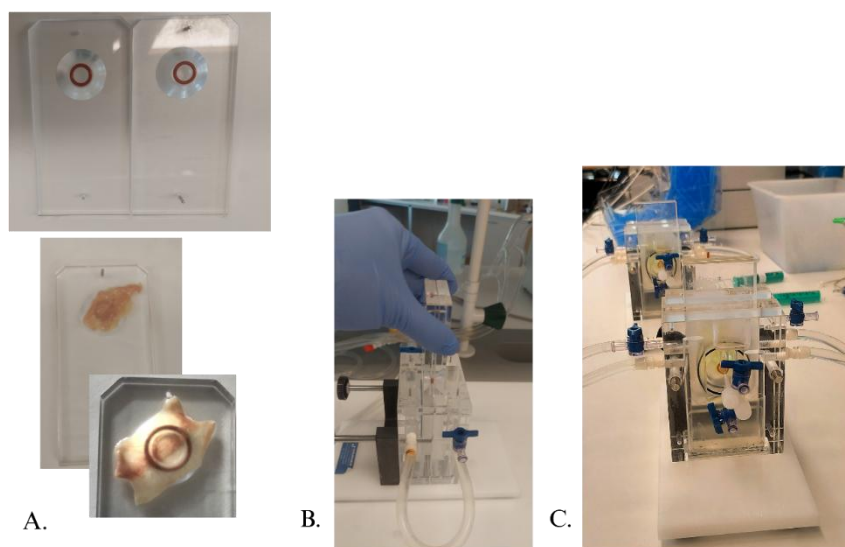
Po przygotowaniu wycinki jelit umieszczano w komorach Ussinga (Warner Instruments, USA) (Ryc. 8, 9). Komory składają się z dwóch przedziałów o pojemności 6 ml każdy, które po zamontowaniu wycinka pomiędzy nimi odpowiadały stronie wewnętrznej – śluzówce (światłu jelita) oraz zewnętrznej – przydancie (błonie surowiczej). Otwór we wkładzie oddzielającym oba przedziały, pozwalający na kontakt tkanki z buforem inkubacyjnym miał średnicę 0,5 cm (co odpowiada powierzchni 0,1963 cm²).



Ryc. 8. Schemat budowy komory Ussinga;

Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Po umieszczeniu wycinków w komorach następowała preinkubacja w świeżym buforze M K-HS o temperaturze $38\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.3 gazowanym w sposób ciągły mieszanką 95%/5% O_2/CO_2 . Ten etap miał na celu przystosowanie tkanki do warunków doświadczenia oraz szybkie rozgrzanie wycinka, w przypadku tkanek transportowanych w niskiej temperaturze. Czas preinkubacji wynosił odpowiednio: 5 oraz 15 minut dla wycinków jelit przewożonych w ciepłym oraz zimnym buforze.



Ryc. 9. Przygotowanie doświadczenia w komorach Ussinga.

- A. Umieszczenie eksplantu jelita pomiędzy dwoma częściami wkładu mocującego go w komorze.
- B. Umieszczenie wkładu w komorze Ussinga.
- C. Wypełnienie komory odpowiednim buforem inkubacyjnym

Po preinkubacji następowała wymiana buforu inkubacyjnego w obu przedziałach. Po wymianie, bufor znajdujący się w komorze od strony śluzówki zawierał dodatkowo markery transportu przez barierę jelitową. W zależności od eksperymentu, stosowano markery przepuszczalności bariery jelitowej: żółć lucyferowa (ang. lucifer yellow, LY) w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, peroksydazę chrzanową (ang. horseradish peroxidase, HRP) (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kofeinę (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mannitol (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Do buforu inkubacyjnego, w niektórych eksperymentach, dodawano 10% FBS.

Podczas inkubacji trwającej od 60 do 180 minut, temperatura oraz pH buforu były utrzymywane na stałym poziomie, był on także gazowany karbogenem w sposób ciągły. Co 30 minut pobierano również próbki o objętości od 200 do 500 μl (w zależności od rodzaju eksperymentu i czasu trwania inkubacji), do dalszych oznaczeń. Na początku i na końcu oraz co 30 minut w trakcie inkubacji mierzony był przeznabłonkowy opór elektryczny (TEER). W niektórych układach doświadczalnych mierzono dodatkowo inne

parametry elektrofizjologiczne: prąd zwarcia (I_{sc}), przewodność całkowitą (G_t), przewodność komórkową (G_c) oraz przez nabłonkową różnicę potencjałów (TEP).

3.2.1.4. Ocena integralności i żywotności eksplantów błony śluzowej w komorze

Ussinga

Weryfikacja integralności eksplantów obejmowała ocenę wizualną eksplantu po preparacji – brak widocznego przerwania tkanki, brak uszkodzeń, a także brak przeciekania buforu inkubacyjnego podczas napełniania jednego z przedziałów komory oraz ocenę parametrów elektrofizjologicznych i transportu substancji znacznikowych, opisanych poniżej.

Ocena żywotności obejmowała oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase, LDH) w buforze inkubacyjnym.

3.2.1.4.1 Pomiar i rejestracja parametrów elektrofizjologicznych

Pomiar parametrów elektrofizjologicznych (TEER, I_{sc} , G_t , G_c , TEP) przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu elektrod: dwóch napięciowych i dwóch natężeniowych (Warner Instruments, USA) umieszczonych po przeciwległych stronach wycinka w komorze Ussinga (jedna w przedziale śluzówkowym, druga w przydankowym), połączonych z systemem zacisków napięcia nabłonkowego („voltage clamp”) ze wzmacniaczem (Ephitelial Voltage Clamp, EC-800, Warner Instruments, USA) oraz rejestratorem sygnału (PowerLab 8/35, ADInstruments,). Elektrody napięciowe Ag/AgCl przed doświadczeniami zostały przygotowane według instrukcji producenta (U-9926, Rev, 11.30.99, Warner Instruments, USA). Przed pierwszym montażem elektrody zostały najpierw poddane chlorowaniu, a następnie zakończenia elektrod oraz wnętrza ich osłonek zostało pokryte mostkiem agarowym zawierającym 3M KCl, tak aby zostały wyeliminowane wszelkie pęcherzyki powietrza, a elementy Ag/AgCl zostały szczelnie przykryte. Zastosowany system zacisków napięciowych ze wzmacniaczem (Ephitelial Voltage Clamp, EC-800, Warner Instruments, USA) pozwala na zastosowanie napięcia ± 120 V, które jest polecane dla badania wysoce przepuszczalnych nabłonków, takich jak nabłonek przewodu pokarmowego. Podczas doświadczenia, przed rozpoczęciem docelowych pomiarów, opór buforu inkubacyjnego został zmierzony i skompensowany przed zastosowaniem metody „voltage clamp” oraz automatycznie odjęty od całkowitego oporu podczas pomiaru TEER. TEER został zmierzony automatycznie po przepuszczeniu przez badany eksplant impulsu bipolarnego prądu o natężeniu 10 μA . W niektórych

doświadczeniach pomiar TEER był wykonywany przy wykorzystaniu miernika Millicell ERS-2 Epithelial Volt-Ohm Meter (Merck GA, Darmstadt, Germany). Pomiar I_{sc} był przeprowadzony po ustaleniu napięcia tkanki na poziomie 0 mV za pomocą techniki zacisku napięciowego (ang. *voltage clamp*), a pomiar TEP został wykonany po ustaleniu natężenia prądu przepływającego przez eksplant na 0 μ A za pomocą zacisku natężeniowego (ang. *current clamp*). Zmiany parametrów elektrofizjologicznych zostały zapisane przy pomocy programu LabChart 7.0 (ADInstruments, Sydney, Australia). W zależności od układu doświadczalnego pomiar był przeprowadzany co 30 minut podczas inkubacji (TEER) lub jednokrotnie po preinkubacji wykonywanej w celu przystosowania eksplantów do warunków eksperymentalnych i kalibracji układu.

3.2.1.4.2 Test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej

Aktywność enzymu LDH oceniono w pobranym w czasie doświadczeń buforze inkubacyjnym znajdującym się w przedziale śluzówkowym oraz przydankowym. Oznaczenie przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu testowego, zgodnie z zleceniami producenta (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Sigma- Aldrich). Odczyt przeprowadzono z użyciem czytnika mikropłytek (BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader, USA).

Wynik przedstawiono jako odsetek aktywności LDH w odpowiednim buforze inkubacyjnym w porównaniu do aktywności enzymu w wycinku tkanki o wymiarach odpowiadających fragmentowi eksplantu podlegającemu ekspozycji w komorze Ussinga, zhomogenizowanym z 1% Triton X-100 (taką aktywność uznano za 100% aktywności enzymu).

3.2.1.4.3 Markery transportu przez eksplant jelita czczego

Do oceny transportu cząsteczek poprzez barierę jelitową wykorzystano substancje znacznikowe – LY, mannitol, HRP oraz kofeinę.

Substancje te były dodawane do buforu inkubacyjnego (LY 100 μ g/ml, HRP 200 μ g/ml, kofeina 100 μ g/ml, mannitol 100 μ g/ml) znajdującego się po stronie śluzówki, a następnie mierzony był ich transport przez wycinek na stronę przydanki podczas inkubacji.

Transport LY oceniono poprzez odczyt zmiany fluorescencji bezpośredniej buforu inkubacyjnego. W tym celu próbki (70 μ l) pobrane w czasie inkubacji przeniesiono w dwóch powtórzeniach na czarną 96-dółkową płytkę z przezroczystym dnem,

a następnie odczytano ich fluorescencję przy pomocy czytnika mikroplatek (Microplate Fluorescence Reader, FLx800, Bio-Tek Instruments). Długości fal wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio 485 i 530 nm. Na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczono procentowe stężenie LY oraz wyliczono przepływ (ang. *flux*) LY poprzez wycinek w czasie inkubacji.

Transport mannitolu przez wycinek oceniono poprzez pomiar stężenia mannitolu w próbkach pobieranych co 30 minut w czasie doświadczenia z buforu inkubacyjnego po stronie śluzówki oraz przydanki. Oznaczenie wykonano z wykorzystaniem komercyjnego testu D-Mannitol Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich) zgodnie z instrukcją producenta.

Transport HRP określono poprzez pomiar aktywności tego enzymu w próbkach buforu inkubacyjnego pobranych na koniec doświadczenia (po 120 minutach inkubacji). Do oceny aktywności HRP wykorzystano pirogallol jako substrat. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta pirogallolu (Sigma-Aldrich) - test enzymatyczny peroksydazy (EC 1.11.1.7).

Zmiany stężenia kofeiny w buforze inkubacyjnym podczas doświadczenia zostały określone z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV (HPLC-UV). Próbkę buforu inkubacyjnego pobranego na zakończenie doświadczenia (po 120 minutach) odwirowano, a supernatant przefiltrowano przez filtr 0,22 µm. Dla zwiększenia objętości analitu połączono pobrane próbki z 2-3 powtórzeń. Następnie 20 µl przefiltrowanych próbek wstrzyknięto do systemu HPLC HP 1100 składającego się z pompy czterokanałowej, automatycznego podajnika próbek, termostatu próbki, termostatu kolumny i detektora diodowego. Zastosowano kolumnę Nucleosil 120-5C18 HPLC (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Fazą ruchomą był metanol. Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Detekcję przeprowadzono przy długości fali 254 nm (ref. 360 nm). Badane substancje identyfikowano na podstawie czasów retencji czystych standardów referencyjnych. Wykonano także krzywe kalibracyjne przy wykorzystaniu roztworu wzorcowego. Powierzchnie pików chromatograficznych analitów mierzono przy użyciu oprogramowania systemu HPLC (Agilent ChemStation Rev. A.06.01 [403] Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA, USA).

Na podstawie zmiany stężenia substancji badanej w przedziale przydankowym dla wszystkich substancji znacznikowych obliczono wartość przepływu (ang. *flux*), odpowiadającą transportowi substancji ze strony śluzówkowej komory do części

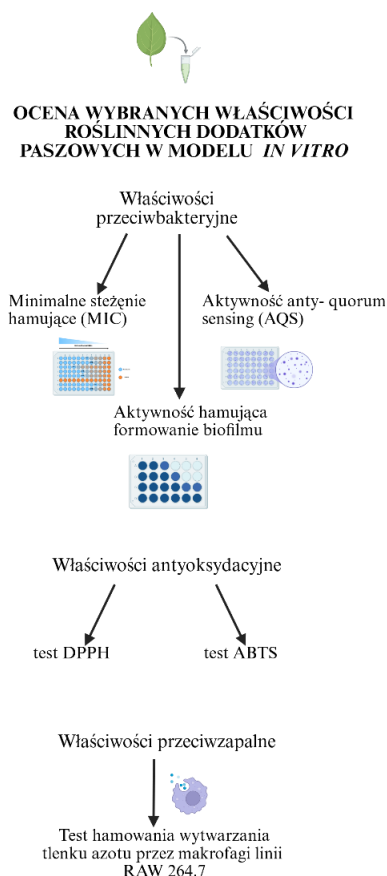
przydankowej wyrażoną w nanomolach substancji na jednostkę czasu (min.) oraz jednostkę powierzchni wymiany (cm²). Wyznaczono również współczynnik przepuszczalności pozornej Papp (cm/s) na podstawie wzoru (Smetanova i in., 2009):

$$Papp = (dQ/dt) \times (1/A \times C_0),$$

gdzie dQ/dt to przepływ substancji z części śluzówkowej do części przydankowej w jednostce czasu (nmol/s), C_0 to początkowe stężenie substancji w przedziale śluzówkowym, odpowiadające sile dyfuzyjnej (nmol/cm³), A to powierzchnia wymiany (cm²).

3.2.2. Ocena wybranych właściwości roślinnych dodatków paszowych - wyciągów roślinnych w warunkach *in vitro*

Ocena właściwości wyciągów roślinnych obejmowała: analizę właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwutleniających, przeciwzapalnych. Na rycinie 10 przedstawiono schematycznie wykonywane badania i wykorzystane metody.



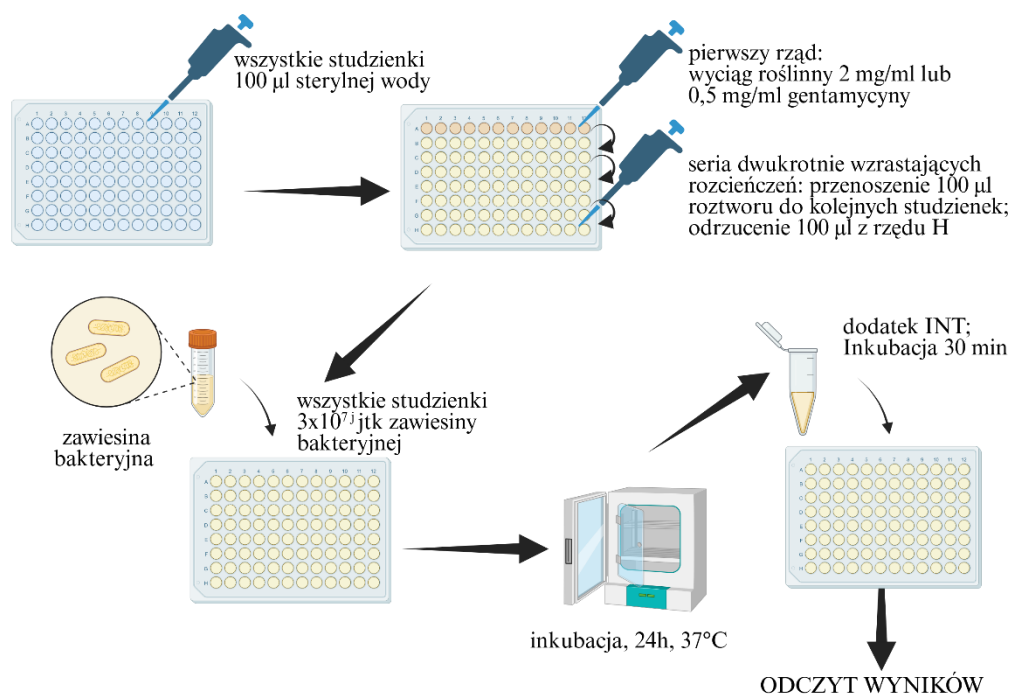
Ryc. 10. Schemat postępowania i wykorzystane metody do oceny wybranych właściwości wyciągów roślinnych w modelu *in vitro*;

Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com

3.2.2.1 Ocena właściwości przeciwbakteryjnych wybranych wyciągów roślinnych

3.2.2.1.1. Minimalne stężenie hamujące

Określenia minimalnego stężenia hamującego (ang. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) wybranych wyciągów roślinnych przeprowadzono metodą mikrorozcieńczeń opisaną przez Eloffa (1998). W doświadczeniach wykorzystano następujące szczepy bakterii: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 51625), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium (ATCC 700720), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43888). Określenie MIC dla każdego ze szczepów przeprowadzono w analogiczny sposób, opisany poniżej (Ryc. 11, 12).

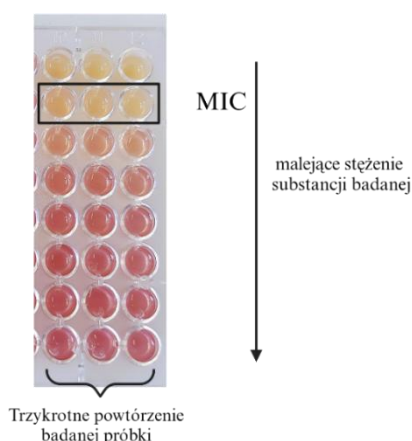


Rys. 11. Schemat doświadczenia w celu wyznaczenia MIC;
Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Kultury bakterii przygotowano poprzez przeniesienie pojedynczej kolonii każdego szczepu z płytki agarowej do wysterylizowanego bulionu MH i przednamnażanie ich przez noc w cieplarni, w temperaturze 37°C. Każda kultura została następnie rozcieńczona sterylnym świeżym bulionem MH w celu uzyskania zawiesiny bakterii zgodnej ze standardem nr 1 w skali McFarlanda (ok. 3×10^8 jtk/ml), co odpowiada

OD=0,257. Absorbancję mierzono przy długości fali 600 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Epoch™ Microplate Spectrophotometer). Następnie do każdej studzienki sterylnej 96-dółkowej płytki dodawano 100 µl sterylnej wody. Roztwór podstawowy (stęż. 10 mg/ml) każdego z badanych wyciągów roślinnych rozcieńczono seryjnie na płytce w trzech powtórzeniach dla każdej próbki, w następujący sposób: 100 µl roztworu podstawowego dodano do studzienek pierwszego rzędu płytki (A), po czym, przenosząc 100 µl roztworu w dół, do studzienek w kolejnych rzędach i odrzucając 100 µl z rzędu H uzyskano seryjne dwukrotne rozcieńczenie. Ostateczny zakres stężeń wyciągów roślinnych wynosił: 2,5 mg/ml - 0,0195 mg/ml. Gentamycyna (Virbac) służyła jako kontrola pozytywna, podczas gdy aceton i 10% DMSO były kontrolami ujemnymi, rozcieńczonymi w analogiczny sposób. Ostateczny zakres stężeń dla gentamycyny wynosił: 0,05 mg/ml - 0,000024 mg/ml, a dla DMSO i acetonu, odpowiednio: 2,5% - 0,0012% oraz 25% - 0,012%. Wykonano również kontrolę czystości pożywki, nakładając ją bezpośrednio na płytkę, bez dodatku zawiesiny bakteryjnej i/lub badanych substancji, a także kontrolę każdej kultury bakteryjnej w czystej pożywce. Następnie do wszystkich studzienek, z wyjątkiem kontroli czystości pożywki, dodano 3×10^7 jtk przygotowanej zawiesiny odpowiedniej kultury bakteryjnej. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie, w celu określenia minimalnego stężenia hamującego, do każdej studzienki inkubowanych płytek dodano 40 µl odczynnika chlorku jodonitrotetrazolinowego (ang. iodonitrotetrazoilum, INT) o stężeniu 0,2 mg/ml.

Następnie płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut przed odczytem MIC. W wyniku aktywności organizmów żywych bezbarwne sole tetrazoliowe są biologicznie redukowane do kolorowego – czerwonego produktu. Ostatnia studzienka z wyraźnym zahamowaniem rozwoju bakterii – brakiem zabarwienia – została oznaczona jako MIC.



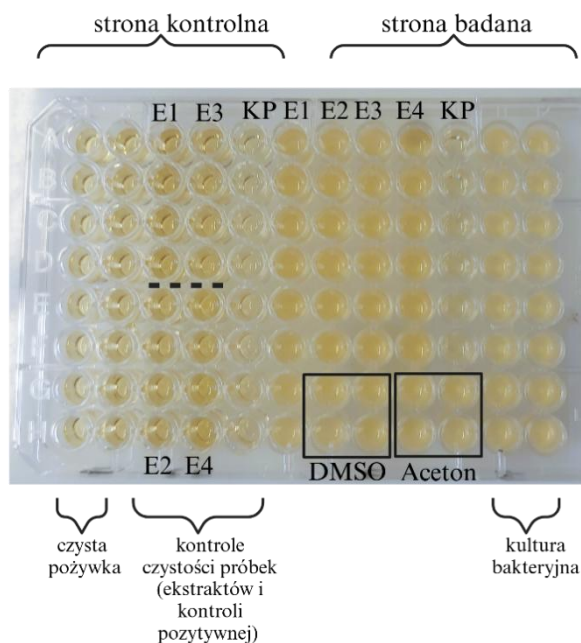
Ryc. 12. Odczyt MIC – ostatni rząd studzienek, w których nie obserwuje się czerwonego zabarwienia świadczącego o wzroście bakterii;

Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

3.2.2.1.2. Wpływ na tworzenie biofilmu

Wpływ wyciągów roślinnych na tworzenie biofilmu oceniano za pomocą zmodyfikowanego protokołu opisanego przez Sandasi i współpracowników (2010) (Ryc. 13, 14). Podczas badania analizowano wpływ wyciągów roślinnych na dwa etapy rozwoju biofilmu. Oceniano: (1) możliwość zapobiegania tworzenia się biofilmu oraz (2) zdolność do niszczenia biofilmu bakteryjnego powstałego w ciągu 24 godzin wzrostu bakterii na płytce, w czystej pożywce. W pierwszym przypadku kultury bakterii inkubowano z wyciągami roślinnymi od początku eksperymentu (T0), w drugim przypadku dodanie wyciągów roślinnych następowało po 24 godzinach wzrostu bakterii (T24). Przygotowano świeżą zawiesinę *S. epidermidis* poprzez przeniesienie pojedynczej kolonii z płytki agarowej do sterylnej pożywki TSB i przednamnażanie w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie poprzez odpowiednie rozcieńczenie zawiesiny w sterylnej pożywce TSB do OD=0,08-1 mierzonej przy długości fali 590 nm, przygotowano zawiesinę bakteryjną odpowiadającą 0,5 w skali McFarlanda (tj. około $1,5 \times 10^8$ jtk/ml). Otrzymaną tak zawiesinę dalej rozcieńczono w pożywce w proporcjach 1:100. Tworzenie biofilmu uzyskano poprzez wysianie $1,5 \times 10^5$ jtk bakterii z przygotowanej, standaryzowanej kultury *S. epidermidis* do sterylnej, płaskodennej, 96-dółkowej płytki. Następnie do każdej ze studzienek dodano 100 µl próbki wyciągu roślinnego, bądź odpowiednich kontroli (negatywnej – sterylnej pożywki TSB i pozytywnej – cyprofloksacyny) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C bez mieszania. Do badania wykorzystano roztwory robocze wyciągów (2 mg/ml) *Taraxacum officinale* (L.), *Solidago virgaurea*, *Cynara scolymus* oraz roztwór o stężeniu sub-MIC: 1,25 mg/ml wyciągu *Silybum marianum* (L.) uzyskane poprzez przygotowanie rozcieńczenia roztworu podstawowego wyciągów 100 mg/ml w sterylnej pożywce (TSB)

i przefiltrowanie go przez filtr strzykawkowy o średnicy 0,22 μm . Oceniono również wpływ rozpuszczalników badanych wyciągów. Kontrolę negatywną stanowiła czysta pożywka (TSB), a kontrolę pozytywną ciprofloksacyna w stężeniu 2 mg/ml, dodatkowo wykonano kontrolę czystości pożywki (TSB, bez zawiesiny bakterii) oraz każdego z wyciągów roślinnych (wyciąg w TSB, bez zawiesiny bakterii).



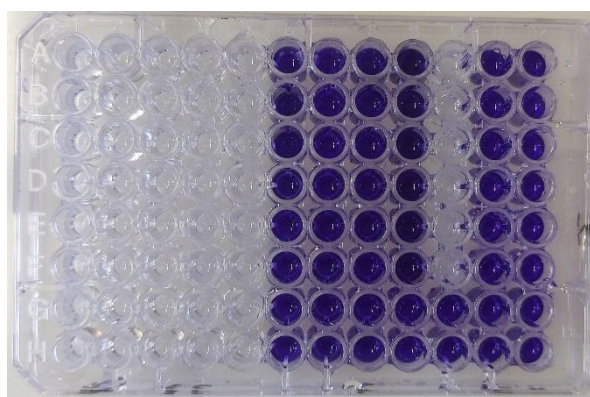
Ryc. 13. Przykładowa płytka przygotowana do oceny zdolności hamowania tworzenia biofilmu badanych wyciągów, po 24-godzinnej inkubacji, przed barwieniem fioletem krystalicznym.

Na dnie studzienek strony badanej makroskopowo widoczny jest wzrost bakterii (z wyjątkiem kontroli pozytywnej); E1,E2,E3,E4 – próbki czterech kolejnych wyciągów roślinnych; KP - kontrola pozytywna. Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Do oceny tworzenia biofilmu wykorzystano zmodyfikowany test barwienia fioletem krystalicznym (CVS) (Sandasi i in., 2010). Przeprowadzono go po 24 godzinach inkubacji z wyciągami w przypadku oceny T0, natomiast dla T24 inkubacja wyniosła 24-godziny w czystej pożywce, a potem kolejne 24 godziny po dodaniu wyciągów roślinnych. Po tym czasie studzienki zostały ostrożnie opróżnione, a płytki przepłukano co najmniej trzy razy sterylną wodą destylowaną w celu usunięcia niezwiązanych lub luźno połączonych komórek bakteryjnych. Następnie płytki wstępnie wysuszono na powietrzu, po czym przełożono je do suszarki laboratoryjnej o temperaturze 60°C, gdzie pozostały na kolejne 45 minut do całkowitego wysuszenia. Związane pod postacią biofilmu komórki bakteryjne, znajdujące się na dnie studzienek, następnie barwiono 150 μl 0,1% roztworem fioletem krystalicznym. Płytki pozostawiono przez 20 minut w temperaturze pokojowej pod przykryciem w celu związania barwnika. Po upływie tego czasu nadmiar fioletem spłukiwano, przemywając płytki sterylną wodą co najmniej pięciokrotnie. Biomasa biofilmu oceniono półilościowo poprzez ponowne rozpuszczenie

fioletu krystalicznego związanego z przylegającymi komórkami za pomocą 150 µl 100% etanolu w celu zniszczenia komórek bakteryjnych. Absorbancję odczytano przy długości fali 590 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Epoch™ Microplate Spectrophotometer) po starannym, ale delikatnym wstrząsaniu. Wyznaczono średnią absorbancję (OD590nm) próbki, a wyniki wyrażono jako procentowe zahamowanie wytwarzania biofilmu/niszczenie powstałego biofilmu za pomocą następującego równania:

$$\% \text{ Zahamowania} = \frac{[(\text{ODkontrola ujemna} - \text{ODpożywka}) - (\text{ODpróba badana} - \text{ODkontrola wyciągu})]}{(\text{ODkontrola ujemna} - \text{ODpożywka})} \times 100$$



Ryc. 14. Płytką z Ryc. 13 przygotowaną do oceny właściwości zdolności hamowania tworzenia biofilmu badanych wyciągów, po 24-godzinnej inkubacji, po wybarwieniu fioletem krystalicznym.

3.2.2.1.3. Aktywność anty-quorum sensing

Aktywność anty-quorum sensing (AQS) wyciągów roślinnych określono przy użyciu szczepu wskaźnikowego *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, według protokołu opisanego przez Chenię (2013) z modyfikacjami (Adeyemo i in., 2022) (Ryc. 15). Zawiesinę bakteryjną przygotowano przez przeniesienie pojedynczej kolonii bakterii z płytki agarowej do 10 ml bulionu lizogennego (ang. lysogeny broth, LB) i jej przednamnażanie w temperaturze 30°C, w inkubatorze z wytrząsarką orbitalną (140 obr./min) przez 24 godziny przed eksperymentem. Zawiesinę bakterii rozcieńczono następnie w bulionie LB i zmierzono absorbancję przy długości fali 590 nm. Zawiesinę dostosowano do $0,1 \pm 0,02$ wzorca nr 0,5 w skali McFarlanda (co odpowiada około $1,5 \times 10^8$ jtk/ml). Po czym otrzymaną zawiesinę bakteryjną rozcieńczono w stosunku 1:100 w bulionie LB, aby uzyskać inokulum $1,5 \times 10^6$ jtk/ml. W celu przygotowania szeregu rozcieńczeń wybranych wyciągów roślinnych 250 µl sterylnej wody destylowanej dodano do wszystkich studzienek 48-dołkowej sterylnej płytki. Następnie do pierwszego rzędu studzienek dodano 250 µl odpowiedniego wyciągu roślinnego (5 mg/ml) i seryjnie rozcieńczono, dwukrotnie, przenosząc 250 µl do kolejnych rzędów aż 250 µl zostało

odrzucone z ostatniego. Po przygotowaniu szeregu rozcieńczeń badanych wyciągów, 250 μ l rozcieńczonej (1:100) zawiesiny bakteryjnej ($1,5 \times 10^6$ jtk) dodano do wszystkich studzienek płytki, z wyjątkiem kontroli negatywnej i kontroli czystości wyciągu, aby uzyskać całkowitą objętość 500 μ l. Kontrolę negatywną stanowiła pożywka (LB), z odpowiednim rozpuszczalnikiem (aceton, DMSO), a kontrolę pozytywną wanilina (10 mg/ml rozpuszczona w etanolu). Dodatkowo wykonano kontrolę jałowości wyciągu (bez zawiesiny bakteryjnej) oraz kontrolę kultury bakteryjnej (stanowiła odniesienie do określenia hamowania produkcji wiolaceiny). Ostateczny zakres stężeń wyciągów roślinnych wynosił: 1,25 mg/ml - 0,039 mg/ml, a waniliny: 2,5 mg/ml- 0,078 mg/ml. Płytki były dalej inkubowane przez 24 godziny w temperaturze 30°C na wytrząsarce orbitalnej (140 obr./min). Efekt anty-quorum sensing został wyznaczony przez ocenę wzrostu bakterii i obecność fioletowej pigmentacji (produkcję wiolaceiny).



Wzrost *Chromobacterium violaceum* na agarze, obecna charakterystyczna fioletowa pigmentacja

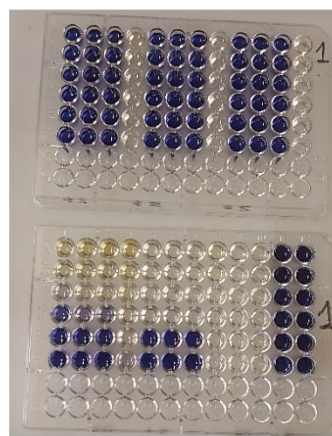
Płytki 96- dołkowe po przeniesieniu do nich supernatantu, gotowe do odczytu absorbancji w celu ilościowego określenia produkcji wiolaceiny



Wzrost *Ch. violaceum* na płytce 48- dołkowej przygotowanej do doświadczenia, obecna charakterystyczna fioletowa pigmentacja



Studzienki zalane DMSO po zakończeniu eksperymentu w celu ilościowego określenia produkcji wiolaceiny



Ryc. 15. Różne etapy doświadczenia badającego właściwości AQS wyciągów roślinnych; Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

Najniższe stężenie, przy którym nie zaobserwowano wzrostu ani pigmentacji, zostało zinterpretowane jako MIC. Obecność wzrostu (zmętnienia) i brak barwy – fioletowego pigmentu zostały zinterpretowane jako minimalne stężenie hamujące quorum sensing (MQSIC). Obecność zarówno wzrostu, jak i pigmentacji została zinterpretowana jako brak aktywności AQS i brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej w badanym stężeniu. Aby określić ilościowo zahamowanie produkcji wiolaceiny, płytki odwirowywano z prędkością 4650 obr./min przez 15 minut w celu osadzenia bakterii zawierających wiolaceinę. Supernatant został usunięty, a pozostały osad bakteryjny zalano ponownie

500 µl 100% roztworu DMSO, a następnie wytrząsano w inkubatorze z prędkością 140 obr./min, aż do rozpuszczenia osadu. Płytki zostały ponownie odwirowane z prędkością 4650 obr./min przez 10 minut w celu oddzielenia komórek bakteryjnych od roztworu. Następnie 200 µl supernatantu przeniesiono na płytkę 96-dołkową i odczytano absorbancję przy 595 nm (Epoch™ Microplate Spectrophotometer).

Procentowe zahamowanie wytwarzania wiołaceiny obliczono za pomocą następującego wzoru:

% zahamowania wytwarzania wiołaceiny = $[(\text{OD}_{\text{kontrola pozytywna}} - \text{OD}_{\text{próba badana}}) / \text{OD}_{\text{kontrola pozytywna}}] \times 100$

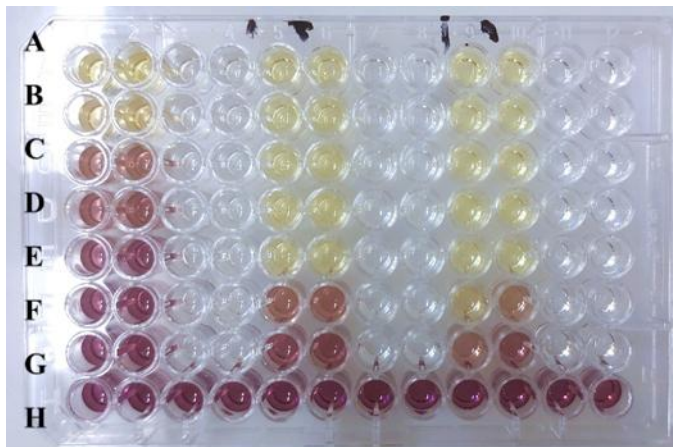
Jako IC₅₀ określono stężenie hamujące 50 % produkcji wiołaceiny, wyznaczone z krzywej zależności stężenie efekt dla badanych substancji.

3.2.2.2. Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych wyciągów roślinnych

Aktywność przeciwutleniającą wyciągów mierzono pod względem ich zdolności do redukcji stabilnych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowych (DPPH) według protokołu zaproponowanego przez Branda-Williamsa i współpracowników (1995) z pewnymi modyfikacjami (Ryc. 16). Do testu przygotowano roztwory podstawowe wyciągów roślinnych o stężeniu 10 mg/ml, z których następnie uzyskano roztwory robocze o stężeniu 1 mg/ml. Test przygotowano w następujący sposób: do każdej studzienki 96-dołkowej płytki dodano 40 µl metanolu (stęż. 99-100%), a następnie do pierwszego rzędu płytki dodano 40 µl wyciągów roślinnych (1 mg/ml) lub substancji stanowiących kontrolę pozytywną – troloksu i kwasu askorbinowego (1 mg/ml), które kolejno seryjnie rozcieńczono. Przygotowano również roztwór podstawowy DPPH w metanolu (1 mg/ml), z którego następnie uzyskano roztwór roboczy o absorbancji 0,9 - 1,0 przy długości fali 517 nm (Epoch™ Microplate Spectrophotometer). Następnie, do każdej studzienki dodano 160 µl roztworu roboczego DPPH, z wyjątkiem prób ślepych, w których zamiast DPPH dodano metanol. Płytki niezwłocznie przykryto folią aluminiową i inkubowano przez 30 minut. Stężenia badanych substancji (wyciągów oraz substancji referencyjnych) wynosiły: od 0,2 do 0,003 mg/ml. Podczas redukcji rodnika DPPH dochodzi do zmiany jego barwy z fioletowej na żółtą. Wartości absorbancji odczytano za pomocą spektrofotometru przy długości fali 517 nm, a efekt wychwytu DPPH określono według następującego wzoru:

Redukcja rodnika DPPH (%) = $[(\text{As} - \text{Ab} / \text{Ak})] \times 100$

gdzie A_s jest absorbancją w obecności badanej próbki (= OD), A_b to absorbancja próbki bez DPPH, jedynie z metanolem (tło), a A_k stanowi absorbancję kontroli negatywnej (100% DPPH). Krzywe wzorcowe wykreślono, zestawiając procentową redukcję rodnika DPPH z kontrolą negatywną.



Ryc. 16. Przykładowa płytka testowa w teście DPPH. Podczas redukcji rodnika DPPH dochodzi do zmiany jego barwy z fioletowej na żółtą. Stężenie badanych substancji maleje od rzędu A do G. W rzędzie H znajduje się kontrola negatywna – DPPH i metanol.

Drugim z wykonanych testów było oznaczenie zdolności wyciągów do redukcji rodników 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) (ABTS+).

Przebieg i przygotowanie doświadczenia było zbliżone do testu DPPH, z tą różnicą, że roztwór roboczy ABTS (Sigma-Aldrich, South Africa) przygotowywano przez połączenie uprzednio rozpuszczonych: 76,81 mg ABTS w 20 ml roztworu metanolu oraz 26,49 mg nadsiarczanu potasu w 20 ml metanolu (o stęż. 99-100%). Następnie mieszaninę pozostawiono na 16 godzin w ciemności przed przeprowadzeniem doświadczenia. Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia roztwór podstawowy rodnika ABTS rozcieńczono metanolem do uzyskania absorbancji o wartości 0,7 - 0,8 przy długości fali 734 nm (Epoch™ Microplate Spectrophotometer), otrzymując w ten sposób roztwór roboczy. Następnie przygotowano szereg rozcieńczeń badanych substancji na płytce 96-dołkowej. W tym celu do każdej studzienki płytki dodano 40 μ l metanolu, po czym do jej pierwszego rzędu dodano 40 μ l wyciągów roślinnych (1 mg / ml) lub substancji odniesienia - troloksu i kwasu askorbinowego (1 mg / ml) i seryjnie je rozcieńczono. Następnie do każdej studzienki dodano 160 μ l ABTS, z wyjątkiem prób ślepych, w których zamiast ABTS dodano metanol. Stężenia badanych substancji (wyciągów oraz substancji referencyjnych) wynosiły: od 0,2 do 0,003 mg/ml. Płytki przykryto folią aluminiową i inkubowano przez 5 minut, po czym odczytano

absorbancję za pomocą czytnika mikropłytek przy długości fali 734 nm. Efekt redukcji rodników obliczono przy użyciu następującego wzoru:

$$\text{Redukcja rodnika ABTS}^+ (\%) = [(A_s - A_b / A_k)] \times 100$$

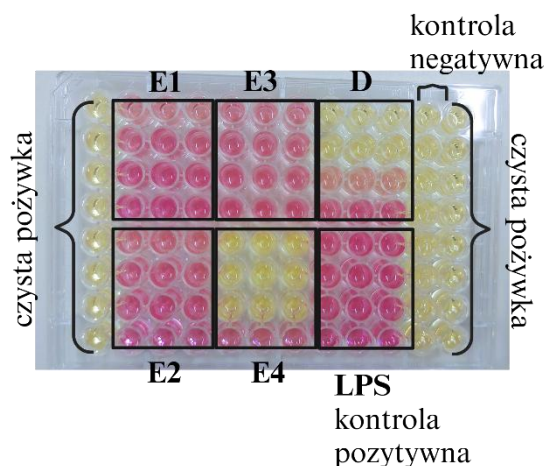
Gdzie A_s jest absorbancją w obecności badanej próbki, A_b to absorbancja próbki bez DPPH, jedynie z metanolem (tło), a A_k stanowi absorbancję kontroli negatywnej (100% ABTS). Krzywe wzorcowe narysowano, wykreślając procentową redukcję rodnika ABTS^+ w stosunku do kontroli negatywnej.

3.2.2.3. Ocena właściwości przeciwzapalnych wybranych wyciągów roślinnych

Do oceny właściwości przeciwzapalnych wybranych wyciągów roślinnych wykorzystano mysie makrofagi ustalonej linii RAW 264.7. Ze względu niestabilność tlenu azotu (ang. nitric oxide, NO), do pośredniej oceny produkcji NO wykorzystano jego bardziej trwałe metabolity – azotany (III), których stężenie określono za pomocą odczynnika Griessa (Sigma-Aldrich, South Africa). Doświadczenie wykonano według procedury opisaną wcześniej przez Dzoyem i współpracowników (2016).

Mysie makrofagi linii RAW 264.7 zakupione z American Type Culture Collection (ATCC, USA), były utrzymywane w modyfikowanym podłożu Eagle'a (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) uzupełnionym 10% FBS, z dodatkiem 1% penicyliny (100 jednostek/ml) i streptomycyny (100 $\mu\text{g/ml}$) w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO_2 (HERAcell 150, Thermo Electron Corp, Separation Scientific, Johannesburg, Republika Południowej Afryki). W celu przeprowadzenia testu makrofagi wysiano do sterylnej płytki 96- dołkowej w ilości 1×10^5 komórek/ studzienkę w 100 μl pożywki hodowlanej (Ryc. 17). Ponadto przygotowano roztwory podstawowe wyciągów roślinnych o stężeniu 10 mg/ml, które przefiltrowano przez sterylne filtry strzykawkowe o średnicy 0,22 μm . Po 24 godzinach inkubacji pożywka została wymieniona na 100 μl nowej, zawierającej 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS *E. coli* 0111:B4, w celu aktywacji makrofagów. Roztwory robocze wyciągów roślinnych przygotowano tuż przed ich dodaniem do studzienek, poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworów podstawowych w podłożu DMEM do uzyskania stężeń od 800 do 20 $\mu\text{g/ml}$ badanych wyciągów (stężenia końcowe w studzienkach wynosiły od 400 do 10 $\mu\text{g/ml}$). W sposób analogiczny została przygotowana substancja odniesienia jaką był diklofenak. Do studzienek (z wyjątkiem kontroli negatywnej i pozytywnej) dodano następnie po 100 μl odpowiedniej próbki. Komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny, po których 100 μl supernatantu przeniesiono na nową płytkę 96- dołkową, na której

do każdej ze studzienek dodano 100 μ l odczynnika Griessa. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). Studzienki w kolumnach 1 i 12 zawierające tylko pożywkę z odczynnikiem Griessa stanowiły próbę ślepą.

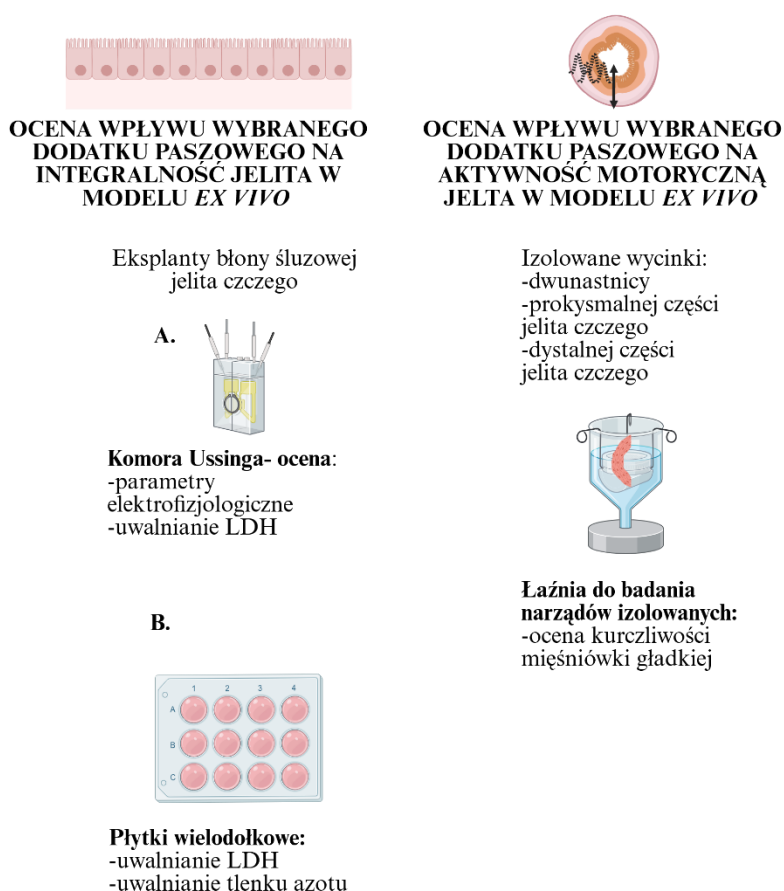


Ryc. 17. Przykładowa płytką przygotowana do oceny hamowania produkcji NO, po dodaniu odczynnika Griessa E1,E2,E3,E4 – próbki czterech kolejnych wyciągów roślinnych; D – diklofenak; Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com

Poziom azotanów (III) w pożywce obliczono na podstawie krzywej wzorcowej azotynu sodu (NaNO_2). Procent zahamowania produkcji NO obliczono na podstawie zdolności każdej próbki do hamowania wytwarzania tlenu azotu przez makrofagi RAW 264.7 w porównaniu z kontrolą (komórki stymulowane LPS, bez badanych substancji). Następnie zbadano żywotność komórek przy użyciu zmodyfikowanego testu kolorymetrycznego (MTT) na bazie redukcji soli tetrazolowej opisanego przez Mosmanna (1983). Podłoże usunięto ze wszystkich studzienek płytki zawierającej makrofagi, a następnie przemyto 100 μ l soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) i zastąpiono 200 μ l świeżego podłoża. Do każdej studzienki dodano 20 μ l MTT (Sigma-Aldrich, South Africa) roztwór podstawowy 5 mg/ml w PBS, po czym płytki inkubowano przez kolejne 2 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie podłoże powtórnie usunięto, a kryształy formazanu MTT rozpuszczono w 100 μ l DMSO. Płytki delikatnie wstrząsano przez 5 minut na wytrząsarce orbitalnej, aby umożliwić rozpuszczenie formazanu. Stopień redukcji MTT zmierzono natychmiast w czytniku mikropłytek, poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). Studzienki w kolumnach 1 i 11-12, zawierające jedynie pożywkę i MTT, bez komórek, służyły jako próba ślepa.

3.2.3. Ocena aktywności wyciągu z *Silybum marianum* (L.) w modelach *ex vivo* opartych na wycinkach jelit pozyskanych z przemysłowego uboju drobiu

WYKORZYSTANE METODY



Ryc. 18. Schematyczne przedstawienie metod wykorzystanych do oceny wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na wybrane funkcje jelita cienkiego brojlerów kurzych w modelu *ex vivo*; Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

3.2.3.1. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na integralność i przepuszczalność eksplantów błony śluzowej jelita inkubowanych w komorze Ussinga

Wpływ wyciągu z *Silybum marianum* (L.) (Sm) na przepuszczalność bariery jelitowej oraz integralność eksplantów został oceniony podczas doświadczeń przeprowadzanych w komorach Ussinga. Doświadczenia były przygotowane według schematu opisanego w sekcji 3.2.1.3.

Wycinki proksymalnej części jelita czczego były przywożone w ciepłym podłożu Williamsa ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.3) z dodatkiem 10% FBS oraz 100 $\mu\text{g/ml}$ Sm w DMSO lub dodatkiem DMSO (kontrola negatywna). Stężenie DMSO podczas transportu nie przekraczało 0,1%. W doświadczeniu mającym na celu ocenę wpływu Sm na wybrane parametry elektrofizjologiczne w warunkach symulowanego zapalenia wycinki były dodatkowo transportowane z dodatkiem lub bez dodatku LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). Czas transportu wycinków do laboratorium, wynoszący 35 minut, służył również za czas preinkubacji z badanymi substancjami.

Po przywiezieniu wycinków do laboratorium eksplanty były przygotowywane poprzez preparację szkiełkiem podstawowym (jak opisano w sekcji 3.2.1.2). Następnie eksplanty były umieszczane w komorach Ussinga i inkubowane w ciepłym M K-HS ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.3). Bufor znajdujący się w komorze od strony śluzówki zawierał dodatkowo 10% FBS. Od strony śluzówki dodawano również substancję badaną: Sm rozpuszczony w DMSO (stężenie 100 $\mu\text{g/ml}$) lub DMSO (kontrola negatywna) z lub bez dodatku LPS (65 $\mu\text{g/ml}$, stężenie wyznaczone na podstawie danych literaturowych Kallapura i in., 2015; Zhang i in., 2017a). Stężenie DMSO w komorach nie przekraczało 0,1%.

Po umieszczeniu eksplantów w komorach Ussinga i pięciominutowej preinkubacji oceniano parametry elektrofizjologiczne według schematu opisanego w sekcji 3.2.1.4.1. Podczas inkubacji trwającej 60-120 minut, temperatura oraz pH buforu były utrzymywane na stałym poziomie, był on także gazowany karbogenem w sposób ciągły. Co 30 minut pobierano również próby o objętości 500 μl do dalszych oznaczeń.

Wykonano także oznaczenie uwalnianego podczas inkubacji LDH, szczegółowo opisane w sekcji 3.2.1.4.2.

3.2.3.2. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na żywotność wycinków jelita podczas inkubacji w płytkach wielodołkowych

Wycinki jelit do doświadczeń na płytce wielodołkowej były transportowane w ciepłym podłożu WE ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7,3) z dodatkiem 10% FBS oraz 100 $\mu\text{g/ml}$ wyciągu z *Silybum marianum* (L.) rozpuszczonym w DMSO lub DMSO (kontrola negatywna). Stężenie DMSO podczas transportu nie przekraczało 0,1%. Czas transportu wycinków do laboratorium, wynoszący 35 minut, służył również za czas inkubacji z wyciągiem z *Silybum marianum* (L.). Doświadczenie zostało wykonane w sposób opisany przez Zhang i in. (2017a), z pewnymi modyfikacjami.

Po przywiezieniu do laboratorium wycinek jelita był rozcinany wzdłuż, a następnie umieszczany szluzówką do góry na szalce Petriego pokrytej parafiną. Po odpowiednim unieruchomieniu fragmentu jelita, przy pomocy sztancy biopsyjnej o średnicy 6 mm były z niego wycinane okrągłe skrawki pełnej grubości, które parami umieszczano w dołkach płytki 12-dołkowej. Każdy dołek uzupełniano 1,5 ml podłoża WE z dodatkiem 10% FBS o temperaturze 39°C, pH 7.3. Następnie przeprowadzono 10 minutową preinkubację, po której następowała wymiana podłoża we wszystkich dołkach oraz dodanie LPS (0-80 µg/ml) i/lub Sm rozpuszczonego w DMSO (stężenie 100 µg/ml) lub DMSO (kontrola negatywna) do odpowiednich dołków testowych. Wycinki kontrolne oraz stymulowane LPS pochodziły od tego samego zwierzęcia, co umożliwiało względne porównanie wyników doświadczenia.

Płytki na czas 120- minutowej inkubacji umieszczone były w inkubatorze (TGO 150 Cell life, Thermo Electron Corporation.) w temperaturze 39°C, w atmosferze 95%/5% O₂/CO₂. Podczas inkubacji co 30 minut były pobierane próby podłoża inkubacyjnego o objętości 200µl do dalszych oznaczeń.

Żywotność wycinków w modelu wykorzystującym inkubację na płytkach wielodołkowych oceniono poprzez test uwalniania LDH. Aktywność enzymu oceniono w pobranym w czasie doświadczeń buforze inkubacyjnym. Oznaczenie przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu testowego, zgodnie z zleceniami producenta (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Sigma- Aldrich). Odczyt przeprowadzono z użyciem czytnika mikropłytek (BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader, USA).

Wynik przedstawiono jako odsetek aktywności LDH w odpowiednim podłożu inkubacyjnym w porównaniu do aktywności enzymu w wycinku tkanki o wymiarach odpowiadających dwóm wycinkom znajdującym się w jednym dołku płytki podczas inkubacji, zhomogenizowanym z 1% Triton X-100 (uznane za 100% aktywności enzymu).

3.2.3.3. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na uwalnianie tlenu azotu przez wycinki jelita podczas inkubacji na płytkach wielodołkowych

Pomiar stężenia azotanów (III) w podłożu hodowlanym służył do pośredniego pomiaru NO wytwarzanego przez wycinki podczas inkubacji. Do oceny stężenia azotynu wykorzystano odczynnik Griessa (Sigma-Aldrich). 50 µl podłoża inkubacyjnego pobranych podczas inkubacji przeniesiono na płytkę 96- dołkową w trzech powtórzeniach, a następnie dodano 50 µl odczynnika Griessa. Mieszaninę inkubowano

przez 15 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikropłytek (BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader, USA). Studzienki zawierające tylko podłoże z odczynnikiem Griessa stanowiły próbę ślepą. Odczynnik Griessa w obecności jonów azotanów (III) tworzy barwnik azowy, powodujący zmianę zabarwienia roztworu z koloru żółtego na różowy. Ilość azotanów (III) w podłożu obliczono na podstawie krzywej wzorcowej azotynu sodu (NaNO_2).

3.2.3.4 Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na aktywność motoryczną izolowanych wycinków jelita cienkiego brojlerów kurzych

3.2.3.4.1 Preparacja wycinków mięśniówki gładkiej jelita cienkiego brojlerów kurzych

Natychmiast po uboju i wyjęciu narządów wewnętrznych następowała izolacja dziesięciocentymetrowego fragmentu wybranego odcinka jelita cienkiego: dwunastnicy, bądź proksymalnej lub dystalnej części jelita czczego. Następnie pobrane fragmenty jelit były płukane i transportowane, zgodnie z opracowaną w Zespole metodyką (Połuszyński i in., 2023). Do płukania wykorzystano zimny RF ($0-4^\circ\text{C}$), a pobrane wycinki były umieszczone w lodowatym ($0-4^\circ\text{C}$) buforze M K-HS do badania aktywności motorycznej i transportowane na lodzie ($0-4^\circ\text{C}$).

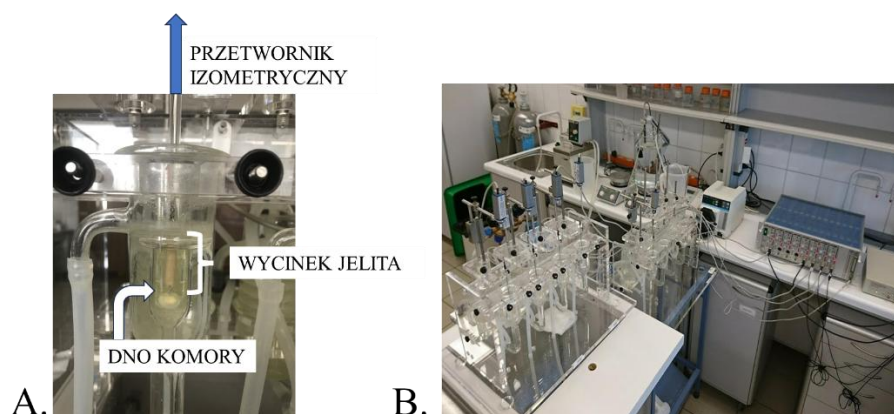
Czas transportu wyizolowanych wycinków z zakładu uboju drobiu do laboratorium wynosił do 35 minut.

Podobnie jak w przypadku eksplantów błony śluzowej, w celu preparacji wycinków mięśniówki gładkiej, wycinki jelit po przywiezieniu do laboratorium były otwierane wzdłuż osi podłużnej, a następnie powtórnie płukane i oceniane makroskopowo. Jedynie wycinki bez widocznych zmian były wykorzystywane do doświadczeń. Następnie z fragmentów jelita wycinano skrawki o wymiarach około 1 cm x 2 cm, równoległe do przebiegu podłużnych włókien mięśni gładkich (Połuszyński i in., 2023).

3.2.3.4.2 Schemat doświadczenia w komorze do badania narządów izolowanych

Wycinki jelit o wymiarach około 1 cm x 2 cm były pojedynczo zamieszczane w komorach do badania narządów izolowanych (Schuler Organ Bath, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) oraz pionowo unieruchamiane poprzez zamocowanie ich dystalnego końca do stalowego haczyka znajdującego się na dnie komory (Ryc. 19). Proksymalny koniec

połączony był z haczykiem przymocowanym do wolframowej nici połączonej z przetwornikiem izometrycznym (F30, type 372, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). Sygnał przechodzący przez przetwornik był następnie amplifikowany przez wzmacniacz mostkowy (DBA, typ 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Niemcy) i odczytywany przez rejestrator analogowo- cyfrowy (PowerLab, ADInstruments, Sydney, Australia). Zmiany aktywności motorycznej wycinków zostały zobrazowane i zapisane w programie LabChart 7.0 (ADInstruments, Sydney, Australia). Analiza danych została przeprowadzona przy użyciu programu LabChart 8.1. i Microsoft Office Excel.



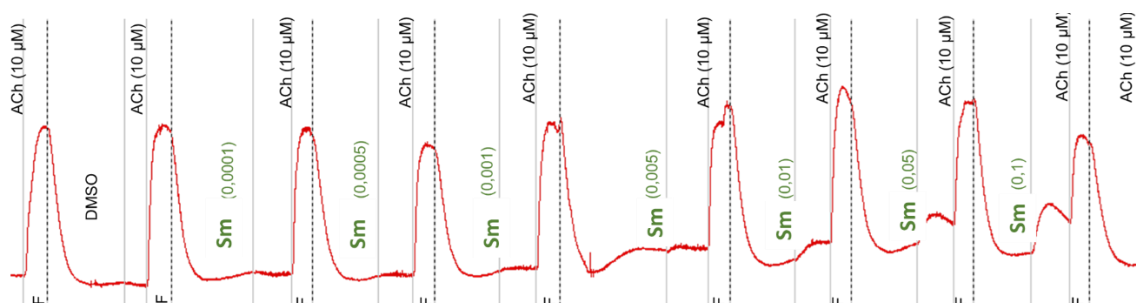
Ryc. 19. Doświadczenie w komorze do badania narządów izolowanych

- A. Wycinek jelita umieszczony w komorze; dystalny koniec przymocowany do stalowego haczyka znajdującego się na dnie komory; proksymalny koniec połączony z haczykiem przymocowanym do wolframowej nici połączonej z przetwornikiem izometrycznym
- B. Komory do badania narządów izolowanych połączone z wzmacniaczem oraz rejestratorem analogowo- cyfrowym

3.2.3.4.3 Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na aktywność motoryczną dwunastnicy i jelita czczego

Doświadczenia przeprowadzono w oparciu o stosowaną w Zakładzie metodykę (Pośluszy i in., 2023). Każde z doświadczeń było poprzedzone około 45minutową preinkubacją, mającą na celu stabilizację wycinków w warunkach doświadczalnych. Podczas preinkubacji wycinki były przepłukiwane co 15-20 minut świeżym buforem Krebsa-Hanseleita (39°C), który w komorach był gazowany karbogenem w sposób ciągły. Doświadczenia przeprowadzane były w warunkach izometrycznych, a zmianę kurczliwości wycinka odczytywano poprzez rejestrację zmian jego napięcia. Po zakończeniu wstępnej preinkubacji wycinki poddano działaniu siły 0,01 N, dwukrotnie w odstępie 15 minutowym. Następnie oceniono odpowiedź

wycinków na działanie prokinetycznej substancji referencyjnej poprzez podanie 10 μ M acetylocholiny (ACh) przynajmniej dwukrotnie. Jedynie wycinki wyraźnie reagujące na ACh w sposób powtarzalny oraz wykazujące miarową aktywność spontaniczną były wykorzystane do dalszych doświadczeń. Rejestrowano aktywność motoryczną przez 3 - 5 minut. Następnie komory przepłukiwano świeżym buforem (ang. *flush*). Po przepłukaniu i stabilizacji aktywności spontanicznej wycinka powtórnie podawano ACh (10 μ M). Następnie powtarzano płukanie świeżym buforem i po powrocie do aktywności spontanicznej podano DMSO w stężeniu 0,5% w celu sprawdzenia reakcji wycinków na rozpuszczalnik. Po stabilizacji aktywności spontanicznej wycinków rozpoczynała się zasadnicza część doświadczenia mająca na celu ocenę wpływu rosnących stężeń Sm, podawanych w sposób niekumulatywny, na aktywność motoryczną wycinków. Badane stężenia wyciągu wynosiły: 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 i 0,1 mg/ml (Ryc. 20). Po podaniu wyciągu reakcję wycinków obserwowano przez około 5 minut (do uzyskania fazy plateau), a następnie podawano ACh (10 μ M). Po kolejnych 5 minutach komory płukano i po stabilizacji pracy wycinka procedurę powtarzano podając wyższe stężenie wyciągu, tj. oceniono wpływ wyciągu na aktywność motoryczną wycinków jelita w sposób niekumulacyjny.



Ryc. 20. Przykładowy zapis zmian aktywności motorycznej wycinka proksymalnej części jelita czczego wywołanych przez Sm. ACh – Acetylocholina (10 μ M), Sil –wyciąg z *Silybum marianum* (L.) F – płukanie (ang. *flush*) świeżym M K-HS.

W ten sposób przeprowadzono ocenę wpływu Sm na aktywność spontaniczną mięśniówki oraz indukowaną acetylocholiną. Na zakończenie eksperymentu podano ACh w celu weryfikacji reaktywności wycinków.

Wszystkie wyniki wyrażono jako procent reakcji kontrolnej, to jest zmiany aktywności motorycznej wycinka w odpowiedzi na M K-HS lub DMSO (0,5%) w przypadku analizy aktywności spontanicznej i skurczu mięśni gładkich wywołanego przez ACh (10 mM) w przypadku analizy wpływu na aktywność indukowaną ACh. Reakcję wywołaną przez

M K-HS, DMSO (0,5%) i ACh w dawce referencyjnej zdefiniowano jako 100% (kontrola).

3.2.4. Obliczenia i analiza statystyczna

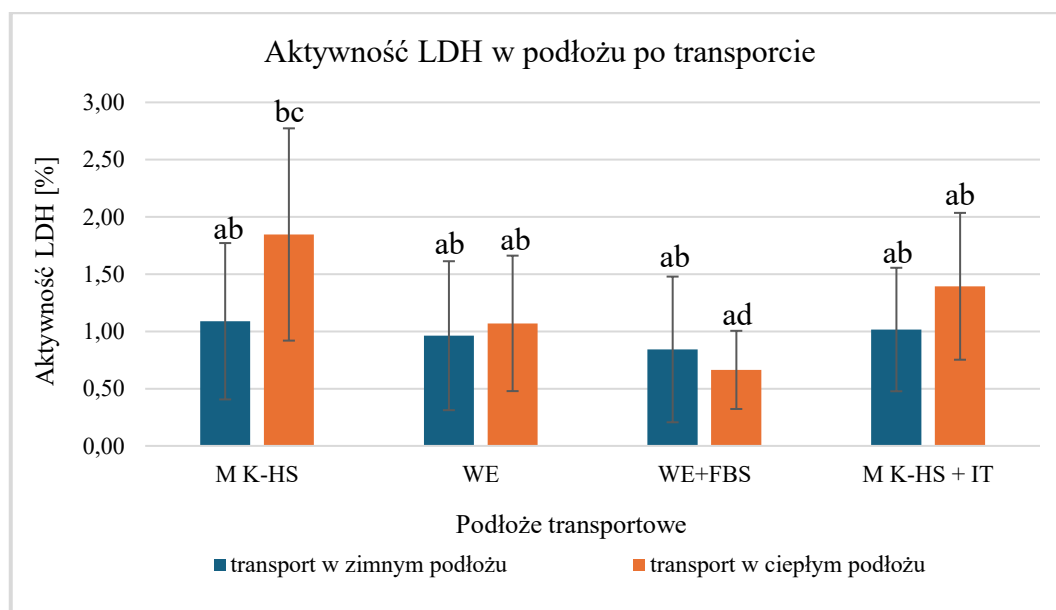
Wyniki poszczególnych doświadczeń zostały wyrażone jako średnia $\pm$ SD. Różnice statystyczne między grupami obliczano przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu porównań wielokrotnych Tukeya lub testu t, jeśli porównywano tylko dwie grupy. Wyniki uznano za statystycznie istotne, gdy $p \leq 0,05$. Obliczenia były wykonywane przy użyciu programów Excel (Microsoft Office 365), LabChart 8.1, StatSoft, Inc. STATISTICA (system oprogramowania do analizy danych), wersja 13 www.statsoft.com oraz GraphPad Prism 8.0.0 dla systemu Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. WYNIKI

4.1. Optymalizacja warunków transportu i charakterystyka modelu z użyciem wycinków jelita czczego

4.1.1. Wpływ warunków transportu na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej przez wycinek

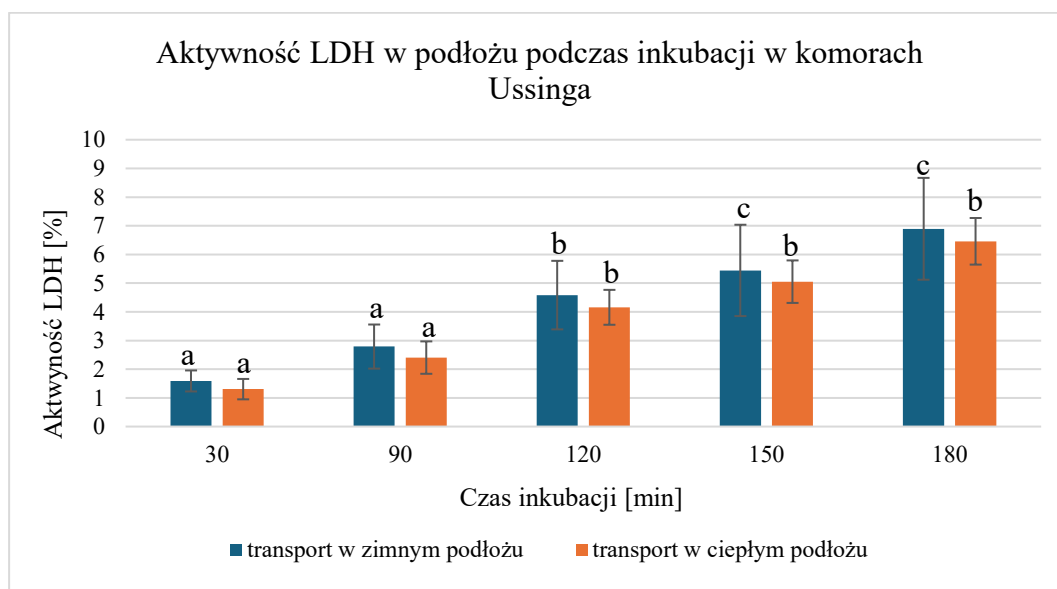
Na wykresie (Ryc. 21) przedstawiono aktywność LDH uwolnionej z komórek wycinków jelit podczas transportu z ubojni do laboratorium, zależnie od zastosowanej podłoża oraz temperatury transportu. Istotne statystycznie różnice zaobserwowano jedynie pomiędzy aktywnością LDH uwolnionej z wycinków transportowanych w ciepłym ($38 \pm 1^\circ\text{C}$) buforze M K-HS (gdzie aktywność LDH była najwyższa i wynosiła $1,83\%$) a aktywnością LDH zmierzoną w ciepłym podłożu transportowym WE z dodatkiem 10% FBS (gdzie stwierdzono najniższą aktywność LDH w eksperymencie, wynoszącą $0,67\% \pm 0,34$). Na podstawie analizy otrzymanych wyników postanowiono wykorzystywać podłoże WE z dodatkiem 10% FBS we wszystkich kolejnych doświadczeniach.



Ryc. 21. Aktywność LDH w podłożu po przywiezieniu wycinków z ubojni do laboratorium, zależnie od warunków transportu (temperatura, zastosowane podłoże). Wynik przedstawiono jako odsetek aktywności LDH w odpowiednim buforze inkubacyjnym w porównaniu do aktywności enzymu we fragmencie śluzówki długości transportowanego wycinka zhomogenizowanym z 1% Triton X-100 (uznano za 100% aktywności enzymu).

Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD ($n=8$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$

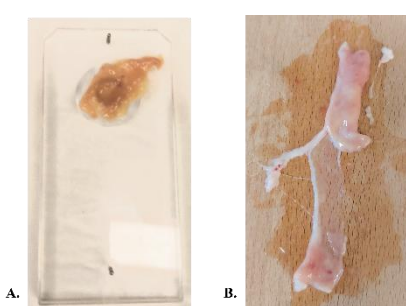
Na wykresie (Ryc. 22) przedstawiono aktywność LDH w buforze inkubacyjnym (M K-HS), podczas inkubacji eksplantów w komorach Ussinga, które zostały przywiezione do laboratorium w podłożu WE z dodatkiem 10% FBS w różnej temperaturze. Statystycznie istotny wzrost aktywności LDH zaobserwowano po 120 minutach inkubacji, niezależnie od temperatury transportu wycinków. W przypadku eksplantów pozyskanych z wycinków transportowanych w ciepłym podłożu nie zaobserwowano dalszego istotnego wzrostu w aktywności uwalnianej LDH do 180 minuty inkubacji. W przypadku eksplantów pozyskanych z wycinków transportowanych w zimnym podłożu kolejny istotny statystycznie wzrost aktywności LDH zaobserwowano po 150 minutach inkubacji, ale bez dalszych, istotnych zmian do 180 minuty inkubacji.



Ryc. 22. Aktywność LDH w buforze inkubacyjnym w czasie inkubacji eksplantów w komorach Ussinga, zależnie od temperatury transportu wycinków i czasu inkubacji. Wynik przedstawiono jako odsetek aktywności LDH w odpowiednim buforze inkubacyjnym w porównaniu do aktywności enzymu w wycinku tkanki o wymiarach odpowiadających fragmentowi eksplantu podlegającemu ekspozycji w komorze Ussinga, zhomogenizowanym z 1% Triton X-100 (uznano za 100% aktywności enzymu). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD ($n=6-13$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$

4.1.2. Wpływ temperatury transportu na skuteczność preparacji

Preparacja wycinków przywiezionych w zimnym podłożu transportowym ($0-4^{\circ}\text{C}$) charakteryzowała się zdecydowanie niższym odsetkiem sukcesów (ok. 50%), w porównaniu z preparacją wycinków przywiezionych w ciepłej pożywce ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$), w przypadku której udawało się skutecznie przygotować eksplant w ok. 85-90%. Brak sukcesów wynikał przede wszystkim z uszkodzeń mechanicznych – przerwania lub rozszczelnienia eksplantu podczas preparacji, a także przeciekania podczas rozgrzewania eksplantu – preinkubacji. Na rycinie 23 przedstawiono wygląd eksplantu podczas preparacji oraz po umieszczeniu na wkładzie do komory Ussinga.



Ryc. 23. Skuteczna preparacja wycinka jelita przed zamontowaniem w komorze Ussinga

A – przygotowany eksplant umieszczony na insercie do komory Ussinga, przed jego zamknięciem;

B wycinek po preparacji szkiełkiem podstawowym; na zdjęciu widoczny fragment jelita pełnej grubości zwróconego słuzówką do góry oraz fragment przydanki pozostały na podkładce po preparacji.

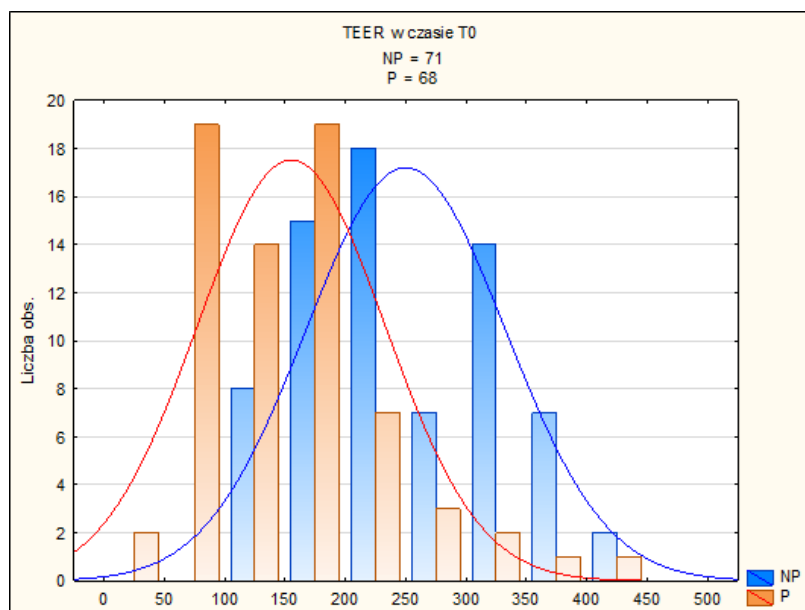
4.1.3. Wpływ preparacji na wartość przeznablonkowego oporu elektrycznego

Na wykresie (Ryc. 24) przedstawiono rozkład wartości TEER w czasie T_0 – odpowiadającemu pomiarowi wykonanemu po zamontowaniu fragmentu tkanki w komorze Ussinga oraz pięciominutowej preinkubacji w celu kalibracji układu.

Zestawienie prezentuje dwie grupy: wycinki niepreparowane (NP) oraz preparowane (P) - eksplanty. Obie grupy charakteryzował rozkład normalny, a średnia wartość TEER w czasie T_0 w przypadku eksplantów wynosiła $154,3 \Omega\text{cm}^2$ i była istotnie niższa niż w przypadku wycinków pełnej grubości, dla których wartość ta wynosiła $248,6 \Omega\text{cm}^2$ (Tabela 3). Jednocześnie zakres wartości TEER dla obu grup był dość szeroki obejmował wartości od 49,0 do $409,5 \Omega\text{cm}^2$ w przypadku eksplantów oraz od 120 do $437,5 \Omega\text{cm}^2$ w przypadku wycinków niepreparowanych. Duży rozrzut wartości wyjściowych, na początku inkubacji, wskazuje na konieczność wykonywania doświadczeń na możliwie jednorodnej grupie wycinków/eksplantów – na przykład pochodzących od zwierząt z jednego stada oraz porównywania względnego otrzymanych wyników, co zostanie omówione w dyskusji pracy.

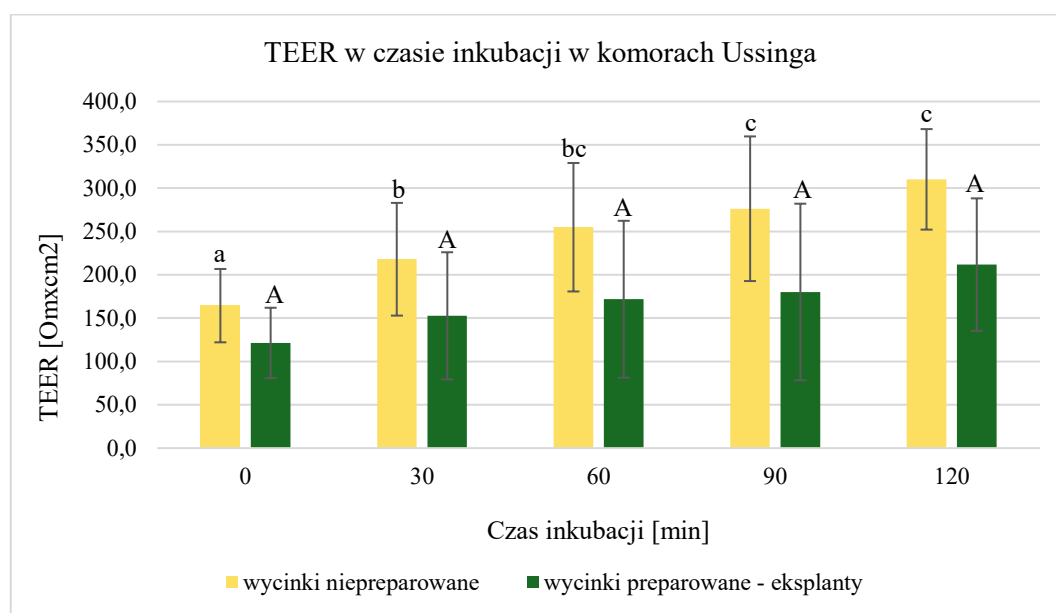
Tabela 3. Porównanie wartości TEER dla wycinków niepreparowanych (NP) oraz preparowanych (P) w czasie T0 przy użyciu testu t-studenta dla prób niezależnych

	Średnia	Liczba (n)	SD	NP. v P p
NP	248,6	71	82,3	< 0,001
P	154,3	68	77,4	



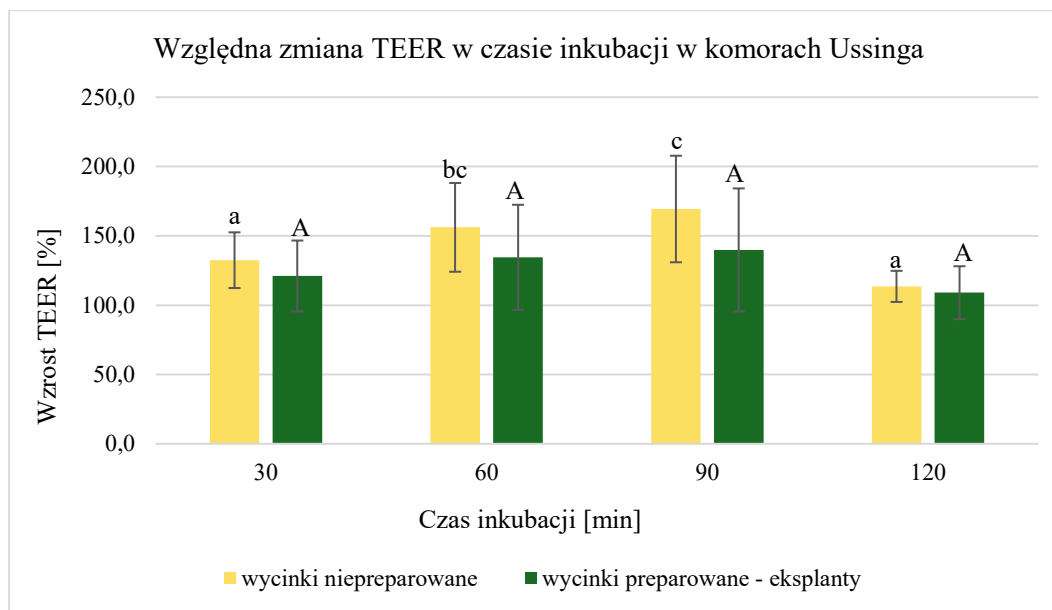
Ryc. 24. Rozkład wartości przelnablonkowego oporu elektrycznego ($\Omega \times \text{cm}^2$) w czasie T0 (po zamontowaniu w komorach Ussinga i po 5-minutowej preinkubacji) dla dwóch grup wycinków – niepreparowanych (n=71), zaznaczonych kolorem niebieskim oraz preparowanych (n=68), zaznaczonych kolorem pomarańczowym. Opracowanie własne, przy użyciu programu Statistica. NP – wycinki niepreparowane; P- wycinki preparowane (eksplant); obs – obserwacje; TEER – przelnablonkowy opór elektryczny

Pomiar TEER co 30 minut w czasie inkubacji wycinków w komorach Ussinga wykazał statystycznie istotny wzrost oporu dla wycinków niepreparowanych już po 30 minutach inkubacji. Do końca inkubacji obserwowano stały wzrost TEER, który w 90 min. okazał się istotnie wyższy niż w 30 min. (Ryc. 25). Nie zaobserwowano istotnych zmian wartości TEER w przypadku eksplantów, chociaż można zauważyć podobną tendencję wzrostową TEER w trakcie trwania inkubacji.



Ryc. 25. Wartości TEER wyrażona jako średnia $\pm$ SD podczas inkubacji wycinków w komorach Ussinga. Różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ w obrębie grup zaznaczono odpowiednio małymi literami dla wycinków niepreparowanych ($n=122$) oraz wielkimi literami dla eksplantów ($n=69$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya).

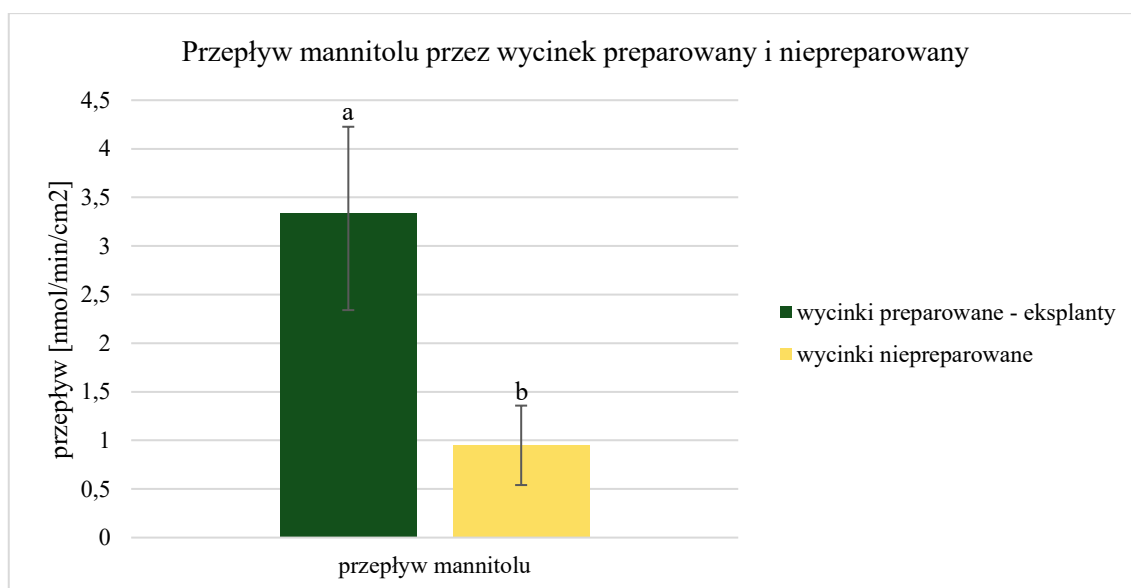
Porównanie względnych zmian wartości TEER w czasie inkubacji, przy przyjęciu wartości z początku inkubacji (T_0) za 100%, wykazało istotny wzrost oporu dla wycinków niepreparowanych pomiędzy 30 a 60 min. inkubacji i dalszy, ale nieistotny wzrost, pomiędzy 60 i 90 minutą inkubacji (Ryc. 26). Nie zaobserwowano istotnych zmian względnych wartości TEER w przypadku eksplantów.



Ryc. 26. Względne zmiany wartości TEER wyrażone jako średnia $\pm$ SD podczas inkubacji wycinków w komorach Ussinga, wyrażone jako % wartości w czasie T0 – uznane za 100%. Różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ w obrębie grup zaznaczono odpowiednio małymi literami dla wycinków niepreparowanych ($n=122$) oraz wielkimi literami dla eksplantów ($n=69$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya).

4.1.4 Charakterystyka transportu substancji wskaźnikowych przez eksplanty w komorach Ussinga

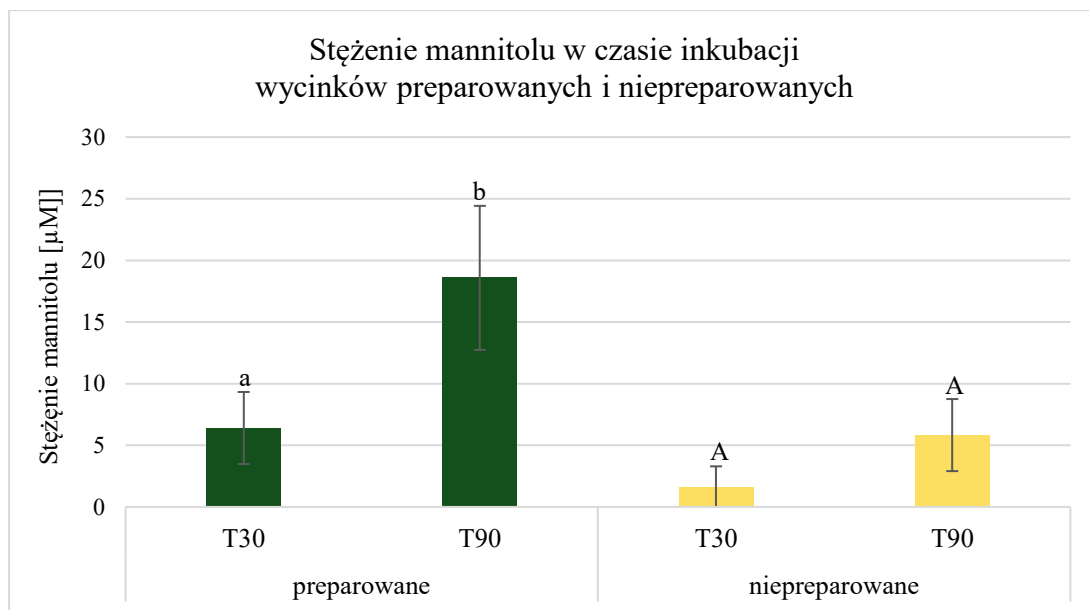
Porównanie transportu mannitolu (substancji wskaźnikowej dla transportu międzykomórkowego) przez wycinek niepreparowany oraz preparowany (eksplant) z przedziału śluzówkowego do przydankowego w komorze Ussinga wykazało istotnie wyższy przepływ mannitolu w przypadku eksplantów błony śluzowej (Ryc. 27). Przepływ przez wycinek preparowany wynosił średnio $3,34 \text{ nmol/min/cm}^2$, podczas gdy przez niepreparowany wynosił $0,95 \text{ nmol/min/cm}^2$.



Ryc. 27. Przepływ mannitolu przez wycinek preparowany i niepreparowany podczas inkubacji w komorach Ussinga. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n=5-7$). Różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Analiza statystyczna wykonana testem t- studenta dla prób niezależnych.

Analiza stężenia mannitolu w przedziale przydanki pokazała, że w przypadku eksplantów zaobserwowano istotny wzrost stężenia mannitolu w przedziale przydankowym po 90 minutach inkubacji, w porównaniu do stężenia po 30 minutach inkubacji, które wynosiło odpowiednio $18,57 (\pm 5,85)$ oraz $6,40 (\pm 2,92) \mu\text{M}$.

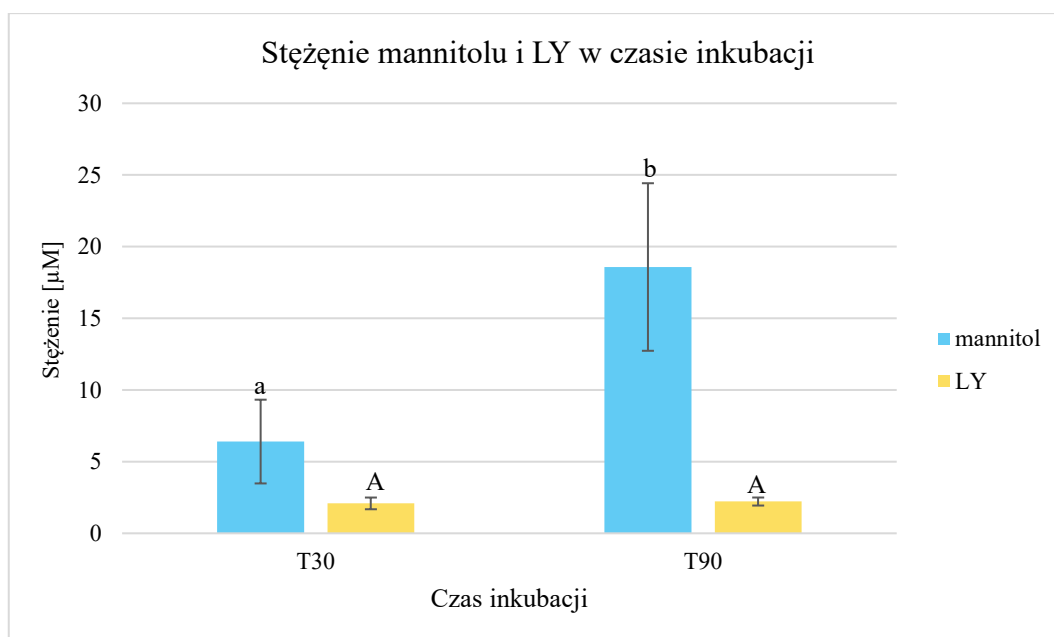
Natomiast w przypadku wycinków niepreparowanych nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia mannitolu po 90 min inkubacji w porównaniu do stężenia po 30 min. inkubacji. Dodatkowo, stężenie mannitolu po 30 min. inkubacji było niewielkie, wynosiło średnio $1,56 \pm 1,73 \mu\text{M}$ i nie różniło się istotnie statystycznie od wartości tła stwierdzanej w czasie T0 (Ryc. 28).



Ryc. 28. Stężenie mannitolu w przedziale przydankowym podczas inkubacji wycinków w komorach Ussinga. Małe litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ w grupie wycinków preparowanych, a wielkie litery niepreparowanych. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości $\pm\text{SD}$ ($n= 5-7$). Analiza statystyczna w obrębie każdej z grup wykonana testem t- studenta dla prób niezależnych.

Ze względu na brak statystycznie istotnych zmian stężenia substancji wskaźnikowej: mannitolu w przypadku wycinków niepreparowanych, kolejne doświadczenia wykonywane były jedynie z wykorzystaniem wycinków preparowanych – eksplantów błony śluzowej.

W przeciwieństwie do zmian stężenia mannitolu, w przypadku żółci luciferowej (LY), innej, powszechnie wykorzystywanej, substancji wskaźnikowej dla transportu międzykomórkowego, podczas inkubacji eksplantów nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian stężenia LY w przedziale przydankowym. Porównanie zmiany stężeń obu substancji podczas inkubacji eksplantów w komorach Ussinga przedstawiono na Ryc. 29.



Ryc. 29. Stężenie mannitolu i żółci lucyferowej (LY) w przedziale przydankowym podczas inkubacji eksplantów w komorach Ussinga. Małe litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ w stężeniu mannitolu, a wielkie litery w stężeniu LY. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 5-7$). Analiza statystyczna dla każdej z substancji wykonana testem t- studenta dla prób niezależnych.

W tabeli 4 przedstawiono porównanie transportu różnych substancji wskaźnikowych przez eksplant błony śluzowej jelita czczego brojlera kurzego. Transport LY jest ponad 60 razy mniejszy niż mannitolu, a transport kofeiny około 240 razy wyższy niż peroksydazy chrzanowej. Jednocześnie LY jest około 50 razy lepiej transportowany niż peroksydaza chrzanowa.

Tabela 4. Transport substancji wskaźnikowych przez eksplant błony śluzowej jelita czczego. W tabeli przedstawiono wartości średnie $\pm$ SD ($n = 6-7$) *przepływ dla LY ma charakter hipotetyczny, ponieważ został obliczony na podstawie danych stężenia LY poniżej LOQ (ang. *Limit of Quantification*, granica oznaczalności) metody analitycznej

Przepływ [nmol/min/cm ²]			
Mannitol	Lucifer yellow*	Peroksydaza chrzanowa	Kofeina
3,34 $\pm$ 0,89	0,05 $\pm$ 0,03	0,001 $\pm$ 0,001	0,24 $\pm$ 0,05

Z kolei w tabeli 5 przedstawiono pozorny współczynnik przepuszczalności dla badanych markerów (Papp), który pozwala porównać wielkość transportu pomiędzy substancjami bez względu na ich stężenie początkowe. W tym porównaniu, zakres współczynnika Papp

dla LY, peroksydazy chrzanowej i kofeiny jest podobny i mieści się w zakresie 10^{-6} cm/s. Przepuszczalność dla kofeiny jest zatem podobna do przepuszczalności dla peroksydazy chrzanowej i około 3-razy wyższa niż dla LY. Warto zwrócić uwagę, że pozorny współczynnik przepuszczalności jest najwyższy dla mannitolu (wynosi $50,07 \times 10^{-6}$ cm/s).

Tabela 5. Współczynnik przepuszczalności pozornej Papp (cm/s) W tabeli przedstawiono wartości średnie $\pm$ SD (n = 6-7) * Papp dla LY ma charakter hipotetyczny, ponieważ został obliczony na podstawie danych stężenia LY poniżej LOQ (ang. *Limit of Quantification*, granica oznaczalności) metody analitycznej

Współczynnik przepuszczalności pozornej Papp (cm/s)			
Mannitol	Lucifer yellow*	Peroksydaza chrzanowa	Kofeina
$50,07 \pm 13,44$ $\times 10^{-6}$	$2,10 \pm 1,27$ $\times 10^{-6}$	$5,63 \pm 3,35$ $\times 10^{-6}$	$7,76 \pm 1,80$ $\times 10^{-6}$

4.1.5. Charakterystyka parametrów elektrofizjologicznych eksplantów inkubowanych w komorze Ussinga

W tabeli 6 przedstawiono parametry elektrofizjologiczne dla eksplantów błony śluzowej jelita czczego (n=8) zamontowanych w komorach Ussinga. Ze względu na duży rozrzut wartości wyjściowych pomiędzy zwierzętami (sekcja 4.1.3. Ryc. 24), w celu ujednolicenia badanej grupy, przedstawiono wyniki od zwierząt pochodzących z jednego stada. Należy zwrócić uwagę, że całkowita przewodność eksplantów (Gt) wynosi $11,43$ mS/cm², podczas gdy przewodność komórkowa (Gc) tylko $2,89$ mS/cm². Tak więc przewodność komórkowa stanowi około 25% całkowitej przewodności eksplantu.

Tabela 6. Wartości elektrofizjologiczne dla eksplantów błony śluzowej jelita czczego w komorach Ussinga. W tabeli przedstawiono średnie dla badanych parametrów $\pm$ SD (n= 8).

Przeznablonkowy opór elektryczny (TEER)	Przewodność całkowita (Gt)	Prąd zwarcia (Isc)	Przewodność komórkowa (Gc)	Przeznablonkowa różnica potencjałów (TEP) Zacisk natężeniowy = $0 \mu A$
Om x cm ²	mS/cm ²	$\mu A/cm^2$	mS/cm ²	mV
$91,84 \pm 23,31$	$11,43 \pm 2,59$	$6,38 \pm 2,36$	$2,89 \pm 1,84$	$2,63 \pm 1,02$

4.2. Ocena wybranych właściwości roślinnych dodatków paszowych - wyciągów roślinnych w warunkach *in vitro*

4.2.1. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych wybranych wyciągów roślinnych

4.2.1.1. Minimalne stężenie hamujące

W tabeli 7 przedstawiono średnie wartości MIC badanych wyciągów roślinnych dla dwóch gatunków gronkowców (bakterie Gram-dodatnie): *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* oraz Gram-ujemnych bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium i dwóch szczepów *Escherichia coli*, w tym enterokrwotocznego serotypu O157:H7. W przypadku wyciągów z *Cynara scolymus*, *Solidago virgaurea* i *Taraxacum officinale* nie udało się wyznaczyć wartości MIC w zakresie testowanych stężeń (do 2,5 mg/ml) dla badanych gronkowców. Jedynie wyciąg z *Silybum marianum* (L.) wykazał słabe działanie hamujące wzrost tych bakterii (MIC równe $1,04 \pm 0,32$ mg/ml). Wyciąg z *Silybum marianum* (L.) wykazał również najsilniejsze właściwości hamujące wzrost bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* spośród testowanych wyciągów, przy czym działanie to było silniejsze wobec badanych szczepów *E.coli* (MIC równe 0,31 mg/ml), niż badanych przedstawicieli *Salmonella* spp. (MIC równe 0,63 mg/ml). W przypadku wyciągów z *Solidago virgaurea* i *Taraxacum officinale* również dla badanych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* nie udało się wyznaczyć wartości MIC w zakresie testowanych stężeń (do 2,5 mg/ml). Wyciąg z *Cynara scolymus* wykazał bardzo słabe działanie hamujące wzrost *Salmonella* spp. i obu szczepów *E. coli*, MIC dla każdej z tych bakterii było równe maksymalnemu badanemu stężeniu wyciągu i wynosiło 2,5 mg/ml.

Tabela 7. Średnie wartości MIC dla badanych wyciągów oraz kontroli pozytywnej (gentamycyna) z 6 niezależnych powtórzeń $\pm$ SD. Zakres badanych stężeń wyciągów wynosił: 2,5 mg/ml - 0,0195 mg/ml oraz 0,05 mg/ml - 0,000024 mg/ml dla kontroli pozytywnej (gentamycyna).

Badany wyciąg/ substancja	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar Enteritidis	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar Typhimurium	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43888)	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	
	MIC						
<i>Cynara scolymus</i>	> 2,50	> 2,50	2,50 $\pm$ 0,00	2,50 $\pm$ 0,00	2,50 $\pm$ 0,00	2,50 $\pm$ 0,00	[mg/ml]
<i>Solidago virgaurea</i>	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50	[mg/ml]
<i>Taraxacum officinale</i>	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50	[mg/ml]
<i>Silybum marianum</i> (L.)	1,04 $\pm$ 0,32	0,73 $\pm$ 0,26	0,63 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,00	0,31 $\pm$ 0,00	0,31 $\pm$ 0,00	[mg/ml]
gentamycyna	0,1 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 1,48	0,02 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	[μ g/ml]

4.2.1.2. Wpływ wybranych wyciągów roślinnych na tworzenie biofilmu

Wpływ badanych wyciągów na wytwarzanie oraz niszczenie biofilmu bakteryjnego wytwarzanego przez *S. epidermidis* podsumowano w tabeli 8. Do badania wykorzystano roztwory robocze wyciągów (2 mg/ml) *Taraxacum officinale* (L.), *Solidago virgaurea*, *Cynara scolymus* oraz roztwór o stężeniu sub-MIC: 1,25 mg/ml wyciągu *Silybum marianum* (L.). Spośród badanych wyciągów, jedynie wyciąg z *Solidago virgaurea* wykazał dobre właściwości hamujące formowanie biofilmu (63 $\pm$ 12% zahamowania), gdyż za takie uznaje się hamowanie powyżej 50% tworzenia biofilmu (Famuyide i in., 2019). Żaden z testowanych wyciągów nie wykazał dobrych właściwości niszczenia wytworzonego biofilmu bakteryjnego. Wartości <0 uznawane są za brak właściwości niszczenia biofilmu, a wręcz za właściwości promujące jego powstawanie (Sandasi i in., 2011). Taki wynik uzyskano dla wszystkich testowanych wyciągów roślinnych.

Tabela 8. Wpływ badanych wyciągów na tworzenie biofilmu. Wyniki wyrażono jako średni odsetek hamowania wytwarzania biofilmu oraz niszczenia biofilmu wytworzonego przez *S.epidermidis* w ciągu 24 godzin $\pm$ SD (n = 4-6). Do badania wykorzystano roztwory robocze wyciągów (2 mg/ml) *Taraxacum officinale* (L.), *Solidago virgaurea*, *Cynara scolymus* oraz roztwór o stężeniu sub-MIC: 1,25 mg/ml wyciągu *Silybum marianum* (L.).

Substancja badana	% hamowania wytwarzania biofilmu przez <i>S.epidermidis</i>	% niszczenia biofilmu wytworzonego przez <i>S.epidermidis</i>
<i>Cynara scolymus</i>	1 $\pm$ 11	-4 $\pm$ 4
<i>Solidago virgaurea</i>	63 $\pm$ 12	-2 $\pm$ 9
<i>Taraxacum officinale</i>	7 $\pm$ 15	-9 $\pm$ 13
<i>Silybum marianum</i>	3 $\pm$ 5	-10 $\pm$ 11
<i>Cyprofloksacyna</i>	99 $\pm$ 6	61 $\pm$ 12

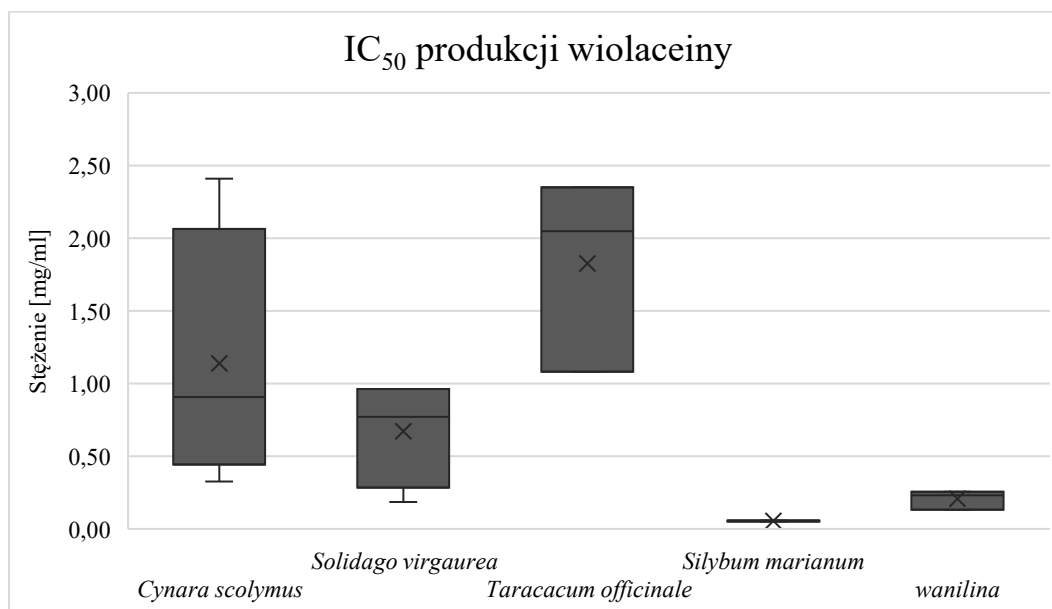
4.2.1.3. Aktywność anty- quorum sensing

Właściwości anty-quorum sensing (AQS) badanych wyciągów roślinnych przedstawiono w tabeli 9. Za minimalne stężenie hamujące quorum sensing (MQSIC) przyjęto najniższe stężenie wyciągu roślinnego charakteryzujące się wzrostem bakterii (zmętnieniem pożywki) i brakiem fioletowego zabarwienia, wskazujące na wzrost bakterii bez pigmentu - wiolaceiny. Spośród badanych wyciągów w zakresie testowanych stężeń (1,25 mg/ml - 0,039 mg/ml) MQSIC udało się wyznaczyć jedynie dla wyciągu z *Silybum marianum* (L.) (MQSIC = 0,23 $\pm$ 0,09 mg/ml). Również MIC, charakteryzujące się brakiem zmętnienia pożywki oraz brakiem fioletowego pigmentu wyznaczono jedynie dla wyciągu z *Silybum marianum* (L.) (MIC = 0,47 $\pm$ 0,18 mg/ml; Tabela 7). Wskazuje to, że spośród badanych wyciągów, wyciąg z *Silybum marianum* (L.) jako jedyny wykazał właściwości hamujące quorum sensing oraz wzrost bakterii.

Tabela 9. Właściwości anty-quorum sensing (AQS) badanych wyciągów roślinnych. Zakres stężeń substancji badanych wynosił 1,25 mg/ml - 0,039 mg/ml dla wyciągów roślinnych, a kontroli pozytywnej - waniliny: 2,5 mg/ml- 0,078 mg/ml. Najniższe stężenie, przy którym nie zaobserwowano wzrostu ani pigmentacji, zostało zinterpretowane jako MIC. Obecność wzrostu (zmętnienia) i brak barwy – fioletowego pigmentu zostały zinterpretowane jako minimalne stężenie hamujące quorum sensing (MQSIC). Jako IC₅₀ określono stężenie hamujące 50% produkcji wiołaceiny, wyznaczone z krzywej zależności stężenie efekt dla badanych substancji. Wyniki wyrażono jako wartości średnie± SD (n = 4-6). *hipotetyczna wartość IC₅₀ wyznaczona na podstawie krzywej

Badany wyciąg/ substancja	MIC (mg/ml)	MQSIC (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
<i>Cynara scolymus</i>	>1,25	>1,25	1,25 ±0,90*
<i>Solidago virgaurea</i>	>1,25	>1,25	0,84 ±0,37
<i>Taracacum officinale</i>	>1,25	>1,25	1,83 ±0,66*
<i>Silybum marianum</i>	0,47 ±0,18	0,23 ±0,09	0,05 ±0,00
<i>Wanilina</i>	0,31 ±0,00	ND	0,21 ±0,07

Na rycinie 30 zamieszczono wartości stężenia hamującego 50% produkcji wiołaceiny dla badanych wyciągów (wartości IC₅₀). Dla wyciągu z *Silybum marianum* (L.) wartość ta wynosi 0,05 ±0,00 mg/ml i jest niższa niż dla kontroli pozytywnej – waniliny (0,21 ±0,07 mg/ml) (Ryc. 30).

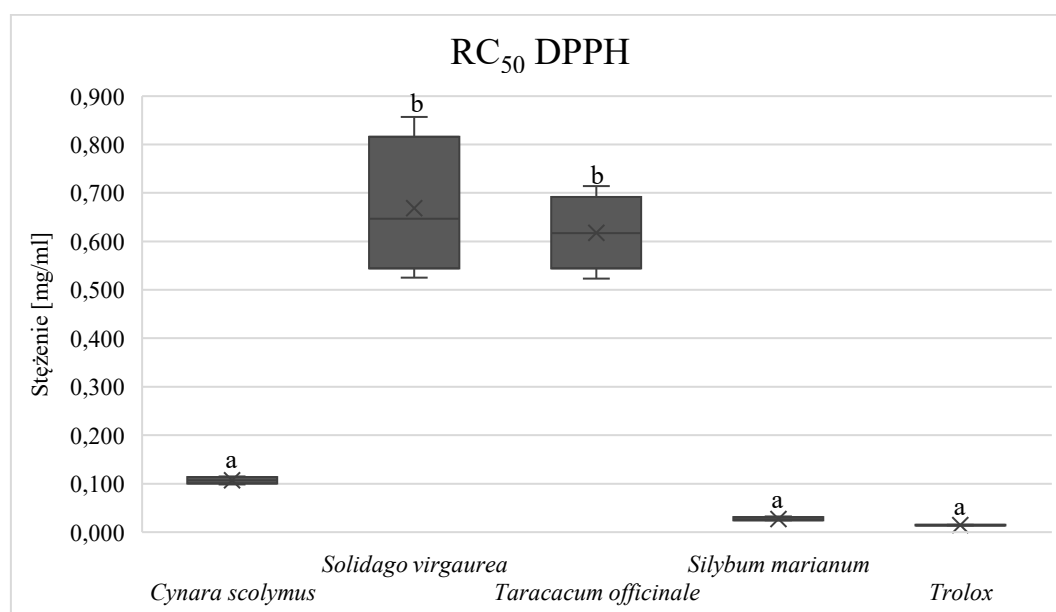


Ryc. 30. IC₅₀ produkcji wiołaceiny - stężenie hamujące 50 % produkcji wiołaceiny, wyznaczone w oparciu o krzywą zależności stężenie - efekt dla badanych substancji. Wyniki wyrażono jako wartości średnie ±SD (n=4-6). Dla wyciągów z *Cynara scolymus* oraz *Taracacum officinale* na podstawie krzywej wyznaczona została jedynie hipotetyczna wartość IC₅₀.

4.2.2. Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych wyciągów roślinnych

4.2.2.1 Test redukcji rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrozylowych

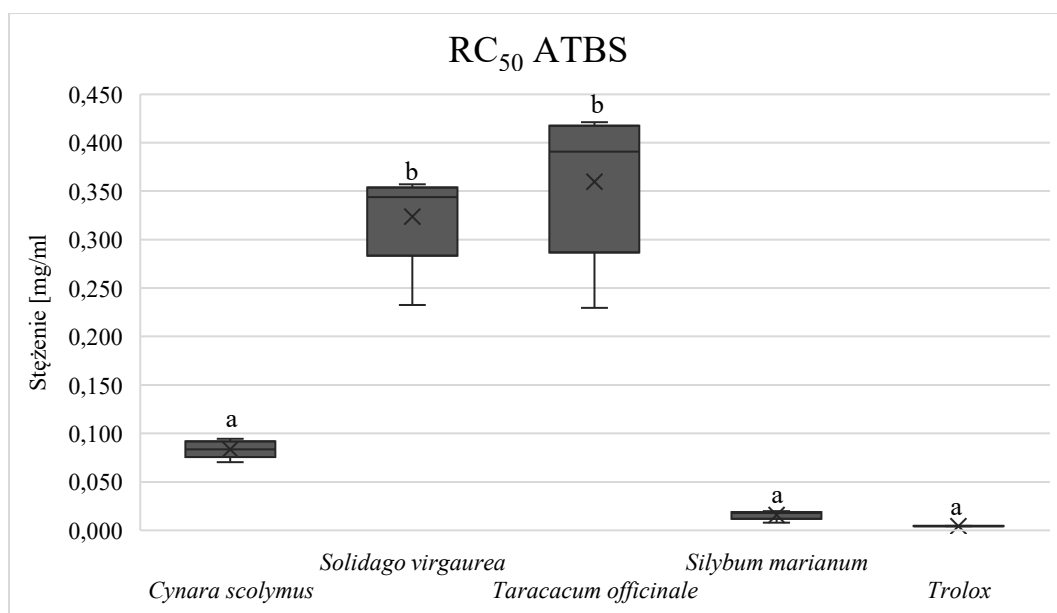
Na wykresie (Ryc. 31) przedstawiono średnie wartości stężeń badanych wyciągów oraz kontroli pozytywnej (trolox) powodujące redukcję (wymiatanie) 50% rodników w teście redukcji DPPH. Najsilniejsze działanie antyoksydacyjne – zbliżone do substancji referencyjnej (troloxu) wykazały wyciągi z *Cynara scolymus* oraz *Silybum marianum* (L.).



Ryc. 31. Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych wyciągów roślinnych w teście DPPH. Na wykresie przedstawiono średnie wartości stężeń badanych substancji powodujące redukcję 50% rodników DPPH (n = 4). Wartości zostały wyznaczone na podstawie krzywej zależności stężenie- efekt dla badanych substancji. Stężenia badanych substancji wynosiły: od 0,2 do 0,003 mg/ml. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya). Różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$

4.2.2.2 Test redukcji rodników 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)

Na wykresie (Ryc. 32) przedstawiono średnie wartości stężeń badanych wyciągów oraz kontroli pozytywnej (trolox) powodujące redukcję (wymiatanie) 50% rodników w teście redukcji ABTS+. Podobnie jak w przypadku redukcji rodnika DPPH (Ryc. 31), najsilniejsze działanie antyoksydacyjne – zbliżone do substancji referencyjnej (troloxu) wykazały wyciągi z *Cynara scolymus* oraz *Silybum marianum* (L.).



Ryc. 32. Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych wyciągów roślinnych w teście ABTS+. Średnie wartości stężeń badanych substancji powodujące redukcję 50% rodników ABTS+ (n=4). Wartości zostały wyznaczone na podstawie krzywej zależności stężenie- efekt dla badanych substancji. Stężenia badanych substancji wynosiły: od 0,2 do 0,003 mg/ml. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya). Różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

4.2.3. Ocena właściwości przeciwzapalnych wybranych wyciągów roślinnych

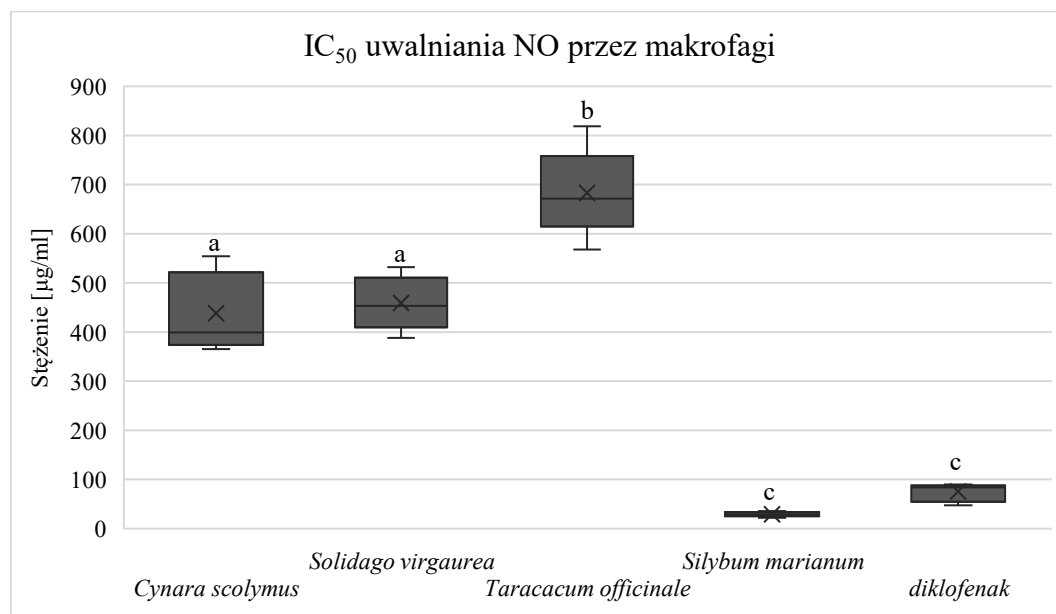
4.2.3.1. Test hamowania wytwarzania tlenu azotu przez makrofagi

linii RAW 264.7

Na wykresie (Ryc. 33) przedstawiono średnie wartości stężeń badanych wyciągów oraz substancji referencyjnej (diklofenak) powodujące zahamowanie uwalniania 50% tlenu azotu przez makrofagi linii RAW264.7. W celu stymulacji makrofagów wykorzystano podłoże zawierające LPS w stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ (stężenie końcowe w dołku 1 $\mu\text{g/ml}$). Stężenia końcowe badanych substancji (wyciągów oraz substancji referencyjnej) wynosiły od 400 do 10 $\mu\text{g/ml}$. W celu wykluczenia efektu wynikającego z działania cytotoksycznego badanych substancji zbadano żywotność komórek przy użyciu zmodyfikowanego testu kolorymetrycznego (MTT). Żaden z badanych wyciągów roślinnych w testowanych zakresach stężeń nie wykazał działania cytotoksycznego wobec makrofagów mysich RAW264.7.

Wartości IC_{50} zostały wyznaczone na podstawie krzywej zależności stężenie - efekt dla badanych substancji. Dla wyciągów z: *Taraxacum officinale* (L.), *Solidago virgaurea*

oraz *Cynara scolymus* na podstawie krzywych wyznaczono jedynie hipotetyczne wartości IC_{50} . Spośród badanych wyciągów najsilniejsze działanie hamujące wytwarzanie NO, niższe od substancji referencyjnej (IC_{50} dla diklofenaku = 76 $\mu\text{g/ml}$), wykazał wyciąg z *Silybum marianum* (L.) (IC_{50} wynosiło 35 $\mu\text{g/ml}$). Najslabsze działanie wykazał wyciąg z *Taraxacum officinale* (L.) (hipotetyczne IC_{50} = 683 $\mu\text{g/ml}$).



Ryc. 33. IC_{50} uwalniania NO przez makrofagi linii RAW 264.7 stymulowane LPS w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$. Wartości wyznaczone w oparciu o krzywą zależności stężenie - efekt dla badanych substancji. Wyniki wyrażono jako wartości średnie $\pm$ SD (n= 5-8); Dla wyciągów z: *Taraxacum officinale* (L.), *Solidago virgaurea* oraz *Cynara scolymus* na podstawie krzywych wyznaczono jedynie hipotetyczne wartości IC_{50} . Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$

4.2.4. Podsumowanie wybranych właściwości wyciągów roślinnych

w warunkach *in vitro*

W celu podsumowania wyników analizy wybranych właściwości badanych wyciągów roślinnych *in vitro* i selekcji dodatku paszowego do badań w modelach *ex vivo* właściwości te zestawiono w Tabeli 10. Najszerszy zakres aktywności wykazał wyciąg z *Silybum marianum* (L.), stąd został on wybrany do kolejnego etapu badań – z wykorzystaniem modeli *ex vivo*.

Tabela 10. Porównanie wybranych właściwości wyciągów roślinnych ocenionych w warunkach *in vitro*. Znakiem „+” zaznaczono wyciąg wykazujący badaną aktywność, a „-” słabe działanie lub brak działania w badanym zakresie stężeń.

Właściwości	Badany wyciąg			
	<i>Taraxacum officinale</i> (L.)	<i>Solidago virgaurea</i>	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Silybum marianum</i> (L.)
Hamowanie wzrostu bakterii (MIC)	-	-	-	+
Hamowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego	-	+	-	-
Niszczenie biofilmu bakteryjnego	-	-	-	-
Aktywność AQS	-	-	-	+
Działanie antyoksydacyjne	-	-	+	+
Hamowanie uwalniania NO (działanie przeciwzapalne)	-	-	-	+

4.3. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na wybrane funkcje jelita cienkiego brojlerów kurzych w warunkach *ex vivo*

4.3.1. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na żywotność i integralności eksplantów błony śluzowej jelita czczego brojlerów kurzych w komorze Ussinga

4.3.1.1. Wpływ wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na wybrane parametry elektrofizjologiczne

Wpływ wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na wybrane parametry elektrofizjologiczne został przedstawiony w tabeli 11. Wycinki do doświadczenia zostały pobrane od osobników z jednego stada, a w każdej z czterech grup doświadczalnych znajdowało się 8 wycinków. Doświadczenie zostało przeprowadzone zgodnie ze schematem opisanym w sekcjach 3.2.1.3. oraz 3.2.3.1. TEER eksplantów pochodzących z wycinków inkubowanych w podłożu z dodatkiem LPS + Sm był istotnie niższy niż w przypadku

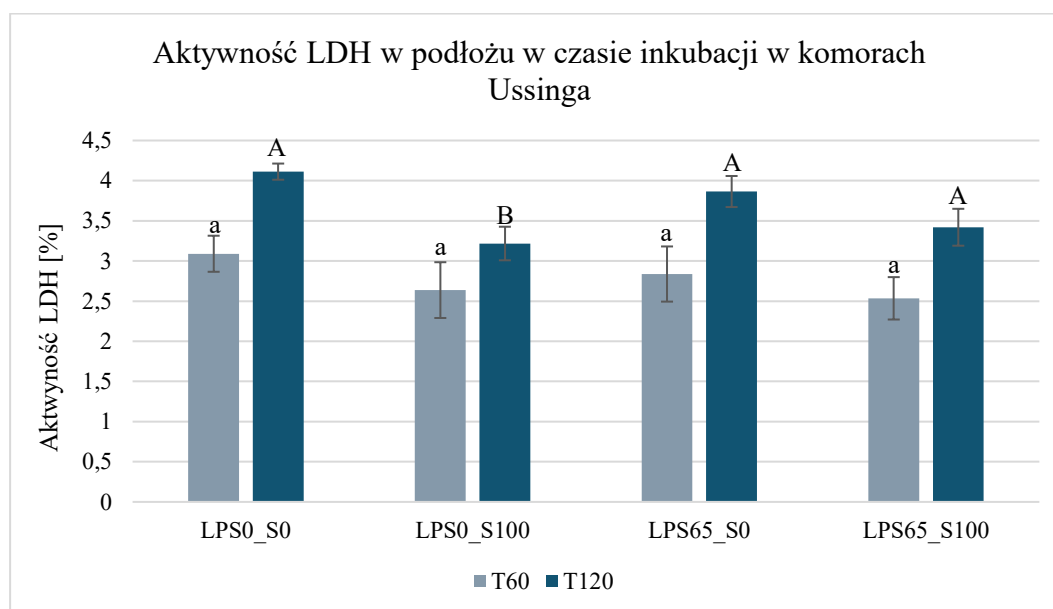
inkubacji wycinków z samym LPS i nie różnił się od kontroli oraz inkubacji z samym Sm. Przewodność całkowita eksplantów pochodzących z wycinków inkubowanych w podłożu z dodatkiem LPS była istotnie niższa niż w przypadku inkubacji wycinków z LPS + Sm. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy prądem zwarcia eksplantów pochodzących z wycinków inkubowanych w podłożu z dodatkiem Sm, a także LPS + Sm, który w obu wypadkach był istotnie niższy niż w przypadku kontroli i wyższy w porównaniu do inkubacji z samym LPS. Inkubacja wycinków z badanymi substancjami, we wszystkich wariantach, spowodowała istotny wzrost przewodności komórkowej w porównaniu do warunków kontrolnych. Inkubacja wycinków z LPS spowodowała istotny wzrost przelnabłonkowej różnicy potencjałów w porównaniu do kontroli, takiego efektu nie zaobserwowano w przypadku inkubacji wycinków z LPS + Sm, a także samym Sm.

Tabela 11. Parametry elektrofizjologiczne eksplantów inkubowanych z dodatkiem Sm (100 µg/ml)/ DMSO (<0,1%)/ LPS (10 µg/ml) lub LPS (10 µg/ml) + Sm (100 µg/ml) do podłoża. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n= 8). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), porównanie w obrębie poszczególnych parametrów – kolumn; różne litery w kolumnach oznaczają różnicę istotną statystycznie $p \leq 0,05$

	Przelabłonkowy opór elektryczny (TEER)	Przewodność całkowita (Gt)	Prąd zwarcia (Isc)	Przewodność komórkowa (Gc)	Przelabłonkowa różnica potencjałów (TEP) zacisk natężeniowy = 0 µA
	Om x cm ²	mS/cm ²	µA/cm ²	mS/cm ²	mV
Kontrola	91,84 ± 23,31 ^{ab}	11,43 ± 2,59 ^{ab}	6,38 ± 2,36 ^a	2,89 ± 1,84 ^a	2,63 ± 1,02 ^a
Sm	102,72 ± 13,46 ^{ab}	9,88 ± 1,34 ^b	-3,19 ± 5,41 ^b	-2,12 ± 3,44 ^{ab}	1,86 ± 0,69 ^a
LPS	127,18 ± 35,40 ^{ac}	8,42 ± 2,31 ^b	-32,49 ± 8,56 ^c	-3,45 ± 1,60 ^{ac}	10,50 ± 3,19 ^b
LPS +Sm	73,98 ± 12,70 ^{bd}	13,92 ± 2,71 ^a	-6,38 ± 5,94 ^b	-2,06 ± 2,49 ^{bd}	3,79 ± 1,43 ^a

4.3.1.2. Wpływ wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej przez eksplanty błony śluzowej jelita czczego brojlerów kurzych

Na wykresie (Ryc. 34) przedstawiono wpływ Sm na uwalnianie LDH przez eksplanty podczas inkubacji w komorach Ussinga. Wycinki jelit do doświadczenia były pobierane oraz transportowane, zgodnie ze schematem opisanym w sekcjach 3.2.1.3. oraz 3.2.3.1. Nie zaobserwowano różnic w aktywności LDH w próbkach pobieranych z buforu inkubacyjnego pomiędzy badanymi grupami po 60 min. inkubacji. Aktywność LDH w buforze inkubacyjnym po 120 minutach inkubacji eksplantów z Sm, bez dodatku LPS była istotnie niższa niż w przypadku inkubacji eksplantów z LPS, LPS + Sm, a także w warunkach kontrolnych.

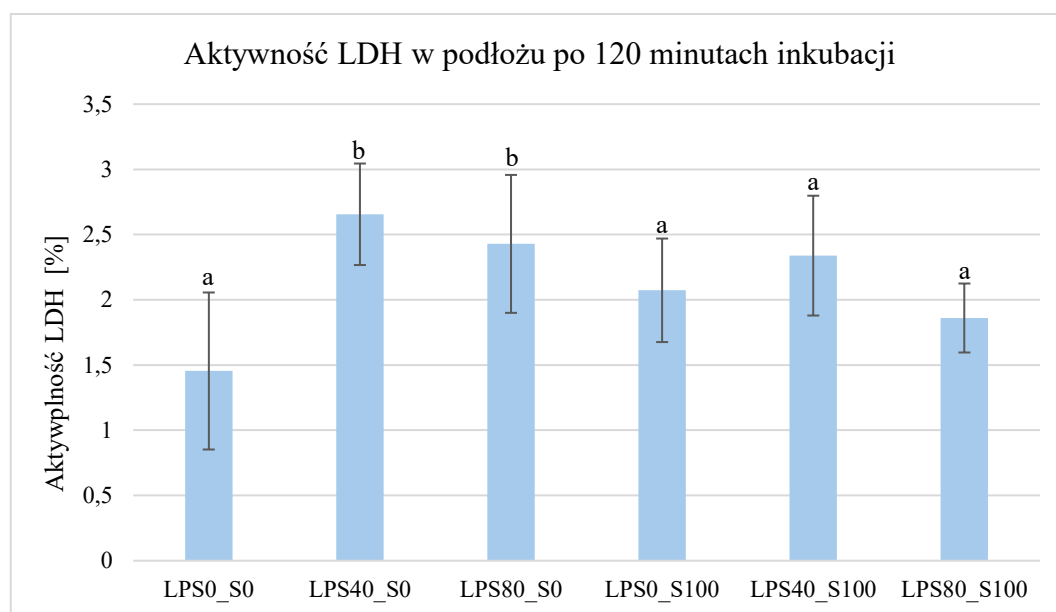


Ryc. 34. Aktywność LDH w buforze inkubacyjnym w czasie inkubacji eksplantów w komorach Ussinga, zależnie od dodatku substancji badanych do buforu od strony śluzówki. Wynik przedstawiono jako odsetek aktywności LDH w odpowiednim buforze inkubacyjnym w porównaniu do aktywności enzymu w wycinku tkanki o wymiarach odpowiadających fragmentowi eksplantu podlegającemu ekspozycji w komorze Ussinga, zhomogenizowanego z 1% Triton X-100 (co uznano za 100% aktywności enzymu).

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD ($n = 4$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$; małe litery oznaczają różnice w czasie T60, a wielkie litery w czasie T120. Skróty oznaczają zastosowane stężenia badanych substancji, odpowiednio dla LPS: LPS0 – 0 $\mu\text{g/ml}$, LPS65- 65 $\mu\text{g/ml}$, dla Sm: S0- 0 $\mu\text{g/ml}$, S100 – 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.2. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na żywotność i integralności wycinków jelit podczas inkubacji na płytkach wielodołkowych

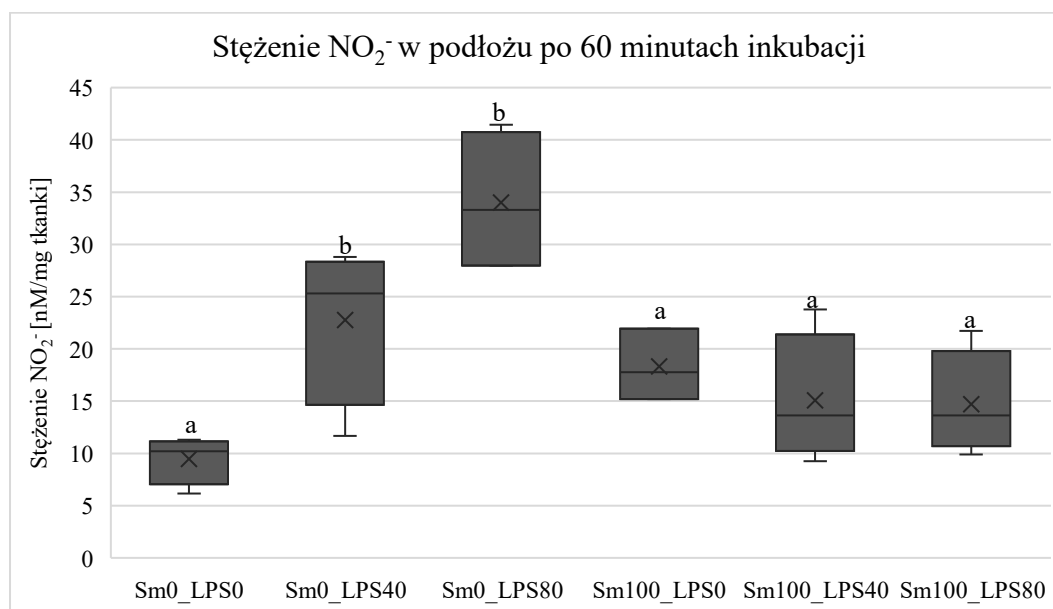
Wpływ Sm na uwalnianie LDH z wycinków jelit podczas 120 min. inkubacji na płytkach wielodołkowych przedstawiono na wykresie (Ryc. 35). Doświadczenie wykonano zgodnie ze schematem opisanym w sekcji 3.2.3.2.1. Aktywność LDH w podłożu po 120 min. inkubacji była istotnie wyższa w przypadku wycinków stymulowanych LPS, zarówno w stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$, jak i 80 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu z kontrolą. LPS w zastosowanych stężeniach nie wykazywał działania cytotoksycznego, tzn. aktywność uwolnionego LDH nie przekroczyła 3%. Znaczących zmian nie zaobserwowano w przypadku wycinków inkubowanych w obecności Sm (Ryc. 35). Niezależnie od zastosowanego stężenia LPS aktywność LDH w podłożu nie różniła się w sposób istotny od aktywności LDH w warunkach kontrolnych.



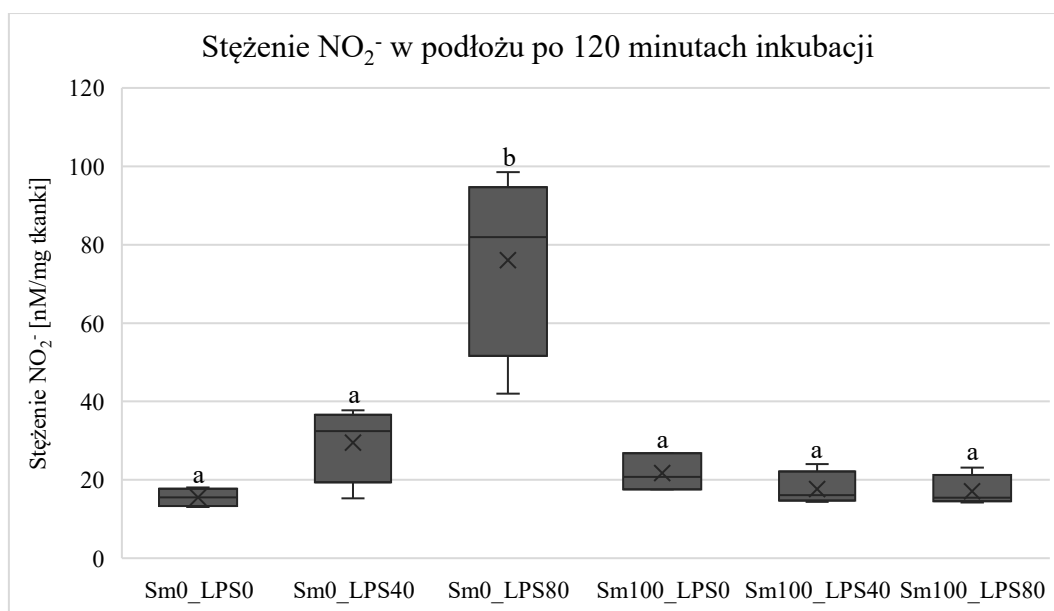
Ryc. 35. Aktywność LDH w podłożu po zakończeniu inkubacji wycinków na płytkach wielodołkowych, zależnie od warunków inkubacji. Wynik przedstawiono jako odsetek aktywności LDH w odpowiednim podłożu inkubacyjnym w porównaniu do aktywności enzymu w wycinku tkanki o wymiarach odpowiadających dwóm eksplantom znajdującym się w jednym dołku płytki podczas inkubacji, zhomogenizowanym z 1% Triton X-100 (uznane za 100% aktywności enzymu). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD ($n=4-8$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Skróty oznaczają zastosowane stężenia badanych substancji, odpowiednio dla LPS: LPS0 – 0 $\mu\text{g/ml}$; LPS40- 40 $\mu\text{g/ml}$; LPS80- 80 $\mu\text{g/ml}$, dla Sm: S0- 0 $\mu\text{g/ml}$, S100 – 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.2.1. Wpływ Sm na uwalnianie tlenku azotu (NO) przez wycinki jelit podczas inkubacji na płytkach wielodółkowych

Do pośredniego pomiaru NO wytwarzanego przez wycinki w doświadczeniu opisanym powyżej w sekcji 4.4.1. wykorzystano określenie stężenia azotanów (III) w podłożu inkubacyjnym po 60 i 120 minutach inkubacji w przeliczeniu na masę wycinków. LPS w obu zastosowanych stężeniach, tj. 40 $\mu\text{g/ml}$ oraz 80 $\mu\text{g/ml}$, po 60 minutach inkubacji spowodował istotny wzrost stężenia NO_2^- w podłożu, w porównaniu z kontrolą (Ryc. 36), natomiast po 120 minutach taki wzrost zaobserwowano jedynie przy narażeniu wycinków na LPS w stężeniu wynoszącym 80 $\mu\text{g/ml}$ (Ryc. 37). W przypadku wycinków inkubowanych z Sm, zarówno po 60 minutach (Ryc. 36), jak i po 120 minutach inkubacji (Ryc. 37), stężenie NO_2^- w podłożu nie różniło się w sposób istotny od kontroli.



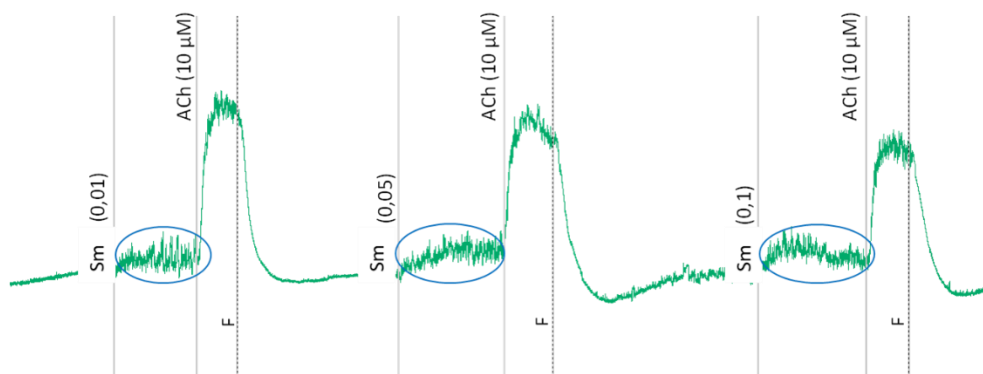
Ryc. 36. Stężenie NO_2^- w podłożu po 60 minutach inkubacji wycinków na płytkach wielodółkowych, zależnie od warunków inkubacji. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD ($n=4-8$) w przeliczeniu na masę wycinków. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne ($p \leq 0,05$); Skróty oznaczają zastosowane stężenia badanych substancji, odpowiednio dla LPS: LPS0 – 0 $\mu\text{g/ml}$; LPS40- 40 $\mu\text{g/ml}$; LPS80- 80 $\mu\text{g/ml}$, dla Sm: S0- 0 $\mu\text{g/ml}$, S100 – 100 $\mu\text{g/ml}$.



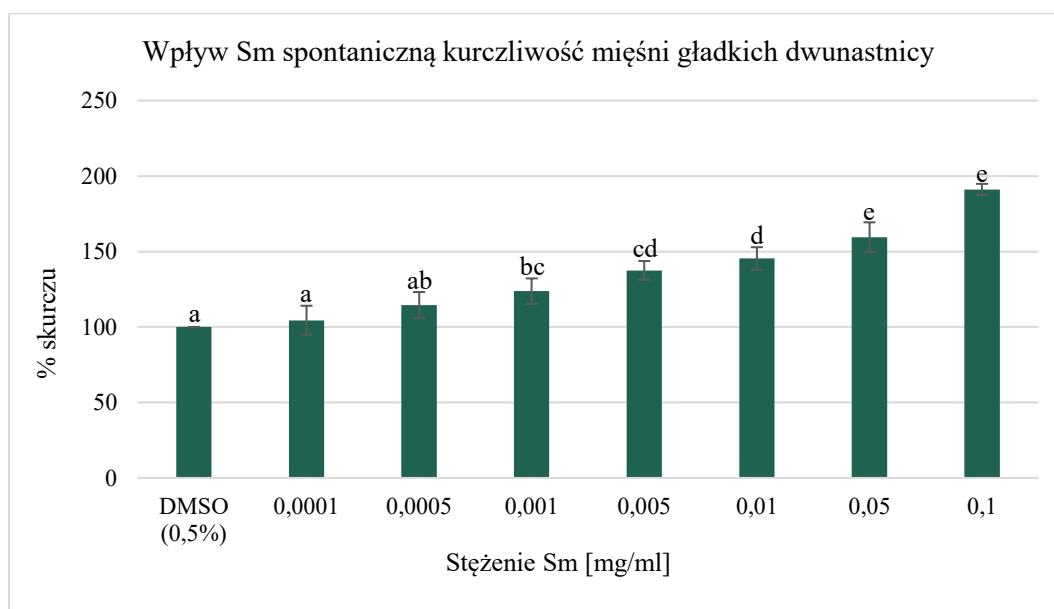
Ryc. 37. Stężenie NO_2^- w podłożu po 120 minutach inkubacji wycinków na płytkach wielodołkowych, zależnie od warunków inkubacji. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD ($n = 4-8$), w przeliczeniu na masę wycinków. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$; Skróty oznaczają zastosowane stężenia badanych substancji, odpowiednio dla LPS: LPS0 – 0 $\mu\text{g/ml}$; LPS40- 40 $\mu\text{g/ml}$; LPS80- 80 $\mu\text{g/ml}$, dla Sm: S0- 0 $\mu\text{g/ml}$, S100 – 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.3. Ocena wpływu wyciągu z *Silybum marianum* (L.) na aktywność motoryczną izolowanych wycinków jelita cienkiego brojlerów kurzych

Wpływ Sm na spontaniczną kurczliwość mięśni gładkich dwunastnicy został przedstawiony na rycinie 38 i 39. Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia w zakresie od 0,0005 mg/ml do 0,1 mg/ml zwiększał kurczliwość mięśni gładkich dwunastnicy. Stężenia 0,05 mg/ml oraz 0,1 mg/ml spowodowały najmocniejszy wzrost siły skurczu – odpowiednio do 159,5 ($\pm 9,9$) % oraz 191,1 ($\pm 3,7$) % wartości dla kontroli (0,5% DMSO). Stężenie 0,0001 mg/ml nie spowodowało istotnych różnic w sile skurczu w porównaniu z kontrolą.



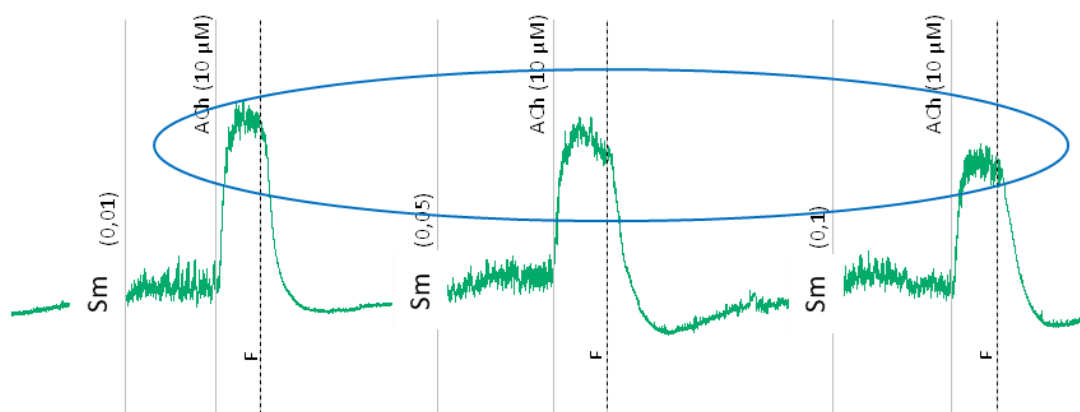
Ryc. 38. Przykładowy zapis zmian spontanicznej aktywności motorycznej wycinka dwunastnicy wywołanych przez Sm. ACh – Acetylocholina (10 µM), Sm –wyciąg z *Silybum marianum* (L.), F – płukanie (ang. *flush*) świeżym M K-HS.



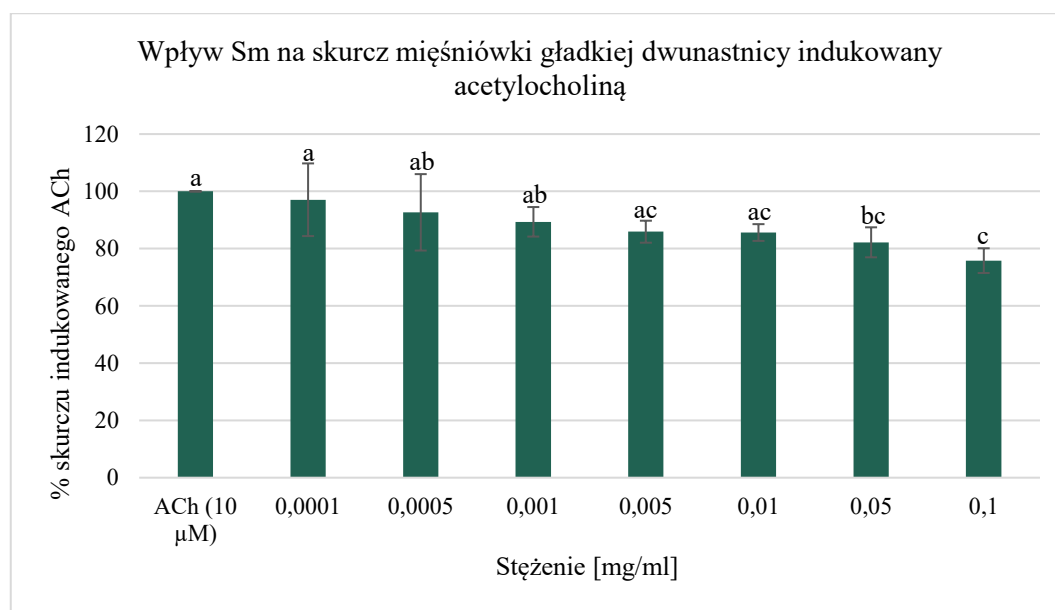
Ryc. 39. Wpływ Sm na spontaniczną kurczliwość mięśni gładkich dwunastnicy. Wyniki przedstawiono jako % odpowiedzi w porównaniu do wartości dla DMSO. Reakcję na DMSO wyrażono jako 100%. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$

Wpływ Sm na skurcz mięśni gładkich dwunastnicy indukowany acetylocholiną został przedstawiony na rycinie 40 i 41. Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia w zakresie od 0,001 mg/ml do 0,1 mg/ml zmniejszał odpowiedź mięśni gładkich na acetylocholinę. Najsilniejszy spadek siły skurczu indukowanego acetylocholiną odnotowano po zastosowaniu stężenia 0,1 mg/ml – spadek siły skurczu do wartości $75,8 (\pm 4,3)\%$ kontroli. Stężenia od 0,001 mg/ml do 0,05 mg/ml spowodowały spadek siły

skurczu do wartości od $89,3 (\pm 5,1)\%$ do $82,2 (\pm 5,2)\%$ kontroli. Stężenia $0,0001 - 0,0005$ mg/ml nie spowodowały istotnych różnic w odpowiedzi na acetylocholinę.

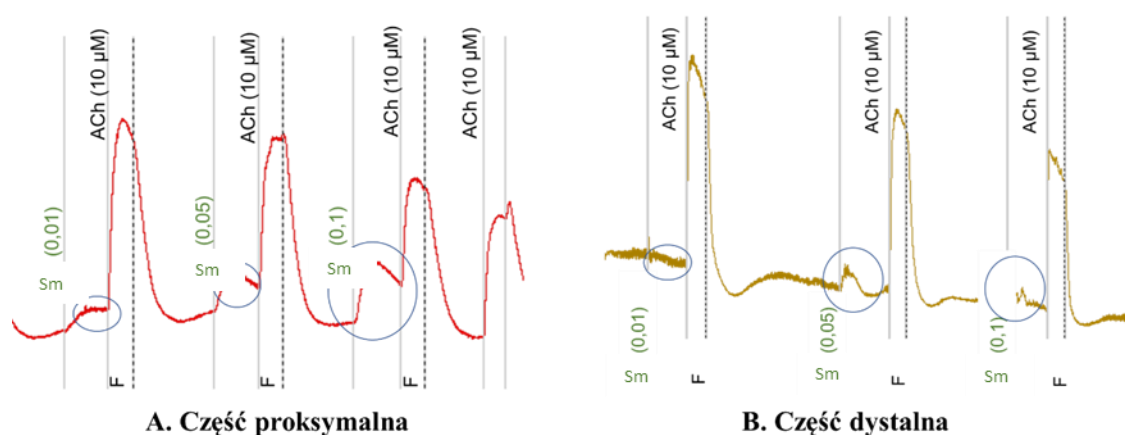


Ryc. 40. Przykładowy zapis zmian aktywności motorycznej wycinka dwunastnicy w odpowiedzi na acetylocholinę wywołanych przez Sm. ACh – Acetylocholina ($10 \mu\text{M}$), Sm – wyciąg z *Silybum marianum* (L.), F – płukanie (ang. *flush*) świeżym M K-HS.

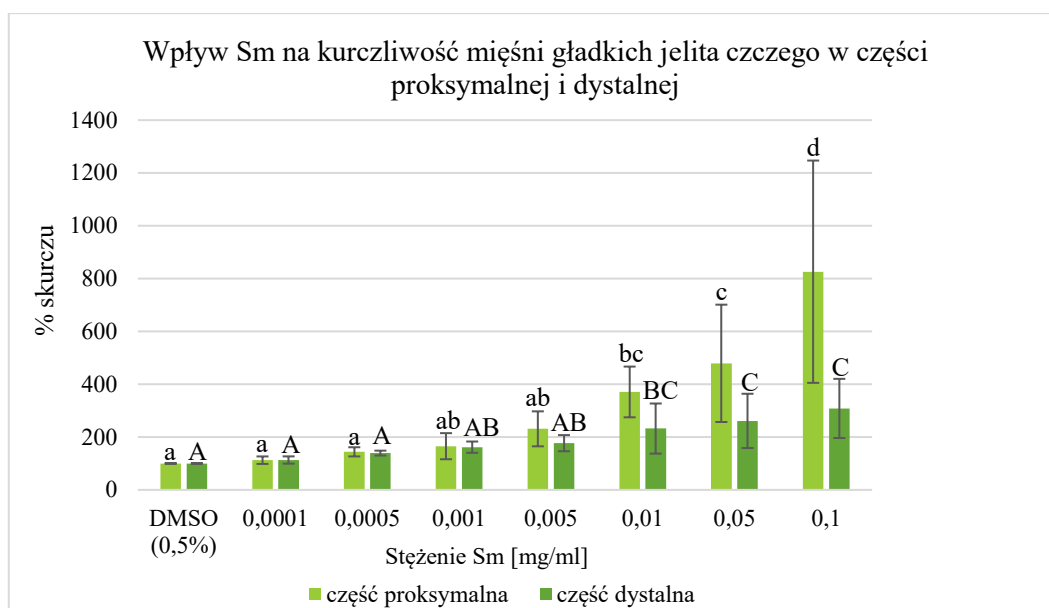


Ryc. 41. Wpływ Sm na skurcz mięśni gładkich dwunastnicy indukowany acetylocholiną. Wyniki przedstawiono jako % odpowiedzi w porównaniu z ACh ($10 \mu\text{M}$). Reakcja na ACh wyrażona jest jako 100%. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$

Wpływ Sm na spontaniczną kurczliwość mięśni gładkich jelita czczego został przedstawiony na rycinach 42 i 43. Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia w zakresie od 0,01 mg/ml do 0,1 mg/ml wyraźnie zwiększał kurczliwość mięśni gładkich jelita czczego w części proksymalnej oraz dystalnej. Przy zastosowaniu najwyższego testowanego stężenia, tj. 0,1 mg/ml średnia siła skurczu wzrosła do 308,4 ($\pm 111,9$) % w przypadku części dystalnej i 826,1 ($\pm 420,9$) % w części proksymalnej. Stężenia 0,0001 – 0,005 mg/ml nie spowodowały istotnych różnic w sile skurczu w porównaniu z kontrolą.



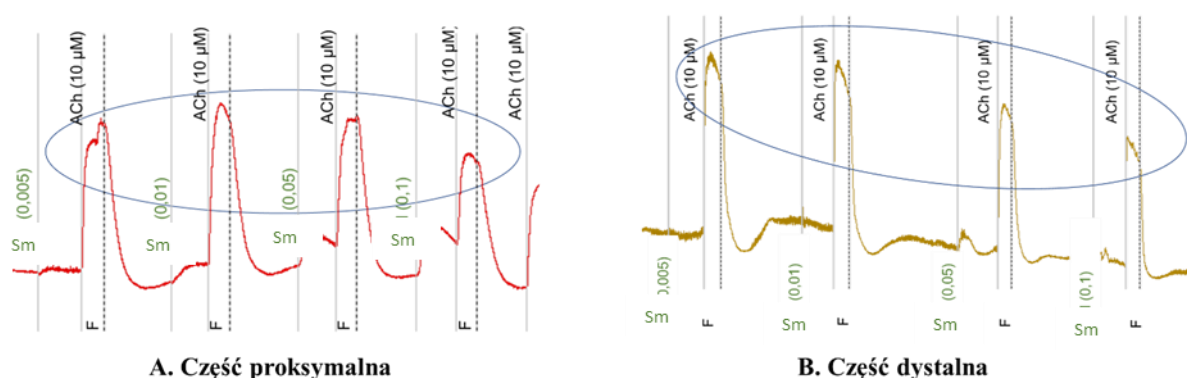
Ryc. 42. Przykładowy zapis zmian aktywności motorycznej wycinka proksymalnej (A) oraz dystalnej (B) części jelita czczego wywołanych przez Sm. ACh – Acetylocholina (10 μ M), Sm –wyciąg z *Silybum marianum* (L.), F – płukanie (ang. *flush*) świeżym M K-HS.



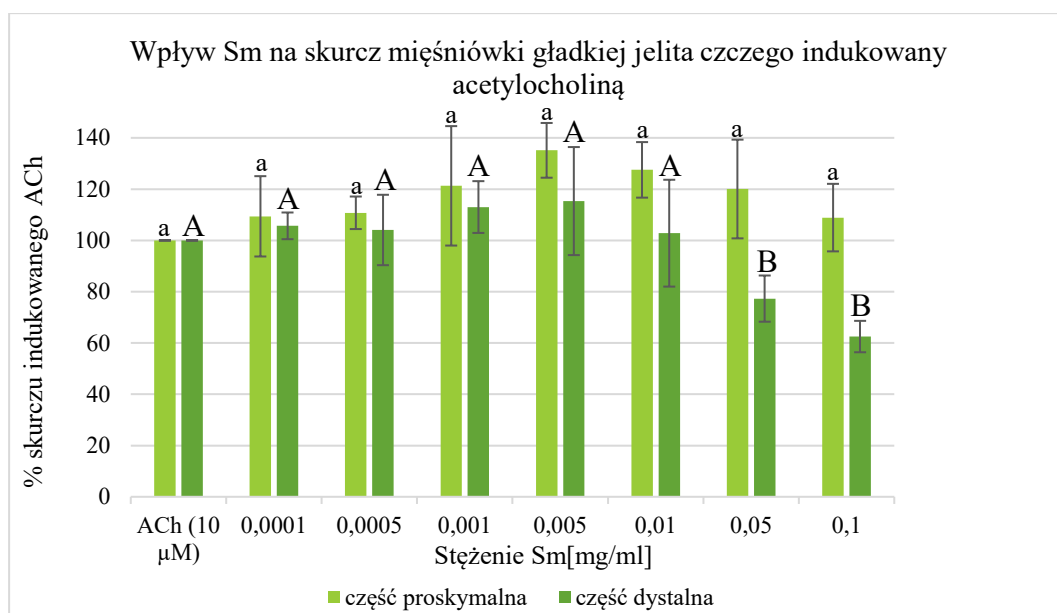
Ryc. 43. Wpływ Sm na spontaniczną kurczliwość mięśni gładkich jelita czczego w części proksymalnej i dystalnej. Wyniki przedstawiono jako % odpowiedzi w porównaniu z DMSO. Reakcję na DMSO wyrażono jako 100%. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5- 6 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya). Małe litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ dla części proksymalnej, a wielkie litery oznaczają różnice $p \leq 0,05$ dla części dystalnej

Na rycinach 44 i 45 został przedstawiony wpływ Sm na kurczliwość mięśni gładkich jelita czczego w odpowiedzi na acetylocholinę w części proksymalnej i dystalnej.

W części proksymalnej Sm nie wpłynął w istotny sposób na aktywność motoryczną mięśniówki w odpowiedzi na acetylocholinę. W przypadku części dystalnej, niższe stężenia nie powodowały istotnych zmian kurczliwości mięśni gładkich, a stężenia w zakresie 0,05-0,1 mg/ml zmniejszyły odpowiedź mięśniówki na acetylocholinę.



Ryc. 44. Przykładowy zapis zmian aktywności motorycznej wycinka proksymalnej (A) oraz dystalnej (B) części jelita czczego w odpowiedzi na acetylocholinę wywołanych przez Sm. ACh – Acetylocholina (10 μ M), Sm –wyciąg z *Silybum marianum* (L.), F – płukanie (ang. *flush*) świeżym M K-HS.



Ryc. 45. Wpływ Sm na skurcz mięśni gładkich jelita czczego w części proksymalnej i dystalnej w odpowiedzi na acetylocholinę (10 μ M). Wyniki przedstawiono jako % odpowiedzi w porównaniu z ACh (10 μ M). Reakcja na ACh wyrażona jest jako 100%. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5-6 niezależnych eksperymentów ($\pm$ SD). Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya). Małe litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ dla części proksymalnej, a wielkie litery oznaczają różnice $p \leq 0,05$ dla części dystalnej

5. DYSKUSJA

Niniejsza praca służyła optymalizacji metody wykorzystania eksplantów jelita czczego brojlerów kurzych, pochodzących z przemysłowego uboju, w badaniach w komorze Ussinga oraz kompleksowej ocenie wpływu wybranego roślinnego dodatku paszowego na zdrowie jelit (ang. *gut health*) brojlerów kurzych. Zdrowie jelit jest tematem obecnie zyskującym duże zainteresowanie naukowe w medycynie człowieka oraz weterynaryjnej (Bischoff, 2011; Ducatelle i in., 2023; Latek i in., 2022; Wickramasuriya i in., 2022; Zhu i in., 2021). Mimo że brakuje ujednoliconej definicji tego terminu w kontekście zdrowia zwierząt i medycyny weterynaryjnej, większość autorów wskazuje na kilka elementów składających się na „zdrowie jelit”, tzn.: brak choroby, zachowany dobrostan zwierzęcia oraz zdolność przewodu pokarmowego do spełniania jego funkcji fizjologicznych i ochrony przed szkodliwymi czynnikami egzo- oraz endogennymi, a także zachowanie równowagi pomiędzy mikrobiomem a przewodem pokarmowym, odpowiednie żywienie i sprawne funkcjonowanie śluzówki jelit oraz układu odpornościowego (Ducatelle i in., 2023; Wickramasuriya i in., 2022; Zhu i in., 2021). Ukazuje to, że na zdrowie przewodu pokarmowego należy patrzeć w sposób całościowy, uwzględniając skomplikowany układ zależności pomiędzy jego poszczególnymi elementami i funkcjami, a także innymi czynnikami, takimi jak żywienie, mikrobiom, a nawet kondycja ogólna i zdrowie całego organizmu.

Zdrowie jelit odgrywa podstawową rolę w trawieniu i wchłanianiu składników odżywczych i tym samym jest istotnym elementem warunkującym wydajność produkcyjną, kluczową dla sektora intensywnej hodowli drobiu. Jednak problemy z funkcjonowaniem jelit występują powszechnie u wysokowydajnych linii drobiu ze względu na bardzo szybkie przyrosty, którym towarzyszy wysokie pobranie paszy, wywierające presję na funkcjonowanie układu pokarmowego (Ducatelle i in., 2023). Może to prowadzić do stałej obecności nadmiaru niewchłoniętych składników odżywczych w świetle jelita, które są następnie wykorzystywane przez mikroorganizmy, prowadząc do rozwoju dysbiozy (zaburzenia składu mikrobioty jelitowej) bądź infekcji skutkujących stanem zapalnym (Ducatelle i in., 2023). Obecność zapalenia, a także narażenie na stres, patogeny błędy żywieniowe czy obecność mykotoksyn w paszy, w konsekwencji mogą prowadzić do zaburzeń integralności i przepuszczalności bariery jelitowej, pogłębiając tym samym już istniejące problemy (Ducatelle i in., 2023; Latek i in., 2022; Zhu i in., 2021). Jednocześnie, wdrażanie polityki Zielonego Ładu oraz

Od pola do stołu (EC, 2020) wymaga ograniczenia stosowania leków przeciwdrobnoustrojowych i przeciwpasożytniczych w produkcji zwierzęcej, dlatego wciąż poszukuje się nowych, alternatywnych strategii mających na celu poprawę zdrowia zwierząt i przerwanie tego błędnego koła zaburzeń. Jednym z rozwiązań zyskujących coraz większą uwagę naukowców, lekarzy weterynarii i hodowców jest możliwość wykorzystania produktów pochodzenia roślinnego w zapobieganiu i leczeniu chorób zwierząt. Skuteczność działania takich produktów wymaga jednak potwierdzenia poprzez większą liczbę wiarygodnych badań naukowych. Ze względu na skomplikowany układ zależności występujących w przewodzie pokarmowym badania wykorzystujące jedynie modele *in vitro* lub skupiające się wyłącznie na jednej z funkcji przewodu pokarmowego mają wiele ograniczeń. Istnieje zatem uzasadniona potrzeba rozwijania i wdrażania nowych modeli i metod badawczych. Stąd głównymi celami niniejszej pracy jest kompleksowa ocena właściwości wybranych wyciągów roślinnych, poprzez równoczesne wykorzystanie badań przesiewowych w warunkach *in vitro* oraz badań na poziomie tkankowym w modelu *ex vivo*. Wykorzystanie modelu *ex vivo* jest szczególnie istotne ze względu na fakt, że uwzględnia on tkanki pochodzące od gatunku docelowego, eliminując tym samym trudności związane z międzygatunkową ekstrapolacją wyników. Wykorzystanie wycinków tkanek w modelu *ex vivo* pozwala także na zachowanie ich pełnej struktury oraz zbadanie różnych funkcji w warunkach jak najbardziej zbliżonych do panujących *in vivo*.

Pierwszy z głównych celów pracy skupiał się na optymalizacji procedury transportu wycinków jelita czczego brojlerów kurzych pochodzących z przemysłowego uboju drobiu oraz charakterystyce pozyskanych z nich eksplantów błony śluzowej w zakresie parametrów elektrofizjologicznych i transportu wybranych substancji wskaźnikowych w komorach Ussinga. Pomimo, że model eksplantów jelitowych kurcząt brojlerów znany jest od wielu lat, wciąż brakuje ujednoliconej metodyki dotyczącej wszystkich etapów prowadzonych doświadczeń, od procedury transportu zaczynając. Dodatkowo w dostępnych pracach opisujących wykorzystanie wycinków jelit kur brakuje informacji na temat możliwości i sposobu wykorzystania tkanek zwierząt pobranych w ubojni. Wykorzystanie w badaniach tkanek pozyskanych poubojowo pozwala spełnić wszystkie z zasad 3R, których stosowanie jest również wpisane w przepisy prawa oraz wytyczne regulujące kwestie etyczne związane z wykorzystaniem zwierząt w eksperymentach (Sneddon i in., 2017). Takie alternatywne podejście badawcze pozwala na znaczące

ograniczenie kosztów oraz czasu badań w porównaniu z badaniami klasycznymi oraz jest zgodne z przepisami Unii Europejskiej narzucającymi konieczność podejmowania działań ograniczających wykorzystanie zwierząt jako modeli badawczych (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1907/2006 z dnia 18 grudnia 2006 r., Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r., Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r.). Model opierający się na tkankach pobieranych podczas komercyjnego uboju pozwala na nieograniczony dostęp do materiału badawczego, a także umożliwia pobranie dużej liczby wycinków reprezentatywnych dla populacji zwierząt, odzwierciedlających rzeczywiste różnice pomiędzy osobnikami. Pozwala także na pobranie kilku wycinków jednego osobnika, umożliwiając następnie względne porównanie uzyskanych wyników. Brak dostępnych wytycznych dotyczących postępowania z wycinkami jelit pobranych poubojowo od brojlerów kurzych oraz świadomość istnienia dużych różnic w zakresie możliwości wykorzystania tkanek różnych gatunków zwierząt (Neirinckx i in., 2011; Nietfeld i in., 1991) spowodowały potrzebę dopracowania poszczególnych kroków w przygotowaniu i wykorzystaniu modelu opartego na tkankach brojlerów kurzych pozyskanych z komercyjnego uboju. Niezbędne było także scharakteryzowanie go w warunkach kontrolnych, tak aby mieć pewność, że wykorzystywany model jest stabilny w zakresie analizowanych parametrów, a uzyskane wyniki wiarygodne.

Warunki, w jakich przechowywany i transportowany jest pobrany wycinek tkanki, odgrywają kluczową rolę w zachowaniu jego żywotności. W transplantologii przyjęło się, że szybkie schłodzenie pobranych narządów do temperatury między 0 a 4°C spowalnia tempo metabolizmu i zmniejsza obrzęk tkanek oraz minimalizuje uszkodzenia wynikające z niedokrwienia (Soo i in., 2020). Jednak podczas, gdy techniki konserwacji w niskich temperaturach mają na celu spowolnienie procesów metabolicznych podczas przechowywania i transportu, nowo opracowywane techniki perfuzji normotermicznej pozwalają na utrzymanie procesów komórkowych i metabolicznych na poziomie fizjologicznym. W rozległej pracy przeglądowej Soo i in. (2020) wskazuje na fakt, że jelito jest jednym z narządów najbardziej wrażliwych na uszkodzenia niedokrwienne podczas transplantacji, ale ponieważ jedynie niewielki odsetek pacjentów potrzebuje przeszczepu tego narządu, mało wiadomo na temat alternatywnych do tradycyjnych metod jego konserwacji w transplantologii. Autorzy wspomnianego artykułu wskazują

jednak, że metody perfuzji normo- i hipotermicznej w odniesieniu do wycinków innych narządów, takich jak nerki czy wątroba, zmniejszają częstość opóźnionego podjęcia funkcji przez przeszczep i reperfuzji niedokrwiennej, przywracają prawidłowy poziom ATP i zwiększają przepływ krwi i natlenowanie przeszczepianego narządu. W przypadku wycinków jelit pobieranych do doświadczeń w warunkach *ex vivo* można znaleźć schematy postępowania z pobranymi tkankami opierające się na szybkim schłodzeniu wycinków po pobraniu, a następnie ich rozgrzewaniu w czasie inkubacji w laboratorium (Amat i in., 1999, Baskara i in., 2021; Grubb i in., 1986; Metzler-Zebeli, 2017; Rehman i in., 2009) lub bazujące na zachowaniu temperatury fizjologicznej podczas wszystkich etapów (Zhang i in., 2017a, 2017b). Co więcej, w niektórych pracach brakuje informacji odnośnie temperatury płukania, preparacji i przygotowania wycinków przed rozpoczęciem doświadczenia (Awad i in., 2008; Awad i in., 2010; Kallapura i in., 2015).

Pierwszym etapem optymalizacji warunków transportu wycinków jelit brojlerów kurzych z zakładu ubojowego do laboratorium była zatem weryfikacja wpływu temperatury transportu na żywotność wycinków w oparciu o analizę uwalnianego przez wycinek LDH (sekcja 3.2.1.4.2). Uwalnianie LDH, będącej enzymem wewnątrzkomórkowym, jest klasycznym wskaźnikiem uszkodzenia błony komórkowej bądź śmierci komórek. W obu przypadkach – zarówno podczas transportu w zimnym ($0-4^{\circ}\text{C}$), jak i ciepłym ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) podłożu, odsetek uwolnionego LDH nie przekraczał 2%. Doświadczenie to miało również na celu ocenę wpływu zastosowanego podłoża transportowego na żywotność wycinków. Wyniki przedstawione na Ryc. 21 pokazują, że większe znaczenie od zastosowanej temperatury wydaje się mieć użycie bogatego w składniki odżywcze podłoża transportowego. Najniższą aktywność LDH (poniżej 1% całkowitej aktywności LDH) zaobserwowano przy użyciu podłoża WE z dodatkiem 10% FBS, zarówno podczas transportu w ciepłym, jak i zimnym podłożu, co świadczy o niewielkim i akceptowalnym występowaniu uszkodzeń komórek wycinka podczas transportu. Brak znaczących różnic w przypadku zastosowania inhibitora trypsyny wykazał, że wzrost aktywności LDH jest związany z innymi procesami niż aktywność enzymów proteolitycznych. Stąd, podczas planowania kolejnych doświadczeń za optymalne warunki transportu uznano zastosowanie podłoża transportowego WE + 10% FBS oraz transport po schłodzeniu lub w temperaturze $38\pm 1^{\circ}\text{C}$. Analizując wpływ temperatury transportu na żywotność wycinków podczas inkubacji, ocenionej w analogiczny sposób, tj. poprzez pomiar aktywności uwolnionego LDH (Ryc. 22) zauważyć można, że w przypadku wycinków

transportowanych w zimnym oraz ciepłym podłożu dynamika zmian do 120 minut inkubacji jest podobna. Po 120 minutach, w obu wariantach następuje istotny statystycznie wzrost aktywności LDH do wartości około 4% całkowitej aktywności LDH. Zważywszy na fakt, że wcześniej, podczas transportu uwolnione zostaje średnio około 2% LDH, po 120 minutach przeżywalność wycinków kształtuje się na poziomie ok. 94-95%. Jako, że przeżywalność na poziomie 95% w opisywanych w niniejszej pracy doświadczeniach uznawana jest za satysfakcjonującą (Ripken i Hendriks, 2015), czas prowadzenia doświadczeń wyznaczono na 120 minut. Żywotność wycinków jest także zależna od gatunku zwierzęcia, jego wieku oraz odcinka przewodu pokarmowego z którego pochodzą (Nietfeld i in., 1991). Opisano, że wycinki pochodzące od dorosłych zwierząt różnych gatunków ulegają szybszej degeneracji w porównaniu z wycinkami pobieranymi od zwierząt młodych i noworodków. Wycinki jelita cienkiego cechuje znacznie krótsza żywotność niż wycinki okrężnicy, co prawdopodobnie jest związane z faktem, że błona śluzowa jelita cienkiego jest bardziej wrażliwa na uszkodzenia niedokrwienne niż błona śluzowa okrężnicy (Nietfeld i in., 1991).

Co ciekawe, wycinki jelit przywożone w ciepłym podłożu transportowym, wydają się bardziej stabilne podczas dłuższej trwającej inkubacji, ponieważ nie zaobserwowano istotnych statystycznie wzrostów w uwalnianiu LDH pomiędzy 120 a 180 minutą inkubacji, w przeciwieństwie do wycinków przywiezionych w zimnym podłożu, w przypadku których istotny wzrost aktywności LDH pojawił się pomiędzy 120 a 150 minutą inkubacji (Ryc. 22).

Temperatura inkubacji miała istotny wpływ na skuteczność preparacji eksplantów błony śluzowej, tj. równomierne oddzielenie warstwy przydanki i części mięśniówki od błony śluzowej z warstwą podśluzową, bez powodowania w nich uszkodzeń mechanicznych. W przypadku wycinków transportowanych w zimnym podłożu odsetek sukcesów preparacji wynosił zaledwie 50% w porównaniu do 85-90% skutecznych preparacji, gdy wycinki były transportowane w ciepłym podłożu. Podsumowując, warunki transportu po schłodzeniu oraz w temperaturze $38\pm 1^{\circ}\text{C}$, przy wykorzystaniu bogatego w składniki odżywcze podłoża, są odpowiednie do prowadzenia doświadczeń *ex vivo* z wykorzystaniem wycinków jelit brojlerów kurzych pozyskanych w ubojni. Jednak ze względu na krótką żywotności wycinków doświadczenie w laboratorium nie powinno trwać dłużej niż 120 minut. Transport w ciepłym podłożu dodatkowo eliminuje stres związany z chłodzeniem i rozgrzewaniem. Zapewnia również możliwość rozpoczęcia

doświadczenia lub preinkubacji z substancją badaną, od razu po pobraniu wycinków w ubojni, na etapie ich transportu, oraz szybszy pomiar parametrów elektrofizjologicznych po przywiezieniu wycinków do laboratorium (z uwagi na eliminację etapu rozgrzewania). Ostatecznie, transport w ciepłym podłożu daje możliwość zbadania większej liczby eksplantów podczas jednego doświadczenia. Ponadto, ze względu na trudności techniczne dotyczące preparacji wycinków przywiezionych w zimnym podłożu, preferowaną metodą transportu, wybraną do wszystkich doświadczeń z eksplantami śluzówki, opisanymi w niniejszej pracy był transport w ciepłym podłożu WE + 10% FBS.

Proces preparacji polegający na oddzieleniu warstwy przydanki oraz błony mięśniowej od błony śluzowej wraz z warstwą podśluzową, poprzedza umieszczenie wycinków w komorze Ussinga. Wykorzystany w niniejszej pracy system służący pomiarowi transportu substancji i jonów poprzez błonę śluzową jelita został opracowany w połowie XX wieku przez duńskiego biologa Hansa H. Ussinga (Clarke, 2009). Pierwotnie służył on do zbadania mechanizmów aktywnego transportu NaCl poprzez skórę żaby. W celu wyeliminowania wpływu transportu biernego jonów związanego z różnicami stężeń elektrolitów oraz ciśnieniem osmotycznym i hydrostatycznym, skóra została umieszczona w komorze w taki sposób, że rozdzielała komorę na dwie części wypełnione identyczną objętością buforu o jednakowym składzie (Clarke, 2009). Pasywny transport wywołowany spontanicznym potencjałem elektrycznym nabłonka został wyeliminowany poprzez zastosowanie techniki zacisku napięciowego (ang. *voltage clamp*), polegającej na wyrównaniu potencjału elektrycznego nabłonka do zera za pomocą zewnętrznego źródła prądu. Prąd, który przepływa przez nabłonek, aby utrzymać potencjał przelnabłonkowy na poziomie zerowym to prąd zwarcia (I_{sc}). Jest on równy algebraicznej sumie przepływu jonów przez nabłonek wynikającej wyłącznie z transportu aktywnego jonów takich jak potas, sód i chlor (Clarke, 2009). Na podstawie tych obserwacji opracowano zmodyfikowany model transportu nabłonkowego Koefoeda-Johnsena i Ussinga (Clarke, 2009). Zgodnie z nim, błona wierzchołkowa wykazuje przepuszczalność dla jonów sodu (Na), natomiast błona podstawno-boczna – dla jonów potasu (K). Model ten stał się fundamentem współczesnego rozumienia transportu przez nabłonek. Kluczową rolę odgrywa tutaj aktywny transport realizowany przez pompę sodowo-potasową (Na-K ATP-azę) w błonie podstawno-bocznej, która tworzy gradient elektrochemiczny wykorzystywany następnie w transporcie wtórnym przez kanały

sodowe oraz kotransportery i antyportery zależne od Na w błonie wierzchołkowej. Podczas badań z wykorzystaniem tego modelu udało się zbadać mechanizmy wydzielania Cl^- , ważnego zarówno dla fizjologii procesów trawienia, jak i dla mechanizmów zaangażowanych w powstawanie biegunki wydzielniczej podczas zapalenia i infekcji przewodu pokarmowego. Biegunka wydzielnicza jest konsekwencją aktywnego wydzielania głównie jonów chlorkowych z komórek nabłonkowych do światła jelita, za którymi drogą międzykomórkową podąża woda w celu utrzymania równowagi osmotycznej (Anand i in., 2016). Biegunka wydzielnicza może być związana ze stanem zapalnym (np. w efekcie zakażenia *Salmonella* spp. lub enterokrwotocznymi szczepami *E.coli* czy *Clostridium difficile*) lub występować bez równoczesnego stanu zapalnego jako efekt zaburzenia procesów wydzielania i wchłaniania w komórkach nabłonka jelitowego (np. przez patogeny takie jak enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli* (ETEC) lub *Vibrio cholerae*) (Anand i in., 2016).

Przez lata model ten pozostawał w użyciu i znalazł zastosowanie w badaniach mających na celu pomiar transportu elektrolitów, składników odżywczych i leków przez nabłonki pochodzące z różnych narządów i układów: pokarmowego, oddechowego, rozrodczego, dokrewnego czy nerwowego (Clarke, 2009). Analiza parametrów elektrofizjologicznych oparta jest na założeniu, że warstwa nabłonka może być traktowana jak opornik w obwodzie elektrycznym tworzonym przez eksplant błony śluzowej umieszczony w komorze Ussinga i połączony z elektrodami. Parametry elektrofizjologiczne wyznaczane przy użyciu tej metody oparte są na prawach fizyki dotyczących prądu elektrycznego, przede wszystkim prawie Ohma, które mówi o wzajemnej zależności pomiędzy napięciem, natężeniem i oporem w układzie elektrycznym. Opisuje je wzór: $U = I \cdot R$, gdzie: U – napięcie [V], I – natężenie prądu [A], R – opór elektryczny [Ω]. Odwrotność oporu stanowi konduktancja, czyli przewodność elektryczna czynna, opisywana wzorem: $G = 1/R$, w którym G oznacza konduktancję [S], a R opór elektryczny [Ω].

Mierzony opór całkowity wynika z oporu komórkowego, a także oporu stawianego przez połączenia międzykomórkowe. Analogicznie, przewodność całkowita - G_t (pomiędzy śluzówką a przydanką) stanowi sumę przewodności komórkowej oraz międzykomórkowej: $G_t = G_c + G_j$. Im bardziej szczelna bariera jelitowa, tym wyższa wartość TEER oraz niższa G_t .

Komora Ussinga wykorzystana do badań przedstawionych w niniejszej pracy została opracowana do oceny różnych rodzajów nabłonków, składających się z pojedynczych warstw komórek. Wszystkie zależności elektrofizjologiczne zostały naukowo wyznaczone dla pojedynczej warstwy komórek, stąd eliminacja kolejnych warstw ściany jelita jest niezbędna do prawidłowej oceny tych parametrów. Dodatkowo obecność przydanki oraz warstwy mięśniówki może wiązać się z występowaniem przypadkowych skurczy mięśni, które zniekształcą dane elektrofizjologiczne takie jak Isc i TEP, a transport substancji przez wycinek może zostać zahamowany (Clarke, 2009; Hempstock i in., 2021). Ponadto wycinki jelit o pełnej grubości cechuje krótsza przeżywalność, ponieważ przydanka stanowi istotną barierę dyfuzyjną dla substancji odżywczych i tlenu (Clarke, 2009; Hempstock i in., 2021). Niektórzy autorzy przedstawiają wyniki badań na wycinkach jelit bez wcześniejszej preparacji (Matei i in., 2023) lub porównują wycinki preparowane i niepreparowane (Binder i Rawlins, 1973; Nejdfor i in., 2000). Dlatego w ramach opracowywania wykorzystanego w niniejszej pracy modelu *ex vivo* podobnie zdecydowano się na porównanie tych dwóch typów wycinków w zakresie wartości TEER oraz przepuszczalności dla wybranych substancji wskaźnikowych. TEER jest parametrem świadczącym o integralności oraz szczelności jelita, a jego spadek wskazuje na wzrost przepuszczalności badanej tkanki (Clarke, 2009; Matei i in., 2023; Neirinckx i in., 2011). Zarówno dla wycinków niepreparowanych, jak i preparowanych, podczas dwugodzinnej inkubacji zaobserwowano tendencję do wzrostu w zakresie wartości TEER, co może sugerować, że wzrost ten jest zjawiskiem fizjologicznym, związanym z aktywnością jelita. W przypadku wycinków preparowanych TEER cechował się większą stabilnością, a jego wzrost był mniej nasilony w porównaniu z wycinkami niepreparowanymi. Niektórzy autorzy wskazują na fakt, że TEER nie zawsze odzwierciedla integralność tkanki, a różne, sprzeczne efekty mogą się sumować, prowadząc do jego pozornie stałej wartości (Neirinckx i in., 2011). Söderholm i współpracownicy (1998) zaobserwowali brak korelacji między wartością TEER a przepuszczalnością wycinków jelit zmierzoną przy wykorzystaniu znakowanej substancji wskaźnikowej. Według autorów, przypuszczalnie, mogło to wynikać z obrzęku warstwy podśluzowej, który zniwelował spadek wartości TEER wynikający z uszkodzonych połączeń ścisłych. Jednakże sami autorzy podkreślają, że w innym z badań przeprowadzonych przez ten sam zespół udało się wykazać korelację między bardziej nasilonymi zmianami TEER, po modulacji połączeń ścisłych (tzw. *tight junction*) w wycinkach błony śluzowej jelita krętego człowieka a przepuszczalnością tych

wycinków dla znakowanego wskaźnika. Sugeruje to, że wartość TEER przynajmniej w trakcie pierwszych godzin eksperymentów, może być powiązana ze stanem połączeń ścisłych w nabłonku wycinków jelit. Równocześnie z doświadczenia własnego zespołu ZFiT wynika, że bardzo wysokie wartości TEER u niektórych osobników (powyżej $200 \Omega \times \text{cm}^2$) mogą być wynikiem procesów zapalnych, bliznowacenia tkanek lub nadmiernej produkcji śluzu (Cisse i in., 2025). Spadek wartości TEER może natomiast wskazywać na obumieranie lub znaczące uszkodzenie wycinków jelita. W aneksie załączono wyniki z doświadczeń pilotażowych, z wykorzystaniem niskiej temperatury oraz użyciem kolagenazy w celu uszkodzenia (rozszczenia) jelita (aneks: Ryc.1). W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano spadek wartości TEER w eksplantach jelita brojlerów po inkubacji w obecności kolagenazy, ale również brak wzrostu TEER w przypadku inkubacji w temp. 4°C.

Można również zauważyć, że wycinki preparowane i niepreparowane w zakresie wartości TEER cechuje rozkład normalny. Oznacza to, że zabieg preparacji miał podobny wpływ na każdy z wycinków oraz był wykonywany w sposób poprawny i powtarzalny, ponieważ jeśli jelito byłoby uszkodzane np. przerwanie ciągłości tkanek to TEER po preparacji powinien być podobny w każdym eksplancie. Szeroka rozpiętość wartości TEER wskazuje na znaczne różnice międzyosobnicze, które mogą być związane z cechami indywidualnymi, ale także warunkami wcześniejszego utrzymania, transportu i stresu zwierząt przed ubojem. Dlatego do doświadczeń docelowych badających wpływ Sm na przepuszczalność wycinków wykorzystano tkanki pozyskane od możliwie jednolitej grupy zwierząt, pochodzących z tego samego stada, a prezentowane w pracy wyniki pochodzą z małych liczebnie grup. Dodatkowo porównując średnie wartości TEER dla wycinków preparowanych oraz niepreparowanych można zauważyć, że wartość ta jest istotnie niższa w przypadku eksplantów śluzówki (Ryc. 24), co odzwierciedla fakt, że tkankę pełnej grubości cechuje wyższy opór oraz, że preparacja była wykonywana skutecznie.

Analizując przepływ substancji wskaźnikowych dla oceny przepuszczalności międzykomórkowej, tj. mannitolu oraz LY (Sharma i in., 2019; Westerhout i in., 2014) przez wycinki preparowane oraz niepreparowane zauważyć można istotne różnice pomiędzy obiema grupami w zakresie przepływu mannitolu. W przypadku wycinków preparowanych stężenie mannitolu po stronie przydanki wzrosło 2,9 razy pomiędzy trzydziestą a dziewięćdziesiątą minutą inkubacji (Ryc. 28). W wycinkach

niepreparowanych wzrost ten był nieznaczny, a maksymalne zmierzone stężenie po stronie przydanki, osiągnięte po 90 minutach inkubacji ($5,83 \pm 2,92 \mu\text{M}$) było niższe niż wycinkach preparowanych po 30 minutach ($6,40 \pm 2,92 \mu\text{M}$; Ryc. 28). Przepływ mannitolu ($\text{nmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) w wycinkach preparowanych był 3,5 razy wyższy niż w niepreparowanych (Ryc. 27). Wyniki te są zgodne z obserwacjami Binder'a i Rawlins (1973), według których wykorzystanie wycinków jelita szczura pełnej grubości wiązało się z uzyskaną istotnie niższą wartością średniego przepływu dwukierunkowego jonów sodu poprzez wycinek w porównaniu z eksplantami błony śluzowej. Podobne wyniki dotyczące przepływu mannitolu poprzez wycinki jelita czczego szczurów uzyskał Nejdfors ze współpracownikami (2000) obserwując istotnie wyższy przepływ tego markera poprzez wypreparowane eksplanty błony śluzowej w porównaniu z wycinkami pełnej grubości. Co ciekawe takich wyników nie uzyskano w przypadku innego badanego odcinka jelita cienkiego tj. jelita krętego (Nejdfors i in. 2000). Porównując średnie wartości przepływu mannitolu poprzez eksplanty błony śluzowej jelita czczego brojlerów kurzych prezentowane w niniejszej pracy (około $3,34 \text{ nmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) oraz tuczników (około $1,18 \text{ nmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) uzyskane w czasie wcześniejszych doświadczeń prowadzonych w ZFiT (Mendel i in., 2019), zauważyć można, że średnie wartości przepływu są zbliżone w przypadku obu gatunków zwierząt. Wyniki dotyczące przepływu mannitolu opisywane w niniejszej pracy są także zbieżne z uzyskanymi przez Bijlsma ze współpracownikami (1995). Autorzy porównali przepływ mannitolu przez eksplanty śluzówki jelita krętego oraz dwunastnicy umieszczone w komorach Ussinga, pozyskane od różnych gatunków zwierząt: kawii domowej, szczura, królika, a także człowieka. We wszystkich przypadkach uzyskali oni wyniki mieszczące się w podobnym zakresie do przytoczonych powyżej (od $3,23$ do $1,16 \text{ nmol}/\text{min}/\text{cm}^2$).

Zaskakująca okazała się obserwacja dotycząca przepływu drugiego z markerów: LY. Jest to hydrofilna substancja drobnocząsteczkowa, która łatwo przemieszcza się przez bariery biologiczne takie jak bariera jelitowa czy bariera krew-mózg międzykomórkowo poprzez dyfuzję bierną (Sharma i in., 2019). Wobec tego jest wykorzystywana jako wskaźnik poprawnego funkcjonowania połączeń ścisłych, odpowiedzialnych za kontrolę przepływu substancji pomiędzy komórkami oraz zachowania polaryzacji błony (Sharma i in., 2019). W przypadku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że pomimo, wyraźnego transportu mannitolu przez eksplant, takiego efektu nie zaobserwowano

w odniesieniu do LY (Ryc. 29). W badaniach przeprowadzonych w zbliżonym modelu wykorzystującym eksplanty jelitowe pochodzące od świń zaobserwowano korelację między wzrostem przepuszczalności dla mannitolu oraz LY przez eksplanty, wywołanym działaniem rozszczelniającym zastosowanej mykotoksyny, a także z równoczesnym obniżeniem wartości TEER (Mendel i in., 2019). Takiej korelacji nie udało się zaobserwować w przypadku analizowanego modelu wykorzystującego tkanki kurze, co prowadzi do trudności w interpretacji uzyskanych wyników. Jednak na podstawie różnic w bazowych wartościach TEER oraz przepływie mannitolu zdecydowano o wykorzystywaniu wypreparowanych wycinków we wszystkich kolejnych doświadczeniach. W celu lepszego scharakteryzowania modelu przeanalizowano przepływ innych substancji, takich jak kofeina czy peroksydaza chrzanowa przez eksplanty, a także dodatkowe parametry elektrofizjologiczne.

Peroksydaza chrzanowa jest substancją, która w warunkach fizjologicznych, w organizmach ssaków, jest transportowana głównie na drodze endocytozy, podczas której podlega częściowej degradacji wewnątrz komórek (Heyman i in., 1982; Heyman i in., 1990; Terpend i in., 1998). Podczas, gdy bariera jelitowa ulega uszkodzeniu, na przykład w efekcie stanu zapalnego czy stresu oksydacyjnego, a połączenia ściśle (ang. *tight junctions*) ulegają rozszczelnieniu, jej transport drogą międzykomórkową może zachodzić w większym stopniu (Vergauwen i in., 2017). Mając na uwadze, że wykonane oznaczenie aktywności HRP nie obejmuje całego systemu transportu, ponieważ pomija ewentualny wewnątrzkomórkowy metabolizm HRP, a produkty rozpadu nie są brane pod uwagę, w analizowanym modelu HRP została wykorzystana jako wskaźnik szczelności bariery jelitowej. Analizując uzyskane wyniki (tabela 4) zaobserwowano, że przepływ HRP przez eksplant podczas inkubacji w warunkach kontrolnych był wyraźnie wyższy niż opisywany w modelach komórkowych i tkankowych *ex vivo*, np. ponad 60 razy wyższy od przepływu przez pojedynczą warstwę komórek ludzkiego gruczołakoraka okrężnicy HT29-19A (Terpend i in., 1998), a także kilkadziesiąt razy wyższy w porównaniu do wartości opisywanych dla eksplantów jelit kur niosek (Metzler-Zebeli, 2017) oraz około 19 razy wyższy niż w przypadku przepływu przez eksplanty błony śluzowej jelita czczego królika w komorach Ussinga (Heyman i in., 1982). Zaobserwowane różnice w transporcie HRP mogą wynikać z zastosowanego modelu badawczego, różnic gatunkowych, a nawet różnic wynikających z wieku zwierząt. Trzeba też uwzględnić wyjściowe stężenie HRP zastosowane w poszczególnych

badaniach. Wyjaśnienie zaobserwowanych rozbieżności jest wielokierunkowe i powinno uwzględniać również stopień degradacji cząsteczki podczas przechodzenia przez komórkę, sposób oznaczenia HRP (izotopowo oraz enzymatycznie), stopień zaangażowania ścieżek związanych z transportem aktywnym, czy możliwość modyfikacji intensywności transportu przez komórki przez stan zapalny. Powyższe dane jednoznacznie wskazują na konieczność badania kilku markerów transportu jelitowego, szczególnie w przypadku analizy nowego modelu. Świadczą też o tym, że większą wartość w opisie modelu ma porównanie transportu różnych markerów niż porównanie transportu jednego markera z innymi modelami.

Do scharakteryzowania modelu w zakresie transportu wewnątrzkomórkowego wykorzystano oznaczenie przepływu kofeiny (tabela 4), ponieważ jest substancją o wysokiej rozpuszczalności i przenikalności, która nie podlega degradacji i jest transportowana głównie drogą dyfuzji biernej przez komórki, a jedynie w niewielkim stopniu drogą międzykomórkową (Smetanova i in., 2009). W porównaniu z wartościami uzyskanymi w analogicznym modelu opartym na eksplantach jelit świń, wartość przepływu kofeiny ($\text{nmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) przez eksplanty jelit kurzych była około dwukrotnie wyższa (Mendel i in., 2022). Ze względu na to, że wiele czynników może wpływać na przepływ substancji w eksperymentalnym układzie *in vitro/ex vivo* w celu bardziej wiarygodnego poznania właściwości badanych substancji w analizowanym modelu, a także odniesienia uzyskanych wyników do danych literaturowych wyznaczony został pozorny współczynnik przepuszczalności (Papp) (tabela 5). Pozwala on na porównanie wyników eksperymentów między sobą, ponieważ jest on skorygowany o powierzchnię transportu, a przede wszystkim zastosowane stężenie substancji badanej (Gaillard i de Boer, 2000). Ze względu na fakt, że stężenie LY w przedziale przydanki jest poniżej limitu oznaczalności metody (ang. *limit of quantification*, LOQ), szczegółowe analizowanie danych uzyskanych z wyliczeń wartości przepływu oraz Papp byłoby mylące. W tym przypadku można jedynie stwierdzić, że obliczony przepływ dla LY nie jest większy niż $0,05 \text{ nmol}/\text{min}/\text{cm}^2$, a Papp jest nie większy niż $2,1 \times 10^{-6}$. Analizując wartości Papp uzyskane dla pozostałych badanych substancji, warto zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku mannitolu wartość ta, jest około 50 razy wyższa niż w badaniach z wykorzystaniem hodowli komórkowych (Smetanova i in., 2009), a także około 10-12 razy wyższa niż opisana w modelu wykorzystującym eksplanty błony śluzowej jelita czczego świń (Westerhout

i in., 2014) oraz niż udokumentowana przez Nejdfors i in. (2000), w badaniach na eksplantach jelita czczego człowieka, szczura i świni. W przypadku kofeiny, wartość Papp jest zbliżona, choć prawie dwukrotnie niższa od tej uzyskanej przez Westerhouta ze współpracownikami (2014) w odniesieniu do eksplantów błony śluzowej jelita czczego świni, a także kilkukrotnie niższa niż wartość uzyskana dla pojedynczej warstwy komórek Caco-2 (Smetanova i in., 2009). Odnosząc uzyskaną wartość Papp dla HRP do wyników uzyskanych w eksplantach jelit świni przez Vergauwen ze współpracownikami (2017), zauważyć można, że także w tym przypadku jest ona kilkadziesiąt razy wyższa od przytoczonych danych literaturowych.

Wyraźnie zwiększona przepuszczalność dla mannitolu oraz HRP mogłaby świadczyć o rozszczelnieniu bariery jelitowej i przeciekaniu tych substancji drogą międzykomórkową, jednak wyniki badań parametrów elektrofizjologicznych przeczą temu założeniu. Biorąc pod uwagę wartość TEER nabłonek w jelicie cienkim zazwyczaj fizjologicznie cechuje wysoka przepuszczalność i wartości TEER mieszczące się w przedziale 50 do 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (dla człowieka) (Fleischer, 1999). Jednak porównując wartości TEER eksplantów jelit kurcząt prezentowane przez Amat ze współpracownikami (1999) z odnotowanymi w niniejszej pracy, zauważyć można, że w cytowanym artykule są one około 3 razy niższe, a w związku z tym badane przez autorów pracy eksplanty cechuje także proporcjonalnie wyższa przewodność. Co ciekawe, w przytoczonej pracy wartości TEER wykazują stosunkowo niewielkie zróżnicowanie, co pozostaje w sprzeczności z obserwacjami własnymi. Należy jednak zauważyć, że w cytowanych badaniach zwierzęta były uśmiercane w wieku 5–8 tygodni, pochodziły z jednorodnej grupy, były utrzymywane w jednakowych warunkach i poddawane ubojowi bezpośrednio na miejscu. Zbliżone do prezentowanych w niniejszej pracy wartości TEER zostały opisane przez Grubb ze współpracownikami (1987) w odniesieniu do eksplantów jelita czczego kurcząt. Wartości I_{sc}, świadcząca o aktywnym transporcie jonów przez nabłonek, dla eksplantów inkubowanych w warunkach kontrolnych opisywanych w niniejszej pracy była stosunkowo niska, co wskazuje na niewielkie nasilenie tego procesu (tabela 6). Wartości I_{sc} oraz G_t (tabela 6) plasują się pomiędzy wartościami przytaczanymi przez Metzler-Zebeli i współpracowników (2017) w odniesieniu do eksplantów pochodzących z proksymalnej oraz dystalnej części jelita czczego kur niosek. Należy jednak zaznaczyć, że autorzy zastosowali inny sposób wyznaczania odcinków jelita, niż przyjęty w opisywanych doświadczeniach, co skutkuje tym, że analizowane tutaj wycinki realnie pochodzą z

regionów położonych pomiędzy obszarami opisanymi w cytowanej pracy. W porównaniu z wynikami prezentowanymi przez Amat ze współpracownikami (1999), analizowana tutaj wartość I_{sc} jest zbliżona do tej opisywanej przez autorów w przypadku eksplantów pochodzących z dwunastnicy kurcząt, ale znacznie niższa od tej obserwowanej w jelicie czczym oraz krętym. Wartość TEP opisywana w pracach Amat ze współpracownikami (1999) oraz Grubb i in. (1987) dla jelita czczego kurcząt jest zbliżona do tej uzyskanej w omawianych doświadczeniach. Jednak wartość I_{sc} prezentowana w niniejszym manuskrypcie, w porównaniu do przytoczonej pracy autorstwa Grubb i in. (1987) po raz kolejny znajduje się pomiędzy wartościami opisywanymi przez autorów dla wycinków dwunastnicy oraz jelita czczego. Podobnie jak w pracy przytoczonej powyżej (Metzler-Zebeli, 2017) autorzy pobierali wycinki jelita czczego dystalnie od fragmentów analizowanych w niniejszych badaniach, stąd możliwe są różnice w uzyskanych wynikach. Ponadto uzyskiwane przez różnych autorów parametry elektrofizjologiczne będą się różnić zależnie od zastosowanej aparatury badawczej, powierzchni elektrod, ich odległości, a także natężenia i napięcia prądu stosowanych zacisków. Podsumowując, pomimo pewnych różnic, uzyskane wyniki dotyczące parametrów elektrofizjologicznych w analizowanych w warunkach kontrolnych eksplantach błony śluzowej jelit czczych kurcząt w ogólnym ujęciu są zgodne z danymi literaturowymi.

Po ustaleniu warunków transportu i inkubacji wycinków jelit oraz dokonaniu charakterystyki opracowanego modelu *ex vivo* kolejnym krokiem było wykonanie przesiewowych badań *in vitro* mających na celu wybranie dodatku paszowego do dalszych analiz w opracowanym modelu tkankowym. Do badań wybrane zostały wyciągi z roślin, których preparaty zostały dopuszczone do stosowania jako dodatki paszowe u drobiu według obowiązującego prawodawstwa unijnego (Reg. (EC) 1831/2003). Istotą badań było wykonanie doświadczeń z wykorzystaniem kompletnych wyciągów, a nie dogłębne badanie właściwości pojedynczych substancji wchodzących w ich skład. W literaturze często można się spotkać z badaniami *in vitro* koncentrującymi się na właściwościach pojedynczych substancji, jednakże nie odpowiada to zwykle sytuacji *in vivo*, a uzyskane wyniki są trudne do interpretacji. Ponadto właściwości wyciągów często różnią się od efektów wywoływanych przez ich wyizolowane składniki, ponieważ odpowiada za nie więcej niż jedna substancja. Wyciąg roślinny stanowi bowiem mieszaninę różnych związków, które mogą wzajemnie modulować swoje efekty, zmniejszając lub zwiększając ogólną aktywność wyciągu (Heinle i in., 2006; Mendel,

2020; Poślusznny i in., 2023). Korzystny wpływ wyciągów roślinnych na zdrowie jelit zwierząt związany jest z faktem, że wykazują one wielokierunkowe działanie: przeciwbakteryjne, przeciwzapalne oraz przeciwutleniające (Famuyide i in., 2019; Julian-Flores i in., 2025; Latek, 2022; Oni i in., 2025). Mogą one także bezpośrednio wpływać na przepuszczalność oraz aktywność motoryczną jelit, których zaburzenia występują w wielu chorobach przewodu pokarmowego, zwłaszcza tych przebiegających z ostrą lub przewlekłą biegunką (Julian-Flores i in., 2025; Palombo, 2006; Poślusznny i in., 2023). Wiele problemów dotyczących układu pokarmowego drobiu jest również wypadkową równoczesnego występowania różnych czynników: ekstremalnie szybkiego tempa wzrostu, stresu, nieprawidłowej diety czy narażenia na patogeny bądź obecność mykotoksyn w paszach. Chcąc im przeciwdziałać konieczne jest również kompleksowe podejście, stąd roślinne dodatki paszowe często stanowią dobre narzędzie w zapobieganiu i zwalczaniu występujących zaburzeń. Ponadto wpisują się one w założenia polityki Unii Europejskiej (Europejski Zielony Ład oraz strategia „Od pola do stołu”) mającej na celu ograniczenie stosowania antybiotyków w zwierząt gospodarskich oraz poszukiwanie alternatywnych sposobów wspomagania zdrowia zwierząt (EC, 2020). Niniejsza praca miała na celu porównanie działania przeciwbakteryjnego, przeciwzapalnego oraz przeciwutleniającego czterech wyciągów roślinnych w modelu *in vitro*, a następnie selekcję najbardziej obiecującego spośród nich (wykazującego najwięcej korzystnych efektów) do dalszych badań w modelu *ex vivo*, w celu określenia jego wpływu na przepuszczalność i aktywność motoryczną jelit. Takie kompleksowe podejście pozwoliło na wielostronną ocenę właściwości oraz efektów działania wybranego dodatku paszowego kontekście zdrowia jelit.

W celu uzyskania jak najbardziej wiarygodnego porównania właściwości analizowanych wyciągów w modelu *in vitro*, zostały one zbadane w tym samym laboratorium (w Zakładzie Fitomedycyny Wydziału Medycyny Weterynaryjnej na Uniwersytecie w Pretorii), przy zastosowaniu jednakowych warunków eksperymentalnych oraz szczepów bakteryjnych. Pozwoliło to zminimalizować rozbieżności wynikające z różnic w zastosowanych stężeniach inokulum bakteryjnego lub szczepach bakterii, a także różnice metodyczne czy sprzętowe.

Badanie właściwości przeciwbakteryjnych było oparte na trzech elementach – określeniu MIC, zdolności hamowania formowania biofilmu oraz aktywności anty- quorum-sensing wybranych wyciągów roślinnych. Do określenia MIC zastosowano standardowo

wykorzystywane w Zakładzie Fitomedycyny szczepy bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych (Adeyemo i in., 2022; Dzoyem, McGaw i Eloff, 2014; Elisha i in., 2017; Famuyide i in., 2019). Ponadto infekcje spowodowane badanymi bakteriami: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. oraz *Escherichia coli*, mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia zwierząt, a także konsumentów produktów pochodzenia zwierzęcego oraz nieść ryzyko rozwoju lekooporności (Ali i in., 2017; Dar i in., 2017; Hassan i in., 2014; Johnson i in., 2007; Shaji i in., 2023; Stromberg i in., 2017; Ribeiro i in., 2018). Z punktu widzenia zdrowia przewodu pokarmowego, szczególnie istotne są bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, ponieważ kolibakterioza oraz salmonelloza uznawane są za najczęściej występujące choroby zakaźne u ptaków w każdym wieku (Hassan i in., 2014). Żaden z badanych wyciągów nie wykazał silnego działania przeciwbakteryjnego *in vitro* w zakresie testowanych właściwości (tabela 10). Według Eloff (2021), wartość MIC poniżej 0,02 mg/ml jest uznawana za wybitne działanie przeciwbakteryjne, 0,021–0,08 mg/ml za znakomitą lub bardzo dobrą aktywność, 0,081–0,16 mg/ml za dobrą aktywność, natomiast wartości MIC w zakresie $0,16 \leq \text{MIC} \leq 0,32$ mg/ml oznaczają umiarkowaną lub średnią aktywność przeciwbakteryjną, podczas gdy wartości MIC powyżej 0,32 są uważane za słabe działanie przeciwbakteryjne. W przypadku badanych wyciągów, jedynie Sm uzyskał wartości MIC poniżej 0,32 mg/ml dla badanych szczepów *E.coli* oraz równą 0,63 mg/ml dla badanych serowarów *Salmonella enterica* (tabela 7), co wskazuje, że może się cechować pewną aktywnością przeciwbakteryjną względem bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, tak istotnych dla zdrowia jelit. Jest to zgodne z badaniami *in vivo*, które wykazały, że dodatek silimaryny w diecie brojlerów kurzych oraz kaczek może prowadzić do korzystnych zmian w składzie ich mikrobioty jelit, zmniejszając liczebność *E.coli* oraz *Salmonella* spp. oraz zwiększając liczebność *Lactobacillus* spp (Elnaggar, El-Said i Ali, 2021; Jahanian i in., 2017; Jahanian i in., 2021; Zaker-Esteghamati i in., 2020). Ponadto, sam autor wspomnianej powyżej klasyfikacji (Eloff, 2021) podkreśla, że wyciągi roślinne o wyższych wartościach MIC nadal mogą być skutecznie stosowane jako leki ziołowe lub w medycynie tradycyjnej, ponieważ mogą zawierać związki działające synergistycznie z innymi substancjami w organizmie człowieka lub zwierzęcia, bądź wywierać swój efekt poprzez działanie immunomodulujące, a nie działać w sposób bezpośredni na patogeny.

W badaniach mających na celu określenie zdolności wyciągów roślinnych do hamowania produkcji biofilmu bakteryjnego analizowane było działanie wyciągów na dwóch etapach, tj. zdolność do zahamowania tworzenia biofilmu przez bakterie oraz zdolność do niszczenia już wytworzonego biofilmu. Biofilm bakteryjny jest wielowarstwową strukturą stworzoną z polimerów cukrów i białek, którą otoczone są bakterie. Jego obecność jest jednym z głównych czynników wirulencji bakterii patogennych, która chroni je przed niekorzystnymi warunkami środowiska, a także zmniejsza ich wrażliwość na leki przeciwbakteryjne (Czyżewska-Dors i in., 2018). Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem bakterii gatunku *Staphylococcus epidermidis* wykazujących silne zdolności do tworzenia biofilmu i uznawanych za jeden ze standardowych gatunków do badań nad biofilmem bakteryjnym (Cheung i Otto, 2025). W przeprowadzonych doświadczeniach jedynie wyciąg z *Solidago virgaurea* wykazał obiecujące działanie w tym zakresie, hamując tworzenie ponad 50% biofilmu (tabela 8), co uznaje się za skuteczne działanie w tym zakresie (Adeyemo i in., 2022; Famuyide i in., 2019). Wszystkie badane wyciągi okazały się nieskuteczne w niszczeniu już utworzonego biofilmu bakteryjnego, a wręcz wykazywały właściwości sprzyjające jego rozwojowi (tabela 8). Podobne wyniki dotyczące promowania rozwoju już powstałego biofilmu przez wyciągi roślinne uzyskał Adeyemo i in. (2022) wskazując na fakt, że niszczenie już wytworzonego biofilmu wydaje się być trudniejszym procesem niż zapobieganie jego rozwojowi. Być może jest to spowodowane faktem, że wyciągi roślinne są zdolne jedynie do zahamowania adhezji bakterii do podłoża, czyli procesu zaangażowanego w początkowe stadia formowania biofilmu, jednak gdy już do niego dojdzie, nie są w stanie przeciwdziałać intensywnej produkcji biofilmu poprzez bakterie reagujące w ten sposób na zmianę środowiska (Adeyemo i in., 2022; Famuyide i in., 2019). Innym z elementów związanych z wirulencją bakterii patogennych jest zjawisko quorum sensing (QS), które odrywa istotną rolę w regulacji ekspresji czynników wirulencji, na przykład: formowaniu biofilmu, ale także w sporulacji, zdolności do ruchu czy wytwarzaniu bakteriocyn (Czyżewska-Dors i in., 2018; Dimitrova i in., 2023;). Badania wykazały, że bakterie produkują sygnały chemiczne zwane autoinduktorami, których stężenie wzrasta wraz z rozrostem populacji bakterii. Gdy stężenie tych związków uzyska określony poziom, związany z osiągnięciem przez populację odpowiedniej liczebności, tzw. kworum, następuje skoordynowana zmiana ekspresji genów, umożliwiającą wspólne działanie całej społeczności bakteryjnej (Chenia, 2013; Czyżewska-Dors i in., 2018; Dimitrova i in., 2023; Naga i Shaaban, 2023).

Za autoinduktory w przypadku bakterii Gram-ujemnych służą acylowane laktony homoseryny (ang. *acyl-homoserine lactones*, AHL) (Chenia, 2013; Czyżewska-Dors, Dors i Pomorska-Mól, 2018; Dimitrova i in., 2023). Modelowym organizmem wykorzystywanym do badania zdolności substancji do hamowania QS, również w odniesieniu do wyciągów roślinnych jest *Chromobacterium violaceum* (Dimitrova i in., 2023). Są to bakterie Gram-ujemne, które na podłożach tworzą charakterystyczne fioletowe kolonie. Obecność fioletowego zabarwienia jest związana z syntezą wiołaceiny, barwnika którego produkcja regulowana jest przez system QS zależny od AHL. Ponieważ zabarwienie jest łatwe do zaobserwowania, a jego intensywność możliwa do ilościowego oznaczenia, *Chromobacterium violaceum* jest powszechnie wykorzystywane do badań naukowych w tym zakresie (Dimitrova i in., 2023). Hamowanie QS może być jedną ze strategii kontroli namnażania i rozprzestrzeniania się bakterii patogennych, a związki pochodzenia naturalnego mogą wykazywać zdolności hamujące QS, czego liczne przykłady prezentują w swojej pracy przeglądowej Naga i Shaaban (2023). Jednym z takich przykładów jest wanilina - substancja wykorzystana w niniejszej pracy jako kontrola pozytywna. Substancja ta pochodzi z rośliny *Vanilla planifolia* (wanilia płaskolistna) i ma zdolność do hamowania syntezy cząsteczek sygnałowych typu AHL, dzięki czemu hamuje produkcję wiołaceiny przez *Chromobacterium violaceum* (Dimitrova i in., 2023; Naga i Shaaban (2023). Spośród wyciągów roślinnych, których właściwości AQS zostały zbadane w niniejszej pracy jedynie Sm wykazał zdolności do hamowania QS zbliżone do kontroli pozytywnej: waniliny, a w przypadku pozostałych wyciągów nie zaobserwowano właściwości hamujących QS (tabela 9; Ryc. 30).

Kolejnym etapem badania prozdrowotnych właściwości wyciągów roślinnych była ocena ich działania antyoksydacyjnego. Jest to bardzo istotny element strategii ochrony i poprawy zdrowia brojlerów kurzych, które ze względu na gwałtowny wzrost oraz szybkie tempo metabolizmu, a także niekorzystne warunki środowiskowe takie jak stres cieplny, są często narażone na stres oksydacyjny (Basiouni i in. 2023; Ebeid i Al-Homidan, 2022; Mishra i Jha, 2019). Ponadto stres oksydacyjny jest często jednym z mechanizmów warunkujących toksyczne działanie mykotoksyn oraz stanowi jeden z elementów w patogenezie wielu chorób przebiegających ze stanem zapalnym (Basiouni i in. 2023; Mavrommatis i in., 2021; Mishra i Jha, 2019). Stres oksydacyjny może negatywnie wpływać na funkcjonowanie przewodu pokarmowego kurcząt, prowadząc

do zwiększenia przepuszczalności bariery jelitowej oraz zaburzeń mikrobioty jelitowej (dysbiozy), co z kolei oddziałuje na stan zdrowia ogólnego i wydajność produkcyjną ptaków (Basiouni i in. 2023; Mishra i Jha, 2019). Wiele substancji pochodzenia roślinnego znanych jest ze swojego działania przeciwzapalnego i przeciwutleniającego, stąd zastosowanie roślinnych dodatków paszowych może być jednym z pomocniczych elementów ograniczania narażenia brojlerów na stres oksydacyjny (Basiouni i in. 2023; Mishra i Jha, 2019). Uzyskane wyniki określające zdolność badanych wyciągów roślinnych do redukcji rodników wykazały, że najsilniejsze właściwości przeciwutleniające charakteryzują wyciągi z *Cynara scolymus* oraz *Silybum marianum* (L.) (Ryc. 31, Ryc. 32). Przedstawione dane odnośnie działania antyoksydacyjnego są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Bahmani i in., 2014; Basiouni i in. 2023; Di Napoli i in., 2023; Elnesr i in., 2023; Porro i in., 2024; Porwal i in., 2019; Schiavone i in., 2007; Zaker-Esteghamati i in., 2021).

Ostatnim krokiem w badaniach właściwości wyciągów roślinnych w modelu *in vitro*, była ocena ich właściwości przeciwzapalnych poprzez określenie ich zdolności do hamowania uwalniania NO przez makrofagi linii RAW264.7. Tlenek azotu jest wytwarzany przez indukowaną syntazę NO (iNOS), głównie w makrofagach pod wpływem LPS lub cytokin prozapalnych (Hussain i Qureshi, 1997, Kallapura i in., 2015, Zhang i in., 2017a). NO jest wolnym rodnikiem, który wykazuje właściwości cytotoksyczne wobec patogenów, jednak w przypadku przewlekłego zapalenia może również powodować uszkodzenia oksydacyjne komórek gospodarza (Basiouni i in. 2023). Stąd, bardzo często rozpatruje się wspólnie działanie antyoksydacyjne oraz przeciwzapalne badanych substancji. Biorąc pod uwagę fakt, że większość chorób ogólnoustrojowych jest związana z przewlekłym stanem zapalnym jelit (Basiouni i in. 2023), przeciwdziałanie mu jest bardzo ważnym elementem ochrony zdrowia zwierząt.

NO jest cząsteczką o krótkiej stabilności, dlatego ilościowe oznaczanie azotynów, stabilnego produktu powstającego z NO, staje się uznanym wskaźnikiem do pośredniego pomiaru stanu zapalnego (Kallapura i in., 2015). Na etapie badań przesiewowych wyciągów w warunkach *in vitro*, badanie wstępne zostało przeprowadzone z wykorzystaniem makrofagów mysich, jednak badanie z wykorzystaniem pojedynczej linii komórkowej, pochodzącej od odmiennego gatunku zwierząt nie odpowiada dokładnie warunkom występującym *in vivo*. Stąd, aby uzyskać bardziej wiarygodne wyniki odnoszące się do brojlerów kurzych, podobne badanie wykonano w kolejnych

etapach doświadczeń z wybranym wyciągiem roślinnym wykorzystując opracowany model *ex vivo* oparty na wycinkach jelit brojlerów kurzych. W badaniu w warunkach *in vitro* Sm wykazał najsilniejsze właściwości przeciwzapalne, silniejsze niż kontrola pozytywna, którą był niesteroidowy lek przeciwzapalny – diklofenak (Ryc. 33).

Podsumowując badania przesiewowe wybranych wyciągów roślinnych w warunkach *in vitro* (tabela 10) można stwierdzić, że w odniesieniu do właściwości przeciwbakteryjnych badanych wyciągów, żaden z nich nie wykazał szczególnie silnej aktywności, jednak najbardziej obiecującym był Sm. Rozpatrując łącznie działanie przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne wyciągów, ponownie najbardziej korzystne właściwości wykazał Sm. Stąd, do badań w trzecim etapie doświadczeń wybrany został wyciąg z *Silybum marianum* (L.). Badania te miały na celu ocenę aktywności wybranego dodatku paszowego – Sm, w modelach *ex vivo* opartych na wycinkach jelit pozyskanych z przemysłowego uboju drobiu. Etap ten miał na celu zdobycie nowej wiedzy dotyczącej działania wybranego wyciągu roślinnego u docelowego gatunku zwierząt, tj. brojlerów kurzych, z wykorzystaniem modelu tkankowego bardziej zbliżonego do warunków *in vivo*. Z drugiej strony, etap ten posłużył również do równoczesnej weryfikacji przydatności opracowanego modelu *ex vivo* do tego typu badań.

S. marianum (L.) od wieków był wykorzystywany do leczenia chorób wątroby i dróg żółciowych u ludzi (Abd El-Ghany, 2022; Bahmani i in., 2015; Bendowski i in., 2022; Porwal i in., 2019; Wang i in., 2020). Jego głównym składnikiem aktywnym jest silimaryna (stanowiąca około 60% suchego wyciągu), w skład której wchodzi wiele flawonolignanów, takich jak sylibina A i B (50–60%), sylikrystyna (20%), sylidianina (10%) i izosylibina (5%), a także flawonoid (taksyfolina) (Abd El-Ghany, 2022; Bahmani i in. 2015; Bendowski i in., 2022; Porwal i in. 2019; Wang i in., 2020). W ostatnich latach *S. marianum* (L.) zaczął zyskiwać popularność również ze względu na swoje działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciw włóknieniowe i immunomodulujące (Abd El-Ghany, 2022; Bahmani i in. 2015; Bendowski i in., 2022; Porwal i in. 2019; Wang i in., 2020). Wykazano jego możliwą skuteczność w leczeniu wspomagającym zespołu metabolicznego, cukrzycy czy nawet nowotworów u ludzi (Bahmani i in., 2015; Pérez-Sánchez i in., 2019; Porwal i in., 2019; Tajmohammadi i in., 2018; Wang i in., 2020). Ze względu na swoje pro-zdrowotne właściwości *S. marianum* (L.) zaczął zyskiwać zainteresowanie również w hodowli i leczeniu chorób zwierząt (Bendowski i in., 2022; Janocha i in., 2021; Wang i in., 2020). Formą *S. marianum* (L.) zazwyczaj stosowaną

zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, jest wyciąg zawierający 70-80% silimaryny (Porwal i in. , 2019; Wang i in., 2020). Sylimaryna wykazuje niską rozpuszczalność w wodzie i jest szybko wydalana z żółcią i moczem, co powoduje jej niską biodostępność (Nucci i in., 2024). Jednak zgodnie z wynikami badań *in vitro* i *in silico* większość flawonolignanów wchodzących w skład silimaryny jest wysoce lub umiarkowanie biodostępna, co umożliwia efektywne wykorzystanie *S. marianum* (L.) w leczeniu oraz profilaktyce chorób (Diukendjieva i in., 2019; Pérez-Sánchez i in., 2019). U zwierząt i ludzi sylimaryna osiąga maksymalne stężenie w osoczu po czterech do sześciu godzinach od podania doustnego (Porwal i in., 2019). Nawet podczas stosowania wysokich dawek sylimaryny u zwierząt, nie stwierdzono jej działania toksycznego lub występowania istotnych skutków ubocznych (Bahmani i in., 2015; Porwal i in., 2019). Wykazano natomiast korzystny wpływ zastosowania wyciągu z *S. marianum* (L.) na przyrosty u świń (Hossain i in., 2024; Nenova i in., 2024; Dang i in., 2022) i drobiu (Abd El-Ghany, 2022; Bendowski i in., 2022; Janocha i in., 2021). Wyciąg z *S. marianum* (L.) może być stosowany u brojlerów kurzych jako dodatek paszowy w celu poprawy parametrów produkcyjnych – przyrostów, współczynnika konwersji paszy (ang. *feed conversion ratio*, FCR), jakości mięsa czy nieśności (Abd El-Ghany, 2022; Bendowski i in., 2022; Janocha i in., 2021; Zaker-Esteghamati i in., 2020). Wykazano również potencjalną skuteczność *S. marianum* (L.) w zapobieganiu, bądź minimalizowaniu niekorzystnych zmian związanych z narażeniem ptaków na mykotoksyny takie jak aflatoksyna B1 (Alhidary i in., 2017; Fani Makki i in., 2013, Jahanian i in., 2017; Zaker-Esteghamati i in., 2020) czy stresem cieplnym (Ahmad i in., 2020; Fathi i in., 2025; Morovat i in., 2015). Pomimo że zainteresowanie wykorzystaniem *S. marianum* (L.) rośnie, zarówno w medycynie człowieka, jak i weterynaryjnej, nadal niewiele wiadomo na temat jego wpływu na ogólne zdrowie jelit, a także takie ich funkcje jak przepuszczalność czy aktywność motoryczna. Z drugiej strony w kilku badaniach wykazano, że zastosowanie wyciągu z *S. marianum* (L.) jako dodatku paszowego może pozytywnie wpływać na morfologię i mikrobiotę jelit zwierząt monogastrycznych: świń (Cai i in., 2023; Hossain i in., 2024; Xu i in., 2022) i drobiu (Faryadi i in., 2021; Guo i in., 2024, Jahanian i in., 2017; Zaker-Esteghamati i in., 2020; Zaker-Esteghamati i in., 2021; Zhou i in., 2022). Niemniej, tego typu doniesień jest niewiele, a dostępne badania koncentrują się głównie na ogólnym zdrowiu zwierząt, parametrach produkcyjnych i jakości mięsa.

Prawidłowo funkcjonująca, szczelna bariera jelitowa jest kluczowa dla odpowiedniego funkcjonowania przewodu pokarmowego, pozwala ona bowiem na efektywne wchłanianie substancji odżywczych i jednocześnie stanowi ochronę przed zagrożeniami takimi jak patogeny, mykotoksyny czy niektóre ksenobiotyki. Wobec tego, pierwszym etapem badań w warunkach *ex vivo* były doświadczenia przeprowadzone w komorach Ussinga mające na celu ocenę wpływu Sm na przepuszczalność jelit. Analizując parametry elektrofizjologiczne zauważono, że inkubacja tkanek w obecności Sm nie zmieniła w sposób istotny żadnych z analizowanych parametrów elektrofizjologicznych w porównaniu z kontrolą, z wyjątkiem I_{sc} (tabela 11). Spadek I_{sc} w obecności Sm może być związany z częściowym zahamowaniem aktywnego transportu jonów przez komórki nabłonka lub (co jest bardziej prawdopodobne ze względu na zmianę kierunku przepływającego prądu) z większym transportem wydzielniczym jonu Cl^- nad aktywnym transportem dokomórkowym jonów Na^+ w porównaniu z kontrolą. W teorii spadek wartości I_{sc} może być także spowodowany zaburzeniami funkcji bariery nabłonkowej prowadzącymi do przenikania substancji drogą międzykomórkową zamiast przezkomórkową, jednak wiązałoby się to z równoczesnym spadkiem wartości TEER i wzrostem G_t , których nie zaobserwowano w tym przypadku. Odmiennie kształtuje się obraz parametrów elektrofizjologicznych podczas narażenia na LPS. W tej sytuacji można zauważyć bardzo wyraźny spadek wartości I_{sc} . Dowiedziono, że LPS może hamować systemy transportowe nabłonka jelit osłabiając działanie Na^+/K^+ -ATPazy w błonie podstawno-bocznej, która utrzymuje aktywność transportera zależnego od Na^+ dla cukrów i aminokwasów, z czym związane jest zmniejszone jelitowe wchłanianie różnych składników odżywczych (Abad i in., 2001; Amador i in., 2008). Jednak Halawa (2012) nie zaobserwowała takiego efektu w przypadku narażenia na LPS eksplantów jelit świń *ex vivo*. Wręcz przeciwnie, w cytowanej pracy (Halawa, 2012) odnotowano wzrost wartości I_{sc} i spadek wartości TEER po narażeniu na LPS, co powiązano z zaburzeniem działania połączeń ścisłych i nasileniem transportu międzykomórkowego. W przypadku omawianych w niniejszej pracy doświadczeń widać wyraźnie, że eksplanty brojlera zareagowały inaczej na zastosowany LPS niż eksplanty świni. Należy zwrócić uwagę na fakt, że wyraźny spadek wartości I_{sc} , jest w istocie wzrostem wartości bezwzględnej tego parametru (z 6,38 do 32,49 $\mu A/cm^2$), który należy tłumaczyć odwróceniem i zwiększeniem przepływu aktywnego prądu do wnętrza jelita. Takie zmiany I_{sc} obserwuje się gdy dochodzi do aktywnego wydzielania jonów Cl^- lub HCO_3^- do światła jelita (wydzielanie wierzchołkowe). Transport aktywny chlorków

i wodorowęglanu do światła jelita świadczy raczej o uruchomieniu reakcji obronnej na LPS, a nie o uszkodzeniu przez LPS bariery jelitowej. Ruch chloru do wnętrza jelita, pociąga za sobą wodę i jest odpowiedzią fizjologiczną, której celem jest zapobieganie wchłanianiu z jelita czynników szkodliwych wywołujących stan zapalny. Z kolei wzrost TEP świadczy o tym, że wzrasta polaryzacja eksplantu. Z reguły wzrost TEP świadczy o nasileniu transportu aktywnego, ale w przypadku omawianego eksperymentu nie można być pewnym jakie jest źródło wzrostu TEP. Niewątpliwie nie doszło do całkowitego uszkodzenia bariery jelitowej ponieważ w takim wypadku TEP zbliżałby się do 0, a TEER by spadał. Podobnie wzrost TEER nie musi świadczyć o wzroście szczelności bariery jelitowej, ale może być związany z utrudnionym przepływem jonów zgodnie z gradientem potencjału. Ponieważ głównym jonem odpowiedzialnym za przepływ prądu przez eksplant jest jon sodu, który w normalnych warunkach przepływa z dodatnio naładowanego bieguna wierzchołkowego do ujemnie naładowanego bieguna podstawnego, to wzrost wydzielania chloru do bieguna wierzchołkowego zmniejsza potencjał dla ruchu sodu. To może być przyczyną spadku przewodności całkowitej, a więc wzrostu TEER. Warto tutaj przypomnieć, że w przypadku badanych eksplantów przewodność komórkowa w układzie kontrolnym odpowiada za około 25% przewodności, podczas gdy po podaniu LPS przewodność komórkowa osiągnęła wartość 41% całkowitej przewodności ($G_c/G_t = 3,45/8,42 = 0,41$). Powyższe rozważania są tylko hipotezą na temat mechanizmów jakie mogą występować po podaniu LPS w badanym układzie, ale świadczą jednocześnie o tym, że w zakresie pomiaru zmian elektrycznych w komorze Ussinga warto zmierzyć i analizować wspólnie różne parametry.

Niewątpliwie w omawianym eksperymencie LPS nie doprowadził do uszkodzenia eksplantów co świadczy o bardzo dobrej żywotności jelita i daje podstawę do wnioskowania, że opracowany układ jest wrażliwy na czynniki eksperymentalne, ale równocześnie odpowiednio odporny, tak jak jelito *in vivo*. Oczywiście obserwowana reakcja eksplantu może być przejściowa a faza „obronna jelita” może szybko przejść w fazę uszkodzenia eksplantu w której dojdzie do gwałtownego spadku TEER i TEP. W przypadku jednoczesnej inkubacji eksplantu z Sm oraz LPS nie zaobserwowano efektów elektrofizjologicznych opisanych dla LPS. W szczególności nie doszło do wzrostu TEER oraz TEP. Może to sugerować, że Sm skutecznie zniwelował wpływ LPS na śluzówkę.

Parametry elektrofizjologiczne w przypadku równoczesnej inkubacji eksplantów z Sm oraz LPS są zbliżone do wartości obserwowanych przy inkubacji z samym Sm oraz w warunkach kontrolnych. Rozważając wpływ Sm na żywotność eksplantów podczas inkubacji w komorach Ussinga zauważyć można, że pomimo że nie zaobserwowano istotnych różnic w aktywności LDH w próbkach pobieranych z buforu inkubacyjnego pomiędzy badanymi grupami po 60 min. inkubacji, aktywność LDH w buforze inkubacyjnym po 120 minutach inkubacji eksplantów z Sm, bez dodatku LPS była istotnie niższa niż w przypadku inkubacji eksplantów z LPS, LPS + Sm, a także w warunkach kontrolnych (Ryc. 34), co może sugerować, że Sm wykazuje pewne właściwości ochronne wobec eksplantów.

Na poprawne funkcjonowanie jelit i zachowanie ich zdrowia wpływ mają także inne elementy, poza barierą fizyczną, takie jak dieta, aktywność motoryczna, skład mikrobioty oraz układ odpornościowy (Wickramasuriya i in., 2022). Dlatego obecnie postuluje się, że w celu oceny wpływu badanych substancji na zdrowie jelit powinno się stosować całościowe, holistyczne podejście (Wickramasuriya i in., 2022). W związku z tym, w kolejnych krokach oceniono działanie przeciwzapalne Sm w modelu tkankowym *ex vivo* oraz jego wpływ na aktywność motoryczną jelit.

Działanie przeciwzapalne Sm w warunkach *ex vivo* zostało ocenione poprzez pomiar uwalniania tlenu azotu przez wycinki jelit inkubowane na płytkach wielodołkowych i stymulowane *in vitro* LPS. Pomimo że NO jest uwalniany głównie przez makrofagi pod wpływem cytokin prozapalnych lub stymulacji LPS, badanie jedynie pojedynczej linii komórkowej nie jest w stanie oddać złożoności reakcji zapalnej przebiegającej *in vivo* (Kallapura i in., 2015; Zhang i in., 2017a). Wprawdzie *in vitro* ilość NO wytwarzanego przez heterofile nie jest porównywalna z ilością wytwarzaną przez makrofagi, jednak *in vivo*, podczas reakcji zapalnej w odpowiedzi na kontakt z patogenem, heterofile są rekrutowane do miejsca zapalenia w znacznie większej liczbie niż makrofagi, co skutkuje porównywalnymi ilościami całkowitego uwolnionego NO (Kallapura i in., 2015). Ze względu na złożoność procesów zaangażowanych w proces zapalny popularność zyskuje wykorzystanie wycinków tkanki w celu jak najlepszego odwzorowania sytuacji *in vivo* (Kallapura i in., 2015; Zhang i in., 2017a). Model oparty na wykorzystaniu wycinków jelit brojlerów kurzych w celu pomiaru stężenia uwalnianego przez nie NO został po raz pierwszy opisany przez Kallapura i in. (2015). Autorzy pobrali wycinki jelita krętego od zwierząt narażonych przyżyciowo na bakterie

Salmonella enterica subsp. *enterica* serowar Enteritidis lub nienarażonych (grupa kontrolna). Pozyskane pośmiertnie wycinki jelit o powierzchni 0,5cm² były następnie inkubowane na płytkach wielodołkowych do 12 godzin z dodatkiem substancji badanych tj. LPS *Salmonella* Enteritidis oraz wyciągów roślinnych. W przywołanej pracy nie została zbadana żywotność eksplantów ani potencjalne działanie cytotoksyczne stosowanego stężenia LPS (100 µg/ml). Zbliżony model, na podstawie którego zostało przygotowane doświadczenie opisane w niniejszej rozprawie (3.2.3.2.), został wykorzystany przez Zhang i in. (2017a). We wspomnianej pracy wycinki jelit zostały pobrane od klinicznie zdrowych, 21-dniowych kurcząt brojlerów rasy Ross 708 i narażone na LPS *E. coli* O55:B5 *in vitro*, w czasie inkubacji na płytkach wielodołkowych. W tym przypadku przed doświadczeniem docelowym autorzy wykonali wstępne badanie mające na celu wyznaczenie optymalnego czasu trwania inkubacji (od 0 do 6 godzin) na podstawie przeżywalności wycinków, określonej przy pomocy badania histopatologicznego oraz pomiarze aktywności LDH w podłożu. Na podstawie pomiaru aktywności LDH wykonali także weryfikację potencjalnie cytotoksycznego działania LPS w różnych stężeniach: od 0 do 100 µg/ml. Do żadnego z opisanych doświadczeń (Kallapura i in., 2015; Zhang i in., 2017a, 2017b) nie wykorzystano wycinków tkanek pochodzących z ubojni. Zespół Zhang wykazał, że opracowany model cechuje krótka żywotność, wyznaczając optymalny czas inkubacji na dwie godziny. Po dwóch godzinach zaobserwowano bowiem istotny wzrost aktywności LDH w podłożu (do 2 godzin przeżywalność wynosiła ponad 90%), a także pojawianie się niekorzystnych zmian w obrazie histopatologicznym, takich jak złuszczenie komórek nabłonka jelitowego, zmiany apoptotyczne w komórkach czy poszerzenie krypt jelitowych, a nasilenie zmian było skorelowane z czasem inkubacji. Obserwacje te są zgodne z aktywnością LDH opisaną w niniejszej pracy w odniesieniu do wycinków jelit inkubowanych na płytkach wielodołkowych (Ryc. 35), również w tym przypadku przeżywalność wycinków do 2 godzin inkubacji wynosiła ponad 90%. Opisane przez Zhang i in. (2017a) zmiany korespondują także z obrazem histopatologicznym wycinków podczas inkubacji w prezentowanym w niniejszej pracy modelu – do dwóch godzin nie zaobserwowano istotnych zmian w morfologii wycinków (aneks: Ryc. 2), a po trzech oraz czterech godzinach inkubacji wyraźnie widoczne było zaburzenie architektury kosmków oraz krypt jelitowych. W przytoczonej pracy (Zhang i in., 2017a) przedstawiono także zależność między zastosowanym stężeniem LPS a ilością NO uwalnianego przez wycinki. Autorzy wykazali, że niskie stężenia LPS (0, 5, 10

i 20 µg/ml) indukowały zależne od dawki uwalnianie NO, z najwyższą wartością osiąganą przy stężeniu 10 i 20 µg/ml, podczas gdy wyższe stężenia LPS (50 i 100 µg/ml) powodowały niższe uwalnianie NO. Prawdopodobnie brak efektu przy zastosowanych wyższych stężeniach LPS był związany z jego działaniem cytotoksycznym potwierdzonym przez autorów poprzez pomiar aktywności LDH w podłożu inkubacyjnym. W przypadku zastosowanych stężeń 0, 5, 10, i 20 µg LPS/ml nie zauważono różnic statystycznych w przeżywalności wycinków, która dla każdego z wariantów wynosiła >90%. Zastosowanie wyższych stężeń LPS tj. 50 oraz 100 µg/ml spowodowało spadek przeżywalności wycinków <80%. W przypadku prezentowanych w niniejszej pracy wyników (Ryc. 35) zastosowane stężenia LPS: 40 oraz 80 µg/ml spowodowały istotny statystycznie wzrost aktywności LDH w podłożu podczas inkubacji ($p \leq 0,05$), jednak przeżywalność wycinków nie spadła poniżej 90%. Ponadto, oba zastosowane stężenia spowodowały istotny wzrost uwalniania NO po 60 minutach inkubacji (Ryc. 36), jednak po 120 minutach inkubacji taki efekt zaobserwowano jedynie w przypadku wyższego stężenia tj. 80 µg/ml (Ryc. 37). Dodatkowo, podczas przygotowań do opisanego doświadczenia zweryfikowano wpływ niższego stężenia LPS wynoszącego 25 µg/ml, zbliżonego do optymalnego stężenia powodującego uwalnianie NO przez wycinki według pracy Zhang i in., 2017a, jednak nie zaobserwowano wzrostu uwalniania NO po 45 oraz 90 minutach inkubacji (aneks: Ryc. 3, Ryc. 4). Wrażliwość wycinków na LPS może być uzależniona od warunków utrzymania zwierząt oraz ich stanu przed ubojem. Pomimo że do uboju przeznaczane są zwierzęta uznane za klinicznie zdrowe wpływ stresu towarzyszącemu transportowi lub obecność podklinicznego zapalenia, a także wcześniejsze przyżyciowe narażenie na patogeny może wpływać na odpowiedź wycinków na stymulację LPS. Zespół Kallapura i in. (2015) zaobserwował wzrost uwalniania NO przez wycinki jelit po 3 godzinach inkubacji. Maksymalna wartości wynosząca średnio 478,42 µM azotynu (III) w podłożu osiągnięta została 6 godzin po stymulacji LPS, w grupie wycinków pochodzących od zwierząt wcześniej przyżyciowo narażonych na *S. enterica*. W grupie wycinków pozyskanych od zwierząt przyżyciowo narażonych na *S. enterica*, ale niestymulowanych LPS *in vitro*, po 3 oraz 6 godzinach również zaobserwowano wzrost stężenia NO₂⁻ w podłożu w porównaniu z kontrolą. Ponadto w grupie wycinków kontrolnych (pochodzących od zwierząt nienarażonych na *S. enterica* i niestymulowanych LPS) po 6 godzinach inkubacji zaobserwowano wzrost stężenia NO₂⁻ w porównaniu z wartością po 3 godzinach, co pokazuje, że sama długotrwała inkubacja w warunkach laboratoryjnych powoduje

stres i reakcję zapalną wycinków. Po 12 godzinach inkubacji stężenie NO_2^- we wszystkich grupach było zbliżone i znacznie niższe niż po 3 i 6 godzinach inkubacji dla wycinków narażonych na LPS, jednak obserwowany spadek stężenia NO_2^- mógł być związany z krótką żywotnością modelu i obumieraniem tkanek, co nie zostało zweryfikowane przez autorów. Odwołując się do wyników prezentowanych przez Kallapura i in. (2015), Zhang (2017a), którzy sugerowali, że wzrost uwalniania NO po zastosowaniu wysokiego stężenia LPS (100µg/ml) w przypadku wycinków pochodzących od ptaków wcześniej narażonych na *S. enterica* może wskazywać na fakt, że wcześniejsza ekspozycja ptaków na *S. enterica* zwiększyła ich tolerancję tkankową na wysokie dawki LPS. Ponadto, zespół Zhang wykorzystał również ten sam model doświadczalny do oceny wpływu treoniny na zdolność wycinków jelit do odpowiedzi immunologicznej po narażeniu na LPS (Zhang i in., 2017b), potwierdzając przydatność modelu do tego rodzaju badań. Dodatkowo wykazano występowanie różnic w ekspresji indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS) pomiędzy kurczętami o różnych genotypach (Hussain i Qureshi, 1997). W przypadku wykorzystania wycinków jelit pochodzących od zwierząt przeznaczonych do komercyjnego uboju brakuje informacji co do diety, długości czasu transportu oraz warunków życia zwierząt. Może to stwarzać trudności w interpretacji uzyskanych wyników. Omawiane w niniejszej pracy wyniki (Ryc. 36, Ryc. 37) wykazały, że opracowany model, oparty na wycinkach pozyskanych od zwierząt rzeźnych jest wrażliwy na LPS. Odpowiedź ta jest zależna od zastosowanego stężenia oraz czasu inkubacji (Ryc. 34, Ryc. 35, aneks: Ryc.3, Ryc.4) Jednak w celu ujednolicenia badanej grupy wskazane może być wykonywanie doświadczeń w oparciu o wycinki pochodzące od osobników z jednego stada (te same warunki utrzymania, dieta, zabiegi zoohigieniczne oraz lekarsko-weterynaryjne). Dodatkowo, jeśli wycinki kontrolne oraz badane pochodzą od jednego zwierzęcia, umożliwia to względne porównanie wyników i eliminuje pewne trudności w ich interpretacji. W przypadku danych prezentowanych w niniejszej pracy (Ryc. 36, Ryc. 37, aneks: Ryc. 3, Ryc. 4) wycinki pochodziły od zwierząt z jednego stada, a wycinki kontrolne oraz inkubowane z badanymi substancjami pochodziły od tego samego zwierzęcia, co umożliwiło porównanie obserwowanych zmian w uwalnianiu NO w sposób względny. W niniejszym manuskrypcie stężenie uwalnianego przez wycinki NO zostało dodatkowo przedstawione w przeliczeniu na masę wycinków. Jest to uzasadnione ich względnie małą masą w stosunku do objętości podłoża (1,5 ml), a także dużymi różnicami między wycinkami w tym zakresie. Masa wycinków, pomimo ich identycznej średnicy i powierzchni - równej 0,28 cm² wahała się od 455 mg

do 1040 mg/ dołek (średnio 656,3 mg $\pm$ 174,3 mg). W pracach przytoczonych autorów (Kallapura i in., 2015; Zhang i in., 2017a,b) masa wycinków nie została uwzględniona przy interpretacji wyników, a powierzchnie wykorzystywanych wycinków różniły się i wynosiły odpowiednio 0,5 cm² oraz 0,25 cm². Uzyskane wyniki potwierdzają, że opisany przez Zhang i in. (2017a,b) oraz Kallapura i in. (2015) model przygotowany w oparciu o tkanki pozyskane z ubojni jest wrażliwy na działanie LPS oraz Sm. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano działanie przeciwzapalne Sm, ponieważ w przypadku wycinków inkubowanych z Sm i LPS, zarówno po 60 minutach (Ryc. 36), jak i po 120 minutach inkubacji (Ryc. 37), stężenie NO₂⁻ w podłożu nie różniło się w sposób istotny od kontroli, pomimo że sam LPS powodował wzrost uwalniania NO. Ponadto mimo że w porównaniu z kontrolą, aktywność LDH w podłożu po 120 minutach inkubacji była istotnie wyższa w przypadku wycinków narażonych na LPS, takich zmian nie zaobserwowano w odniesieniu do wycinków inkubowanych w obecności LPS z dodatkiem Sm (Ryc. 35). Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych dla eksplantów inkubowanych w komorach Ussinga (ryc. 34), Sm wydaje się mieć pewien cytoprotekcyjny wpływ na wycinki podczas inkubacji.

Rozważając podanie doustne substancji mających na celu poprawę zdrowia i przyrostów zwierząt istotnym wydaje się także poznanie wpływu badanej substancji na perystaltykę przewodu pokarmowego. Właściwa motoryka jest kluczowa dla odpowiedniego wchłaniania substancji odżywczych, a także eliminacji szkodliwych metabolitów i patogenów (Posłuszny i in., 2023; Scanes i Pierzchała-Koziec, 2014). Brakuje jednak doniesień na temat wpływu wyciągu z *S. marianum* (L.) lub jego składników (takich jak silimaryna, silibina) na motorykę przewodu pokarmowego. W odniesieniu do stosowania wyciągu z *S. marianum* (L.) u ludzi odnaleźć można informację na temat możliwego działania przeczyszczającego wyciągu z *S. marianum* (L.) w przypadku zastosowania wysokich dawek (>1000 mg na dobę), co tłumaczone jest zwiększonym wydzielaniem i przepływem żółci (Bahmani i in., 2014; Porwał i in., 2019). W przypadku zwierząt informacje na temat wpływu *S. marianum* (L.) na motorykę przewodu pokarmowego są znikome. Schemann i in. (2006) zbadał wpływ wyciągu z *S. marianum* (L.) na aktywność motoryczną żołądka kawii domowej w warunkach *ex vivo*. Badanie to nie wykazało jednoznacznego wpływu wyciągu z *S. marianum* (L.) na kurczliwość mięśni gładkich tego narządu. W zależności od osobnika, w proksymalnej części żołądka wyciąg z *S. marianum* (L.) powodował nasilenie lub osłabienie siły skurczu. W niektórych

przypadkach obserwowane efekty (skurcz/relaksacja) były powtarzalne i nasilały się wraz z wyższymi stężeniami badanego wyciągu, podczas gdy w innych, zastosowanie wyższych stężeń wyciągu nie zwiększało siły wcześniej obserwowanych reakcji, przeciwnie zmieniało ich charakter z nasilenia do osłabienia skurczu. Wyciąg z *S. marianum* (L.) nie wykazał również spójnego wpływu na kurczliwość odźwiernika. W części wypadków zwiększył amplitudę skurczu mięśni odźwiernika, ale ze względu na brak powtarzalności tych efektów i brak zależności od stężenia, nie zaobserwowano istotności statystycznej. Heinle i in. (2006) zbadał wpływ wyciągu *S. marianum* (L.) (zawierającego 2.06 mg/ml sylibiny) oraz pojedynczej substancji aktywnej wchodzącej w jego skład – sylibiny (2.20 mg/ml) na motorykę części dystalnej jelita krętego kawii domowej w warunkach *ex vivo*. Zarówno wyciąg, jak i izolowana substancja czynna nie wykazały znaczącego wpływu na aktywność motoryczną jelita krętego. W przypadku skurczu indukowanego histaminą zaobserwowano osłabienie siły reakcji średnio do wartości 72% (za 100% przyjęto reakcję na histaminę) $\pm 31\%$, jednak nie wykazano istotności statystycznej. Silibina wykazała znikomy efekt na siłę skurczu indukowanego histaminą, powodując jego niewielkie osłabienie do wartości średniej $89.6 \pm 21.8\%$. W przypadku skurczów spontanicznych, wyciąg z *S. marianum* (L.) powodował nieznaczny wzrost siły skurczu do wartości $115.4 \pm 44.0\%$ i niewielkie osłabienie częstotliwości skurczów ($94.6 \pm 33.4\%$). Zaobserwowane zmiany nie osiągnęły jednak istotności statystycznej. Stoi to w sprzeczności z wynikami prezentowanymi w niniejszej pracy, które wskazują, że wyciąg z *S. marianum* (L.) silnie wpływa na motorykę jelit, zarówno w zakresie aktywności spontanicznej, jak i indukowanej acetylocholiną. Obserwowane rozbieżności mogą wynikać ze zmienności międzygatunkowej oraz różnic między badanymi odcinkami przewodu pokarmowego. W przytoczonej pracy Heinle i in. (2006) analizowano wpływ badanych substancji na aktywność motoryczną jelita krętego, podczas gdy w niniejszym manuskrypcie zaprezentowano wpływ Sm na aktywność dwunastnicy oraz jelita czczego w części proksymalnej i dystalnej. Prezentowane tu wyniki wskazują na różnice w zakresie wpływu Sm na motorykę zależnie od odcinka przewodu pokarmowego. Wprawdzie zarówno w przypadku dwunastnicy, jak i jelita czczego Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia zwiększał siłę skurczu spontanicznego, jednak w dwunastnicy odpowiedź zaobserwowano już przy zastosowaniu niskiego stężenia wynoszącego 0,0005 mg/ml, a w części proksymalnej i dystalnej jelita czczego wyraźna reakcja pojawiła się przy zastosowaniu stężenia dwadzieścia razy wyższego tj. 0,01 mg/ml

(Ryc. 39, Ryc. 43). Jednocześnie wzrost siły skurczu po zastosowaniu najwyższego badanego stężenia tj. 0,1 mg/ml w przypadku jelita czczego osiągnął znacznie wyższe wartości wynoszące odpowiednio $308,4 \pm 111,9\%$ w części dystalnej i $826,1 \pm 420,9\%$ w części proksymalnej niż w dwunastnicy, gdzie wyniósł $191,1 \pm 3,7\%$ w porównaniu z kontrolą (reakcja na DMSO przyjęta za 100%). Różnice zaobserwowano także w odniesieniu do reakcji na acetylocholinę. W dwunastnicy Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia (w zakresie od 0,001 mg/ml do 0,1 mg/ml) zmniejszał odpowiedź mięśni gładkich na acetylocholinę (Ryc. 41). Nie odnotowano natomiast istotnego wpływu Sm na siłę skurczu indukowanego acetylocholiną w części proksymalnej jelita czczego, przeciwnie widoczna była tendencja do zwiększenia przez niego siły skurczu w tej części jelita, zwłaszcza w środkowym zakresie badanych stężeń, tj. pomiędzy 0,001 mg/ml a 0,01 mg/ml (Ryc. 45). W części dystalnej przy zastosowaniu stężeń 0,05 – 0,1 mg/ml Sm zmniejszał średnią siłę skurczu (Ryc. 45). Można zauważyć, że przeważającą reakcją na Sm było osłabienie odpowiedzi mięśni gładkich na acetylocholinę. Skurcz indukowany przez ACh nie jest normalnym skurczem perystaltycznym, może on występować na przykład w przypadku biegunek i powodować ból i dyskomfort (Posłuszny i in., 2023). Stąd, osłabienie tego typu reakcji może być korzystne w przypadku profilaktyki i leczenia wielu chorób przewodu pokarmowego drobiu przebiegających z biegunką. Potencjalnie korzyści z zastosowania *S. marianum* (L.) do zapobiegania biegunkom zostały również opisane przez Di Carlo i in. (1993). We wspomnianej pracy zbadano wpływ niektórych substancji czynnych izolowanych z *S. marianum* (L.): silimaryny, sylibiny oraz taksyfoliny, na objętość kału i ilość Na^+ uwolnionego do światła jelit w przypadku biegunki wywołanej eksperymentalnie w warunkach *in vivo* u szczurów. Zwierzętom najpierw podano dootrzewnowo badane flawonoidy i flawolignany (w dawce 12,5–200 mg/kg), a następnie, w celu wywołania biegunki, po godzinie olej rycynowy (2 ml). Zwierzęta uśmiercono po 30 minutach, usunięto całe jelito cienkie, pobrano jego zawartość i zmierzono jej objętość, a próbki treści przeanalizowano oceniając stężenie Na^+ . Badanie wykazało, że podanie oleju rycynowego zwiększyło objętość treści i wydzielanie sodu do światła jelita 8 do 9 razy w porównaniu ze szczurami w grupie kontrolnej, a zastosowanie badanych substancji w wysokich dawkach tj. 200 mg/kg silimaryny, sylibiny lub taksyfoliny istotnie zmniejszyło objętość wydalanego kału i stężenie Na^+ uwalnianego do światła jelita w porównaniu z grupą zwierząt, która otrzymała jedynie olej rycynowy. W cytowanym artykule (Di Carlo i in., 1993) zaprezentowano również wpływ sylibiny, silimaryny

i taksyfoliny na czas pasaży jelitowego u myszy w warunkach *in vivo*. Wykazano, że wszystkie wymienione substancje podawane wysokich dawkach, tj. 100-200 mg/kg, zmniejszały czas pasaży jelitowego u myszy (23-41%; $p < 0,05-0,01$), choć ta tendencja była obserwowana również po zastosowaniu niższych dawek. Jest to zgodne z prezentowanymi w niniejszej pracy wynikami wskazującymi na zwiększenie spontanicznej kurczliwości różnych odcinków jelita cienkiego przez Sm w warunkach *ex vivo*. Warto jednak zauważyć, że nie zawsze działanie poszczególnych substancji czynnych jest równe efektowi wywoływanemu przez wyciąg (Heinle i in., 2006; Poszłuszny i in., 2023). Otrzymane wyniki mogą wskazywać na dwojakie działanie Sm, który powoduje przyspieszenie perystaltyki w sytuacji fizjologicznej (nasilenie aktywności spontanicznej mięśni gładkich) oraz wykazuje działanie spazmolityczne w przypadku skurczów wywołanych acetylocholiną.

W hodowli zwierząt jako dodatki paszowe najczęściej stosowane są wyciągi, a nie pojedyncze substancje aktywne, stąd w niniejszej pracy zdecydowano się na zbadanie wpływu wyciągu z *S. marianum* (L.) na poszczególne funkcje przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie wyciągu z *S. marianum* (L.) może być dobrym wyborem zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu chorób przebiegających z zaburzeniem motoryki oraz stanami zapalnymi przewodu pokarmowego u drobiu.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przygotowanie i charakterystyka modelu eksplantów jelit brojlerów kurzych:

1. Wycinki jelit brojlerów kurzych pozyskane z uboju przemysłowego mogą z powodzeniem być wykorzystywane do badań w komorach Ussinga.
2. Wycinki jelit cechuje duża zmienność międzyosobnicza w zakresie podstawowych parametrów elektrofizjologicznych (TEER, Gt, Gc, TEP, Isc), co wskazuje na konieczność analizowania i porównywania wyników w obrębie małych, możliwie jednorodnych grup. Wskazane jest również względne porównywanie uzyskanych wyników, które opisywany model zapewnia dzięki możliwości inkubacji eksplantów pochodzących od tego samego osobnika w warunkach kontrolnych oraz z substancją badaną.
3. Eksplanty jelit w komorach Ussinga cechuje krótki czas przeżywalności, więc doświadczenie z ich wykorzystaniem nie może przekraczać 120 minut.
4. Wycinki do doświadczeń mogą być transportowane po schłodzeniu ($0-4^{\circ}\text{C}$) lub w temperaturze odpowiadającej temperaturze ciała ptaków ($38\pm 1^{\circ}\text{C}$) w bogatym w składniki odżywcze podłożu, z dodatkiem FBS. Transport w temperaturze $38\pm 1^{\circ}\text{C}$ pozwala na szybsze rozpoczęcie doświadczenia w laboratorium oraz skuteczniejszą preparację.
5. Preparacja jest niezbędna do prawidłowej oceny transportu przez śluzówkę oraz parametrów elektrofizjologicznych.
6. Proponowanymi parametrami do oceny właściwości elektrofizjologicznych eksplantów błony śluzowej jelita, związanymi z ich przepuszczalnością i integralnością są: TEER, Gt, Gc, TEP, Isc.
7. Proponowaną substancją wskaźnikową do oceny transportu międzykomórkowego w eksplantach jelita kurcząt jest mannitol. LY nie może służyć za wskaźnik transportu międzykomórkowego w opisywanym modelu.

Badania przesiewowe wybranych właściwości wyciągów roślinnych w warunkach *in vitro*:

8. Żaden z badanych wyciągów z: *Taraxacum officinale* (L.); *Solidago virgaurea*; *Silybum marianum* (L.) oraz *Cynara scolymus*, nie wykazuje silnego działania

przeciwbakteryjnego *in vitro* w zakresie testowanych właściwości (MIC, właściwości hamujące tworzenie biofilmu, aktywność AQS).

9. Wyciąg z *Silybum marianum* (L.) wykazuje umiarkowane działanie przeciwbakteryjne względem bakterii patogennych dla przewodu pokarmowego, takich jak badane szczepy *Escherichia coli* oraz badane serowary *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
10. Spośród badanych wyciągów, jedynie wyciąg z *Solidago virgaurea* wykazuje satysfakcjonujące właściwości hamujące formowanie biofilmu. Żaden z testowanych wyciągów nie wykazuje satysfakcjonujących właściwości niszczenia wytworzonego biofilmu bakteryjnego.
11. Spośród badanych wyciągów, wyciąg z *Silybum marianum* (L.) jako jedyny wykazuje właściwości hamujące quorum sensing.
12. Wyciągi z *Cynara scolymus* oraz *Silybum marianum* (L.) wykazują silne działanie antyoksydacyjne – zbliżone do substancji referencyjnej (troloxu).
13. Sm w badanym modelu *in vitro* oraz *ex vivo*, po stymulacji LPS, wykazuje działanie przeciwzapalne.

Ocena wpływu wybranego wyciągu roślinnego: z *Silybum marianum* (L.) (Sm) na wybrane funkcje jelita cienkiego brojlerów kurzych w warunkach *ex vivo*:

14. Sm wykazuje częściowe działanie cytoprotekcyjne względem eksplantów podczas dłuższej inkubacji (do 120 minut) oraz po stymulacji LPS.
15. Sm skutecznie niweluje wpływ LPS na śluzówkę w odniesieniu do parametrów elektrofizjologicznych.
16. Sm znacząco moduluje aktywność mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego, przy czym charakter i siła działania zależy od odcinka przewodu pokarmowego.
17. Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia zwiększa siłę skurczu spontanicznego mięśniówki jelita czczego oraz dwunastnicy, przy czym w odniesieniu do dwunastnicy efekt ten jest znacznie silniej wyrażony.
18. W dwunastnicy Sm w sposób zależny od zastosowanego stężenia zmniejsza odpowiedź mięśni gładkich na acetylocholinę.
19. Sm nie wykazuje istotnego wpływu na siłę skurczu indukowanego acetylocholiną w części proksymalnej jelita czczego. Przeciwnie, Sm wykazuje tendencję do zwiększania siły skurczu w tej części jelita.

20. W części dystalnej jelita czczego niższe stężenia Sm nie wpływają istotnie na odpowiedź mięśniówki na acetylocholinę. Wysokie stężenia Sm zmniejszają siłę skurczu indukowanego acetylocholimą w tej części jelita.
21. Przeważającą reakcją na Sm jest nasilenie aktywności spontanicznej mięśniówki jelita cienkiego oraz osłabienie odpowiedzi mięśni gładkich na acetylocholinę.

Uzyskane wyniki wskazują, że połączenie modeli *in vitro* i *ex vivo* umożliwia kompleksową analizę właściwości ekstraktów roślinnych oraz ocenę ich potencjalnej przydatności w poprawie zdrowia przewodu pokarmowego brojlerów kurzych. *Silybum marianum* (L.), ze względu na liczne właściwości prozdrowotne wykazane w niniejszej pracy, może stanowić obiecujący element alternatywnych i nowoczesnych strategii ukierunkowanych na wspieranie zdrowia jelit zwierząt. Jego zastosowanie może być szczególnie korzystne w profilaktyce i terapii zaburzeń przebiegających ze stanem zapalnym oraz nieprawidłową aktywnością motoryczną przewodu pokarmowego.

BIBLIOGRAFIA

1. Abad, B., Mesonero, J. E., Salvador, M. T., Garcia-Herrera, J., & Rodriguez-Yoldi, M. J. (2001). Effect of lipopolysaccharide on small intestinal L-leucine transport in rabbit. *Digestive Diseases and Sciences*, 46(5), 1113–1119.
2. Abd El-Ghany, W. A. (2022). The potential uses of silymarin, a milk thistle (*Silybum marianum*) derivative in poultry production system. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 12(1), 46–52. <https://doi.org/10.51227/ojafr.2022.7>
3. Adeyemo, R. O., Famuyide, I. M., Dzoyem, J. P., & Joy, L. M. (2022). Anti-biofilm, antibacterial, and anti-quorum sensing activities of selected South African plants traditionally used to treat diarrhoea. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 1307801. <https://doi.org/10.1155/2022/1307801>
4. Ahmad, M., Chand, N., Khan, R. U., Ahmad, N., Khattak, I., & Naz, S. (2020). Dietary supplementation of milk thistle (*Silybum marianum*): Growth performance, oxidative stress, and immune response in natural summer stressed broilers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(2), 711–715.
5. Alhidary, I. A., Rehman, Z., Khan, R. U., & Tahir, M. (2017). Anti-aflatoxin activities of milk thistle (*Silybum marianum*) in broiler. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 559–566.
6. Ali, Y., Islam, M. A., Muzahid, N. H., Sikder, M. O. F., Hossain, M. A., & Marzan, L. W. (2017). Characterization, prevalence and antibiogram study of *Staphylococcus aureus* in poultry. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 253–256.
7. Amador, P., Marca, M. C., García-Herrera, J., Lostao, M. P., Guillén, N., De la Osada, J., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2008). Lipopolysaccharide induces inhibition of galactose intestinal transport in rabbits in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22(5–6), 715–724.
8. Amat, C., Piqueras, J. A., Planas, J. M., & Moretó, M. (1999). Electrical properties of the intestinal mucosa of the chicken and the effects of luminal glucose. *Poultry Science*, 78(8), 1126–1131.
9. Anand, S., Mandal, S., Patil, P., & Tomar, S. K. (2016). Pathogen-induced secretory diarrhea and its prevention. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(11), 1721–1739.
10. Arczewska-Włosek, A., Świątkiewicz, S., Tomaszewska, E., Muszyński, S., Dobrowolski, P., & Józefiak, D. (2023). Effects of anticoccidial vaccination and

- Taraxacum officinale extract on the growth performance, biochemical parameters, immunity, and intestinal morphology of eimeria-challenged chickens. *Life*, 13(9), 1927.
11. Awad, W. A., Ghareeb, K., & Böhm, J. (2010). Effect of addition of a probiotic micro-organism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 94(4), 486-494.
 12. Awad, W. A., Ghareeb, K., Nitsch, S., Pasteiner, S., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2008). Effects of dietary inclusion of prebiotic, probiotic and synbiotic on the intestinal glucose absorption of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 7(7), 688–691.
 13. Awad, W. A., Hess, C., & Hess, M. (2017). Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins*, 9(2), 60.
 14. Ayuso, P., Quizhpe, J., Rosell, M. D. L. Á., Peñalver, R., & Nieto, G. (2024). Bioactive compounds, health benefits and food applications of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and artichoke by-products: A review. *Applied Sciences*, 14(11), 4940.
 15. Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). *Silybum marianum*: Beyond hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 20(4), 292–301.
 16. Basiouni, S., Tellez-Isaias, G., Latorre, J. D., Graham, B. D., Petrone-Garcia, V. M., El-Seedi, H. R., Yalçın, S., El-Wahab, A. A., Visscher, C., May-Simera, H. L., Huber, C., Eisenreich, W., & Shehata, A. A. (2023). Anti-inflammatory and antioxidative phytogetic substances against secret killers in poultry: Current status and prospects. *Veterinary Sciences*, 10(1), 55. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010055>
 17. Baskara, A. P., Sharma, S., Sener-Aydemir, A., Koger, S., Ariyadi, B., Dono, N. D., ... & Metzler-Zebeli, B. U. (2021). Cinnamon bark oil and coconut oil emulsions modified small intestinal motility and barrier function in laying hens in an ex vivo experiment. *British Poultry Science*, 62(3), 435–442.
 18. Bendowski, W., Michalczuk, M., Jóźwik, A., Kareem, K. Y., Łozicki, A., Karwacki, J., & Bień, D. (2022). Using milk thistle (*Silybum marianum*) extract to improve the welfare, growth performance and meat quality of broiler chicken. *Animals*, 12(9), 1085. <https://doi.org/10.3390/ani12091085>
 19. Bijlsma, P. B., Peeters, R. A., Groot, J. A., Dekker, P. R., Taminiau, J. A., & Van Der Meer, R. (1995). Differential *in vivo* and *in vitro* intestinal permeability to lactulose

- and mannitol in animals and humans: A hypothesis. *Gastroenterology*, 108(3), 687–696.
20. Binder, H. J., & Rawlins, C. L. (1973). Electrolyte transport across isolated large intestinal mucosa. *American Journal of Physiology*, 225(5), 1232–1238. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1973.225.5.1232>
 21. Bischoff, S. C. (2011). “Gut health”: A new objective in medicine? *BMC Medicine*, 9(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24>
 22. Branton, S. L., Lott, B. D., Morgan, G. W., & Deaton, J. W. (1988). Research note: Position of Meckel’s diverticulum in broiler-type chickens. *Poultry Science*, 67(4), 677–679. <https://doi.org/10.3382/ps.0670677>
 23. Cai, L., Gao, G., Yin, C., Bai, R., Li, Y., Sun, W., Pi, Y., Jiang, X., & Li, X. (2023). The effects of dietary silybin supplementation on the growth performance and regulation of intestinal oxidative injury and microflora dysbiosis in weaned piglets. *Antioxidants*, 12(11), 1975. <https://doi.org/10.3390/antiox12111975>
 24. Casteleyn, C., Doom, M., Lambrechts, E., Van den Broeck, W., Simoens, P., & Cornillie, P. (2010). Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: A review. *Avian Pathology*, 39(3), 143–150. <https://doi.org/10.1080/03079451003786105>
 25. Chenia, H. Y. (2013). Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia africana* fruit extracts. *Sensors*, 13(3), 2802–2817. <https://doi.org/10.3390/s130302802>
 26. Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2025). *Staphylococcus epidermidis* – Key to understanding biofilms, commensalism, and more. *Journal of Bacteriology*, 207(9), e0016525. <https://doi.org/10.1128/jb.00165-25>
 27. Chłopecka, M., Dziekan, N., Mendel, M., Bąkała, A., Małydyk, J., & Więchetek, M. (2007). Evaluation of time-stability of an alternative research model based on isolated rat gastrointestinal strips. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58, 73–86.
 28. Chopra, D. P., Dombkowski, A. A., Stemmer, P. M., & Parker, G. C. (2010). Intestinal epithelial cells *in vitro*. *Stem Cells and Development*, 19(1), 131–142.
 29. Cisse, S., Matuszewski, A., Bień, D., Ciborowska, P., Zalewska, A., Urban, J., Michalczuk, M., Mendel, M., Latek, U., & Polak, J., et al. (2025). Effects of standardized natural citrus extract on growth, gut health, carcass quality, and welfare of broiler chickens. *Animals*, 15(2), 127. <https://doi.org/10.3390/ani15020127>

30. Clarke, L. L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), G1151–G1166.
31. Czyżewska-Dors, E., Dors, A., & Pomorska-Mól, M. (2018). Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania. *Życie Weterynaryjne*, 93(11).
32. Dang, X., Cho, S., & Kim, I. H. (2022). *Silybum marianum* seed extract supplementation positively affects the body weight of weaned piglets by improving voluntary feed intake. *Journal of Animal Science and Technology*, 64(4), 696–706.
<https://doi.org/10.5187/jast.2022.e39>
33. Dar, M. A., Ahmad, S. M., Bhat, S. A., Ahmed, R., Urwat, U., Mumtaz, P. T., Bhat, S. A., Dar, T. A., Shah, R. A., & Ganai, N. A. (2017). *Salmonella typhimurium* in poultry: A review. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 345–354.
<https://doi.org/10.1017/S0043933917000204>
34. Di Carlo, G., Autore, G., Izzo, A. A., Maiolino, P., Mascolo, N., Viola, P., ... & Capasso, F. (1993). Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: Structure–activity relationships. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45(12), 1054–1059.
35. Di Napoli, A., & Zucchetti, P. (2021). A comprehensive review of the benefits of *Taraxacum officinale* on human health. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 110.
36. Di Napoli, A., Germani, F., Da Silva, S. D., Senatori, L., Parisi, F., & Zucchetti, P. (2023). Artichoke (*Cynara scolymus* L.): A review of its health-promoting properties. *Authorea Preprints*. <https://doi.org/10.22541/au.169117611.17088020/v1>
37. Dimitrova, P. D., Damyanova, T., & Paunova-Krasteva, T. (2023). *Chromobacterium Violaceum*: A Model for Evaluating the Anti-Quorum Sensing Activities of Plant Substances. *Scientia Pharmaceutica*, 91(3), 33.
<https://doi.org/10.3390/scipharm91030033>
38. Diukendjieva, A., Alov, P., Tsakovska, I., Pencheva, T., Richarz, A., Kren, V., ... & Pajeva, I. (2019). *In vitro* and *in silico* studies of the membrane permeability of natural flavonoids from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. and their derivatives. *Phytomedicine*, 53, 79–85.

39. Ducatelle, R., Goossens, E., Eeckhaut, V., & Van Immerseel, F. (2023). Poultry gut health and beyond. *Animal Nutrition*, 13, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.05.006>
40. Dyrektywa 2010/63/UE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*, L 276, 33–79.
41. Dzoyem, J. P., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2014). *In vitro* antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 147. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-147>
42. Dzoyem, J. P., Nkuete, A. H. L., Eloff, J. N., & McGaw, L. J. (2016). Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and 15-LOX activity by anthraquinones from *Pentas schimperi*. *Planta Medica*, 82(14), 1246–1251. <https://doi.org/10.1055/s-0042-104417>
43. Ebeid, T. A., & Al-Homidan, I. H. (2022). Organic acids and their potential role for modulating the gastrointestinal tract, antioxidative status, immune response, and performance in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 78(1), 83–101. <https://doi.org/10.1080/00439339.2022.1988803>
44. Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 133. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1634-6>
45. Elnaggar, A. S., El-Said, E. A., & Ali, R. (2021). Physiological and immunological responses of ducks (*Cairina moschata domestica*) to silymarin supplementation. *Egyptian Poultry Science Journal*, 40(4), 895–913.
46. Elnesr, S. S., Elwan, H. A., El Sabry, M. I., & Shehata, A. M. (2023). The nutritional importance of milk thistle (*Silybum marianum*) and its beneficial influence on poultry. *World's Poultry Science Journal*, 79(4), 751–768. <https://doi.org/10.1080/00439339.2023.2234387>
47. Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64(8), 711–713. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957563>

48. Eloff, J. N. (2021). A proposal towards a rational classification of the antimicrobial activity of acetone tree leaf extracts in a search for new antimicrobials. *Planta Medica*, 87(10/11), 836–840. <https://doi.org/10.1055/a-1312-9605>
49. European Commission. (2020). *A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system* (COM(2020) 381 final). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52020DC0381>
50. European Commission. (2022). Regulation (EC) No 1831/2003. European Union Register of Feed Additives (Edition 03/2022, Annex I – 18.05.2022). https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives_en
51. European Medicines Agency. (2008). *Community herbal monograph on Solidago virgaurea L., herba* (Doc. Ref. EMEA/HMPC/285758/2007). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). <https://www.ema.europa.eu>
52. European Medicines Agency. (2018). *European Union herbal monograph on Cynara cardunculus L. (syn. Cynara scolymus L.), folium* (EMA/HMPC/194014/2017). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). <https://www.ema.europa.eu>
53. European Medicines Agency. (2018). *Milk thistle fruit – Silybum marianum (L.) Gaertn., fructus* (EMA/415131/2018). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). <https://www.ema.europa.eu>
54. European Medicines Agency. (2021). *European Union herbal monograph on Taraxacum officinale F.H. Wigg., radix* (EMA/HMPC/475726/2020). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). <https://www.ema.europa.eu>
55. European Parliament and Council. (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (REACH), establishing the European Chemicals Agency. *Official Journal of the European Union*, L 396, 1–849.
56. European Parliament and Council. (2008). Regulation (EC) No 1272/2008 of 16 December 2008 on classification, labeling, and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Official Journal of the European Union*, L 353, 1–1355.
57. Famuyide, I. M., Aro, A. O., Fasina, F. O., & Dzoyem, J. P. (2019). Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated South African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. *BMC*

Complementary and Alternative Medicine, 19, 141. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>

58. Fani Makki, O., Afzali, N., & Omid, A. (2013). Effect of different levels of silymarin (*Silybum marianum*) on growth rate, carcass variables and liver morphology of broiler chickens contaminated with aflatoxin B1. *Poultry Science Journal*, 1(2), 105–116.
59. Faryadi, S., Sheikahmadi, A., Farhadi, A., & Nourbakhsh, H. (2021). Effects of silymarin and nano-silymarin on performance, egg quality, nutrient digestibility, and intestinal morphology of laying hens during storage. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 1633–1644.
60. Fathi, M., Zarrinkavyani, K., Biranvand, Z., & Mustafa, T. Y. (2025). The effect of silymarin on antioxidant, performance, immunoglobulin protein levels, cecal microbiota, and hemobiochemical indicators in heat-stressed broilers. *Poultry Science Journal*, 13(1), 115–126. <https://doi.org/10.22069/psj.2024.22640.2127>
61. Fleischer, D. (1999). Biological transport phenomena in the gastrointestinal tract: Cellular mechanisms. In *Transport processes in pharmaceutical systems* (pp. 163–200). CRC Press.
62. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (n.d.). *Gateway to poultry production and products – Poultry production*. Pobrano 20 października 2025 z <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/en>
63. Fursenco, C., Calalb, T., Uncu, L., Dinu, M., & Ancuceanu, R. (2020). *Solidago virgaurea* L.: a review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities. *Biomolecules*, 10(12), 1619.
64. Gaillard, P. J., & de Boer, A. G. (2000). Relationship between permeability status of the blood–brain barrier and *in vitro* permeability coefficient of a drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 95–102.
65. Grubb, B. R., Driscoll, S. M., & Bentley, P. J. (1987). Electrical PD, short-circuit current and fluxes of Na and Cl across avian intestine. *Journal of Comparative Physiology B*, 157, 181–186. <https://doi.org/10.1007/BF00692362>
66. Guo, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, X., Zhao, J., Li, H., ... & Wang, G. (2024). Dietary silymarin improves performance by altering hepatic lipid metabolism and cecal microbiota function and its metabolites in late laying hens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15, 100. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01057-w>

67. Halawa, A., Dänicke, S., Kersten, S., & Breves, G. (2012). Effects of deoxynivalenol and lipopolysaccharide on electrophysiological parameters in growing pigs. *Mycotoxin research*, 28(4), 243-252.
68. Hassan, M. M., Amin, K. B., Ahaduzzaman, M., Alam, M., Faruk, M. S., & Uddin, I. (2014). Antimicrobial resistance pattern against *E. coli* and *Salmonella* in layer poultry. *Research Journal of Veterinary Practice*, 2(2), 30–35.
69. Heinle, H., Hagelauer, D., Pascht, U., Kelber, O., & Weiser, D. (2006). Intestinal spasmolytic effects of STW 5 (Iberogast®) and its components. *Phytomedicine*, 13, 75–79.
70. Hempstock, W., Ishizuka, N., & Hayashi, H. (2021). Functional assessment of intestinal tight junction barrier and ion permeability in native tissue by Ussing chamber technique. *Journal of Visualized Experiments*, (62468).
<https://doi.org/10.3791/62468>
71. Heyman, M., Crain-Denoyelle, A. M., Nath, S. K., & Desjeux, J. F. (1990). Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line CaCo-2. *Journal of Cellular Physiology*, 143(2), 391–395.
72. Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J. F., & Morgat, J. L. (1982). Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum *in vitro*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 242(6), G558–G564.
73. Hossain, M. M., Hwang, H. S., Jang, S. Y., Yu, S., & Kim, I. H. (2024). Supplemental impact of silymarin in growing pig diet on the growth performance, total tract digestibility, faecal microflora, faecal noxious gas emission and absorption rate in blood. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108(1), 206–214.
74. Hussain, I., & Qureshi, M. A. (1997). Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poultry Science*, 76(11), 1524–1530.
<https://doi.org/10.1093/ps/76.11.1524>
75. Jahanian, E., Mahdavi, A. H., & Jahanian, R. (2021). Silymarin improved the growth performance via modulating the microbiota and mucosal immunity in *Escherichia coli*-challenged broiler chicks. *Livestock Science*, 249, 104529.
76. Jahanian, E., Mahdavi, A. H., Asgary, S., & Jahanian, R. (2017). Effects of dietary inclusion of silymarin on performance, intestinal morphology and ileal bacterial count in aflatoxin-challenged broiler chicks. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5), e43–e54.

77. Janocha, A., Milczarek, A., & Pietrusiak, D. (2021). Impact of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) seeds in broiler chicken diets on rearing results, carcass composition, and meat quality. *Animals*, 11(6), 1550. <https://doi.org/10.3390/ani11061550>
78. Jiang, Y., & Cock, I. E. (2024). Taraxacum officinale (L.) Weber ex FH Wigg Root Extracts Inhibit the Growth Gastrointestinal Bacterial Pathogens and Potentiate the Activity of Conventional Antibiotics. *Pharmacognosy Communications*, 14(1).
79. John, L. J., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2011). Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & redox signaling*, 15(5), 1255-1270.
80. Johnson, J. R., Sannes, M. R., Croy, C., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., Bender, J., Smith, K. E., Winokur, P. L., & Belongia, E. A. (2007). Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. *Emerging Infectious Diseases*, 13(6), 838–846. <https://doi.org/10.3201/eid1306.061576>
81. Julián-Flores, A., Aguilar-Zárate, P., Michel, M. R., Sepúlveda-Torre, L., Torres-León, C., Aguilar, C. N., & Chávez-González, M. L. (2025). Exploring the Therapeutic Potential of Medicinal Plants in the Context of Gastrointestinal Health: A Review. *Plants*, 14(5), 642. <https://doi.org/10.3390/plants14050642>
82. Kallapura, G. K., Hernandez-Velasco, X., Piekarski, A., Lassiter, K., Pumford, N. R., Tellez, G., Bottje, W. G., Hargis, B. M., & Faulkner, O. B. (2015). Development of an ex vivo ileal explant culture method for amplified production and differential measurement of nitrite. *International Journal of Poultry Science*, 14, 245–251.
83. Kamil, M. A. I. M., Reduan, M. F. H., Noor, M. A. M., Abu-Bakar, L., Shamsuddin, S. H., Azmi, A. F. M., & Mahamud, S. N. A. The Effects of Piper Betle and Alpinia galanga Feed Additives on Growth Performance, Carcass Characteristics and Histomorphometry of Small Intestine in Broilers. *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 61(2).
84. Khazaei, R., Seidavi, A., & Bouyeh, M. (2022). A review on the mechanisms of the effect of silymarin in milk thistle (*Silybum marianum*) on some laboratory animals. *Veterinary Medicine and Science*, 8(1), 289-301.
85. Latek, U., Chłopecka, M., Karlik, W., & Mendel, M. (2022). Phytogetic compounds for enhancing intestinal barrier function in poultry—A review. *Planta Medica*, 88(3/4), 218–236.

86. Latek, U., Mendel, M., Karlik, W., & Chłopecka, M. (2020). Wykorzystanie izolowanych wycinków przewodu pokarmowego jako modelu do oceny aktywności motorycznej i przepuszczalności bariery jelitowej. W M. Naumowicz (Red.), *Biomedycyna, środowisko i zdrowie. Teoria i praktyka* (ss. 140–153). ArchaeGraph. ISBN 978-83-66709-16-4
87. Lea, T. (2015). Epithelial cell models; general introduction. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 95-102.
88. Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 cell line. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 113-124.
89. Matei, D., Ghișe, A., & Dumitrescu, E. (2023). Ussing chamber: The study of transepithelial transport in the small intestine. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară, LVI*(2), 114.
90. Mavrommatis, A., Giamouri, E., Tavrizelou, S., Zacharioudaki, M., Danezis, G., Simitzis, P. E., Zoidis, E., Tsiplakou, E., Pappas, A. C., Georgiou, C. A., & Feggeros, K. (2021). Impact of mycotoxins on animals' oxidative status. *Antioxidants*, 10(2), 214. <https://doi.org/10.3390/antiox10020214>
91. Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Karlik, W. (2016a). Modification of abomasum contractility by flavonoids present in ruminants diet: In vitro study. *Animal*, 10(8), 1431–1438.
92. Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Karlik, W. (2016b). The effect of alfalfa saponins on the contractility of bovine isolated abomasum and duodenum preparations. *Livestock Science*, 188, 153–158.
93. Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Wiechetek, M. (2011). The effect of the whole extract of common ivy (*Hedera helix*) leaves and its selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strip. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3), 796–802.
94. 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, 112982.
95. Mendel, M., Karlik, W., & Chłopecka, M. (2019). The impact of chlorophyllin on deoxynivalenol transport across jejunum mucosa explants obtained from adult pigs. *Mycotoxin Research*, 35(2), 187–196. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00342-2>

96. Mendel, M., Karlik, W., Latek, U., Chłopecka, M., Nowacka-Kozak, E., Pietruszka, K., & Jedziniak, P. (2022). Does deoxynivalenol affect amoxicillin and doxycycline absorption in the gastrointestinal tract? Ex vivo study on swine jejunum mucosa explants. *Toxins*, 14(11), 743. <https://doi.org/10.3390/toxins14110743>
97. Metzler-Zebeli, B. U., Hollmann, M., Aschenbach, J. R., & Zebeli, Q. (2017). Comparison of electrogenic glucose transport processes and permeability between proximal and distal jejunum of laying hens. *British Poultry Science*, 58(3), 278–282.
98. Mfotie Njoya, E., et al. (2017). Phytochemical analysis with free radical scavenging, nitric oxide inhibition and antiproliferative activity of *Sarcocephalus pobeguini* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1712-5>
99. Mishra, B., & Jha, R. (2019). Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 60. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00060>
100. Morovat, M., Chamani, M., Zarei, A., & Sadeghi, A. A. (2015). Dietary but not *in ovo* feeding of *Silybum marianum* extract resulted in an improvement in performance, immunity and carcass characteristics and decreased the adverse effects of high temperatures. *British Poultry Science*. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1121537>
101. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
102. Naga, N. G., & Shaaban, M. I. (2023). Quorum sensing and quorum sensing inhibitors of natural origin. In *Drug Discovery and Design Using Natural Products* (pp. 395–416). Cham: Springer Nature Switzerland.
103. Neirinckx, E., Vervaeke, C., Michiels, J., De Smet, S., Van Den Broeck, W., Remon, J. P., ... & Croubels, S. (2011). Feasibility of the Ussing chamber technique for the determination of in vitro jejunal permeability of passively absorbed compounds in different animal species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(3), 290–297.
104. Nejdfor, P., Ekelund, M., Jeppsson, B., & Weström, B. R. (2000). Mucosal in vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: Species- and region-related differences. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(5), 501–507.

105. Nenova, R., Enchev, S., & Ivanov, V. (2024). Influence of the addition of milk thistle extract (*Silybum marianum* Gaertn) in compound feeds for fattening pigs on the biochemical indexes of blood and gain. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 30(1).
106. Nietfeld, J. C., Tyler, D. E., Harrison, L. R., Cole, J. R., Latimer, K. S., & Crowell, W. A. (1991). Culture and morphologic features of small intestinal mucosal explants from weaned pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 52(7), 1142–1146.
107. Nucci, R. A. B., Abou Nehmi-Filho, V., Bastos, M. F., de Freitas, J. A., Otoch, J. P., Pessoa, A. F. M., & Jacob-Filho, W. (2024). Modulation of small-intestine morphology in mice by a novel supplement containing *Silybum marianum*, yeast β -glucan, prebiotics, and minerals. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 14(3), 426–430.
108. Nunes, R., Silva, C., & Chaves, L. (2016). Tissue-based in vitro and ex vivo models for intestinal permeability studies. In *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* (pp. 203–236). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00013-4>
109. Oni, A. I., & Oke, O. E. (2025). Gut health modulation in poultry through phytogenics: Mechanisms, benefits, and applications. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1616734.
110. Palombo, E. A. (2006). Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: Modes of action and effects on intestinal function. *Phytotherapy Research*, 20(9), 717–724.
111. Paun, G., Neagu, E., Alecu, A., Albu, C., Seciu-Grama, A. M., & Radu, G. L. (2024). Evaluating the antioxidant and antidiabetic properties of *Medicago sativa* and *Solidago virgaurea* polyphenolic-rich extracts. *Molecules*, 29(2), 326.
112. Pérez-Sánchez, A., Cuyàs, E., Ruiz-Torres, V., Agulló-Chazarra, L., Verdura, S., González-Álvarez, I., ... & Menendez, J. A. (2019). Intestinal permeability study of clinically relevant formulations of silibinin in Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1606.
113. Pinton, P., Nougayrède, J. P., Del Rio, J. C., Moreno, C., Marin, D. E., Ferrier, L., ... & Oswald, I. P. (2009). The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 237(1), 41-48.

114. Porro, C., Benameur, T., Cianciulli, A., Vacca, M., Chiarini, M., De Angelis, M., & Panaro, M. A. (2024). Functional and Therapeutic Potential of *Cynara scolymus* in Health Benefits. *Nutrients*, 16(6), 872. <https://doi.org/10.3390/nu16060872>
115. Porwal, O., Ameen, M. M., Anwer, E. T., Uthirapathy, S., Ahamad, J., & Tahsin, A. (2019). *Silybum marianum* (Milk Thistle): Review on its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(5), 199–206.
116. Posłuszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M. (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.
117. Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benarbia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—Ex Vivo Study. *Animals*, 15(5), 626.
118. Randall, K. J., et al. (2011). Explant culture of gastrointestinal tissue: A review of methods and applications. *Cell Biology and Toxicology*, 27(4), 267–284. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9187-5>
119. Rath, N. C., Liyanage, R., Gupta, A., Packialakshmi, B., & Lay Jr, J. O. (2018). A method to culture chicken enterocytes and their characterization. *Poultry Science*, 97(11), 4040–4047.
120. Rehman, H., Ijaz, A., Specht, A., Dill, D., Hellweg, P., Männer, K., & Zentek, J. (2009). In vitro effects of alpha toxin from *Clostridium perfringens* on the electrophysiological parameters of jejunal tissues from laying hens preincubated with inulin and N-acetyl-L-cysteine. *Poultry Science*, 88(1), 199–204.
121. Ribeiro, C. M., Stefani, L. M., Lucheis, S. B., Okano, W., Cruz, J. C. M., Souza, G. V., ... & Afreixo, V. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry and poultry meat: A meta-analysis. *Journal of Food Protection*, 81(7), 1055–1062.
122. Ripken, D., & Hendriks, H. F. J. (2015). Porcine ex vivo intestinal segment model. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 255-262.
123. Ruhnke, I., Röhe, I., Meyer, W., Kröger, S., Neumann, K., & Zentek, J. (2013). Method for the preparation of mucosal flaps from the jejunum of laying hens for transporter studies in Ussing chambers. *Archives of Animal Nutrition*, 67(2), 161–168. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2013.776328>

124. Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
125. Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30–35. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x>
126. Sandasi, M., Leonard, C. M., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. *South African Journal of Botany*, 77(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.011>
127. Scanes, C. G. (2020). Avian physiology: Are birds simply feathered mammals? *Frontiers in Physiology*, 11, 542466.
128. Scanes, C. G., & Pierzchala-Koziec, K. (2014). Biology of the gastrointestinal tract in poultry. *Avian Biology Research*, 7(4), 193–222. <https://doi.org/10.3184/175815514X14162292284822>
129. Schemann, M., Michel, K., Zeller, F., Hohenester, B., & Rühl, A. (2006). Region-specific effects of STW 5 (Iberogast®) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. *Phytomedicine*, 13(Supplement 1), 90–99.
130. Schiavone, A., Righi, F., Quarantelli, A., Bruni, R., Serventi, P., & Fusari, A. (2007). Use of *Silybum marianum* fruit extract in broiler chicken nutrition: Influence on performance and meat quality. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91(5–6), 256–262.
131. Shaji, S., Selvaraj, R. K., & Shanmugasundaram, R. (2023). Salmonella infection in poultry: A review on the pathogen and control strategies. *Microorganisms*, 11(11), 2814. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112814>
132. Sharma, B., Luhach, K., & Kulkarni, G. T. (2019). In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery. In *Brain Targeted Drug Delivery System* (pp. 53–101). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814001-7.00004-4>
133. Smetanova, L., Stetinova, V., Kholova, D., Kvetina, J., Smetana, J., & Svoboda, Z. (2009). Caco-2 cells and Biopharmaceutics Classification System (BCS) for prediction of transepithelial transport of xenobiotics (model drug: caffeine). *Neuroendocrinology Letters*, 30(1), 101.
134. Sneddon, L. U., Halsey, L. G., & Bury, N. R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of Experimental Biology*, 220(17), 3007–3016.

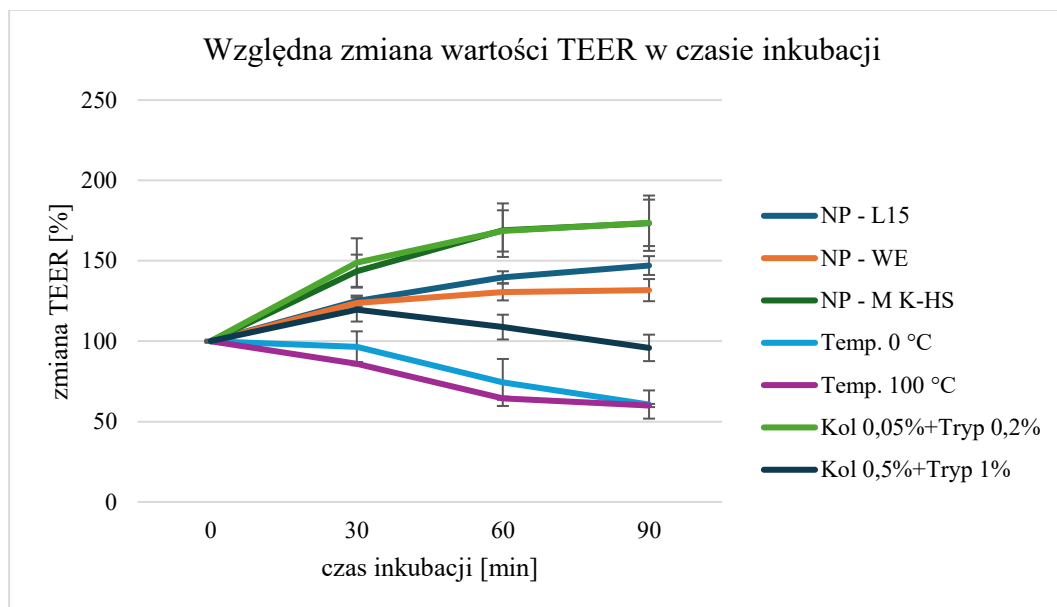
135. Sohel, M. S. H., Miah, M. H., Faruq, A. A., Rahman, M. L., & Islam, K. N. (2019). Development of small intestinal morphology on the basis of growth and absorption rate in broiler chicken (Cobb 500) of Bangladesh. *Bangladesh J. Vet. Ani. Sci*, 7(1), 09-14.
136. Soo, E., Marsh, C., Steiner, R., Stocks, L., & McKay, D. B. (2020). Optimizing organs for transplantation; advancements in perfusion and preservation methods. *Transplantation Reviews*, 34(1), 100514.
137. Stromberg, Z. R., Johnson, J. R., Fairbrother, J. M., Kilbourne, J., Van Goor, A., Curtiss III, R., & Mellata, M. (2017). Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS One*, 12(7), e0180599.
138. Tajmohammadi, A., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2018). *Silybum marianum* (milk thistle) and its main constituent, silymarin, as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 32(10), 1933–1949.
139. Terpend, K., Boisgerault, F., Blaton, M. A., Desjeux, J. F., & Heyman, M. (1998). Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: Effect of interferon γ . *Gut*, 42(4), 538–545.
140. Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews immunology*, 9(11), 799-809.
141. Van Wyk, B. E., & Wink, M. (2019). *Medicinal plants of the world*. CABI.
142. Velge, P., Bottreau, E., Quéré, P., Pardon, P., Nicolle, J. C., Morisson, M., ... & Dimier, I. (2002). Establishment and characterization of partially differentiated chicken enterocyte cell clones. *European Journal of Cell Biology*, 81(4), 203–212.
143. Vergauwen, H., Degroote, J., Prims, S., Wang, W., Fransen, E., De Smet, S., ... & Van Ginneken, C. (2017). Artificial rearing influences the morphology, permeability and redox state of the gastrointestinal tract of low and normal birth weight piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 30.
144. Wang, X., Zhang, Z., & Wu, S. C. (2020). Health benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, pharmacology, and applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11644–11664.
145. Wang, X., Zhang, Z., & Wu, S. C. (2020). Health benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, pharmacology, and applications. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(42), 11644-11664.

146. Węgrzyn, D., Adamek, K., & Łoniewska, B. (2017). Budowa bariery jelitowej. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 63, 6–9.
147. Westerhout, J., van de Steeg, E., Grossouw, D., Zeijdner, E. E., Krul, C. A., Verwei, M., & Wortelboer, H. M. (2014). A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 167–177.
148. Wickramasuriya, S. S., Park, I., Lee, K., Lee, Y., Kim, W. H., Nam, H., & Lillehoj, H. S. (2022). Role of physiology, immunity, microbiota, and infectious diseases in the gut health of poultry. *Vaccines*, 10(2), 172. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020172>
149. Xu, S., Jiang, X., Jia, X., Jiang, X., Che, L., Lin, Y., ... & Wu, D. (2022). Silymarin modulates microbiota in the gut to improve the health of sow from late gestation to lactation. *Animals*, 12(17), 2202.
150. Xu, Y., Shrestha, N., Pr  at, V., & Belouqui, A. (2021). An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 175, 113795.
151. Yuan, C., He, Q., Li, J. M., Azzam, M. M., Lu, J. J., & Zou, X. T. (2015). Evaluation of embryonic age and the effects of different proteases on the isolation and primary culture of chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Animal Science Journal*, 86(6), 588–594.
152. Zaker-Esteghamati, H., Seidavi, A. R., & Bouyeh, M. (2020). A review on the effect of *Silybum marianum* and its derivatives on broilers under healthy and aflatoxicosis conditions: Part 1: Performance, carcass and meat characteristics, and intestinal microflora. *World's Poultry Science Journal*, 76(2), 318–327.
153. Zaker-Esteghamati, H., Seidavi, A., & Bouyeh, M. (2021). The effects of *Cynara scolymus* and *Silybum marianum* on growth, carcass and organ characteristics, immunity, blood constituents, liver enzymes, jejunum morphology, and fatty acid profile of breast meat in broilers. *Food Science & Nutrition*, 9(12), 6692–6706.
154. Zhang, Q., Eicher, S. D., Ajuwon, K. M., & Applegate, T. J. (2017). Development of a chicken ileal explant culture model for measurement of gut inflammation induced by lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 96(9), 3096–3103.
155. Zhou, Z.-B., Wang, W.-W., Xu, Y.-D., Lai, Y.-Q., Bai, X.-L., Song, Z.-H., Liu, Z.-K., & He, X. (2022). Effects of silymarin on antioxidant capacity, immune function

- and intestinal flora of rapid yellow feather broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 34(12), 7686–7700. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2022.12.021>
156. Zhu, Q., Sun, P., Zhang, B., Kong, L., Xiao, C., & Song, Z. (2021). Progress on gut health maintenance and antibiotic alternatives in broiler chicken production. *Frontiers in Nutrition*, 8, 692839.

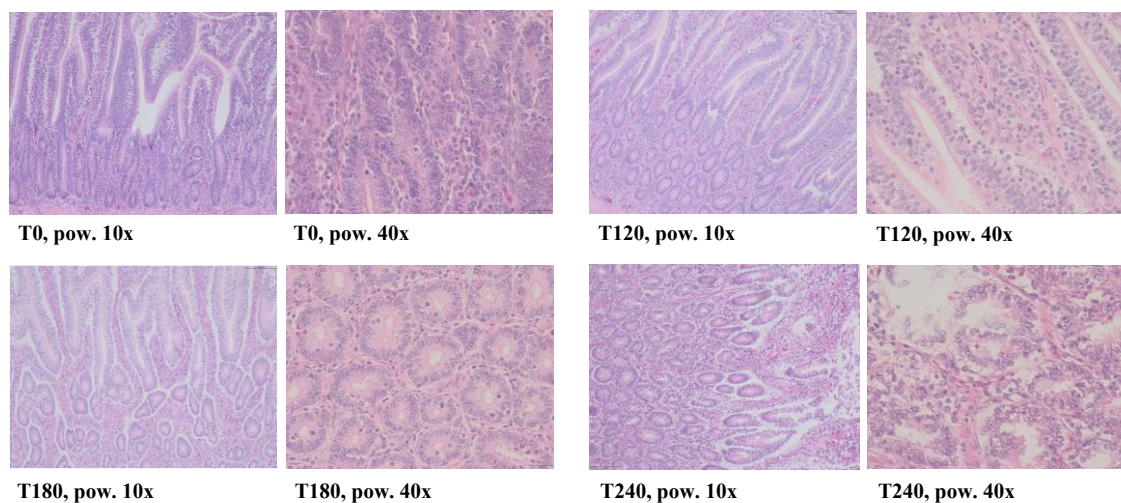
ANEKS

W Aneksie przedstawiono dodatkowe wyniki poszerzające dane zaprezentowane w głównej części dysertacji.

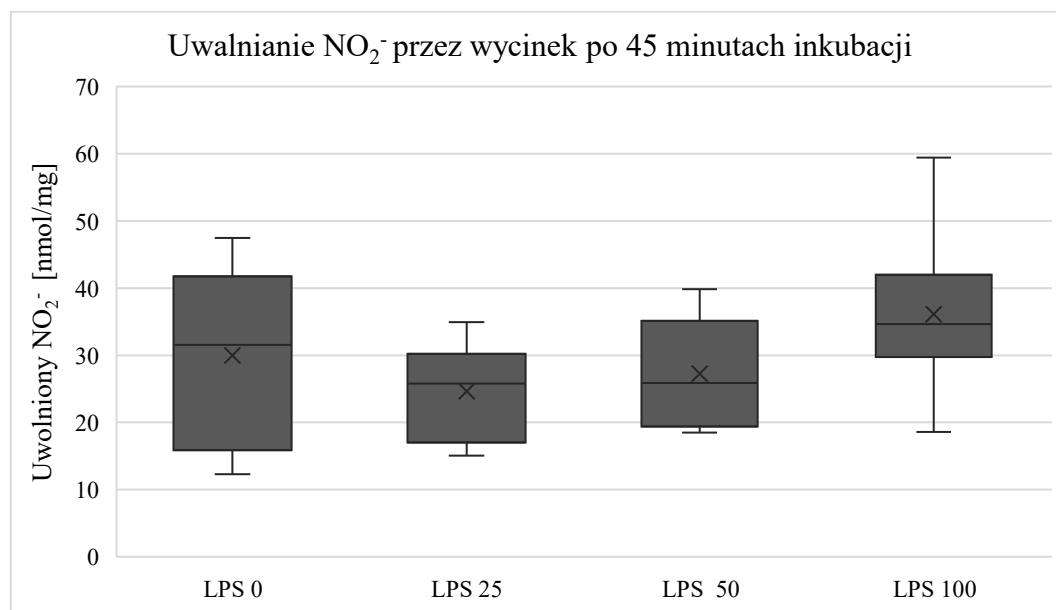


Ryc. 1. Wpływ warunków inkubacji na względną zmianę wartości (%) przeznabłonkowego oporu elektrycznego (TEER) wyrażoną jako odsetek wartości (%), na początku inkubacji (w czasie T0). NP. – wycinki niepreparowane; L-15 – podłoże Leibovitz L-15; WE – podłoże Williamsa E; M K-HS – modyfikowany bufor Krebsa – Henseleita; temp. – temperatura; Kol – kolagenaza; Tryp – tripsyna

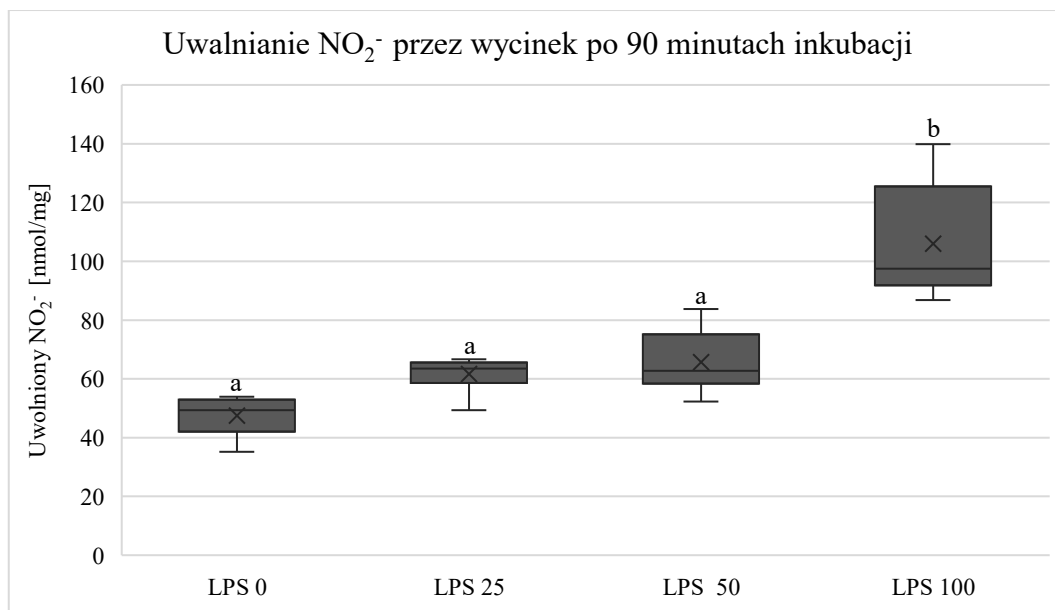
Żywotność wycinka w czasie inkubacji – ocena histopatologiczna



Ryc. 2. Ocena histopatologiczna żywotności wycinków jelit podczas inkubacji na płytkach wielodołkowych. Preparaty barwione hematoksyliną i eozyną (H&E). Do 90 minuty inkubacji widoczna zachowana struktura kosmków jelitowych i integralność nabłonka. Po 180 oraz 240 minutach inkubacji widoczny rozpad kosmków jelitowych, złuszczenie, obrzęk i rozpad komórek nabłonka.



Ryc. 3. Stężenie NO_2^- w podłożu po 45 minutach inkubacji wycinków na płytkach wielodołkowych, zależnie od zastosowanego stężenia LPS. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD ($n=4-8$), w przeliczeniu na masę wycinków. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya) nie wykazała różnic statystycznych na poziomie istotności ($p \leq 0,05$); Skróty oznaczają zastosowane stężenia LPS: LPS0 – 0 g/ml; LPS 25- 25 µg/ml; LPS 50- 50 µg/ml, LPS 100 – 100 µg/ml.



Ryc. 4. Stężenie NO_2^- w podłożu po 90 minutach inkubacji wycinków na płytkach wielodołkowych, zależnie od zastosowanego stężenia LPS. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD ($n=4-8$), w przeliczeniu na masę wycinków. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukeya), różne litery oznaczają różnice statystyczne na poziomie istotności $p \leq 0,05$; Skróty oznaczają zastosowane stężenia LPS: LPS0 – 0 g/ml; LPS 25- 25 $\mu\text{g/ml}$; LPS 50- 50 $\mu\text{g/ml}$, LPS 100 – 100 $\mu\text{g/ml}$.