

Wpływ wybranych dodatków paszowych na stan histologiczny błony śluzowej jelit tuczników*)

ANNA REKIEL, WOJCIECH BIELECKI*, MARZENA CICHOWICZ**,
JUSTYNA WIĘCEK, JÓZEF KULISIEWICZ

Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-787 Warszawa

**Instytut Medycyny Wojskowej Akademii Medycznej, ul. Szaserów 128, 00-909 Warszawa

Rekiel A., Bielecki W., Cichowicz M., Więcek J., Kulisiewicz J.

Effect of chosen feed additives on the histology of mucosa in fatteners' intestines

Summary

The experiment studied 32 crossbred fatteners. The animals were fed in a two-stage system with the addition of feed antibiotic (control group – C) or prebiotic BIO-MOS (*Saccharomyces cerevisiae*, strain 1026; 0.1% during the first period of fattening) (experimental group – E). From 16 animals chosen at random (8 fatteners each from groups E and C) the following sections of small intestine were sampled post mortem and preserved for histological, histochemical and immuno-histochemical evaluation: duodenum, jejunum and ileum. Staining by the review (H-E) and paS-Alcjan method was carried out. Antibodies bax, bcl-x, bcl-2 and PCNA and Ki-67 were used to evaluate apoptosis and proliferation.

The preliminary studies in situ revealed the suitability of the employed antibodies: bax, bcl-x and bcl-2 in evaluating apoptosis. Histological, histochemical and immuno-histochemical evaluation of the mucosa in the small intestines of the animals receiving feed antibiotic or its replacer – prebiotic, showed that the effect of the employed additives differentiated in terms of morphological traits, apoptosis and proliferation abilities of crypts' epithelium. It was concluded that there were no negative effects of BIO-MOSS on the mucosa of the small intestine in fatteners.

Keywords: fatteners, feed additives, small intestine, epithelial cells

Dodatki paszowe korzystnie zwiększają ilość bakterii kwaszących (11, 18), działają na system immunologiczny, pośrednicząc w procesie fagocytozy, wpływają na aktywację i różnicowanie limfocytów (16, 26, 27). Pod wpływem czynników żywieniowych występują różnorodne zmiany w błonie śluzowej jelit (4, 7, 23), w tym takie, które zmieniają wchłanianie składników pokarmowych (12). Badania histologiczne wykazują ich wpływ na wzrost kosmków jelitowych oraz zwiększenie liczby krypt. W kryptach mnożą się komórki nabłonkowe, produkowane są czynniki odporności przeciwbakteryjnej – defensyny, oraz czynniki endokrynne, np. chomogranina A. Pod wpływem dodatków paszowych enterocyty krypt jelitowych zwiększają lub zmniejszają aktywność proliferacyjną. Zmianie ulega ich aktywność wydzielnicza, np. produkcja śluzu i czynników bakteriobójczych (8, 13, 23-25).

Celem badań było określenie wpływu dodatku antybiotyku lub prebiotyku na obraz histologiczny oraz aktywność apoptotyczną i proliferacyjną enterocytów jelita cienkiego tuczników.

Materiał i metody

Przeprowadzono eksperyment produkcyjny na 32 tucznikach mieszańcach przydzielonych do grupy kontrolnej (K) i doświadczalnej (D). Zwierzęta w czasie trwania doświadczenia były klinicznie zdrowe, (zaburzenia gastryczno-jelitowe nie wystąpiły), a przed tuczem zostały odrobaczone. Świnie utrzymywano indywidualnie, żywiono systemem dwufazowym, zgodnie z normami (3). Tuczniki K otrzymywały 5% premiks z dodatkiem antybiotyku flawomycyny (100 mg na 1 kg), a zwierzęta D premiks bez antybiotyku. Tucznikom doświadczalnym w I fazie tuczu podawano 0,1% dodatek prebiotyku BIO-MOS (*Saccharomyces cerevisiae*, szczep 1026). Wykonano badania składu chemicznego surowców i mieszanek paszowych AOAC (2) z zastosowaniem aparatury Tecator, określono ich wartość pokarmową. Wartość energetyczna 1 kg mieszanki podawanej tucznikom w I i II fazie tuczu wynosiła 12,3 i 12,2 MJ EM (3), a zawartość białka w paszy dla świń z grupy K i D odpowiednio: I faza 165 i 166 g/kg i II faza 143 i 149 g/kg.

Po zakończeniu tuczu wybrano losowo i ubito przy masie 100,5 kg ($\pm 0,5$ kg) 16 tuczników (po 8 sztuk z grupy). *Post mortem* pobrano wycinki z trzech odcinków jelita cien-

*) Projekt KBN Nr P06Z 026 25.

kiego: dwunastnicy (D), jelita czczego (CZ) i jelita biodrowego (B) (5×20 mm każdy), przepłukano 0,9% roztworem soli fizjologicznej i utrwalone w 10% zbuforowanym roztworze formaliny. Utrwalone wycinki zatopiono w parafinie (Paraplast-Sigma). Bloczki parafinowe krojono na mikrotomie na seryjne skrawki grubości $4 \mu\text{m}$. Wykonano barwienie histologiczne hematoksyliną i eozyną (HE) i histochemiczne paS-Alcjan (dla wykrycia mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych).

Wykonano badania wstępne, stosując do barwień gastrynę, somatostatynę, chromograninę. Immunohistochemicznie oznaczano występowanie antygenów bax, bcl-x, bcl-2, PCNA i Ki-67. Na ich podstawie do badań diagnostycznych *in vitro* użyto przeciwciał: Polyclonal Rabbit Anti-Human Bax (bax); Polyclonal Rabbit Anti-Human Bcl-X (bcl-x); Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2, Oncoprotein, Clone 124 (bcl-2); Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67, Clone Ki-S5 (Ki-67); Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antygen (PCNA), Clone PC10 (PCNA).

Oceny preparatów dokonano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego BX 50 Olympus, przy powiększeniu $400\times$.

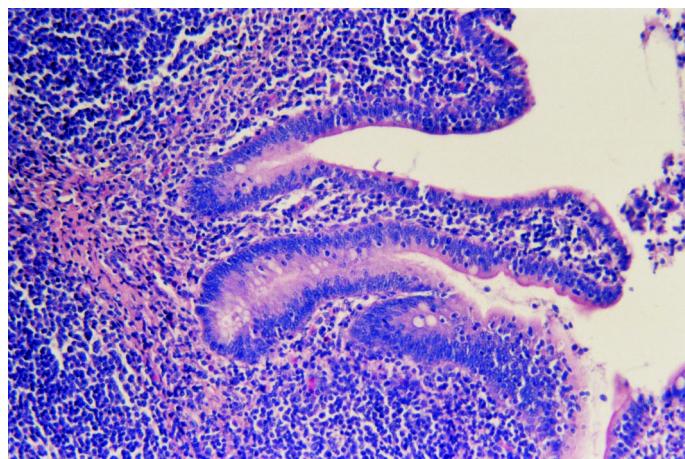
W preparatach barwionych metodami immunohistochemicznymi określano reakcje dodatnie i ujemne, o charakterze rozproszonym (bax, bcl-x, bcl-2) lub policzalnym (PCNA, Ki-67). Komórki PCNA dodatnie i Ki-67 dodatnie, liczono w trzech powtórzeniach, każdorazowo do stu komórek. Wynik obliczeń zapisywano jako średnią powtórzeń. Podobnie postępowano obliczając procent komórek kubkowych produkujących kwaśne lub obojętne mukopolisacharydy.

Wyniki opracowano statystycznie stosując jednoczynnikową analizę wariancji z wykorzystaniem metody najmniejszych kwadratów.

Wyniki i omówienie

Nie stwierdzono różnic potwierdzonych statystycznie w czasie trwania tuczu, przyrostach dobowych i wykorzystaniu paszy przez tuczniki z grupy K i D. Wymienione wskaźniki w grupie kontrolnej i doświadczalnej wyniosły, odpowiednio: 101,4 dnia, 786,1 g/dobę i 2,73 kg/kg oraz 104 dni, 767,3 g/dobę i 2,78 kg/kg.

Wykonane standardowe barwienie hematoksyliną-eozyna (ryc. 1), posłużyło do oceny histologicznej poszczególnych odcinków jelit tuczników z grupy K i D. W zrębie błony śluzowej dwunastnicy (grupa K) występowały komórki jednojądrzaste, przy czym dominowały komórki plazmatyczne i tuczne (tab. 1). W zrębie błony śluzowej jelita czczego wystąpiły nacieki komórek jednojądrzastych, ogniskowo z dużym udziałem komórek tucznych. Stwierdzano również ogniskowo nacieki z przewagą komórek limfoidnych. W kryptach stwierdzono liczne komórki kubkowe. W błonie śluzowej jelita biodrowego stwierdzano obfite nacieki komórek jednojądrzastych, ogniskowo z przewagą komórek plazmatycznych oraz ogniskowo z przewagą komórek tucznych (tab. 1).



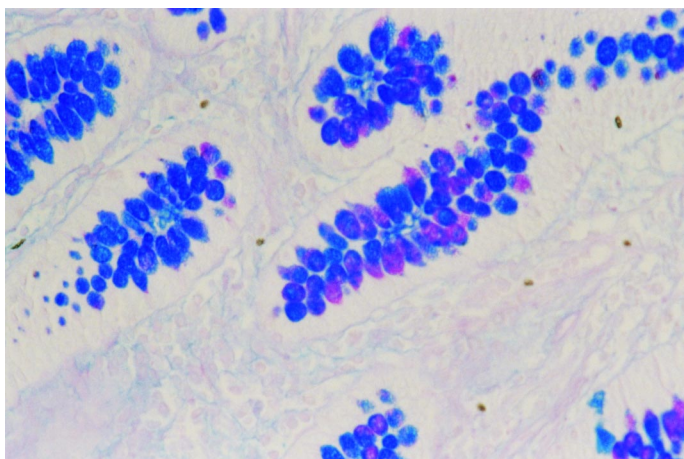
Ryc. 1. Histologiczny obraz błony śluzowej jelita biodrowego u świni z grupy kontrolnej. Barwienie HE, pow. $100\times$

Tab. 1. Ocena histologiczna nacieków komórkowych w błonie śluzowej jelit (barwienie H-E)

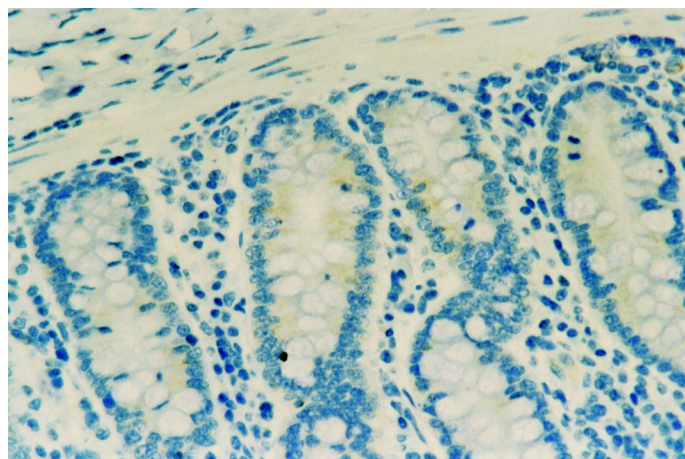
Komórki	Odcinek jelita cienkiego					
	Dwunastnica		Jelito czcze		Jelito biodrowe	
	Grupa					
	K	D	K	D	K	D
Jednojądrzaste	++**	++**	++**	++***	++**	++**
Plazmocyty	++	++*	++		++	
Limfocyty		+	++**			
Monocyty				+		
Histiocyty					++	+
Tuczne	+	+	++	++	++	
Eozynofile			+	+		

Objaśnienia: K – grupa kontrolna (flawomycyna); D – grupa doświadczalna (BIO-MOS); obecność komórek: + – umiarkowana, ++ – liczne, +++ – bardzo liczne (mała, średnia, duża); nacieki komórek: * – umiarkowane, ** – obfite, *** – bardzo obfite

W wycinkach dwunastnicy pobranych od tuczników z grupy doświadczalnej (D) wykazano nacieki komórek jednojądrzastych (tab. 1), ogniskowo z przewagą limfocytów oraz ogniskowo z przewagą komórek plazmatycznych i tucznych. W zrębie jelita czczego w naciekach komórkowych stwierdzano duży udział komórek tucznych, ogniskowo z udziałem makrofagów oraz nieco mniejszym udziałem eozynofili. Nacieki komórek jednojądrzastych, w tym obecność makrofagów, oraz ogniskowo nacieki komórek jednojądrzastych, z udziałem komórek tucznych stwierdzano w jelicie biodrowym. Można uznać, że obraz histologiczny jelit tuczników w grupach K i D był porównywalny. Osek (14) podkreśla istotny udział enterocytów w zamianie monomerycznej postaci immunoglobulin IgA w formę dimeryczną zawierającą wydzielniczy komponent glikoproteinowy warunkujący ich odporność na proteolizę. Jednocześnie sekrecyjne przeciwciała klasy IgA odgrywają istotną rolę w reakcjach odpornościowych i obronnych ze strony układu GALT.



Ryc. 2. Reakcja na obecność mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych w błonie śluzowej jelita biodrowego u świni z grupy kontrolnej. Barwienie histochemiczne paS-Alcjan, pow. 200 ×



Ryc. 3. Dodatnia reakcja bcl-2 w jelicie czczym u świni z grupy doświadczalnej. Barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał Clon 124, pow. 200 ×

Tab. 2. Udział komórek kubkowych w kryptach jelitowych (paS-Alcjan)

Mukopolisacharydy	Dwunastnica		SE	Jelito czcze		SE	Jelito biodrowe		SE
	Grupa			Grupa			Grupa		
	K	D		K	D		K	D	
Kwaśne	98,3	99,7	0,538	98,3	99,7	0,352	86,0	86,7	5,465
Obojętne	1,7	0,3	0,538	1,7	0,3	0,352	14,0	13,3	5,465

Tab. 3. Ocena apoptozy enterocytów w kryptach jelitowych (procent reakcji)

Przeciwciało	Odcinek jelita											
	Dwunastnica				Jelito czcze				Jelito biodrowe			
	Grupa											
	K		D		K		D		K		D	
	Reakcja											
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bax	0	100	50	50	0	100	50	50	50	50	0	100
Bcl-x	0	100	25	75	0	100	25	75	0	100	0	100
Bcl-2	25	75	100	0	50	50	75	25	50	50	100	0

Objaśnienia: reakcja: + dodatnia, – ujemna

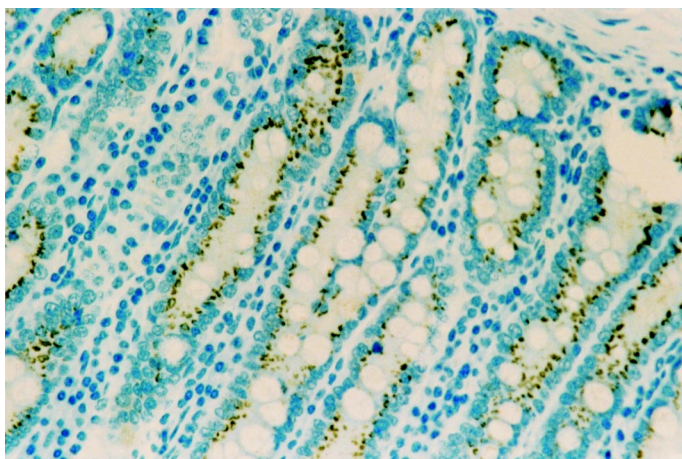
W badaniach własnych udział (odsetek) komórek kubkowych wydzielających mukopolisacharydy kwaśne w porównaniu do wydzielających mukopolisacharydy obojętne był bardzo wysoki i porównywalny (brak różnic statystycznie istotnych) w grupach K i D w trzech badanych odcinkach jelit (tab. 2, ryc. 2). W dwunastnicy i jelicie czczym tuczników z obu grup (D i K) był większy niż w jelicie biodrowym. Odsetek komórek kubkowych wydzielających mukopolisacharydy obojętne kształtował się odwrotnie w trzech ocenianych odcinkach jelit (D-CZ-B). Wpływ czynnika żywieniowego na zmiany w jelitach obserwowano w badaniach histochemicznych (6). Stwierdzono wzrost liczby komórek kubkowych w kryptach i kosmkach jelitowych, zwiększenie wydzielania mucyn będących podstawowym składnikiem śluzu oraz brak

zmian w zakresie proporcji między kwaśnymi i obojętnymi mukopolisacharydami. Wykazano też zdolność wiązania się ze śluzem jelitowym przeciwciał S-IgA, co umożliwia wytworzenie dodatkowej warstwy zabezpieczającej (14).

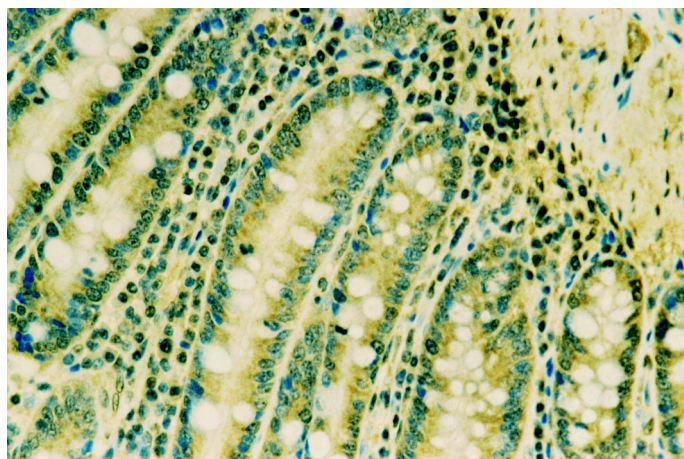
Apoptoza i proliferacja występująca w nabłonku jelit mogą być określone przy użyciu technik immunohistochemicznych (1, 5, 10, 17). Wstępne badania *in situ* wykonane w ramach badań własnych wykazały przydatność przeciwciał bax, bcl-x, bcl-2 do oceny samobójczej śmierci komórek. Stosując do znakowania białek wymienione przeciwciała uzyskano reakcje dodatnie (tab. 3). Często obserwowano reakcję dyspersyjną (ryc. 3). Apoptoza enterocytów w kryptach jelitowych oceniona na podstawie odsetka reakcji pozytywnych dla bax i bcl-x oraz bcl-2 była jednak słabo wyrażona. Odsetek dodatnich reakcji dla bax i bcl-2 wahał się w grupie K i D odpowiednio: od 0% do 50% i od 25% do 100%. Dla bax był większy w dwunastnicy i jelicie czczym w grupie doświadczalnej w porównaniu z kontrolną, a dla bcl-2 w dwunastnicy i jelicie biodrowym.

Bax należy do rodziny białek homologicznych z Bcl-2. Białka apoptotyczne Bax i Bcl-2 biorą udział w regulacji procesu apoptozy (17, 20, 21). Są promotorami śmierci komórki. W jądrze występuje antagonist Bax – Bcl-2. Związany jest on z chromosomami, a poziom jego ekspresji zależy od cyklu komórkowego i jest największy podczas mitozy (21).

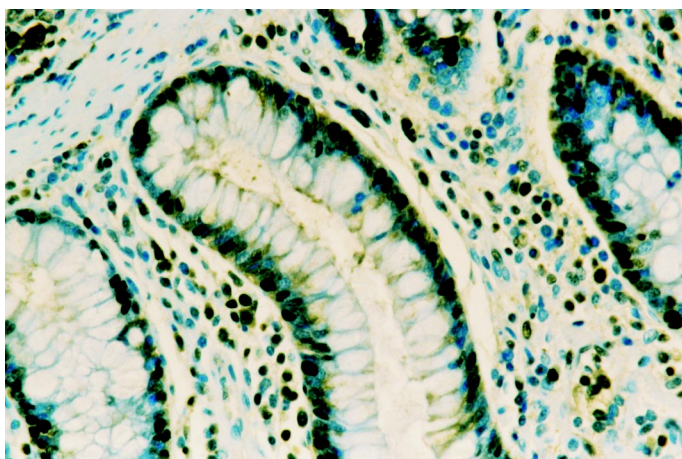
Odsetek komórek Ki-67 dodatnich i PCNA dodatnich nie wykazywał regularnych zależności, uzyskane reakcje były wyraźne (tab. 4). Odsetek reakcji dodatnich po zastosowaniu Ki-67 był największy w jelicie czczym, słabiej wyrażony w dwunastnicy, a najmniej-



Ryc. 4. Występowanie komórek Ki-67 dodatnich w błonie śluzowej dwunastnicy u świni z grupy kontrolnej. Barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych Ki-S5, pow. 200 ×



Ryc. 5. Występowanie komórek Ki-67 dodatnich w błonie śluzowej jelita czczego u świni z grupy doświadczalnej. Barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych Ki-S5, pow. 200 ×



Ryc. 6. Występowanie komórek PCNA dodatnich w błonie śluzowej jelita biodrowego u świni z grupy kontrolnej. Barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych PC 10, pow. 200 ×

szy w jelicie biodrowym. W grupie D w porównaniu z K reakcja na przeciwciało Ki-67 była słabiej wyrażona, odpowiednio liczba komórek Ki-67 dodatnich w trzech kolejnych odcinkach jelita (D-CZ-B) była mniejsza o: 26,52, 10,26, 26,95 jednostek procentowych (ryc. 4 i 5, tab. 4).

Przeciwciało monoklonalne Ki-67 znakuje proliferujące komórki z ekspresją antygenu Ki-67, m.in.

w komórkach zdrowych. Ekspresja antygenu występuje podczas wszystkich aktywnych faz cyklu komórkowego (faz G_1 , S, G_2 i M), nie występuje w fazie spoczynkowej (G_0) i w komórkach nieaktywnych. Antygen jest rozkładany, kiedy komórka wchodzi w stan nieproliferacyjny (22).

W badaniach własnych przy znakowaniu preparatów przeciwciałem PCNA, w grupie D w porównaniu z K obserwowano mniej reakcji pozytywnych wskazujących na proliferację. W badanych grupach żywieniowych (K, D) stwierdzono też mniejszą aktywność proliferacyjną w kryptach w jelicie biodrowym w porównaniu z dwunastnicą i jelitem czczym. Porównanie grupy D do K w odcinkach D-CZ-B charakteryzuje mniej nasiloną reakcją dodatnią, odpowiednio o: 16,91, 10,03, 16,63 punktu procentowego (ryc. 6). Różnica istotna przy $p \leq 0,05$ wystąpiła między grupą K i D dla dwunastnicy (tab. 4).

Przeciwciało monoklonalne PCNA umożliwia oznaczanie komórek proliferujących tkanek zdrowych (9). Ekspresję tego białka obserwuje się w końcówce fazy G_1 i w początkowej fazie S. PCNA ma zasadnicze znaczenie dla ciągłości przebiegu cyklu komórkowego. Oligonukleotydy o działaniu przeciwnym do PCNA zapobiegają przejściu komórek do fazy S cyklu. PCNA spełnia ważną rolę dla życia i śmierci komórek, jest elementem mechanizmu replikacji DNA

i naprawy jego uszkodzeń. Brak lub niski poziom czynnościowego PCNA może prowadzić do apoptozy komórki (10, 15). W komórkach znaczonych przeciwciałem barwienie jest prawie całkowicie ograniczone do jądra, ma ono charakter rozlany, ziarnisty lub mieszany (9).

W badaniach Domeneghini i wsp. (7) ocena histometryczna i immunohistochemiczna (PCNA) po zastosowaniu L-glutaminy i/lub nukleotydów

Tab. 4. Ocena właściwości proliferacyjnych enterocytów w kryptach jelitowych (odsetek reakcji pozytywnych)

Przeciwciało/ komórki dodatnie	Odcinek jelita cienkiego								
	Dwunastnica			Jelito czcze			Jelito biodrowe		
	Grupa		SE	Grupa		SE	Grupa		SE
	K	D		K	D		K	D	
Ki-S5 / Ki-67	49,33	36,25	3,536	56,92	51,08	1,878	44,83	32,75	3,239
PC 10 / PCNA	77,42 ^a	64,33 ^b	2,520	73,08	65,75	2,434	67,17	56,00	2,805

Objaśnienia: a, b – różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$

wykazała pozytywny efekt suplementacji na morfologiczno-funkcjonalne cechy błony śluzowej jelit.

Sakata i wsp. (19) stwierdzili, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, stymulują proliferację komórek nabłonka, w różnym stopniu: n-masłowy > propionowy > octowy. Proliferacja nasila się pod ich wpływem. Źródłem tych kwasów mogą być procesy fermentacyjne, można też podawać je doustnie, w formie wlewów dożylnych lub infuzji żołądkowo-jelitowej (19).

Podsumowanie

Badania wstępne *in situ* wykazały przydatność użytych przeciwciał bax, bcl-x, bcl-2 do oceny apoptozy.

Ocena histologiczna, histochemiczna i immunohistochemiczna błony śluzowej jelita cienkiego zwierząt otrzymujących antybiotyk paszowy lub prebiotyk, wykazała zróżnicowany wpływ stosowanych dodatków na cechy morfologiczne, apoptozę i zdolności proliferacyjne nabłonka krypt. Można stwierdzić brak negatywnego oddziaływania BIO-MOS-u na błonę śluzową jelita cienkiego tuczników.

Piśmiennictwo

- Adams J. M., Cory S.: The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281, 1322-1326.
- Anon.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington, DC 1990.
- Anon.: Normy Żywienia Świń. IFiZZ PAN. Omnitech-Press, Warszawa 1993.
- Babinska I., Rotkiewicz T., Otrocka-Domagala I.: The effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. administration on the morphology of the gastrointestinal tract, liver and pancreas in piglets. *Pol. J. Vet. Sci.* 2005, 8, 29-35.
- Boise L. H., Gonzalez-Garcia M., Postema C. E., Ding L., Lindsten T., Turka L. A., Mao X., Nunez G., Thompson C. B.: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993, 74, 597-608.
- Brown P. J., Miller B. G., Stokes C. R., Blazquez N. B., Bourne F. J.: Histochemistry of mucins of pig intestinal secretory epithelial cells before and after weaning. *J. Comp. Pathol.* 1988, 98, 313-323.
- Domeneghini C., Di Giancamillo A., Savoini G., Paratte R., Bontempo V., Dell'Orto V.: Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. *Histol. Histopathol.* 2004, 19, 49-58.
- Ekelund K. M., Ekblad E.: Structural, neuronal, and functional adaptive changes in atrophic rat ileum. *Gut* 1999, 45, 236-245.
- Hall P. A., Levison D. A., Woods A. L., Yu C. C.-W., Kellock D. B., Watkins J. A., Barnes D. M., Gillett C. E., Camplejohn R., Dover R., Waseem N. H., Lane D. P.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 1990, 162, 285-294.
- Kelman Z.: PCNA: structure, functions and interactions (Review). *Oncogene* 1997, 14, 629-640.
- Kot B., Jakubczak A., Bukowski K.: Antagonistyczne działanie bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do wybranych drobnoustrojów. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 53-57.
- Lodemann U., Hubener K., Jansen N., Martens H.: Effect of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 2006, 60, 35-48.
- McCullogh J. S., Ratcliffe B., Mandir N., Carr K. E., Goodlad R. A.: Dietary fibre and intestinal microflora: effect on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut* 1998, 42, 799-806.
- Osek J.: Immunologiczne mechanizmy obronne przewodu pokarmowego. *Magazyn Wet., Suplement. Świnie. Zapobieganie chorobom i leczenie* 65-67.
- Paunesku T., Mittal S., Proctić M., Oryhon J., Korolev S. V., Joachimiak A., Woloschak G. E.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001, 77, 1007-1021.
- Pickard K. M., Bremner A. R., Gordon J. N., Macdonald T. T.: Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* 2004, 18, 271-285.
- Reed J. C.: Mini-review: Bcl-2 and the regulation on programmed cell death. *J. Cell Biol.* 1994, 124, 1-6.
- Rekiel A., Gajewska J.: Zmiany mikroflory jelitowej tuczników pod wpływem wybranych czynników żywieniowych. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 925-930.
- Sakata T., Adachi M., Hashida M., Sato N., Kojima T.: Effect of n-butyric acid on epithelial cell proliferation of pig colonic mucosa in short-term culture. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1995, 102, 163-164.
- Sato T., Hanada M., Bodrug S., Irie S., Iwama N., Boise L. H., Thompson C. B., Golemis E., Fong L., Wang H. G., Reed J. C.: Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 9238-9242.
- Schandl C. A., Li S., Re C. G., Fan W., Willingham M. C.: Mitotic chromosomal Bcl-2: I. Stable expression throughout the cell cycle and association with isolated chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 1999, 47, 139-149.
- Scholzen T., Gerdes J.: The Ki-67 protein: from the known and the unknown (review). *J. Cell Physiol.* 2000, 182, 311-322.
- Schweiger M., Steffl M., Amselgruber W. M.: Differential expression of EGF receptor in the pig duodenum during the transition phase from maternal milk to solid food. *J. Gastroenterol.* 2003, 38, 636-642.
- Thoreux K., Balas D., Bouley C., Senegal-Balas F.: Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 stimulated growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. *Digestion* 1998, 59, 349-359.
- Van Nevel C. J., Decuyper J. A., Dierick N. A., Moll K.: Incorporation of galactomannans in the diet of newly weaned piglets: effect on bacteriological and some morphological characteristics of the small intestine. *Arch. Anim. Nutr.* 2005, 59, 123-138.
- Yasui H.: Immunomodulatory function of lactic acid bacteria; Antonie van Leeuwenhoek 1999, 76, 383-389.
- Zimmermann B., Bauer E., Mosenthin R.: Pro- and prebiotics in pig nutrition – potential modulators of gut health? *J. Anim. Feed Sci.* 2001, 10, 47-56.

Adres autora: dr hab. Anna Rekiel, prof. SGGW, ul. Rtm. Pileckiego 107/107, 02-781 Warszawa; e-mail: anna_rekiel@sggw.pl