



**UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY**
w Lublinie

**WYDZIAŁ
MEDYCYNY
WETERYNARYJNEJ**

PRACA DOKTORSKA

Doctoral thesis

**Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo
na liczbę komórek somatycznych w mleku krów**

The effect of intramammary administration of quercetin, morin, and
pectin on the somatic cell count in cow's milk.

Lek. wet. Marcin Kocik

Promotor

dr hab. Artur Burmańczuk prof. uczelni

Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

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

Data

Podpis promotora

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami. Przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego. Niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech publikacji naukowych:

- 1) Kocik, M., Burmańczuk, A., Grabowski, T., and Tomaszewska, E., Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows. A Field Pilot Study. Agriculture, 15(16), p.1760. 2025.

MEiN: 100 pkt, IF: 3,6

- 2) Kocik, M., Burmańczuk, A., Bednarski, M., Sołtysiuk, M., Grabowski, T., and Tomaszewska, E. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by Escherichia coli and Streptococcus uberis. Agriculture, 15(22), p.2359. 2025.

MEiN: 100 pkt, IF: 3,6

- 3) Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz and Ewa Tomaszewska. A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows. Annals of Animal Science. DOI: [10.2478/aoas-2026-00252026](https://doi.org/10.2478/aoas-2026-00252026) 2026.

MEiN: 140 pkt, IF: 2,2

Sumaryczny IF: 9,4

Sumaryczna punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki: 340

Badania były sfinansowane ze środków własnych autora

Spis treści

Streszczenie	4
Abstract	5
Wstęp	6
Cel pracy:	9
Materialy i metody	10
Wyniki badania potencjału terapeutycznego oraz tolerancji miejscowej pektyn po podaniu dowymieniowym	14
Wyniki badania potencjału terapeutycznego oraz tolerancji miejscowej moryny po podaniu dowymieniowym	17
Potwierdzenie lub wykluczenie interakcji farmakodynamicznej w przypadku równoczesnego podania trzech substancji czynnych: kwercetyny, moryny i pektyny oraz potwierdzenie lub wykluczenie wpływu na efekt terapeutyczny	19
Dyskusja	21
Wnioski	38
Bibliografia	40
Artykuły wraz z oświadczeniami autorów	49

Streszczenie

Zapalenie gruczołu mlekowego stanowi jeden z głównych problemów ekonomicznych i sanitarno-epidemiologicznych w stadach bydła mlecznego, a globalne działania na rzecz ograniczenia stosowania antybiotyków zwiększają zainteresowanie skutecznymi, nie antybiotykowymi terapiami dowymieniowymi. Niniejsza rozprawa to zbiór wyników trzech badań terenowych oceniających związki bioaktywne pektynę, morynę i kwercetynę jako potencjalną alternatywę lub uzupełnienie konwencjonalnego leczenia przeciwbakteryjnego.

W pierwszym badaniu pilotażowym krowy z *mastitis* poddano terapii 10% pektyną lub licencjonowanym antybiotykiem dowymieniowym. Obie terapie prowadziły do porównywalnego zmniejszenia nasilenia objawów klinicznych i \log_2 -SCC w ciągu 48 h, z podobnymi wskaźnikami wyleczeń bakteriologicznych, profilem patogenów oraz brakiem działań niepożądanych, co potwierdza bezpieczeństwo i skuteczność pektyny jako alternatywy dla antybiotyków. Drugie badanie oceniało morynę jako jedyny składnik; 3% moryna istotnie obniżała SCC i poprawiała wyniki kliniczne w *mastitis* wywołanym przez *E. coli*, osiągając skuteczność zbliżoną do antybiotyków, natomiast w zakażeniach *S. uberis* efekt był wolniejszy i mniej wyraźny. W trzecim doświadczeniu krowy rasy holsztyńsko-fryzyjskiej z łagodnym *mastitis* wywołanym przez *Escherichia coli* lub *Streptococcus uberis* otrzymywały preparat dowymieniowy zawierający pektynę, morynę i kwercetynę (PMQ), standardowy antybiotyk lub bufor fosforanowy. Zarówno PMQ, jak i antybiotyk powodowały istotne obniżenie wyniku komórek somatycznych (SCS) od około 72h, czemu towarzyszyła poprawa kliniczna, natomiast w grupie kontrolnej takich zmian nie obserwowano. Łącznie wyniki wskazują, że preparaty oparte na pektynie i flawonoidach wykazują wymierne działanie przeciwzapalne i wspomagające w leczeniu *mastitis* u krów. Ich bezpieczeństwo, brak okresu karencji oraz udokumentowane korzyści kliniczne wspierają ich potencjalną rolę jako nieantybiotykowych alternatyw, które mogą przyczynić się do racjonalnego stosowania antybiotyków w produkcji mleka.

Abstract

Mastitis remains one of the most serious health and economic challenges in dairy herds, and global efforts to reduce the use of antibiotics have increased interest in effective non-antibiotic intramammary therapies. These publications present a collection of findings from three field studies evaluating natural bioactive compounds pectin, morin, and quercetin as alternatives or adjuncts to conventional antimicrobial treatment. In the first pilot study, cows with mastitis were treated with 10% pectin or a licensed intramammary *antibiotic*. Both therapies led to comparable reductions in clinical severity and log₂-SCC within 48 hours, with similar bacteriological cure rates, pathogen profiles, and no adverse effects, confirming the safety and efficacy of pectin as an alternative to antibiotics. The second study assessed morin as a single active compound; 3% morin significantly reduced SCC and improved clinical outcomes in mastitis caused by *E. coli*, achieving efficacy comparable to antibiotics, whereas in *S. uberis* infections the response was slower and less pronounced. In the third experiment, Holstein–Friesian cows with moderate mastitis caused by *Escherichia coli* or *Streptococcus uberis* received an intramammary preparation containing pectin, morin, and quercetin (PMQ), a standard antibiotic, or phosphate buffer. Both PMQ and the antibiotic resulted in a significant reduction in somatic cell score (SCS) beginning at approximately 72 hours, accompanied by clinical improvement; no improvement was observed in the control group. Overall, the results indicate that pectin and flavonoid-based formulations exhibit measurable anti-inflammatory and supportive therapeutic effects in the treatment of mastitis in cows. Their safety, lack of withdrawal period, and documented clinical benefits support their potential role as non-antibiotic alternatives that may contribute to the rational use of antibiotics in milk production.

Wstęp

Mastitis (zapalenie wymienia) pozostaje jedną z najczęściej występujących oraz ekonomicznie najbardziej obciążających chorób bydła mlecznego (1). Szacuje się, że koszt pojedynczego przypadku klinicznego wynosi 179–500 USD na krowę, co wynika zarówno z obniżenia produkcji mleka, jak i kosztów leczenia oraz brakowania zwierząt (2,3,4). Wśród patogenów środowiskowych dominują *Escherichia coli* oraz *Streptococcus uberis*, które stanowią główne czynniki etiologiczne mastitis w wielu krajach, w tym w Polsce (5,6). Dane krajowe wskazują, że udział *S. uberis* w próbkach mleka z ćwiartek klinicznie i podklinicznie zmienionych wynosi 39–49% (7), natomiast w innych badaniach izolowano go w 38% przypadków mastitis klinicznego, podczas gdy *E. coli* odpowiadała za 21% przypadków (8).

Mastitis jest również najczęstszym wskazaniem do stosowania antybiotyków u krów mlecznych, co istotnie przyczynia się do narastania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR). Pomimo 53% redukcji sprzedaży weterynaryjnych antybiotyków w Europie w latach 2011–2022 (Polska wg danych 18.9%) oraz osiągnięcia przez UE połowy zakładanego celu redukcji do 2030 roku, zużycie antybiotyków związane z leczeniem mastitis pozostaje wysokie (9). W kontekście globalnego problemu AMR oraz koncepcji One Health konieczne jest opracowanie alternatywnych, skutecznych i bezpiecznych metod terapeutycznych, które ograniczą zależność od antybiotyków przy jednoczesnym utrzymaniu zdrowia wymienia. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie naturalnymi związkami bioaktywnymi o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwdrobnoustrojowych i immunomodulacyjnych (1,10,11). Szczególną uwagę zwracają flawonoidy, takie jak moryna i kwercetyna, oraz polisacharydy roślinne, w tym pektyny.

Moryna wykazuje udokumentowane działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające i immunomodulacyjne, m.in. poprzez hamowanie szlaków sygnałowych NF- κ B i MAPK (12). Badania *in vitro* na komórkach nabłonka gruczołu mlekowego stymulowanych LPS wykazały, że moryna redukuje ekspresję cytokin prozapalnych oraz wspiera integralność bariery krew–mleko (13). Pomimo obiecujących wyników, dowody kliniczne dotyczące jej skuteczności u krów mlecznych są ograniczone, a brak danych *in vivo* dotyczących mastitis wywołanego przez *E. coli* i *S. uberis* uzasadnia potrzebę dalszych badań (12,14,15).

Kwercetyna to flawonoid, który między innymi wpływa na przebieg procesu zapalnego, angiogenezę, oraz odwrotny transport cholesterolu (16,17,18,19,20). Wykazano, że hamuje różnicowanie limfocytów Th1 oraz obniża poziomy licznych mediatorów zapalnych, takich jak IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-25, IL-33, MCP-1, NF- κ B, VEGF-A, COX-2, 5-LOX, iNOS, NO, CRP, TNF α i TNF γ . Redukuje także ekspresję cząsteczek adhezyjnych VCAM-1, ICAM-1 i MIP-2 (16,17,18,19,20,21). Kwercetyna była badana w wielu schorzeniach u ludzi, m.in. w gruźlicy, cukrzycy, reumatoidalnym zapaleniu stawów czy zespole suchego oka, a obecnie prowadzone są liczne badania kliniczne dotyczące jej wpływu na nowotwory (22,23). Mimo szerokiego zakresu badań, farmakodynamiczny efekt kwercetyny po podaniu dowymieniowym u krów z mastitis nie został dotychczas oceniony. Pojedyncze doniesienia sugerują, że produkty bogate w kwercetynę mogą wykazywać potencjał terapeutyczny w mastitis (24), co potwierdzono również dla innych flawonoidów, takich jak kempferol, astragalina, alpinetyna, bajkaleina czy indirubina (25,26,27,28,29).

Aktualnie wiele ośrodków naukowych prowadzi wielokierunkowe badania nad polisacharydami roślinnymi, w tym pektynami, które wykazują właściwości przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe (30,31,32). Pektyny mogą destabilizować błony bakteryjne, wykazują działanie antyadhezyjne oraz modulują odpowiedź immunologiczną poprzez interakcję z receptorami Toll-podobnymi (TLR) (33,34,35). Nabłonek gruczołu mlekowego była wykazuje ekspresję receptorów TLR-2 i TLR-4, które rozpoznają ligandy gronkowcowe i paciorkowcowe, inicjując kaskadę cytokinową zależną od NF- κ B (36,37). Pektyny mogą blokować heterodimer TLR2/1, osłabiając sygnalizację prozapalną (38). Dodatkowo w środowisku mleka o pH 6,4–6,9 oraz obecności jonów Ca²⁺ sprzyja tworzeniu przez pektyny porowatych hydrożeli, które mogą wydłużać czas przebywania w zbiorniku strzykowym, stanowić barierę dla bakterii i destabilizować błony Gram-dodatnich patogenów. Pektyny rzadko były badane w kontekście terapii dowymieniowej, głównie z powodu wyzwań formulacyjnych, takich jak lepkość roztworów i szybkie żelowanie w obecności Ca²⁺. Dobór pektyny nisko-metoksylowanej o obniżonej lepkości oraz ograniczenie stężenia do $\leq 10\%$ umożliwia jednak ich praktyczne zastosowanie w warunkach klinicznych (39,40,41,42).

W świetle dostępnych danych postawiono hipotezę, że naturalne związki bioaktywne: moryna, kwercetyna oraz pektyna jabłkowa mogą stanowić skuteczne terapie wspomagające w łagodnych i wybranych przypadkach klinicznego *mastitis*. Ich właściwości

przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe mogą przyczyniać się do redukcji nasilenia zmian zapalnych w gruczole, co powinno przejawiać się obniżeniem liczby komórek somatycznych oraz poprawą stanu klinicznego zajętych ćwiartek. Celem badań jest zatem ocena skuteczności miejscowego stosowania tych związków w mastitis wywołanym przez dwa powszechne patogeny.

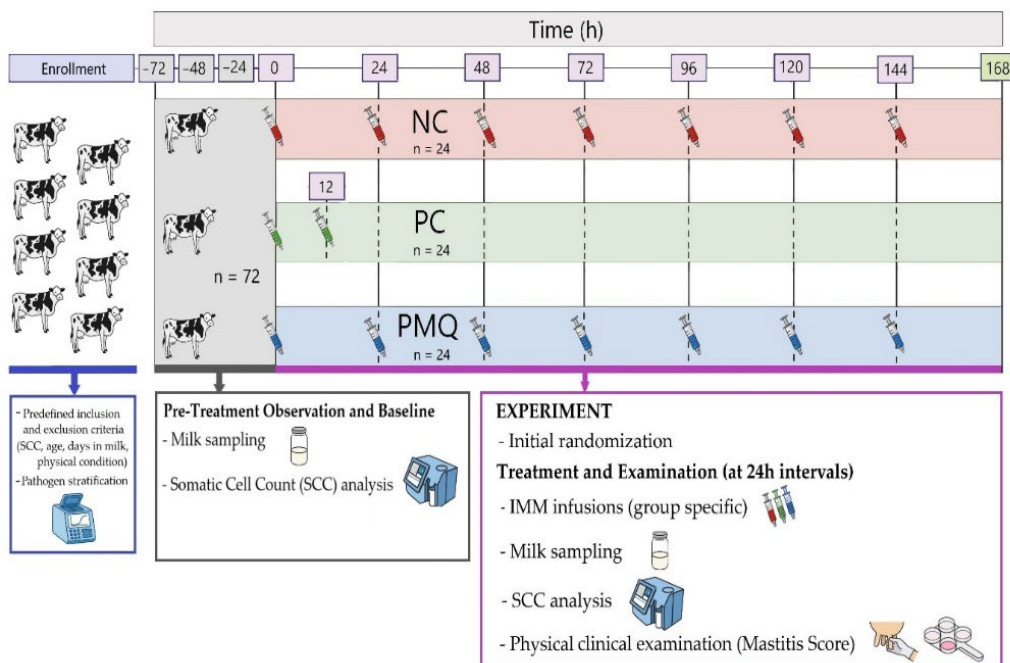
Cel pracy:

1. Potwierdzenie lub wykluczenie potencjału terapeutycznego oraz tolerancji miejscowej pektyn po podaniu dowymieniowym (zarówno w odniesieniu do strzyku jak i całego gruczołu mlekowego).
2. Potwierdzenie lub wykluczenie potencjału terapeutycznego oraz tolerancji miejscowej moryny po podaniu dowymieniowym (zarówno w odniesieniu do strzyku jak i całego gruczołu mlekowego).
3. Potwierdzenie lub wykluczenie interakcji farmakodynamicznej po dowymieniowym podaniu trzech substancji czynnych: kwercetyny, moryny i pektyny oraz potwierdzenie lub wykluczenie ich wpływu na gruczoł mlekowy związany z zapobieganiem nawrotom *mastitis*.

Materialy i metody

Wszystkie procedury dotyczące badań na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi standardami etycznymi i zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie (zgoda nr 12/2024).

Pektynę, morynę oraz kwercetynę (Sigma–Aldrich, Merck Group, Darmstadt, Niemcy) rozpuszczano w buforze fosforanowym (PBS; Sigma–Aldrich) do końcowych stężeń odpowiednio 10%, 3% i 0,5% (m/v). Proces rozpuszczania prowadzono w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze 37 °C przez około 30 minut, aż do uzyskania jednorodnego roztworu. Stężenia poszczególnych składników dobrano na podstawie wcześniejszych badań wstępnych dotyczących ich działania w terapii mastitis. Otrzymany roztwór pektyny, moryny oraz złożonego roztworu pektyna-moryna-kwercetyna (PMQ) przenoszono do sterylnych strzykawek z elastycznym przewodem aplikacyjnym. Preparat przygotowywano codziennie bezpośrednio przed użyciem, aby zapewnić jego stabilność i jałowość.



Rycina 1 Ogólny harmonogram badania

Do doświadczenia włączono wieloródki rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (3–7 lat) pochodzące z jednego stada towarowego (Liplas, woj. małopolskie). Wstępna kwalifikacja opierała się na comiesięcznych danych produkcyjnych i zdrowotnych dostarczonych przez Polską Federację Hodowców Bydła i Producentów Mleka (SCC, wiek, dni laktacji, wydajność mleczna). Kryteria włączenia obejmowały: wieloródki ≤ 100 dni laktacji, pierwszy epizod umiarkowanego klinicznego mastitis obejmującego jedną ćwiartkę oraz $SCC > 400\ 000$ komórek/mL w zajętej ćwiartce. Dane ze stada wskazywały, że dominującymi patogenami były *Escherichia coli* oraz *Streptococcus uberis*. Kryteria wykluczenia obejmowały: ostre choroby ogólnoustrojowe, zaburzenia metaboliczne (kliniczna lub subkliniczna ketoza, hipokalcemia), niedobory żywieniowe, współistniejące infekcje oraz zaawansowane objawy kliniczne (zaczernienie skóry wymienia, silną bolesność, patologiczny wyciek). Wymię oceniano badaniem fizykalnym pod kątem zmian przewlekłych a krowy z ogniskowym stwardnieniem lub guzkowatością wykluczano. W celu potwierdzenia etiologii mastitis pobierano aseptyczne próbki mleka i analizowano je metodą RT-qPCR z użyciem zestawu VetMAX™ MastiType Multi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), umożliwiającego wykrycie 15 głównych patogenów mastitis. U wszystkich krow potwierdzono monoinfekcję. Spośród krow spełniających kryteria włączenia losowo wybrano 72 osobniki. W trzydniowym okresie przed rozpoczęciem leczenia pobierano próbki mleka do oznaczenia SCC. Średnia SCC ze wszystkich krow i punktów czasowych stanowiła wartość wyjściową dla badania. Następnie, bez dodatkowej stratyfikacji według parametrów produkcyjnych, krowy losowo przydzielono do trzech grup terapeutycznych ($n = 24$). Analiza statystyczna potwierdziła brak istotnych różnic między grupami w zakresie SCC przed leczeniem (-24 h) oraz rozkładu patogenów ($P > 0,05$), co zapewniało równoważność wyjściową. Grupa badana otrzymywała siedem dowymieniowych infuzji po 5 mL roztworu pektyny, moryny lub PMQ w odstępach 24-godzinnych (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h). Grupa kontrolna pozytywna (PC) otrzymywała dwie infuzje komercyjnego preparatu złożonego zawierającego chlorowoderek tetracykliny (200 mg), siarczan neomycyny (250 mg), bacytracynę (2000 IU) oraz prednizolon (10 mg) w 0 i 12 h. Grupa kontrolna negatywna (NC) otrzymywała infuzje PBS zgodnie z harmonogramem grupy badanej. Wszystkie podania wykonywano bezpośrednio po porannym udoju o godz. 9:00. Przed aplikacją dezynfekowano skórę wymienia i ujście strzykowe (Oxy-Foam D, EcoLab Inc., Saint Paul, MN, USA). Ze względu na różnice w harmonogramach leczenia lekarz weterynarii wykonujący podania znał przydział grup, jednak nie uczestniczył w pozostałych etapach badania. Krowy

monitorowano pod kątem ogólnego stanu zdrowia oraz miejscowej tolerancji. Codziennie rano, od 0 do 168 h (tj. do 24 h po ostatnim podaniu IMM), oceniano nasilenie mastitis w zajętej ćwiartce przed leczeniem, stosując standaryzowaną 4-stopniową skalę: 0 - brak zmian; 1 - łagodne zmiany mleka; 2 - umiarkowane zmiany mleka z łagodnym stanem zapalnym; 3 - ciężkie mastitis z wyraźnym stanem zapalnym i objawami ogólnymi. Próbkę mleka pobierano w tych samych punktach czasowych. Przed pobraniem dezynfekowano ujście strzykowe 70% etanolem. Próbkę pobierano do probówek 50 mL zawierających bronopol (8 mg) i natamycynę (0,3 mg) (Broad Spectrum Microtabs II, Bentley Instruments) i przechowywano w chłodzie do czasu analizy. SCC oznaczano w ciągu 12 godzin od pobrania, wykorzystując półautomatyczny analizator BactoCount IBCm (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA).

W trakcie doświadczenia pobrano dwukrotnie krew do analizy pod kątem biochemicznym i hematologicznym: bezpośrednio przed rozpoczęciem leczenia (punkt czasowy 0 h) oraz 24 godziny po podaniu ostatniej dawki badanych substancji (punkt czasowy 168 h). Krew pobierano z żyły ogonowej do probówek z EDTA K₂ w celu wykonania podstawowej analizy hematologicznej oraz do probówek z aktywatorem krzepnięcia w celu przeprowadzenia analiz biochemicznych.

Analizy hematologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego analizatora hematologicznego Abacus Junior Vet (Diatron, Budapeszt, Węgry), zgodnie z procedurami zalecanymi przez producenta. Oznaczano następujące parametry krwi obwodowej: całkowitą liczbę leukocytów (WBC), liczbę erytrocytów (RBC), stężenie hemoglobiny (HGB), hematokryt (HCT), średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC), współczynnik zmienności rozkładu objętości erytrocytów (RDW) oraz liczbę płytek krwi (PLT).

Po separacji surowicy wykonano oznaczenia wybranych parametrów biochemicznych, obejmujących stężenia cholesterolu całkowitego, mocznika, bilirubiny całkowitej, kreatyniny, wapnia oraz fosforu nieorganicznego. Analizy biochemiczne przeprowadzono przy użyciu automatycznego analizatora Mindray BS-120 (Bio-Medical Electronics, Shenzhen, Chiny) z zastosowaniem komercyjnych, gotowych do użycia zestawów diagnostycznych (Alfa Diagnostics, Warszawa, Polska).

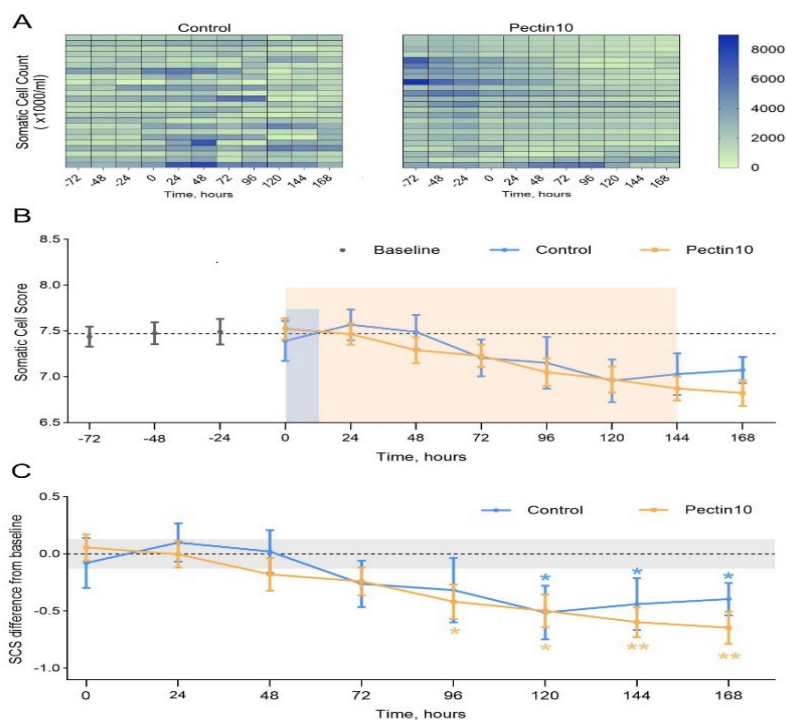
Jakość i wiarygodność pomiarów zapewniono poprzez rutynową weryfikację aparatury oraz procedur analitycznych z wykorzystaniem standaryzowanej surowicy kontrolnej wieloparametrycznej (Alfa Diagnostics). Wszystkie oznaczenia wykonywano w warunkach zgodnych z obowiązującymi normami laboratoryjnymi oraz zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP).

Analiza profilu cytokin została ograniczona do czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α), najbardziej wiarygodnego markera początkowej fazy odpowiedzi zapalnej. Stężenia TNF- α mierzono za pomocą dostępnego komercyjnie, bydlęcego zestawu ELISA (LS-F5014, LSBio, Seattle, WA, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Absorbancję odczytywano przy użyciu czytnika mikropłytek Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Wyniki badania potencjału terapeutycznego oraz tolerancji miejscowej pektyn po podaniu dowymieniowym

Badanie miało charakter randomizowanego pilotażowego badania terenowego i zostało przeprowadzone na grupie 48 krów rasy Holstein–Friesian, u których stwierdzono naturalnie występujące kliniczne zapalenie wymienia obejmujące jedną ćwiartki wymienia. Kryteriami kwalifikacji do badania były wyraźne objawy kliniczne mastitis oraz somatyczna liczba komórek w mleku przekraczająca 400 000 komórek/mL. Krowy losowo przydzielono do jednej z dwóch równolicznych grup terapeutycznych. W grupie doświadczalnej zastosowano dowymieniowo 10-procentowy roztwór pektyny, podawany raz dziennie przez siedem kolejnych dni. Grupę kontrolną leczono standardowo, zgodnie z zaleceniami producenta, przy użyciu zarejestrowanego wieloskładnikowego preparatu antybiotykowego aplikowanego dowymieniowo podany w dwóch dawkach w odstępie 24 godzin. Taki schemat badania umożliwił bezpośrednie porównanie skuteczności i bezpieczeństwa terapii pektyną z powszechnie stosowanym leczeniem antybiotykowym w warunkach praktyki terenowej.

Ocena efektów terapeutycznych obejmowała zarówno parametry kliniczne, jak i laboratoryjne. Monitorowano nasilenie objawów klinicznych mastitis w oparciu o punktową skalę oceny, zmiany somatycznej liczby komórek w mleku (po transformacji logarytmicznej), wyniki badań bakteriologicznych mleka, profil izolowanych patogenów oraz dynamikę zmian stężenia TNF- α w mleku jako wskaźnika lokalnej odpowiedzi zapalnej. Dodatkowo oceniano wpływ zastosowanego leczenia na wydajność mleczną oraz parametry hematologiczne i biochemiczne krwi, co pozwalało na kompleksową ocenę bezpieczeństwa terapii. Okres obserwacji obejmował czas od 72 godzin przed rozpoczęciem leczenia do 168 godzin po jego rozpoczęciu. Wyniki zostały zobrazowane graficznie na wykresach.



Rycina 2. (A) Heat mapa przedstawia wartości SCC ($\times 1000/\text{mL}$) u poszczególnych krów w grupach Kontrolnej i Pectin10 w okresie od -72 h do 168 h. Każdy wiersz odpowiada jednej krowie, a intensywność koloru odzwierciedla poziom SCC. (B) Średnie wartości SCS w okresie bazowym (wyznaczona wartość bazowa zaznaczona linią przerywaną) oraz w całym okresie eksperymentalnym dla obu grup terapeutycznych. Okres podawania wieloskładnikowego preparatu leczniczego w grupie Kontrolnej (0–12 h) zaznaczono jasnoniebieskim tłem, natomiast okres leczenia pektyną w grupie Pectin10 (0–144 h) oznaczono jasno pomarańczowym tłem. W żadnym punkcie czasowym nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. Dane przedstawiono jako średnie \pm SE. (C) Zmiany wartości SCS w trakcie trwania doświadczenia, wyrażone jako różnica względem wartości wyjściowej (95% przedział ufności dla wartości bazowej zaznaczony jasnoszarym tłem). Dane przedstawiono jako średnie \pm SE. Analiza statystyczna: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; liniowy model mieszany dla pomiarów powtarzanych (LMM) z korekcją FDR dla wielokrotnych porównań.

Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno w grupie leczonej pektyną, jak i w grupie otrzymującej antybiotyki, doszło do istotnego i porównywalnego zmniejszenia nasilenia objawów klinicznych zapalenia wymienia. Poprawa stanu klinicznego była widoczna już po 48 godzinach od rozpoczęcia leczenia, co wskazuje na szybkie działanie terapeutyczne obu zastosowanych schematów. Równolegle zaobserwowano istotny spadek liczby komórek somatycznych w mleku, przy czym nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami, co sugeruje podobną skuteczność terapii pektyną i leczenia antybiotykowego w zakresie redukcji stanu zapalnego w wymieniu.

Analiza wyników badań bakteriologicznych wykazała porównywalne odsetki wyleczeń mikrobiologicznych w obu grupach terapeutycznych. Najczęściej izolowanymi

drobnoustrojami były bakterie środowiskowe, w tym *Streptococcus uberis*, gronkowce koagulazo-ujemne oraz *Escherichia coli*, co jest zgodne z aktualnym profilem etiologicznym klinicznych postaci mastitis w stadach mlecznych. Istotne z punktu widzenia praktycznego jest to, że zastosowanie pektyny nie wiązało się z pogorszeniem skuteczności leczenia w porównaniu ze standardową terapią antybiotykową. Terapia pektyną została również oceniona jako bezpieczna. W trakcie badania nie obserwowano podrażnień miejscowych w obrębie strzyków ani objawów ogólnych u leczonych krów. Nie stwierdzono negatywnego wpływu terapii na wydajność mleczną ani istotnych zmian w parametrach hematologicznych i biochemicznych krwi, co potwierdza dobrą tolerancję zastosowanego preparatu. Brak istotnych zmian stężenia TNF- α w mleku pomiędzy grupami dodatkowo sugeruje, że terapia pektyną nie wywoływała nadmiernej odpowiedzi zapalnej i działała w sposób porównywalny do leczenia antybiotykowego.

Podsumowując, wyniki badania wskazują, że dowymieniowa terapia 10-procentowym roztworem pektyny jest bezpieczna, dobrze tolerowana i wykazuje skuteczność kliniczną oraz bakteriologiczną porównywalną z konwencjonalnym leczeniem antybiotykowym u krów z klinicznym zapaleniem wymienia o łagodnym i umiarkowanym przebiegu. Uzyskane dane potwierdzają potencjał pektyny jako alternatywnej metody terapeutycznej, która może przyczynić się do ograniczenia stosowania antybiotyków w leczeniu mastitis, redukcji ryzyka powstawania oporności drobnoustrojów oraz eliminacji problemu pozostałości leków w mleku. Choć badanie miało charakter pilotażowy, jego wyniki stanowią istotną przesłankę do dalszych, szerzej zakrojonych badań klinicznych oraz do rozważenia praktycznego zastosowania pektyny w programach racjonalnej terapii i profilaktyki zapalenia wymienia w stadach bydła mlecznego

Wyniki badania potencjału terapeutycznego oraz tolerancji miejscowej moryny po podaniu dowymieniowym

Badanie oceniało skuteczność moryny – naturalnego flawonoidu o działaniu przeciwzapalnym – w terapii klinicznego mastitis wywołanego przez *Escherichia coli* i *Streptococcus uberis* u krów mlecznych, w porównaniu ze standardowym leczeniem antybiotykowym oraz placebo (PBS). Do doświadczenia włączono 48 krów z umiarkowanym mastitis, które losowo przydzielono do trzech grup: Badania (Moryna), Kontrolna (antybiotyk do wymieniowy) oraz PBS. Wyjściowe wartości SCC były porównywalne między ćwiartkami zakażonymi *E. coli* (średnia 7,27; 95% CI: 7,16–7,39) a tymi zakażonymi *S. uberis* (średnia 6,94; 95% CI: 6,78–7,11), co wskazuje, że grupy lecznicze w obu typach infekcji rozpoczynały od podobnego, związanego z chorobą poziomu wyjściowego.

U krów zakażonych *E. coli* dynamika SCS (Somatic Cell Score) różniła się między grupami. W grupie kontrolnej wartości pozostawały bliskie poziomowi wyjściowemu aż do 6. dnia, kiedy zaobserwowano gwałtowny i istotny spadek w 144 h ($p < 0,001$, średnia: 5,953, 95% CI: 5,059–6,846, ES: –2,103) oraz w 168 h ($p < 0,001$, średnia: 5,752, 95% CI: 5,063–6,441, ES: –2,422). W grupie PBS nie odnotowano istotnych zmian w żadnym punkcie czasowym (wszystkie $p > 0,05$, średnia w 168 h: 7,483, 95% CI: 7,205–7,762). W grupie badanej wartości SCS pozostawały porównywalne z poziomem wyjściowym przez pierwsze pięć dni leczenia (24–120 h), jednak później pojawił się stopniowy spadek. W 14 h ($p = 0,008$, średnia: 6,364, 95% CI: 5,738–6,989, ES: –1,449) oraz w 168 h ($p = 0,023$, średnia: 5,953, 95% CI: 5,059–6,846, ES: –1,263) wartości SCS w grupie badanej były istotnie niższe w porównaniu z poziomem wyjściowym. Porównania między grupami wykazały brak różnic w fazie wczesnej (0–120 h). Jednak w 144 h grupa PBS miała wyższe SCS niż zarówno grupa kontrolna, jak i badana, a w 168 h wszystkie grupy różniły się między sobą. Wyniki te wskazują, że grupa, w której podawana była moryna, podobnie jak grupa kontrolna, skutecznie obniżała SCS w zapaleniu wymienia wywołanym przez *E. coli*.

W ćwiartkach zakażonych *S. uberis* grupa kontrolna wykazywała stopniowy i konsekwentny spadek wartości SCS, z istotnymi redukcjami obserwowanymi od 48 h ($p = 0,025$, średnia: 6,274, 95% CI: 5,394–7,154, ES: –1,110) i utrzymującymi się w okresie 96–168 h (wszystkie $p = 0,033$, średnia w 168 h: 7,483, 95% CI: 7,205–7,762, ES: –1,044).

W grupie PBS nie odnotowano spójnej poprawy – jedynie przejściowy, nieistotny wzrost SCS w 96 h ($p = 0,086$), a wszystkie pozostałe punkty czasowe pozostawały porównywalne z poziomem wyjściowym. W grupie Moryna nie wykryto istotnych zmian względem wartości początkowych w ciągu pierwszych 6 dni (144 h), jednak pod koniec okresu obserwacji pojawiła się tendencja spadkowa, osiągając późny, niewielki spadek z trendem w 168 h ($p < 0,076$, średnia: 6,400, 95% CI: 5,797–7,004). Porównania między grupami wskazały, że grupa otrzymująca PBS konsekwentnie wykazywała wyższe wartości SCS niż grupa kontrolna od 48h (48–168 h) doświadczenia. Analiza po randomizacji (globalny test dokładny Fishera) potwierdziła, że wartości Score mierzone w punkcie czasowym 0 h również nie różniły się istotnie między grupami, zarówno w podgrupach *E. coli*, jak i *S. uberis*, co zapewnia równowagę wartości wyjściowych przed rozpoczęciem leczenia. Co istotne, wynik 3 nie został odnotowany u żadnego zwierzęcia w żadnym punkcie czasowym w którejkolwiek grupie. U krów zakażonych *E. coli* w grupie kontrolnej wyniki kliniczne istotnie zmniejszyły się od 48 h ($p = 0,003$), z utrzymującą się i wyraźną redukcją obserwowaną w okresie 96–168 h (wszystkie $p < 0,001$). W grupie Moryna poprawa była widoczna już w 48 h ($p = 0,024$) i pozostawała istotna przez cały okres od 3. do 7. dnia ($p \leq 0,011$). Natomiast w grupie PBS nie odnotowano istotnych zmian w porównaniu z wartością wyjściową w żadnym punkcie czasowym (wszystkie $p > 0,05$). U krów zakażonych *S. uberis* w grupie kontrolnej nie wykryto istotnych różnic względem wartości wyjściowych aż do 6. dnia, kiedy wyniki znacząco spadły w 144 h i 168 h (oba $p = 0,005$). W grupie Moryna istotna redukcja pojawiła się w 96 h ($p = 0,038$), nasiliła się w 144 h i utrzymała w 168 h (oba $p < 0,001$). Natomiast w grupie PBS nie odnotowano istotnych zmian w porównaniu z wartością wyjściową w żadnym punkcie czasowym (wszystkie $p > 0,05$).

Nie zaobserwowano żadnych miejscowych reakcji niepożądanych związanych z leczeniem, takich jak podrażnienie strzyków, zwiększona wrażliwość na ból czy nieprawidłowy wygląd mleka poza zmianami związanymi z mastitis, w żadnej grupie. Nie stwierdzono istotnych różnic w wydajności mleka przed i po leczeniu w żadnej grupie. Analiza RT-qPCR po zakończeniu leczenia wykazała obecność *S. uberis* w mleku ze wszystkich trzech grup, natomiast *E. coli* nie była już wykrywana w żadnej próbce mleka w żadnej grupie.

Potwierdzenie lub wykluczenie interakcji farmakodynamicznej w przypadku równoczesnego podania trzech substancji czynnych: kwercetyny, moryny i pektyny oraz potwierdzenie lub wykluczenie wpływu na efekt terapeutyczny

Badanie oceniało skuteczność terapii kombinacji trzech substancji czynnych: kwercetyny, moryny i pektyny (PMQ) w terapii mastitis wywołanego przez *Escherichia coli* i *Streptococcus uberis* u krów mlecznych, w porównaniu ze standardowym leczeniem antybiotykowym (PC) oraz placebo (NC). W grupie NC (kontrola negatywna) SCS pozostawał stabilny przez cały okres obserwacji i nie odnotowano istotnych odchyżeń od poziomu początkowego w żadnym punkcie czasowym ($P > 0,05$ dla wszystkich porównań). W przeciwieństwie do tego, obie grupy leczone (PC i PMQ) wykazały znaczące obniżenie SCS począwszy od 72 godzin ($P < 0,01$ do $P < 0,001$) oraz dalszy spadek aż do 168 godzin.

Porównania międzygrupowe nie wykazały istotnych różnic pomiędzy grupami w początkowym okresie obserwacji (0–96 h). W 120 godzinie grupa PC różniła się od NC ($P < 0,05$). W 144 i 168 godzinie zarówno grupa PC, jak i PMQ charakteryzowały się istotnie niższymi wartościami SCS względem NC ($P < 0,05$), przy czym nie było różnic pomiędzy PC a PMQ. Nasilenie procesu zapalnego wymienia na początku badania (0 h) nie różnił się istotnie pomiędzy grupami leczonymi, co potwierdza ich porównywalność przed rozpoczęciem interwencji ($P > 0,05$, test dokładny Fishera). W grupie NC nie zaobserwowano istotnych zmian nasilenia objawów mastitis przez 168 godzin obserwacji – stan zapalny utrzymywał się na poziomie wyjściowym. Z kolei w obu grupach leczonych odnotowano istotną poprawę. W grupie PC znaczące obniżenie punktacji pojawiło się od 72 godzin ($P < 0,01$) i utrzymywało się do końca badania ($P < 0,001$). W grupie PMQ odpowiedź wystąpiła wcześniej, z bardzo istotną poprawą już od 72 godzin ($P < 0,001$), utrzymującą się przez cały okres obserwacji. Przewidywania populacyjne z modelu CLMM obrazują te zmiany w czasie.

Przewidywane prawdopodobieństwo utrzymywania się stanu zapalnego (wynik ≥ 1) pozostawało stabilne i bardzo wysokie w grupie NC (~97–99%) przez cały okres, co jest zgodne z nieleczonym zakażeniem. Obie grupy leczone wykazywały stopniowy spadek prawdopodobieństwa zapalenia w czasie. W grupie PC wartość ta zmniejszyła się z 95,5%

na początku do 45,0% w 168 godzinie, co stanowi 53% redukcję. W grupie PMQ obserwowano podobny trend: spadek z 96,1% do 64,1% (redukcja o 33%). Warto zauważyć, że grupa PC osiągnęła niższe końcowe prawdopodobieństwo stanu zapalnego niż PMQ, choć obie wykazały znaczną poprawę względem grupy nieleczonej. Szerokie przedziały ufności (CI 95%) w grupach leczonych wraz z upływem czasu odzwierciedlają wzrastającą heterogeniczność odpowiedzi na terapię – część zwierząt osiągnęła całkowite wyleczenie, podczas gdy u innych utrzymywały się objawy umiarkowanego zapalenia.

Dyskusja

Przeprowadzone badanie jest jednym z nielicznych eksperymentalnych prac oceniających skuteczność zastosowania terapii do wymieniowej pektyny oraz flawonoidów u krów mlecznych w warunkach produkcyjnych. Dotychczasowe publikacje koncentrowały się głównie na badaniach *in vitro*, natomiast dane dotyczące ich miejscowego zastosowania w leczeniu mastitis są bardzo ograniczone. W tym eksperymencie skuteczność substancji naturalnych porównano po raz pierwszy z terapią antybiotykową, co czyni to badanie ważnym punktem wyjścia do dalszych badań klinicznych i praktycznych. Mastitis to złożona choroba a jej rozwój obejmuje przewód pokarmowy, metabolity drobnoustrojów, mikrobiotę i niedobory żywieniowe. Utrwalone postrzeganie mastitis wyłącznie jako infekcji egzogennej jest niepełne, ponieważ coraz więcej dowodów wskazuje na istnienie osi łączącej zdrowie jelit i gruczołu mlekowego.

Standardowe terapie mastitis opierają się głównie na antybiotykach podawanych do wymienia lub systemowo. Choć antybiotyki są skuteczne przeciwko typowym patogenom mastitis, ich nadużywanie niesie ryzyko oporności drobnoustrojów i wymaga ścisłego przestrzegania okresów karencji mleka. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie alternatywnymi terapiami mastitis, które ograniczają stosowanie antybiotyków. W niniejszym badaniu, przeprowadzonym w rzeczywistych warunkach fermi mlecznej, przetestowano trzy różne opcje stosując samodzielnie pektynę, morynę lub kombinacje pektyn, moryny oraz kwercetyny. Analizowano zmiany kliniczne, SCC, parametry krwi i biochemiczne między grupą otrzymującą badaną substancję a grupą kontrolną leczoną standardowym preparatem wieloskładnikowym. Preparat w grupie kontrolnej zawierał kombinację kilku substancji czynnych o szerokim spektrum działania przeciw typowym patogenom mastitis. W kontekście problemów związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz koniecznością przestrzegania okresów karencji mleka, celem badania była ocena alternatywnej, nie antybiotykowej terapii mastitis z wykorzystaniem pektyn oraz flawonoidów. Warto wspomnieć, że użyty komercyjny preparat antybiotykowy stanowi dobrze ugruntowany standard w leczeniu mastitis. Uzyskanie efektu terapeutycznego przy zastosowaniu środka nie antybiotykowego potwierdza potencjał pektyn i flawonoidów jako alternatywnej strategii leczenia.

Wyniki sugerują, że stosowanie roztworu pektyn oraz flawonoidów może być porównywalne ze stosowaniem antybiotyków, chociaż wymaga to potwierdzenia w badaniach o większej mocy statystycznej. Szybsza regresja objawów klinicznych obserwowana w grupie pektynowej wskazuje, że pektyny mogą skutecznie modulować odpowiedź zapalną w wymieniu a objawy kliniczne ustępowały średnio o 1,6 dnia wcześniej niż w grupie kontrolnej ($p < 0.05$).

Obiektywnym potwierdzeniem dynamiki przebiegu procesu zapalnego była analiza zmian liczby komórek somatycznych (SCC). Wyższe SCC oznacza silniejszą odpowiedź zapalną i większą infiltrację leukocytów. W badaniu stwierdzono znacznie szybszy spadek SCC w grupie leczonej pektyną niż w grupie kontrolnej a już 48 godzin po rozpoczęciu leczenia średnie SCC spadało wyraźniej niż w grupie antybiotykowej (różnice od 2. dnia były statystycznie istotne). Oznacza to szybsze ustępowanie stanu zapalnego i wcześniejszy powrót do fizjologicznego stanu gruczołu.

Terapeutyczne efekty pektyny wynikają prawdopodobnie z wielu nakładających się mechanizmów. Pektyny, polisacharydy roślinne wykazują właściwości immunomodulacyjne, m.in. poprzez oddziaływanie z receptorami TLR2 i TLR4, co może tłumić kaskadę zapalną i prowadzić do łagodniejszego przebiegu choroby. Choć nie działają bezpośrednio bakteriobójczo, mogą wzmacniać mechanizmy obronne gospodarza i ograniczać uszkodzenia tkanek (41,43).

Opisano również ich działanie przeciwzapalne w badaniach u ludzi suplementacja pektyną cytrusową obniżała poziomy cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ), a zwiększała IL-10 (44). Podobne efekty obserwowano w modelach zwierzęcych (zapalenie jelit, alergii, zapalenie płuc) (45,46). Badania in vitro potwierdzają, że pektyny modulują aktywność komórek odpornościowych, m.in. zmniejszając produkcję cytokin i wolnych rodników.

Badania w modelach dermatologicznych i błon śluzowych wykazały, że hydrożele na bazie pektyny tworzą stabilne, bioadhezyjne warstwy, które chronią powierzchnie nabłonka, zmniejszając przepuszczalność transepitelialną i wspierają regenerację tkanek (47). Założyliśmy, że podobne żelowanie zachodzi w obrębie wymienia, umożliwiając pektynie pokrycie nabłonka, ograniczenie adhezji bakterii i wzmocnienie funkcji bariery. Może to częściowo tłumaczyć szybkie poprawy kliniczne i cytologiczne obserwowane w grupie leczonej pektyną. To podwójne działanie biologiczne i mechaniczne może wyjaśniać

korzystne wyniki kliniczne i cytologiczne, mimo zastosowania prostego 10% roztworu bez dodatkowych substancji czynnych. Ponadto pektyny i pokrewne polisacharydy są powiązane z procesami regeneracji tkanek, w tym aktywacją autofagii i naprawą nabłonka (48). Mechanizmy te mogły przyczynić się do szybszej stabilizacji funkcji gruczołu i potencjalnie niższego ryzyka nawrotu obserwowanego w tym badaniu.

Podsumowując, zaobserwowana skuteczność pektyny wydaje się wynikać z synergicznego połączenia efektów immunomodulacyjnych, tworzenia bariery fizycznej oraz wsparcia dla naprawy tkanek. Ten wielopoziomowy mechanizm działania może oferować istotne korzyści w porównaniu z konwencjonalnymi terapiami, które koncentrują się wyłącznie na eliminacji patogenów, szczególnie w obliczu rosnącej presji na ograniczenie stosowania antybiotyków w produkcji mleka. Uzyskane dane stanowią solidną podstawę do planowania badań na większą skalę. Pektyna może okazać się bezpieczną i skuteczną alternatywą lub uzupełnieniem terapii mastitis, wspierając wysiłki na rzecz redukcji stosowania antybiotyków w medycynie weterynaryjnej. Jej potencjalne korzyści ekonomiczne brak okresu karencji mleka i mniej ograniczeń w sprzedaży mleka dodatkowo zwiększają jej atrakcyjność w praktyce hodowlanej.

Ważnym spostrzeżeniem był brak działań niepożądanych związanych z terapią pektyną w trakcie badania. Żadna z krów, które otrzymywały 10% roztwór pektyny do wymienia przez 7 dni, nie wykazywała oznak miejscowego podrażnienia w leczonych ćwiartkach (np. zwiększonego bólu, obrzęku niezwiązanego z infekcją czy wydzieliny sugerującej reakcję alergiczną) ani objawów ogólnych wskazujących na możliwą toksyczność. Nie stwierdzono istotnych zmian w profilach hematologicznych, co można przypisać umiarkowanemu charakterowi zapalenia i braku systemowego przesunięcia leukocytów typowego dla ostrego mastitis. Zastosowanie pektyny było dobrze tolerowane zarówno w trakcie, jak i po zakończeniu leczenia, a nie odnotowano żadnych nieprawidłowych zachowań ani zmian jakości mleka poza tymi związanymi z procesem zapalnym. Nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomach TNF- α w mleku między grupą badaną a grupą kontrolną. Brak wzrostu TNF- α w grupie badanej może odzwierciedlać kontrolowaną lokalną odpowiedź immunologiczną, zgodną z immunomodulacyjnymi właściwościami pektyny, które wspierają ustępowanie stanu zapalnego bez nadmiernej produkcji cytokin. Profil bezpieczeństwa jest zgodny z ogólną charakterystyką pektyn jako naturalnych substancji od dawna stosowanych w przemyśle farmaceutycznym. Pektyny są klasyfikowane jako błonnik pokarmowy i uznawane za bezpieczne; ponadto badania nad ich

stosowaniem w szczególnie wrażliwych populacjach (np. w mieszankach dla niemowląt) potwierdziły brak szkodliwego działania (43). Brak działań niepożądanych w niniejszym badaniu wskazuje, że podanie pektyny do wymienia nie stanowi zagrożenia dla zdrowia krów, a jednocześnie jest atrakcyjną alternatywą pod względem bezpieczeństwa żywności. W przeciwieństwie do antybiotyków, pektyny nie pozostawiają pozostałości w mleku i nie przyczyniają się do selekcji oporności drobnoustrojów. Ten aspekt bezpieczeństwa jest szczególnie istotny w kontekście działań na rzecz ograniczenia stosowania antybiotyków u zwierząt produkujących żywność. Ocena alternatywnych terapii do wymienia powinna uwzględniać nie tylko skuteczność kliniczną, ale także tolerancję miejscową i bezpieczeństwo stosowania. Pektyny, podobnie jak inne naturalne polisacharydy, wykazują doskonałą tolerancję miejscową w wymieniu. W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych nabłonka gruczołu mlekowego roztwory pektyny nie wykazywały cytotoksyczności, nawet przy wysokich stężeniach (49). Choć bezpośrednie doniesienia o podaniu pektyny do wymienia są ograniczone, doświadczenia z formułacjami żelowymi (np. hydroksypropylometyloceluloza, karboksymetyloceluloza, alginian) wskazują, że polisacharydy te nie uszkadzają tkanek strzyków i nie indukują stanu zapalnego w badaniach *ex vivo* (49). W praktyce klinicznej nie obserwowano podrażnień ani dyskomfortu u krów po zastosowaniu roztworów pektyny, co jest zgodne ze statusem GRAS (Generally Recognized As Safe) pektyn powszechnie stosowanych w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym (50). Wysoki profil bezpieczeństwa potwierdza, że 10% roztwór pektyny może być bezpiecznie stosowany do wymienia, minimalizując ryzyko działań niepożądanych. Z perspektywy praktyki klinicznej niezwykle istotne są właściwości farmakokinetyczne pektyn po podaniu do wymienia. Polisacharydy podane do wymienia nie przedostają się do krążenia systemowego i pozostają głównie w tkance wymienia, co eliminuje obawy dotyczące pozostałości w mleku i konieczności stosowania okresów karencji.

Pektyny są lokalnie biodegradowalne przez enzymy (np. lizozym) lub fagocytowane przez makrofagi, a ewentualna śladowa obecność w mleku nie wpływa negatywnie na jego skład (laktoza, tłuszcz, białko) ani cechy organoleptyczne (51). W przeciwieństwie do antybiotyków, pektyny nie podlegają ograniczeniom poziomu pozostałości, ponieważ są klasyfikowane jako rozpuszczalny błonnik pokarmowy ze statusem GRAS. Farmakokinetyka pektyn w wymieniu charakteryzuje się szybkim przekształceniem roztworu w hydrożel, przedłużonym utrzymaniem *in situ* i minimalnym wchłanianiem

systemowym. Zapewnia to skoncentrowany, długotrwały efekt miejscowy bez ryzyka toksyczności ogólnoustrojowej (50).

Badania dotyczące skuteczności moryny przeprowadzono wobec dwóch głównych patogenów wywołujących kliniczne zapalenie wymienia (4). Jednak mastitis spowodowany przez te patogeny różni się pod względem patogenezą. Mastitis wywołane przez *E. coli* wiąże się z zapaleniem indukowanym endotoksynami, w którym terapia antybiotykowa nie jest konieczna; główny nacisk kładzie się na leczenie przeciwzapalne (52). Natomiast mastitis spowodowane przez *S. uberis* obejmuje kolonizację wymienia, dlatego terapia przeciwdrobnoustrojowa jest niezbędna (6,8).

Wyniki niniejszego badania dowodzą, że skuteczność terapeutyczna moryny w leczeniu mastitis zależała od czynnika etiologicznego i była ogólnie niższa niż w przypadku standardowej terapii antybiotykowej. Zaobserwowano wyraźne różnice w przebiegu mastitis wywołanego przez *E. coli* i *S. uberis*. Zakażenia *E. coli* charakteryzowały się szybkim i wyraźnym wzrostem SCC, podczas gdy *S. uberis* częściej prowadzi do postaci podostrej lub przewlekłej z łagodniejszymi objawami klinicznymi i utrzymującym się podwyższonym SCC.

W zakażeniach *E. coli* poprawa kliniczna pojawiała się stosunkowo wcześnie (48–72 h), natomiast redukcja SCC następowała dopiero po kilku dniach. Ta rozbieżność między ustępowaniem objawów klinicznych a normalizacją SCC jest typowa dla takich infekcji, gdzie poprawa kliniczna zazwyczaj wyprzedza odpowiedź komórkową w gruczole mlekowym. W grupie leczonej antybiotykiem objawy kliniczne ustępowały szybciej niż w grupie moryny, szczególnie w pierwszych dniach po zakażeniu *E. coli*. Krowy otrzymujące terapię konwencjonalną wykazywały wcześniejsze zmniejszenie obrzęku i zaczerwienienia ćwiartki. W grupie moryny również obserwowano stopniową poprawę kliniczną, ale zmiany następowały wolniej.

Podobny wzorzec odnotowano w analizie SCC w zakażeniach *E. coli* liczba komórek somatycznych w mleku spadała do wartości zbliżonych do normy w grupie antybiotykowej pod koniec pierwszego tygodnia leczenia. U krow leczonej moryną SCC pozostawał podwyższony przez dłuższy czas, co wskazuje na wolniejszą normalizację odpowiedzi zapalnej. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, że w colimastitis poprawa kliniczna często wyprzedza normalizację parametrów mleka. W takich przypadkach ograniczenie stosowania antybiotyków wpisuje się w obecne trendy racjonalizacji terapii

przeciwdrobnoustrojowej. W zakażeniach wywołanych przez patogeny Gram-ujemne można rozważyć ograniczenie antybiotyków na rzecz leczenia wspomagającego, zgodnie z koncepcją One Health i działaniami na rzecz zmniejszenia presji selekcyjnej oporności. W mastitis spowodowanym przez *E. coli* obraz kliniczny zwykle odzwierciedla gwałtowną ogólnoustrojową reakcję zapalną: krowy często wykazują wysoką gorączkę, apatię, brak apetytu, sporadyczną biegunkę oraz objawy endotoksemii lub wstrząsu (53). Jednak *E. coli* może również powodować łagodne zapalenie ograniczone do jednej ćwiartki (4). Badania wskazują, że kliniczne mastitis wywołane przez *E. coli* najczęściej objawia się krótkim, pojedynczym szczytem SCC na krzywej laktacji (54), natomiast mastitis spowodowane przez *S. uberis* zwykle ma łagodniejszy i bardziej przewlekły przebieg. *S. uberis* rzadziej wywołuje ciężką reakcję ogólnoustrojową z gorączką. Ogólnie jego przebieg kliniczny jest łagodniejszy i bardziej wydłużony niż w ostrym colimastitis (55,56). W zakażeniach *S. uberis* zmiany SCC są bardziej zmienne i długotrwałe. *S. uberis* może powodować zarówno ostre mastitis (ze skokiem SCC podobnym do innych patogenów), jak i infekcje podkliniczne utrzymujące podwyższone SCC przez dłuższy czas (54). Ogólnie patogeny Gram-dodatnie (streptokoki, gronkowce) częściej powodują utrzymujące się, przewlekłe podwyższenie SCC, podczas gdy infekcje Gram-ujemne (np. *E. coli*) zwykle skutkują krótkotrwałymi skokami SCC związanymi z ostrym epizodem zapalenia (56).

W niniejszym badaniu oceniano ostre kliniczne mastitis środowiskowe wywołane przez *E. coli* i *S. uberis*. Infekcje te są zwykle napędzane szybką reakcją zapalną i często wykazują spontaniczne wyleczenie kliniczne, szczególnie w przypadku *E. coli*, gdy zapalenie jest odpowiednio kontrolowane poprzez częste dojenie i leczenie wspomagające. Natomiast mastitis spowodowane przez *S. aureus* jest klasyfikowane jako zakaźne, a nie środowiskowe, zwykle ma charakter przewlekły i związany z biofilmem, a spontaniczne wyleczenie jest rzadkie ze względu na wewnątrzkomórkową persystencję bakterii. Dlatego strategie leczenia i oczekiwane wyniki kliniczne różnią się znacząco między tymi grupami patogenów.

Nasze obserwacje z niniejszego eksperymentu odzwierciedlają dobrze znane różnice między infekcjami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi, przy czym *S. uberis* częściej występuje jako mastitis podostre lub przewlekłe. Terapia antybiotykowa skutkowała stopniowym i systematycznym spadkiem SCS, a poprawa kliniczna następowała równolegle. Kontrolny antybiotyk IMM był terapią skojarzoną obejmującą zarówno patogeny Gram-ujemne (*E. coli*), jak i Gram-dodatnie (*S. uberis*), w tym tetracyklinę,

neomycynę i bacytracynę, z prednizolonem w celu zmniejszenia stanu zapalnego. Odzwierciedla to standardową praktykę weterynaryjną w leczeniu klinicznego mastitis. Profile wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe w polskich stadach mlecznych pokazują, że *S. uberis* pozostaje wysoce wrażliwy na terapię opartą na bacytracynie, wykazując jednocześnie oporność na aminoglikozydy, takie jak neomycyna (8). To dobrze koreluje z zastosowanym w naszym badaniu antybiotykiem skojarzonym, gdzie bacytracyna prawdopodobnie przyczyniła się do lepszej eliminacji *S. uberis*. W przypadku *E. coli* wrażliwość na neomycynę jest zmienna co może tłumaczyć, dlaczego przewaga antybiotyku nad moryną była mniej wyraźna w przypadku mastitis coliformowego.

Wyniki odzwierciedlają charakterystyczny przebieg mastitis paciorkowcowego, który cechuje się długotrwałym podwyższeniem SCC. Leczenie moryną prowadziło do poprawy klinicznej; jednak redukcja SCC była wyraźnie wolniejsza i mniej zaznaczona niż w grupie antybiotykowej, co wskazuje na ograniczoną skuteczność tego związku wobec zakażeń paciorkowcowych. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, że *S. uberis* ma dużą zdolność do utrzymywania się w tkance gruczołu mlekowego i wymaga celowanej terapii antybiotykowej (56). W przypadku *S. uberis* różnice między grupami były mniej wyraźne, co odzwierciedla łagodniejszy, przewlekły charakter tych infekcji. Niemniej jednak terapia antybiotykowa prowadziła do szybszej poprawy miejscowych objawów zapalnych i bardziej wyraźnego spadku SCC w porównaniu z leczeniem moryną. W grupie moryny u części krów utrzymywał się podwyższony SCC aż do końca okresu obserwacji. Wyniki te sugerują, że choć moryna wspiera łagodzenie objawów zapalnych, jej skuteczność w eliminacji infekcji jest niższa niż w przypadku standardowej terapii antybiotykowej, szczególnie w mastitis wywołanym przez *S. uberis*.

Porównanie naszych wyników z doniesieniami literaturowymi z ostatnich lat potwierdza wiele zaobserwowanych wzorców. Po pierwsze, leczenie mastitis wywołanego przez *E. coli* stanowi szczególny przypadek w praktyce weterynaryjnej. Wykazano, że w łagodnych i umiarkowanych postaciach zapalenia spowodowanego przez pałeczki Gram-ujemne odsetek spontanicznych wyleczeń jest wysoki, a terapia antybiotykowa nie zawsze znacząco zwiększa odsetek wyleczeń w porównaniu z brakiem leczenia. Na przykład w badaniach klinicznych mastitis na tle *E. coli* w wielu przypadkach nie stwierdzono różnicy w odsetku wyleczeń bakteriologicznych między krowami otrzymującymi antybiotyki a nieleczonymi. Gwałtowna i silna odpowiedź zapalna indukowana przez *E. coli* często prowadzi do eliminacji bakterii przez układ odpornościowy jeszcze przed zadziałaniem

antybiotyku (57). Z drugiej strony istnieją również doniesienia wskazujące na korzyści z terapii antybiotykowej w mastitis coliformowym. Schukken i wsp. zaobserwowali wyższy odsetek wyleczeń *E. coli* u krów leczonych antybiotykami (89%) w porównaniu z nieleczonymi (53%), choć autorzy podkreślili ograniczoną liczebność próby i potrzebę dalszych badań (58).

W naszym eksperymencie w grupie moryny wiele przypadków *E. coli* zostało skutecznie opanowanych, co jest zgodne z powyższymi obserwacjami dotyczącymi wysokiej tendencji do spontanicznego wyleczenia infekcji koliformowych. Prawdopodobnie moryna, dzięki działaniu przeciwzapalnemu, stworzyła warunki wspierające mechanizmy obronne krowy w zwalczaniu infekcji. Literatura podkreśla znaczenie terapii wspomagającej w takich sytuacjach. Gdy antybiotyki nie poprawiają rokowania (z powodu wysokiego odsetka spontanicznych wyleczeń lub oporności bakterii), leczenie objawowe staje się kluczowe (59). W praktyce klinicznej przejawia się to m.in. rosnącym stosowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w leczeniu mastitis. Według najnowszego przeglądu w Danii aż 72% lekarzy weterynarii stosuje wyłącznie leczenie przeciwzapalne bez antybiotyków w łagodnych przypadkach mastitis wywołanego przez patogeny Gram-ujemne (1,60). NLPZ, takie jak fluniksyna czy meloksykam, obniżają gorączkę i ból oraz łagodzą skutki endotoksemii w mastitis coliformowym, co często wystarcza, aby poprawić stan krowy i umożliwić układowi odpornościowemu eliminację patogenów (1).

Nasze wyniki dla *E. coli* (gdzie moryna wykazała skuteczność kliniczną porównywalną z antybiotykami w przypadkach umiarkowanie ciężkich) są zatem zgodne z trendem ograniczania stosowania antybiotyków w mastitis Gram-ujemnym przy jednoczesnym stosowaniu intensywnej terapii przeciwzapalnej. Z drugiej strony sytuacja jest inna w przypadku patogenów Gram-dodatnich. Środowiskowe paciorkowce, takie jak *S. uberis*, choć zdolne do wywoływania mastitis o różnym nasileniu (od podklinicznego do ciężkiego), są znane z niskiej tendencji do spontanicznej eliminacji z gruczołu mlekowego. Infekcje te często wymagają aktywnej interwencji, ponieważ bakterie Gram-dodatnie mogą ukrywać się w tkance gruczołu, tworzyć biofilm i utrzymywać się przez długi czas. Pozyskane dane potwierdzają, że standardowa terapia antybiotykowa (działająca bakteriobójczo wobec *S. uberis*) była znacznie skuteczniejsza w eliminacji infekcji niż poleganie wyłącznie na immunomodulacyjnym działaniu moryny. Piśmiennictwo fachowe donosi o przewagach leczenia antybiotykowego w mastitis wywołanym przez paciorkowce.

Badania porównawcze wykazały istotnie wyższe wskaźniki wyleczeń bakteriologicznych w grupach leczonych antybiotykami w porównaniu z grupami nieleczonymi lub placebo (57). Ponadto brak skutecznego leczenia infekcji paciorkowcowej niesie ryzyko przejścia w formę podkliniczną z przewlekłym podwyższeniem SCC, co zaobserwowaliśmy u części krów otrzymujących morynę. Dlatego nasze wyniki nie są sprzeczne z obecnymi zaleceniami, lecz je potwierdzają. *S. uberis* pozostaje patogenem, którego skuteczne leczenie trudno jest zastąpić bez antybiotyków, choć w przyszłości ich połączenie z terapiami wspomagającymi (np. z użyciem substancji takich jak moryna) może poprawić wyniki leczenia.

Możliwym wyjaśnieniem zaobserwowanych różnic jest odmienny mechanizm działania moryny w porównaniu z antybiotykami i wynikające z tego ograniczenia. Antybiotyk zastosowany w naszym badaniu działał bezpośrednio bakteriobójczo, szybko redukując populację *E. coli* lub *S. uberis* w gruczole mlekowym. Natomiast moryna nie jest środkiem przeciwdrobnoustrojowym. Ograniczone zahamowanie obserwowane in vitro jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że jej główny mechanizm działania polega na modulacji odpowiedzi zapalnej gospodarza, a nie na bezpośredniej aktywności przeciwbakteryjnej. Jako naturalny związek flawonoidowy moryna wykazuje udokumentowane właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne, przy czym jej wpływ na szlaki odpornościowe i zapalne gospodarza wydaje się kluczowy w kontekście mastitis. To uzasadnia ocenę moryny jako terapii wspomagającej, a nie leczniczej w mastitis (61).

Modele eksperymentalne wykazały, że moryna może znacząco hamować nadmierne reakcje zapalne indukowane przez endotoksyny lub bakterie. Jiang i wsp. wykazali w mysim modelu mastitis indukowanego LPS (lipopolisacharyd *E. coli*), że podanie moryny zmniejszało zmiany patologiczne w gruczole mlekowym. Ograniczało obrzęk i infiltrację neutrofili oraz istotnie obniżało ekspresję cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β , IL-6) i chemokin (CCL2, CXCL2) w tkance (61). Jednocześnie moryna modulowała kluczowe szlaki sygnałowe komórek: hamowała fosforylację czynników transkrypcyjnych NF- κ B (podjednostka p65) i kinaz MAPK (ERK1/2, p38), a także zmniejszała aktywację inflammasomu NLRP3 (61). Efekty te przekładały się na ograniczenie produkcji mediatorów zapalnych i ochronę komórek gruczołu przed uszkodzeniami spowodowanymi reakcją immunologiczną. Co istotne, moryna wykazała również zdolność stabilizacji bariery krew–mleko. W obecności moryny nie dochodziło do spadku poziomu białek połączeń ścisłych (claudina-3, okludyna) w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego (61).

Zachowanie integralności połączeń ścisłych zapobiega nadmiernej przepuszczalności naczyń i przenikaniu składników krwi do mleka, a także może ograniczać translokację toksyn bakteryjnych (np. endotoksyny *E. coli*) do krążenia ogólnoustrojowego (61). W kontekście klinicznym przekłada się to na niższe ryzyko ostrej reakcji ogólnoustrojowej (toksemii) u leczonych zwierząt. Mechanizmy te wyjaśniają, dlaczego w naszym badaniu krowy otrzymujące morynę wykazywały łagodniejsze objawy zapalne niż można by oczekiwać w nieleczonym mastitis. Choć moryna nie eliminowała patogenów, hamowała nadmierną odpowiedź immunologiczną, zmniejszając szkodliwe skutki zapalenia, a jednocześnie – jak sugerują cytowane badania – nie całkowicie upośledzała mechanizmy obronne odpowiedzialne za eliminację patogenów. Takie działanie immunomodulacyjne może być szczególnie korzystne w zakażeniach *E. coli*, gdzie intensywna reakcja zapalna i związana z nią endotoksemia odpowiadają za większość objawów klinicznych. W przypadku *S. uberis* zmniejszenie nasilenia zapalenia (wynikające z działania moryny) również przynosiło ulgę tkankom i obniżało SCC, ale nie gwarantowało eliminacji bakterii, ponieważ patogeny te mogą utrzymywać się w gruczole mlekowym nawet w obecności antybiotyku.

Warto zauważyć, że badania nad podobnymi związkami roślinnymi (np. cynarazoid C z *Cynanchum atratum*) wykazały porównywalne efekty, takie jak hamowanie szlaków NF- κ B/MAPK i łagodzenie objawów mastitis w modelach eksperymentalnych (61). Moryna zatem wpisuje się w szerszy kontekst poszukiwania naturalnych inhibitorów odpowiedzi zapalnej, które mogłyby wspierać leczenie mastitis.

Przy omawianiu wyników niniejszego badania należy uwzględnić pewne ograniczenia. Po pierwsze, liczebność próby była stosunkowo mała, co zmniejsza moc statystyczną i wymaga ostrożności przy uogólnianiu wniosków na całą populację krów. Po drugie, eksperyment został zaprojektowany jako krótkoterminowe badanie typu proof-of-concept, mające na celu ocenę wczesnej poprawy klinicznej i odpowiedzi zapalnej w ciągu pierwszych siedmiu dni od rozpoczęcia leczenia. Nie pozwala to na ocenę długoterminowych wskaźników nawrotów ani przewlekłych skutków, które powinny być uwzględnione w przyszłych badaniach. Kolejne ograniczenie dotyczy aspektów farmakologicznych. Moryna jest słabo rozpuszczalnym związkiem polifenolowym, co może ograniczać jej biodostępność. W naszym eksperymencie była podawana do wymienia; jednak farmakokinetyka i stężenia w tkance gruczołu mlekowego nie zostały określone. Nie można wykluczyć, że alternatywne drogi podania, wyższe dawki lub nowe formułacje

mogłyby poprawić skuteczność, co wymaga dalszych badań. Wreszcie, potrzebne są wielośrodkowe badania w warunkach fermowych, aby zweryfikować uzyskane wyniki na większą skalę i potwierdzić praktyczną przydatność moryny w terapii mastitis.

Pomimo tych ograniczeń uzyskane wyniki mają istotne implikacje dla praktyki weterynaryjnej i kierunków przyszłych badań. Po pierwsze, potwierdzają potencjał moryny jako środka łagodzącego przebieg mastitis. Może to znaleźć zastosowanie jako terapia wspomagająca, np. w połączeniu z antybiotykiem lub w wybranych przypadkach nawet jako alternatywa dla leczenia antybiotykowego. Jest to szczególnie istotne w mastitis wywołanym przez patogeny Gram-ujemne, gdzie – jak omówiono wcześniej – kluczowym wyzwaniem jest kontrola zapalenia i endotoksemii. Zgodnie z aktualnymi przeglądami rośnie presja na opracowanie terapii mastitis niezależnych od antybiotyków; jednak wiele z tych podejść wciąż nie ma w pełni udokumentowanej skuteczności klinicznej. Nasze badanie dostarcza nowych danych w tym obszarze, sugerując, że moryna może w przyszłości stać się wartościową opcją terapeutyczną w leczeniu mastitis. Intensywna opieka (terapia płynowa, częste dojenie) w połączeniu z podaniem moryny u krowy z umiarkowanym mastitis *E. coli* i decyzją lekarza weterynarii o wstrzymaniu antybiotyków mogłaby prowadzić do wyzdrowienia przy mniejszym obciążeniu ogólnoustrojowym i bez generowania okresu karencji mleka, co ma zarówno znaczenie ekonomiczne, jak i zdrowotne. Ponadto brak wykrywalnych miejscowych reakcji niepożądanych sugeruje, że podanie moryny do wymienia było dobrze tolerowane. Jednak dalsze badania powinny obejmować dodatkowe punkty bezpieczeństwa, takie jak wydajność mleka z ćwiartki i monitorowanie pod kątem subklinicznych uszkodzeń tkanek. Ogólnie rzecz biorąc, niniejsze wyniki przybliżają nas do tego celu, pokazując zarówno potencjał, jak i wyzwania związane z zastosowaniem moryny w medycynie weterynaryjnej.

Należy podkreślić, że badanie przeprowadzono w warunkach komercyjnej fermy z ciągłym monitoringiem na miejscu. Choć wstępne, dane *in vivo* potwierdzają skuteczność w rzeczywistych warunkach narażenia na patogeny środowiskowe i wieloczynnikowe stresory (np. obciążenie cieplne, wyzwania żywieniowe i okołoporodowe), obok czynników związanych z gospodarzem – takich jak podłoże genetyczne i regulacja epigenetyczna – które mogą modulować podatność na mastitis i odpowiedź na leczenie (62,63,64). Hipotetycznie moryna mogłaby również zwiększać efekt zmniejszonej dawki antybiotyku, ograniczając tym samym stosowanie chemioterapeutyków przy zachowaniu wysokiej skuteczności leczenia.

Zanim moryna będzie mogła wejść do praktycznego stosowania, potrzebne są dalsze badania. Idealnie powinny być prowadzone w warunkach mastitis o różnym nasileniu, wywołanego przez różne patogeny i u krów na różnych etapach laktacji, aby potwierdzić skuteczność moryny w zróżnicowanych scenariuszach. Takie badania powinny monitorować nie tylko parametry kliniczne i zapalne, ale także obejmować regularne posiewy mleka w trakcie i po terapii, aby jednoznacznie określić, czy moryna zapewnia wyleczenie bakteriologiczne. Przyszłe badania powinny również ustalić profil bezpieczeństwa moryny, w tym czy powoduje działania niepożądane u krów oraz czy ewentualne pozostałości w mleku są bezpieczne dla konsumentów. Jako naturalny związek polifenolowy moryna prawdopodobnie nie niesie takich samych zagrożeń jak antybiotyki (np. promowanie szczepów opornych czy pozostawianie szkodliwych pozostałości w żywności); jednak formalna ocena tych aspektów byłaby wymagana przed dopuszczeniem do stosowania. Kolejnym kierunkiem badań powinna być optymalizacja formulacji moryny.

Uzyskane wyniki wskazują, że terapia składająca się z trzech komponentów pektyna + moryna + kwercetyna (PMQ) była klinicznie skuteczna i porównywalna ze standardowym leczeniem antybiotykowym. Ponieważ bakteriologiczne wyleczenie było oceniane wyłącznie opisowo i bez wystarczającej mocy statystycznej do porównania, nie można wyciągać wniosków dotyczących eliminacji patogenów. W dyskusji skupiono się więc na klinicznym ustąpieniu objawów oraz dynamice zmian liczby komórek somatycznych (SCC), które były głównymi, zweryfikowanymi rezultatami badania. Zarówno grupa kontrolna, jak i PMQ wykazały istotne obniżenie klinicznych wskaźników zapalenia wymienia w ciągu 72 godzin od rozpoczęcia leczenia, po czym nastąpił znaczący spadek SCS w ciągu 96 godzin.

Wspomniane wcześniej w niniejszej dyskusji wykazały 100% skuteczność leczenia zarówno pektyną, jak i antybiotykami. W niniejszym badaniu zarówno grupa PMQ, jak i kontrolna osiągnęły porównywalną poprawę kliniczną. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wynikach klinicznych na żadnym etapie obserwacji. Jednocześnie grupa PMQ wykazywała tendencję do szybszego ustępowania objawów stanu zapalnego. W poprzednim badaniu z użyciem samej 10% pektyny objawy kliniczne ustępowały średnio o 1,6 dnia wcześniej niż w grupie antybiotykowej. Podobnie, w analizie SCC, wyraźny spadek liczby komórek somatycznych w grupie pektyny obserwowano po około 96 godzinach leczenia, podczas gdy w grupie antybiotykowej redukcja ta następowała dopiero po 120 godzinach. W naszej terapii PMQ zaobserwowano zbliżony trend, wskazujący na nieco szybszą normalizację parametrów w porównaniu z leczeniem antybiotykowym. Nie zaobserwowano

działań niepożądanych związanych z miejscową tolerancją preparatu PMQ, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami badań nad pektyną i moryną. Nie odnotowano oznak podrażnienia czy uszkodzenia tkanki wymienia po podaniu preparatu. Wydajność mleka po leczeniu była porównywalna w obu grupach, a brak antybiotyków eliminuje ryzyko obecności pozostałości leków oraz konieczność karencji. Sugeruje to, że terapia PMQ może być bezpieczną alternatywą, pozwalającą uniknąć ryzyka rozwoju oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz problemów z karencją mleka związanych z konwencjonalnym stosowaniem antybiotyków.

Analiza zmian SCS i obrazu klinicznego w bieżącym badaniu zwraca uwagę na różnice związane z etiologią zakażenia. Choć nasze badanie nie stratyfikowało wyników według patogenu, wcześniejsze badania wskazują, że mastitis wywołane przez *E. coli* charakteryzuje się szybkim, krótkotrwałym stanem zapalnym, podczas gdy zakażenia przez *S. uberis* prowokują bardziej przedłużony, podostry lub przewlekły przebieg, często skutkujący utrzymującym się podwyższonym. Według literatury, krowy z mastitis wywołanym przez *E. coli* często wykazują gwałtowny wzrost liczby leukocytów w mleku (szczyt SCC) w pierwszych dniach, który szybko opada wraz z ustępowaniem reakcji zapalnej (65,66). W przypadku *S. uberis* zmiany są zazwyczaj mniej gwałtowne, ale bardziej rozciągnięte w czasie. Nasze wyniki odzwierciedlają ten schemat: poprawa kliniczna pojawiała się wcześniej (około 48–72 godziny), natomiast normalizacja parametrów cytologicznych (SCC) trwała dłużej, co jest typowe dla zakażeń przez bakterie typu *Coli* (67). W grupie antybiotykowej objawy kliniczne ustępowały szybciej niż w grupie PMQ, zwłaszcza w pierwszych dniach leczenia mastitis wywołanej przez *E. coli*. U krów leczonych PMQ redukcja obrzęku i zaczerwienienia wymienia następowała stopniowo, lecz wolniej. Nie oceniano bezpośrednio profili cytokin w mleku; jednak porównania z opublikowanymi badaniami sugerują, że PMQ wykazuje właściwości przeciwzapalne. W przeciwieństwie do preparatów steroidowych czy niektórych antybiotyków łączonych z glikokortykosteroidami, naturalne składniki takie jak pektyna, moryna i kwercetyna hamują gromadzenie komórek zapalnych oraz uwalnianie cytokin, nie wywołując jednocześnie oporności bakteryjnej ani nie powodując negatywnych efektów w mleku (68,69). Wcześniejsze doniesienia wskazują, że podanie doustne lub miejscowe pektyn nie podwyższa poziomów TNF- α ani we krwi, ani w mleku. Wyniki badań nie wykazały istotnych różnic w stężeniu TNF- α pomiędzy leczeniem pektyną a terapią kontrolną. Podobnie liczne badania *in vitro* oraz modele doświadczalne udowodniły, że kwercetyna

redukuje syntezę TNF- α , IL-1 β , IL-6 i innych cytokin prozapalnych (70,71). Kwercetyna może hamować aktywację NF- κ B, częściowo poprzez modulację szlaków z udziałem receptorów Toll-like, co skutkuje obniżeniem syntezy cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , IL-1 β i IL-6. Stanowi więc obiecujący naturalny związek o właściwościach przeciwzapalnych. Badania *in vitro* dowodzą, że kwercetyna hamuje reakcje zapalne wywołane przez LPS poprzez blokowanie szlaku TLR4/NF- κ B (68,69). Jeśli chodzi o pektynę, jej potencjał regulacji odpowiedzi immunologicznej jest słabiej opisany. Brakuje również badań wyjaśniających jej wpływ na sygnalizację TLR, aktywację NF- κ B oraz profile cytokin w tkance gruczołu mlekowego. Należy również podkreślić, że skuteczność i bezpieczeństwo obu podejść, szczególnie dla pektyny i moryny, pozostają niedostatecznie udokumentowane. Obecnie lepiej traktować je jako terapie eksperymentalne lub wspomagające niż w pełni zweryfikowane alternatywy dla konwencjonalnych środków przeciwzapalnych i przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w leczeniu mastitis.

Niemniej, uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, a także ujawniają nowe spostrzeżenia. W prototypowym badaniu *in vivo* dotyczącym spontanicznego wyleczenia podanie 10% roztworu pektyny prowadziło do poprawy klinicznej i obniżenia SCS na poziomie zbliżonym do osiągniętego po leczeniu antybiotykiem. Co istotne, efekt przeciwzapalny pektyny obserwowano już po 48 godzinach od podania, a zmiany cytologiczne zachodziły szybciej niż w grupie antybiotykowej. W świetle tych obserwacji terapia PMQ zastosowana w niniejszym badaniu wykazała nieco wolniejsze rozpoczęcie działania (znaczące zmiany około 72 godzin), co można przypisać różnicom w składzie lub dawkowania oraz zróżnicowanej naturze mieszaniny trójskładnikowej. W przypadku samej moryny wcześniejsze eksperymenty pokazały, że 3% roztwór moryny istotnie łagodził objawy mastitis wywołanej przez *E. coli*, przywracając stan kliniczny oraz obniżając SCC, choć wolniej niż antybiotyki. W zakażeniach *S. uberis* skuteczność moryny była ograniczona: poprawa kliniczna pojawiała się dopiero po 96–168 godzinach, a redukcja SCC była wyraźnie słabsza niż po leczeniu antybiotykowym. Nasze obserwacje również sugerują, że PMQ sprawdza się dobrze w zakażeniach Gram-ujemnych (szybka poprawa kliniczna w przypadkach *E. coli*), natomiast skuteczność wobec infekcji Gram-dodatnich jest umiarkowana, co koresponduje z wynikami uzyskanymi dla samej moryny. Potwierdza to obserwację, że PMQ łagodzi stan zapalny nawet w zakażeniach *S. uberis*, lecz nie eliminuje infekcji tak skutecznie jak silne antybiotyki. Jeśli chodzi o kwercetynę, wcześniejsze badania wykazały, że powtarzane podanie do wymieniowe

wyraźnie obniżało SCC u krów z mastitis w ciągu ośmiu dni terapii (68). Nasze obserwacje potwierdzają, że kwercetyna (choć w połączeniu z innymi składnikami) przyczynia się do redukcji komórek zapalnych w mleku. Kombinacja pektyny, moryny i kwercetyny mogła działać poprzez mechanizmy komplementarne: kwercetyna i moryna mogły wzmacniać efekt immunomodulujący, a pektyna prawdopodobnie przyspieszała powstawanie bariery ochronnej. Zastosowana mieszanka osiągnęła co najmniej poziom skuteczności obserwowany dla każdego ze składników z osobna, podobnie jak badane wcześniej pektyna i moryna, redukując zarówno objawy kliniczne, jak i SCC. Kluczowe nowe wnioski wynikają z oceny efektu kumulacyjnego oraz potwierdzenia bezpieczeństwa tej kombinacji (nie odnotowano działań niepożądanych), jak również wskazania, że terapia PMQ pozwala obniżyć poziom zapalenia niemal do poziomu osiąganego po antybiotykoterapii systemowej, a jednocześnie może skrócić czas do poprawy w porównaniu z brakiem leczenia.

W ostatnich latach wiele związków pochodzenia naturalnego oceniano jako alternatywy dla antybiotyków w terapii mastitis u bydła. Są to m.in. immunomodulujące polisacharydy takie jak β -glukany, chitozan, alginiany oraz różne ekstrakty roślinne (72). Chociaż niektóre z nich mogą stymulować rekrutację leukocytów lub wywierać bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe, ich skuteczność kliniczna jest niejednoznaczna i często zależy od patogenu. Przykładowo, β -glukany wykazują ograniczoną skuteczność w przewlekłych infekcjach Gram-dodatnich, podczas gdy chitozan i alginiany mają właściwości przeciwbakteryjne i wspomagające gojenie, ale mogą mieć ograniczoną penetrację do głębszych warstw tkanki gruczołu mlekowego (73,74,75,76,77). Ograniczenia te podkreślają potrzebę lepiej zdefiniowanych, wieloskładnikowych naturalnych preparatów. Podejście PMQ, łączące polisacharyd (pektynę) z dwoma flawonoidami (moryną i kwercetyną), może pomóc rozwiązać część tych problemów. Pektyna wspiera integralność bariery nabłonkowej i redukuje lokalny stan zapalny, moryna może ograniczać tworzenie biofilmu, a kwercetyna zapewnia komplementarne działanie antyoksydacyjne i immunomodulujące. Podawane razem składniki mogą oddziaływać synergistycznie, zapewniając bardziej przewidywalne i szybkie łagodzenie objawów zapalenia niż preparaty jednoskładnikowe czy surowe ekstrakty roślinne. W przeciwieństwie do olejków eterycznych czy leków homeopatycznych, PMQ ma jasno zdefiniowany skład i mechanistyczną podstawę potwierdzoną w modelach eksperymentalnych, co wzmacnia jego potencjał jako ustrukturyzowanej, nie antybiotykowej opcji terapeutycznej.

Omówione wyniki wpisują się w światowy trend redukcji stosowania antybiotyków w medycynie weterynaryjnej. Koncepcja One Health, wraz z rosnącą opornością patogenów, podkreśla potrzebę poszukiwania alternatywnych strategii terapeutycznych. Jak sugeruje Jiang i in., ograniczenie antybiotykoterapii jest szczególnie uzasadnione w przypadkach infekcji Gram-ujemnych, gdzie efekty przeciwzapalne mogą pozwolić układowi odpornościowemu gospodarza na naturalne wyeliminowanie infekcji (78). Nasze obserwacje są zgodne z takim podejściem – leczenie wspomagające PMQ przyniosło wyniki porównywalne z antybiotykami. Brak pozostałości antybiotyków w mleku po terapii PMQ stanowi dodatkową korzyść z punktu widzenia zdrowia publicznego i produkcji mleka.

Niemniej terapia PMQ ma także ograniczenia. Jej skuteczność może być niższa w ciężkich lub przewlekłych infekcjach wywołanych przez patogeny Gram-dodatnie, takie jak *S. uberis*, które są znane z możliwości przetrwania w tkance gruczołu mlekowego. W niniejszym badaniu sama moryna powodowała jedynie wolniejszą i mniej wyraźną redukcję SCC w zakażeniach *S. uberis*, w porównaniu z leczeniem antybiotykowym. Można zatem założyć, że w przypadkach ciężkiego mastitis lub infekcji mieszanych antybiotyki pozostają niezbędne, a PMQ może pełnić głównie rolę terapii wspomagającej. Konieczne są dalsze badania nad optymalizacją dawkowania i formulacji PMQ, lepszym poznaniem farmakokinetyki jego składników oraz oceną jego zastosowania w różnych postaciach mastitis. Wymagane są także szeroko zakrojone badania kliniczne *in vivo*, które pozwolą ocenić skuteczność terapii na różnych etapach choroby oraz porównać ją z innymi metodami leczenia.

Niniejsze badanie ma kilka istotnych ograniczeń. Przede wszystkim brak danych farmakokinetycznych dotyczących składników PMQ po podaniu do wymieniowym uniemożliwia ocenę ich penetracji tkankowej, czasu działania oraz optymalnego schematu dawkowania. Próba obejmowała stały cykl leczenia, co nie pozwala na wyciągnięcie wniosków na temat elastyczności terapii. Kolejnym ograniczeniem jest heterogeniczność infekcji i potencjalna zmienność szczepów, połączona z dość ograniczoną liczebnością próby (72 krowy) oraz brakiem stratyfikacji według etapu laktacji, statusu metabolicznego, wydajności mlecznej lub genotypu krowy, co mogło wpłynąć na odpowiedź na leczenie (79). Okres obserwacji ograniczono do 7 dni, bez bakteriologicznej oceny po leczeniu. Nie wiadomo zatem, czy patogeny zostały całkowicie wyeliminowane oraz jaki był wpływ PMQ na mikrobiom wymienia i ryzyko nawrotów. Nie przeprowadzono również analiz molekularnych – nie oceniano wpływu PMQ na ekspresję cytokin, sygnalizację TLR czy

markery stresu oksydacyjnego w nabłonku gruczołu. Takie dane mogłyby pomóc wyjaśnić mechanizmy działania i dostarczyć obiektywnej walidacji. Wreszcie, terapia PMQ wymaga częstego podawania (siedem dawek dziennie), co ogranicza jej praktyczność. Brakuje też porównań różnych proporcji składników PMQ. Dalsze badania powinny ocenić skuteczność, potencjalną synergię oraz możliwości formułacji preparatów o przedłużonym uwalnianiu.

Podsumowując, wyniki sugerują, że terapia PMQ składająca się z trzech komponentów może stanowić obiecującą alternatywę dla leczenia antybiotykowego w zarządzaniu klinicznym zapaleniem wymienia u krów mlecznych. Zastosowane naturalne związki łączą działanie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe oraz ochronne dla bariery nabłonkowej, jednocześnie unikając komplikacji związanych ze stosowaniem antybiotyków. Potencjał PMQ najlepiej realizować jako część zintegrowanej strategii leczenia, szczególnie w łagodnych infekcjach, przy stałym monitorowaniu efektów terapii i dalszym badaniu ograniczeń tej metody.

Pozyskane wyniki ułatwią projektowanie badań klinicznych w celu określenia możliwości wykorzystania moryny w warunkach produkcyjnych i wskazania, czy i w jaki sposób taka terapia mogłaby zostać zintegrowana z istniejącymi protokołami leczenia mastitis. Pozwoli to na opracowanie skutecznych, bezpiecznych i przyjaznych dla środowiska metod zwalczania mastitis (1).

Wnioski

1. Przeprowadzone badanie kliniczne wykazało, że podanie do wymienia 10% roztworu pektyny zapewniło porównywalny poziom skuteczności klinicznej, bez istotnych statystycznie różnic w stosunku do standardowej terapii antybiotykowej, a jednocześnie mogło prowadzić do szybszej poprawy klinicznej i szybszej normalizacji markerów zapalenia (SCC), bez obserwowanych działań niepożądanych. Uzyskane wyniki mają także szersze znaczenie, wpisując się w założenia koncepcji One Health, której celem jest integracja zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska. Stosowanie pektyn do wymienia może stanowić istotny krok w kierunku redukcji użycia antybiotyków w hodowli bydła mlecznego, przyczyniając się tym samym do ograniczenia ryzyka rozwoju oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Zastosowanie pektyn jako naturalnych i bezpiecznych substancji wpisuje się w globalne strategie produkcji mleka wolnego od pozostałości antybiotykowych oraz wspiera ochronę zdrowia publicznego i środowiska. Pektyna jako naturalny, bezpieczny i skuteczny związek, może w przyszłości odegrać kluczową rolę w ograniczaniu stosowania antybiotyków u bydła mlecznego.
2. Niniejsze badanie wykazało, że moryna jako związek pochodzenia naturalnego, może łagodzić objawy kliniczne mastitis wywołanego przez *E. coli* oraz *S. uberis*. Jednak skuteczność moryny w eliminacji zakażenia była niższa niż w przypadku standardowej terapii antybiotykowej podawanej do wymienia, szczególnie w przypadkach infekcji *S. uberis*. Moryna może zatem pełnić funkcję terapii wspomagającej, ukierunkowanej na ograniczenie stanu zapalnego wymienia i liczby komórek somatycznych, zwłaszcza w infekcjach Gram-ujemnych, w których wskaźniki samoistnych wyleczeń są stosunkowo wysokie. Jej stosowanie może przyczynić się do ograniczenia zużycia antybiotyków w stadach bydła mlecznego oraz poprawy dobrostanu krów. Niemniej jednak, ponieważ pełne wyleczenie bakteriologiczne nie zostało potwierdzone, moryna nie powinna być traktowana jako zamiennik antybiotyków w przypadku zakażeń wywołanych przez patogeny Gram-dodatnie. Konieczne są dalsze badania z wydłużonym okresem obserwacji oraz mikrobiologiczną weryfikacją, aby określić odpowiednie sytuacje kliniczne do jej zastosowania. Moryna może zatem pełnić funkcję terapii wspomagającej,

ukierunkowanej na ograniczenie stanu zapalnego wymienia i liczby komórek somatycznych, szczególnie w infekcjach Gram-ujemnych, gdzie wskaźniki samoistnych wyleczeń są stosunkowo wysokie.

3. Pozyskane dane pozwalają wnioskować o tym, że terapia składająca się z trzech komponentów- pektyny, moryny oraz kwercyny może stanowić obiecującą alternatywę dla leczenia antybiotykowego w zarządzaniu klinicznym zapaleniem wymienia u krów mlecznych. Zastosowane naturalne związki łączą działanie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe oraz ochronne dla bariery nabłonkowej, jednocześnie unikając komplikacji związanych ze stosowaniem antybiotyków. Potencjał PMQ najlepiej realizować jako część zintegrowanej strategii leczenia, szczególnie w łagodnych infekcjach, przy stałym monitorowaniu efektów terapii i dalszym badaniu ograniczeń tej metody.

Bibliografia

1. Li, X.; Xu, C.; Liang, B.; Kastelic, J.P.; Han, B.; Tong, X.; Gao, J. Alternatives to Antibiotics for Treatment of Mastitis in Dairy Cows. *Front. Vet. Sci.* 2023, 10, 1160350.
2. Krebs, I.; Zhang, Y.; Wentz, N.; Leimbach, S.; Krömker, V. Severity of Clinical Mastitis and Bacterial Shedding. *Pathogens* 2023, 12, 1098.
3. Leite De Campos, J.; Gonçalves, J.L.; Kates, A.; Steinberger, A.; Sethi, A.; Suen, G.; Shutske, J.; Safdar, N.; Goldberg, T.; Ruegg, P.L. Variation in Partial Direct Costs of Treating Clinical Mastitis among 37 Wisconsin Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 2023, 106, 9276–9286.
4. Wieland, M. Mastitis in Cattle. In *MSD Veterinary Manual*; MSD Publications: Telangana, India, 2024; Available online: <https://www.msdveterinary.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/mastitis-in-cattle> (accessed on 6 November 2025).
5. Bechtold, V.; Petzl, W.; Huber-Schlenstedt, R.; Sorge, U.S. Distribution of Bovine Mastitis Pathogens in Quarter Milk Samples from Bavaria, Southern Germany, between 2014 and 2023—A Retrospective Study. *Animals* 2024, 14, 2504. [CrossRef]
6. Morales-Ubaldo, A.L.; Rivero-Perez, N.; Valladares-Carranza, B.; Velázquez-Ordoñez, V.; Delgadillo-Ruiz, L.; Zaragoza-Bastida, A. Bovine Mastitis, a Worldwide Impact Disease: Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Viable Alternative Approaches. *Vet. Anim. Sci.* 2023, 21, 100306.
7. Kaczorek-Łukowska, E.; Małaczewska, J.; Wójcik, R.; Duk, K.; Blank, A.; Siwicki, A.K. Streptococci as the New Dominant Aetiological Factors of Mastitis in Dairy Cows in North-Eastern Poland: Analysis of the Results Obtained in 2013–2019. *Ir. Vet. J.* 2021, 74, 2.
8. Dobrut, A.; Siemińska, I.; Sroka-Oleksiak, A.; Drożdż, K.; Sobońska, J.; Mroczkowska, U.; Brzywczy-Włoch, M. Molecular and Phenotypic Identification of Bacterial Species Isolated from Cows with Mastitis from Three Regions of Poland. *BMC Vet. Res.* 2024, 20, 193.

9. European Medicines Agency. European Sales and Use of Antimicrobials for Veterinary Medicine (ESUAvet). In Annual Surveillance Report for 2023 (EMA/CVMP/ESUAVET/80289/2025); European Medicines Agency: London, UK, 2025.
10. Aksoy, A.; Alazragi, R.; Alabdali, A.Y.M.; Aljazzar, R.; El Sadi, S.; Alostaz, M.; El Hindi, M. Antibacterial Activity of Metallic-Core Gold, and Silver Nanoparticles against Some Animal Pathogens. *Ann. Anim. Sci.* 2023, 23, 473–479.
11. Romanek, J.; Trzcinska, M.; Samiec, M. Multi-Faceted Characterization of Mesenchymal Stem Cells and Their Application as Powerful Tool for Agrobiotechnology, Assisted Reproductive Technologies, and Veterinary and Regenerative Biomedicine—A Review. *Ann. Anim. Sci.* 2024, 24, 367–377.
12. Wang, J.; Guo, C.; Wei, Z.; He, X.; Kou, J.; Zhou, E.; Yang, Z.; Fu, Y. Morin Suppresses Inflammatory Cytokine Expression by Downregulation of Nuclear Factor- κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathways in Lipopolysaccharide Stimulated Primary Bovine Mammary Epithelial Cells. *J. Dairy Sci.* 2016, 99, 3016–3022.
13. Yu, S.; Liu, X.; Yu, D.; Changyong, E.; Yang, J. Morin Protects LPS-Induced Mastitis via Inhibiting NLRP3 Inflammasome and NF- κ B Signaling Pathways. *Inflammation* 2020, 43, 1293–1303.
14. Yu, J.; Wan, K.; Sun, X. Improved Transdermal Delivery of Morin Efficiently Inhibits Allergic Contact Dermatitis. *Int. J. Pharm.* 2017, 530, 145–154.
15. Sales, L.S.; Hewitt, B.; Muchova, M.; Brighenti, F.L.; Kuehne, S.A.; Grant, M.M.; Milward, M.R. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Evaluation of Morin. *Arch. Oral Bio* Bhaskar, S., Helen, A., 2016.
16. Bhaskar, S., Helen, A., 2016. Quercetin modulates toll-like receptor-mediated protein kinase signaling pathways in oxLDL-challenged human PBMCs and regulates TLR activated atherosclerotic inflammation in hypercholesterolemic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 423, 53–65.
17. Bhaskar, S., Sudhakaran, P.R., Helen, A., 2016. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF-kappaB signaling pathway. *Cell. Immunol.* 310, 131–140.
18. Caglayan Sozmen, S., Karaman, M., Cilaker Micili, S., Isik, S., Bagriyanik, A., Arikan Ayyildiz, Z., Uzuner, N., Anal, O., Karaman, O., 2016. Effects of quercetin

- treatment on epithelium-derived cytokines and epithelial cell apoptosis in allergic airway inflammation mice model. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 15, 487–497.
19. Maurya, A.K., Vinayak, M., 2017. Quercetin attenuates cell survival, inflammation, and angiogenesis via modulation of AKT signaling in murine T-cell lymphoma. *Nutr. Cancer* 1–11.
 20. Cui, Y., Hou, P., Li, F., Liu, Q., Qin, S., Zhou, G., Xu, Si, Y., Guo, S., 2017. Quercetin improves macrophage reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 16 (9). 1. 2025, 178, 106343.
 21. Meng, L., Lv, Z., Yu, Z.Z., Xu, D., Yan, X., 2016. Protective effect of quercetin on acute lung injury in rats with sepsis and its influence on ICAM-1 and MIP-2 expressions. *Genet. Mol. Res.* 15.
 22. Butov, D., Zaitseva, S., Butova, T., 2016a. Efficacy and safety of quercetin and poly vinylpyrrolidone in treatment of patients with newly diagnosed destructive pulmonary tuberculosis in comparison with standard antimycobacterial therapy. *Int. J Mycobacteriol.* 5 (Suppl. 1), S110–s111.
 23. Javadi, F., Ahmadzadeh, A., Eghtesadi, S., Aryaeian, N., Zabihyeganeh, M., Rahimi Foroushani, A., Jazayeri, S., 2016. The effect of quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized controlled trial. *J. Am. Coll. Nutr.* 1–7.
 24. Wang, K., Jin, X.L., Shen, X.G., Sun, L.P., Wu, L.M., Wei, J.Q., Marcucci, M.C., Hu, F.L., Liu, J.X., 2016. Effects of Chinese Propolis in protecting bovine mammary epithelial cells against mastitis pathogens-induced cell damage. *Mediat. Inflamm.* 2016, 8028291
 25. Cao, R., Fu, K., Lv, X., Li, W., Zhang, N., 2014. Protective effects of kaempferol on lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Inflammation* 37, 1453–1458.
 26. Chen, H., Mo, X., Yu, J., Huang, Z., 2013. Alpinetin attenuates inflammatory responses by interfering with toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in lipopo lysaccharide-induced mastitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 17, 26–32.
 27. He, X., Wei, Z., Zhou, E., Chen, L., Kou, J., Wang, J., Yang, Z., 2015. Baicalein attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 mediated NF-kappaB and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 28,470–476.

28. Lai, J.L., Liu, Y.H., Peng, Y.C., Ge, P., He, C.F., Liu, C., Chen, Y.Y., Guo, A.Z., Hu, C.M., 2017. Indirubin treatment of lipopolysaccharide-induced mastitis in a mouse model and activity in mouse mammary epithelial cells. *Mediat. Inflamm.* 2017, 3082805.
29. Li, F., Liang, D., Yang, Z., Wang, T., Wang, W., Song, X., Guo, M., Zhou, E., Li, D., Cao, Y. Zhang, N., 2013. Astragalosin suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model. *Int. Immunopharmacol.* 17, 478–482.
30. Beukema, M.; Ishisono, K.; de Waard, J.; Faas, M.M.; de Vos, P.; Kitaguchi, K. Pectin Limits Epithelial Barrier Disruption by *Citrobacter rodentium* through Anti-Microbial Effects. *Food Funct.* 2021, 12, 881–891.
31. Daoud, Z.; Sura, M.; Abdel-Massih, R.M. Pectin Shows Antibacterial Activity against *Helicobacter pylori*. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013, 4, 273–277.
32. Lee, J.-H.; Lee, Y.-K.; Choi, Y.-R.; Park, J.; Jung, S.K.; Chang, Y.H. The Characterization, Selenylation and Anti-Inflammatory Activity of Pectic Polysaccharides Extracted from *Ulmus pumila* L. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 111, 311–318.
33. Sahasrabudhe, N.M.; Beukema, M.; Tian, L.; Troost, B.; Scholte, J.; Bruininx, E.; Bruggeman, G.; Van Den Berg, M.; Scheurink, A.; Schols, H.A.; et al. Dietary Fiber Pectin Directly Blocks Toll-Like Receptor 2-1 and Prevents Doxorubicin-Induced Ileitis. *Front.Immunol.* 2018, 9, 383.
34. Blanco-Pérez, F.; Steigerwald, H.; Schülke, S.; Vieths, S.; Toda, M.; Scheurer, S. The Dietary Fiber Pectin: Health Benefits and Potential for the Treatment of Allergies by Modulation of Gut Microbiota. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2021, 21, 43.
35. Rajan, D.K.; Divya, D.; Mohan, K. Potential Role of Plant Polysaccharides as Immunostimulants in Aquaculture—A Review. *Ann.Anim. Sci.* 2023, 23, 951–969.
36. Yang, W.; Zerbe, H.; Petzl, W.; Brunner, R.M.; Günther, J.; Draing, C.; Von Aulock, S.; Schuberth, H.-J.; Seyfert, H.-M. Bovine TLR2 and TLR4 Properly Transduce Signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* Fails to Both Activate NF- κ B in Mammary Epithelial Cells and to Quickly Induce TNF α and Interleukin-8 (CXCL8) Expression in the Udder. *Mol. Immunol.* 2008, 45, 1385–1397.
37. Huang, Y.; Shen, L.; Jiang, J.; Xu, Q.; Luo, Z.; Luo, Q.; Yu, S.; Yao, X.; Ren, Z.; Hu, Y.; et al. Metabolomic Profiles of Bovine Mammary Epithelial Cells Stimulated by Lipopolysaccharide. *Sci. Rep.* 2019, 9, 19131.

38. Mohnen, D. Biosynthesis of Pectins and Galactomannans. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1999; pp. 497–527; ISBN 978-0-08-091283-7
39. Kandeel, S.A.; Megahed, A.A.; Constable, P.D. Evaluation of Hand-held Sodium, Potassium, Calcium, and Electrical Conductivity Meters for Diagnosing Subclinical Mastitis and Intramammary Infection in Dairy Cattle. *Vet. Intern. Med.* 2019, 33, 2343–2353.
40. Harte, F.M.; Montes, C.; Adams, M.; San Martin-Gonzalez, M.F. Solubilized Micellar Calcium Induced Low Methoxyl-Pectin Aggregation during Milk Acidification. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 2705–2709.
41. Yan, J.; Yang, R.; Yu, S.; Zhao, W. The Application of the Lytic Domain of Endolysin from *Staphylococcus aureus* Bacteriophage in Milk. *J. Dairy Sci.* 2021, 104, 2641–2653.
42. Presentato, A.; Piacenza, E.; Scurria, A.; Albanese, L.; Zabini, F.; Meneguzzo, F.; Nuzzo, D.; Pagliaro, M.; Martino, D.C.; Alduina, R.; et al. A New Water-Soluble Bactericidal Agent for the Treatment of Infections Caused by Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. *Antibiotics* 2020, 9, 586.
43. Donadio, J.L.S.; Fabi, J.P.; Sztejn, M.B.; Salerno-Gonçalves, R. Dietary Fiber Pectin: Challenges and Potential Anti-Inflammatory Benefits for Preterms and Newborns. *Front. Nutr.* 2023, 10, 1286138.
44. Vijay, A.; Kelly, A.; Miller, S.; Marshall, M.; Alonso, A.; Kouraki, A.; Probert, C.; Simpson, E.J.; Valdes, A.M. Supplementation with Citrus Low-Methoxy Pectin Reduces Levels of Inflammation and Anxiety in Healthy Volunteers: A Pilot Controlled Dietary Intervention Study. *Nutrients* 2024, 16, 3326.
45. Bagnicka, E.; Brzozowska, P.; Zukowski, K.; Grochowska, R. The Association of Gene Polymorphisms with Milk Production and Mastitis Resistance Phenotypic Traits in Dairy Cattle. *Ann. Anim. Sci.* 2023, 23, 419–430.
46. Steigerwald, H.; Albrecht, M.; Blissenbach, B.; Krause, M.; Wangorsch, A.; Schott, M.; Gonzalez-Menendez, I.; Quintanilla Martinez, L.; Toda, M.; Vieths, S.; et al. Dietary Fiber Pectin Alters the Gut Microbiota and Diminishes the Inflammatory Immune Responses in an Experimental Peach Allergy Mouse Model. *Sci. Rep.* 2024, 14, 30503.

47. Nordin, N.N.; Aziz, N.K.; Naharudin, I.; Anuar, N.K. Effects of Drug-Free Pectin Hydrogel Films on Thermal Burn Wounds in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Polymers* 2022, 14, 2873.
48. Tong, J.; Hou, X.; Cui, D.; Chen, W.; Yao, H.; Xiong, B.; Cai, L.; Zhang, H.; Jiang, L. A Berberine Hydrochloride-Carboxymethyl Chitosan Hydrogel Protects against *Staphylococcus aureus* Infection in a Rat Mastitis Model. *Carbohydr. Polym.* 2022, 278, 118910.
49. Bhattarai, S.; Perumal, D.; Rathbone, M.J.; Bunt, C.R.; Alany, R.G. On the Biocompatibility and Teat Retention of in Situ Gelling Intramammary Formulations: Cattle Mastitis Prevention and Treatment. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1732.
50. Zhou, K.; Wang, X.; Chen, D.; Yuan, Y.; Wang, S.; Li, C.; Yan, Y.; Liu, Q.; Shao, L.; Huang, L.; et al. Enhanced Treatment Effects of Tilmicosin against *Staphylococcus aureus* Cow Mastitis by Self-Assembly Sodium Alginate-Chitosan Nanogel. *Pharmaceutics* 2019, 11, 524.
51. Zhang, H.; Wang, Z.; Yao, H.; Jiang, L.; Tong, J. Intramammary Infusion of Matrine-Chitosan Hydrogels for Treating Subclinical Bovine Mastitis—Effects on Milk Microbiome and Metabolites. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 950231.
52. Sales, L.S.; Hewitt, B.; Muchova, M.; Brighenti, F.L.; Kuehne, S.A.; Grant, M.M.; Milward, M.R. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Evaluation of Morin. *Arch. Oral Biol.* 2025, 178, 106343.
53. Goulart, D.B.; Mellata, M. *Escherichia Coli* Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 928346.
54. De Haas, Y.; Veerkamp, R.F.; Barkema, H.W.; Gröhn, Y.T.; Schukken, Y.H. Associations Between Pathogen-Specific Cases of Clinical Mastitis and Somatic Cell Count Patterns. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 95–105.
55. Cobirka, M.; Tancin, V.; Slama, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals* 2020, 10, 2212. [CrossRef] [PubMed]
56. Lavon, Y.; Leitner, G.; Kressel, Y.; Ezra, E.; Wolfenson, D. Comparing Effects of Bovine *Streptococcus* and *Escherichia Coli* Mastitis on Impaired Reproductive Performance. *J. Dairy Sci.* 2019, 102, 10587–10598.
57. Nankemann, F.; Leimbach, S.; Nitz, J.; Tellen, A.; Wente, N.; Zhang, Y.; Klocke, D.; Krebs, I.; Müller, S.; Teich, S.; et al. Antibiotic Treatment vs. Non-Antibiotic Treatment in Bovine Clinical Mastitis During Lactation with Mild and Moderate Severity. *Antibiotics* 2025, 14, 702

58. Schukken, Y.H.; Bennett, G.J.; Zurakowski, M.J.; Sharkey, H.L.; Rauch, B.J.; Thomas, M.J.; Ceglowski, B.; Saltman, R.L.; Belomestnykh, N.; Zadoks, R.N. Randomized Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a 5-Day Ceftiofur Hydrochloride Intramammary Treatment on Nonsevere Gram-Negative Clinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 2011, 94, 6203–6215.
59. Ruegg, P.L. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 2018, 34, 413–425.
60. Smith, G.W.; Davis, J.L.; Tell, L.A.; Webb, A.I.; Riviere, J.E. Extralabel Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cattle. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 2008, 232, 697–701.
61. Jiang, A.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Wu, D.; Liu, Z.; Li, S.; Liu, X.; Han, Z.; Wang, C.; Wang, J.; et al. Morin Alleviates LPS-Induced Mastitis by Inhibiting the PI3K/AKT, MAPK, NF- κ B and NLRP3 Signaling Pathway and Protecting the Integrity of Blood-Milk Barrier. *Int. Immunopharmacol.* 2020, 78, 105972.
62. Bagnicka, E.; Brzozowska, P.; Zukowski, K.; Grochowska, R. The Association of Gene Polymorphisms with Milk Production and Mastitis Resistance Phenotypic Traits in Dairy Cattle. *Ann. Anim. Sci.* 2023, 23, 419–430.
63. Semik-Gurgul, E.; Złabek, T.; Kawecka-Grochocka, E.; Zalewska, M.; Kościuczuk, E.; Bagnicka, E. Epigenetic States of Genes Controlling Immune Responsiveness in Bovine Chronic Mastitis. *Ann. Anim. Sci.* 2022, 22, 575–581.
64. Korwin-Kossakowska, A.; Ropka-Molik, K.; Złabek, T.; Szmatoła, T.; Lewczuk, D.; Kościuczuk, E.; Marczak, S.; Bagnicka, E. Gene Expression Adjustment of Inflammatory Mechanisms in Dairy Cow Mammary Gland Parenchyma during Host Defense against Staphylococci. *Ann. Anim. Sci.* 2022, 22, 903–913.
65. Sumon S., Parvin M., Ehsan M., Islam, M. Dynamics of somatic cell count and intramammary infection in lactating dairy cows. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, 2022,7(2), 314
66. Williamson J., Callaway T., Rollin E., Ryman V. (2022). Association of milk somatic cell count with bacteriological cure of intramammary infection – a review. *Agriculture*, 12(9), 1437.
67. Kirkeby C., Schwarz D., Denwood M., Farre M., Nielsen S.S., Gussmann M., Toft N., Halasa T. Dynamics of somatic cell count (SCC) and differential SCC during and following intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 2021, 104(3), 3427–3438.


68. Burmańczuk A., Hola P., Milczak A., Piech T., Kowalski C., Wojciechowska B., Grabowski T. Quercetin decrease somatic cells count in mastitis of dairy cows. *Res. Vet. Sci.*,2018, 117, 255–259.
69. Jiang M., Lv Z., Huang Y., Cheng Z., Meng Z., Yang T., Yan Q., Lin M., Zhan K., Zhao, G. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in bovine mammary epithelial cells by suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Front. Vet. Sci.*,2022, 9, 915726.
70. Xiong G., Ji W., Wang F., Zhang F., Xue P., Cheng M., Sun Y., Wang X., Zhang T. Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF- κ B signaling pathway. *BioMed Res. Int.*, 2019, 6282635.
71. Yu, C., Wang D., Yang Z., Wang, T. Pharmacological effects of polyphenol phytochemicals on the intestinal inflammation via targeting TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.*,2022, 23(13), 6939.
72. do Nascimento G.M., Rodrigues R.A., Brugnera H.C., Barbosa J.C., Favaron F.R., Rossi G.A. M., Bragança C.R.S., Schocken-Iturrino R.P., de Ávila F.A., Cardozo M.V. Antimicrobial activity of teat antiseptic formulations based on plant extracts for controlling bovine mastitis: in vitro and in vivo evaluation. *Vet. Sci.*, 2025,12(4), 293.
73. Inchaisri C., Persson, Johannisson A. Studies on the modulation of leucocyte subpopulations and immunoglobulins following intramammary infusion of β 1,3-glucan into the bovine udder during the dry period. *J. Vet. Med. B*,2000, 47(5), 373–386.
74. Godoy C.A., Balic I., Moreno A.A., Diaz O., Arenas Colarte C., Bruna Larenas T., Gamboa A., Caro Fuentes N. Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan nanoparticles against *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis milk. *Pharmaceutics*,2025, 17(2), 186.
75. Guamán S.A., Elhadi A., Salama A.A.K., Manuelian C.L., Caja G., Albanell, E. Beta-glucans improve the mammary innate immune response to endotoxin challenge in dairy ewes. *Animals*, 2024,14(20), 3023.
76. Kruk K., Winnicka, K. Alginates combined with natural polymers as valuable drug delivery platforms. *Marine Drugs*, 2022, 21(1), 11.
77. Tomanić D., Samardžija M., Kovačević Z. Alternatives to antimicrobial treatment in bovine mastitis therapy: A review. *Antibiotics*, 2023,12(4), 683.

78. Jiang L., Li Q., Liao H., Liu H., Wang Z. (2025). Enhancing agricultural productivity in dairy cow mastitis management: Innovations in non-antibiotic treatment technologies. *Vet. Sci.*, 12(7), 662.
79. Bagnicka E., Brzozowska P., Żukowski K., Grochowska R. (2023). The association of gene polymorphisms with milk production and mastitis resistance phenotypic traits in dairy cattle. *Ann. Anim. Sci.*, 23(2), 419–430.

Artykuły wraz z oświadczeniami autorów

Article

Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows: A Field Pilot Study

Marcin Kocik ¹, Artur Burmańczuk ^{2,*}, Tomasz Grabowski ³ and Ewa Tomaszewska ⁴¹ Private Veterinary Practice, Chopina 5, 33-100 Tarnów, Poland; kocikmj@gmail.com² Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland³ Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Gdansk, Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, Poland; tomasz.grabowski@gumed.edu.pl⁴ Department Animal Physiology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland; ewarst@interia.pl

* Correspondence: artur.burmanczuk@up.lublin.pl

Abstract

The rise in antimicrobial resistance and strict milk withdrawal regulations drive the search for safe, non-antibiotic intramammary therapies. This pilot field study focused on clinical parameters, including the somatic cell count (SCC) and the assessment of changes, as well as overall safety, which together enabled a prospective evaluation of whether the substance exerted any therapeutic effect. In this study, 48 Holstein–Friesian cows with naturally occurring clinical mastitis (somatic cell count > 400,000 cells/mL; single quarter) were randomized to receive either seven daily infusions of 10% pectin ($n = 24$) or two standard intramammary doses of a licensed multi-component antibiotic formulation ($n = 24$). The clinical severity scores (0–3) and SCC were monitored from 72 h before to 168 h after treatment initiation; the bacteriological cultures, milk TNF- α , milk yield, and blood hematology/biochemistry were also assessed. Both groups exhibited comparable and significant reductions in the mastitis scores and log₂-transformed SCC by 48 h post-treatment, with equivalent bacteriological cure rates and pathogen profiles (predominantly *Streptococcus uberis*, coagulase-negative staphylococci, and *Escherichia coli*) and no local irritation, systemic adverse effects, or alterations in the milk yield, TNF- α , or blood parameters. These findings indicate that intramammary pectin at a 10% concentration is safe and well tolerated and that it provides efficacy equivalent to standard antibiotic therapy, supporting its potential as an alternative mastitis treatment that avoids antibiotic residues and contributes to antimicrobial stewardship.



Academic Editors: Giancarlo Bozzo and Mo Salman

Received: 25 June 2025

Revised: 5 August 2025

Accepted: 15 August 2025

Published: 16 August 2025

Citation: Kocik, M.; Burmańczuk, A.; Grabowski, T.; Tomaszewska, E.Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows: A Field Pilot Study. *Agriculture* **2025**, *15*, 1760. <https://doi.org/10.3390/agriculture15161760>**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).**Keywords:** pectin; mastitis; intramammary; inflammation

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a well-documented risk to both animal and public health. Therefore, research into natural compounds with anti-inflammatory and antimicrobial properties has expanded steadily in recent years, reflecting their potential as supportive therapies for infectious and chronic diseases in veterinary medicine. Between 2011 and 2022, veterinary antimicrobial sales in Europe, expressed in mg per population correction unit (PCU), where 1 PCU corresponds to 1 kg of animal biomass, fell by 53% (from 161.2 to 75.8 mg/PCU)—an average decline of roughly 6–7% per year. The year 2022 alone brought an additional 12.7% reduction relative to 2021 [1]. Data from the first ESUAvet

report [2] show that the EU has already reached half of the 50% reduction targeted for 2030 (88.5 mg/PCU versus the goal of 59.2 mg/PCU).

The regulatory changes related to AMR have also increased the research into non-antibiotic compounds that can be safely and effectively used to treat or prevent udder diseases, especially mastitis, a common and economically significant condition in dairy cattle. Mastitis is a severe inflammatory process affecting the mammary gland and tissues of the udder in dairy cattle, typically caused by bacterial infection, and it is characterized by an elevated somatic cell count (SCC), altered milk composition, and compromised animal welfare [3,4]. It is the most commonly recorded disease in dairy cows worldwide and has a negative impact on dairy farm profitability. In 2022, approximately 4458 tons (or 4,458,000 kg) of active antibiotic substances were sold for use in farmed animals and aquaculture in the European Economic Area countries, plus Switzerland and the UK. The total antimicrobial consumption for food-producing animals in 2022 was measured at 73.9 mg/PCU [5]. Current treatment protocols still rely heavily on antibiotics, contributing to the development of AMR and necessitating milk withdrawal periods that reduce productivity and profitability.

Large-scale epidemiological data indicate that Gram-positive cocci remain the dominant cause of bovine mastitis. Across Europe, and in comparable datasets elsewhere, *Staphylococcus* and *Streptococcus* spp. dominate bovine mastitis, accounting for 77% of positive isolates in a 10-year Bavarian survey and 78% of clinical cases in a 97-herd UK-based study, while more recent large-scale surveys place their combined prevalence firmly in the \approx 75–85% range [6–10].

Therefore, any non-antibiotic intramammary strategy must primarily address infections caused by *Staphylococcus* and *Streptococcus* species. Among the alternative candidates for mastitis management are pectic polysaccharides, derived from plant cell walls [11]. Intramammary use of chitosan gels, β -glucan nanoparticles and herbal extracts has shown mixed efficacy, but data on pectin are absent [12–16]. Pectins have demonstrated both anti-inflammatory and antimicrobial properties, including disruption of bacterial membranes and anti-adhesive effects, particularly under acidic conditions, where protonation increases the electrostatic interactions with negatively charged bacterial surfaces [17–19]. Additionally, pectins have been shown to modulate host immune responses through their interaction with Toll-like receptors (TLRs) and the regulation of cytokine production [20]. Various forms of pectin exert direct and/or indirect immunomodulatory effects through multiple mechanisms [21,22].

Intervention studies in humans have shown that pectin supplementation can reduce the circulating levels of pro-inflammatory cytokines while simultaneously increasing the anti-inflammatory cytokine IL-10 [23]. This supports the systemic anti-inflammatory potential of pectins, despite their primary site of action being the gastrointestinal tract. Importantly, pectins are not directly absorbed; due to their high molecular weight and complex structure, they do not cross the intestinal barrier into the systemic circulation [24]. As such, their effects are exerted locally in the gut, rather than systemically like conventional anti-inflammatory drugs. Although there are no studies on intramammary administration of pectins, their known anti-inflammatory properties suggest their possible use in the treatment of mastitis.

While the systemic benefits of dietary pectins are well documented, considerably less is known about their potential for local application in the mammary gland. This study aimed to fill this gap by assessing the local tolerance and dose-dependent effects of pectin solutions administered intramammary to dairy cows with mastitis.

The bovine mammary epithelium expresses functional TLR-2 and TLR-4 receptors that sense staphylococcal and streptococcal ligands and trigger an NF- κ B-dependent cytokine

cascade [25,26]. Citrus and apple pectins have been shown to bind and sterically block the TLR2/1 heterodimer on intestinal epithelial cells, thereby attenuating downstream pro-inflammatory signaling [27]. Local delivery of low methoxyl pectin (LM-pectin) into the gland therefore offers a plausible route to dampen TLR-mediated inflammation at its epithelial origin. In addition, milk provides the physicochemical milieu required for LM-pectin's functionality. Normal bovine milk maintains a pH of 6.4–6.8, rising to ≈ 6.8 –6.9 during mastitis, and contains free Ca^{2+} [28]. Pectin strands can rapidly cross-link with Ca^{2+} within this pH window to form a porous hydrogel (“egg-box” junction zones) that (i) prolongs the residence time inside the teat cistern, (ii) acts as a physical barrier to bacterial colonization, and (iii) slowly releases protonated carboxyl groups able to electrostatically destabilize Gram-positive membranes [29–31].

Despite its generally recognized as safe (GRAS) status and extensive use as a food hydrocolloid, pectin has seldom been explored for use in intramammary therapy. Two formulation hurdles help explain this gap. First, even modest concentrations ($>1\%$ w/v) of pectin display specific viscosities at 25 °C [32], which complicates passage through teat cannulas. Second, the high Ca^{2+} level in milk induces in situ gelation within seconds, risking cannula blockage and uneven distribution [29]. Earlier work, therefore, focused on polymers with lower viscosity or thermogelling behavior, such as chitosan hydrogels that remain fluid at room temperature and set only at 37 °C [13].

The present study deliberately addresses these formulation challenges by (i) selecting LM-pectin grades with reduced intrinsic viscosity, (ii) limiting the concentration to $\leq 10\%$ w/v , and (iii) administering immediately after re-suspension to minimize premature cross-linking. This fills a clear knowledge gap, because no peer-reviewed intramammary trials with pectin have been reported to date.

Taken together, these features support the working hypothesis that intramammary LM-pectin can simultaneously regulate host TLR signaling and exert direct antibiofilm/antimicrobial pressure on *Staphylococcus* and *Streptococcus* spp.

Considering that pectins are not classical pharmaceuticals, although they are increasingly recognized as modulators of inflammation through TLR inhibition and subsequent downregulation of pro-inflammatory cytokines [23], the hypothesis of this study is that intramammary administration of apple pectin solutions at a concentration of 10% is well tolerated by the mammary tissue and exerts a dose-dependent anti-inflammatory effect—leading to a reduction in the somatic cell counts and clinical signs of mastitis in dairy cows. This hypothesis was tested under real-world conditions using naturally occurring clinical mastitis cases.

This study aimed to evaluate the intramammary use of apple-derived pectin in dairy cows with clinical mastitis, focusing on preliminary evaluation of effects like local tolerability, dose-dependent effects, and impact on udder health indicators. Therefore, it was decided to compare directly with the reference therapy, i.e., an antibiotic.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

This study was conducted on a group of Holstein–Friesian cows, weighing $\approx 650 \pm 50$ kg, aged 3 to 7 years. The study was conducted at a single farm (Liplas village, Lesser Poland Voivodeship, Poland; 49°57' N 20°13' E) between December 2024 and April 2025. The animals were fed a standard diet consisting of protein concentrates, mixed cereals, maize silage, grass silage, straw, and supplements. Unlimited access to water was provided.

2.2. Inclusion and Exclusion Criteria for the Study

The initial selection of cows for the experimental and control groups was based on monthly reports provided by the Polish Federation of Cattle Breeders and Dairy Farmers, which included data on the SCC, age, lactation stage, and individual milk yield. Only multiparous cows within the first 100 days of lactation were considered eligible. Only cows with inflammation limited to one quarter were enrolled in the experiment, and those with moderate mastitis. The main inclusion criterion was an SCC exceeding 400,000 cells/mL in one of the four udder quarters [33].

Animals were excluded from the study if they showed acute and severe systemic signs of mastitis, signs of chronic disease such as hyperketonemia or hypocalcemia, nutritional deficiencies, or infectious diseases. Cows with advanced clinical symptoms, including skin cyanosis resulting from circulatory disturbances in the udder or pathological discharge from the affected quarter between milkings, were also excluded. Furthermore, udder palpation was performed to detect indurations or nodules (abscesses) within the mammary gland, which are typical of chronic *Staphylococcus aureus* infections and served as grounds for exclusion.

2.3. Pectin Preparation

Pectin from apple (#93854, Sigma-Aldrich, Merck Group, Darmstadt, Germany) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich) to the desired concentration. The solution was prepared using a SONIC-2 ultrasonic bath (POLSONIC, Warsaw, Poland) and agitated for 30 min at 37 °C. The resulting pectin solution was transferred into custom-prepared 5 mL dermal tubing syringes. The final intramammary (IMM) dose was administered as 5 mL of the prepared pectin solution in PBS.

2.4. Pectin Dose Selection

In the preliminary experiment, pectin was prepared at concentrations of 2%, 4%, 10%, and 20%. However, the 20% concentration produced a suspension that was too viscous for IMM administration. Consequently, IMM administration of the 2%, 4%, and 10% pectin solutions was scheduled, with each formulation to be administered seven times, at 24 h intervals, to 10 cows per group diagnosed with clinical mastitis. A veterinarian conducted local tolerance assessments and clinical evaluations at 12 h intervals, with the mastitis scores determined at morning milking. It was anticipated that if the clinical signs worsened, the pectin treatment would be discontinued and standard systemic and intramammary antibiotic therapy, along with supportive care, would be initiated. However, following several days of administering 2% and 4% pectin, most animals exhibited worsening mastitis symptoms, necessitating the introduction of antibiotic treatment and the termination of further pectin administration in these groups. Therefore, the 2% and 4% concentrations were excluded from the study (Supplementary Figure S1). Only the 10% pectin group, in which no animals required antibiotic treatment throughout the preliminary experiment, was included in the main experiment as the experimental pectin group.

2.5. Study Design

In the main study, 48 cows with clinical mastitis that met the predefined inclusion and exclusion criteria were enrolled. Prior to group allocation, all the animals underwent a three-day pre-treatment observation period (time points: −72 h, −48 h, and −24 h), during which milk samples were collected and analyzed for the SCC. The mean SCC across all the cows and all three time points was used to establish a global baseline for the study.

Following this period, cows were randomly assigned to one of two treatment groups ($n = 24$ per group). Post-randomization analysis confirmed that the SCC values measured

at the –24 h time point did not differ significantly between the groups, ensuring baseline equivalence prior to treatment initiation.

The experimental group (the Pectin10 group, $n = 24$) received IMM administration of 10% pectin, applied seven times at 24 h intervals (time points: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, and 144 h). The animals were not given any other drugs.

The Control group ($n = 24$) was treated with the licensed multi-component formulation Mastijet Fort (Intervet International B.V., Boxmeer, the Netherlands), which is indicated for infectious and inflammatory conditions typical of acute bovine mastitis. One dose (8 g, containing tetracycline hydrochloride, 200 mg; neomycin sulphate, 250 mg; bacitracin, 2000 IU; and prednisolone, 10 mg) was infused IMM at time point 0 h, followed by a second dose 12 h later (total of two injections). In the Control group, two intramammary doses of a multi-component antibiotic (Mastijet Fort) were administered without prior pathogen-specific sensitivity testing, reflecting common field practice in which treatment is initiated immediately after diagnosis and culture results are used periodically to adjust herd-level therapy.

Both the pectin solution and the multi-component drug were administered into the affected quarter immediately after the morning milking. Before administration, the udder skin and teat orifice were disinfected with Oxy-Foam D (EcoLab Inc., Saint Paul, MN, USA) and dried with a disposable paper towel.

2.6. Physical Clinical Examinations

Throughout the entire duration of the experiment, the condition of the udder and the general health status of all the experimental animals were monitored by the same experienced veterinarian, who performed regular local tolerance assessments related to pectin or drug administration, as well as clinical examinations of each animal at 24 h intervals [34].

The mastitis scores were recorded for the treated udder quarter during routine health monitoring conducted at morning milking, using a standardized 4-point scale. Score 0 indicated normal milk and udder appearance with no abnormalities; Score 1 reflected the presence of a small number of clots in the milk without visible swelling, redness, heat, or pain upon palpation; Score 2 indicated numerous clots, visible separation of milk and whey, and mild swelling, redness, heat, and pain; and Score 3 was assigned in cases of systemic illness (e.g., elevated body temperature), watery milk, and pronounced swelling, redness, heat, pain, and/or hardness of the affected quarter [35,36].

The mastitis scoring began three days before the initiation of treatment (at time points –72 h, –48 h, and –24 h), was conducted daily throughout the treatment period (time points 0 h to 144 h), and concluded one day after the final pectin dose (time point 168 h).

2.7. Milk and Blood Sample Collection

Milk samples were collected from the affected udder quarters after mastitis scoring was performed. A total of 15 milk samples per cow were collected throughout the study, starting three days prior to treatment initiation (time point –72 h) and ending 24 h after the final pectin administration (time point 168 h). All the milk samples were collected according to a standardized protocol, prior to pectin or multi-component drug administration. Before sampling, the udder quarters were thoroughly washed and dried, and the teat orifices were disinfected with 70% ethanol. The first 3–4 streams of milk were discarded to avoid contamination.

Milk samples for bacteriological culture, isolation, and identification of the causative bacterial agent were aseptically collected at time points –72 h and 168 h into sterile, labeled test tubes without preservatives. Milk samples for the somatic cell count (SCC)

determination were collected in a volume of 30 mL into 50 mL Falcon tubes containing Broad Spectrum Microtabs II preservative tablets (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA), consisting of bronopol (8 mg) and natamycin (0.3 mg), to prevent spoilage and stabilize the sample during transport. After collection, all the milk samples were stored on ice in a cooler box and transported under chilled conditions to the laboratory for further analysis.

The milk yield was continuously recorded, and data from the month preceding the mastitis diagnosis (before treatment) and the month following the end of treatment were used for analysis.

Blood samples were collected twice: immediately before the start of treatment (time point 0 h) and 24 h after the final pectin administration (time point 168 h). Blood was drawn from the tail vein into EDTA K₂ tubes for basic hematological analysis and into clot activator tubes for biochemical analysis.

2.8. Analyses

2.8.1. Milk Analyses

The somatic cell count (SCC) levels in the milk were determined using a semi-automated BactoCount IBCm analyzer (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA).

Analyses were performed in the microbiological laboratory, which routinely conducts diagnostic testing for mastitis-causing pathogens in samples from this dairy farm. Briefly, milk samples were cultured using standard bacteriological and mycological procedures. For bacterial isolation, samples were streaked on Columbia blood agar plates supplemented with 5% sheep blood and incubated aerobically at 36 °C for 24–48 h. For fungal detection, samples were inoculated onto Sabouraud dextrose agar containing chloramphenicol to suppress bacterial growth and incubated at 36 °C for up to 72 h. The colony morphology was assessed after 24, 48, and 72 h of incubation. Representative colonies were subjected to Gram staining and examined microscopically. Gram-positive cocci arranged in chains were classified as *Streptococcus* spp., while Gram-positive cocci in clusters were classified as *Staphylococcus* spp. Coagulase and catalase tests were performed to differentiate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci (CNS). Gram-negative rods were classified as coliforms, predominantly *Escherichia coli*. When the morphological and basic biochemical characteristics were inconclusive, isolates were further identified using commercial biochemical identification systems (API 20E, API Staph, API Strep; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), which assess the bacterial enzymatic activities and carbohydrate utilization patterns to enable species-level identification. No fungal colonies were detected on Sabouraud agar during the incubation period; therefore, no further identification of fungal isolates was conducted.

The cytokine profile analysis was intentionally limited to tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), the most reliable marker of the initial phase of the inflammatory response. The TNF- α concentrations were measured using a commercially available, bovine-specific ELISA kit (LS-F5014, LSBio, Seattle, WA, USA), following the manufacturer's instructions. The absorbance was read using a Benchmark Plus microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

All the measurements were performed in technical duplicates.

2.8.2. Blood Analyses

Hematological analyses were conducted using the Abacus Junior Vet automated hematology analyzer (Diatron, Budapest, Hungary). The following parameters were assessed: white blood cell count, red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, red cell distribution width, and platelet count.

After serum separation, biochemical parameters, including cholesterol, urea, bilirubin, creatinine, calcium, and phosphorus, were measured using an automated biochemistry analyzer (Mindray BS-120, Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China) with commercial, ready-to-use test kits (Alfa Diagnostics, Warsaw, Poland). All the measurements were validated using a multiparametric control serum (Alfa Diagnostics).

2.9. Statistical Analysis

All the analyses were performed in R (version 4.5.0). Statistical significance was defined as a p -value < 0.05 in all the analyses.

The required sample size was determined a priori based on an ANCOVA design using the `pwr.f2.test` function from the `pwr` package. Assuming a significance level (α) of 0.05 and targeting a moderate effect size ($f^2 = 0.18$, equivalent to Cohen's $f \approx 0.42$), a sample of $n = 24$ animals per group (total $n = 48$) was deemed sufficient to achieve a statistical power of 0.80.

The relative abundance of the pathogen species isolated from the milk samples was compared using Fisher's exact test.

The somatic cell counts were \log_2 -transformed to obtain the somatic cell score (SCS) in order to normalize the data and meet the assumptions of the linear model [37,38]. To analyze the effect of the treatment and time on the SCS, a linear mixed-effects model was fitted with fixed effects for the group, the time, and their interaction, and a random intercept for the cow to account for repeated measures using the `lme4` package. Post hoc pairwise comparisons between the groups at each time point, as well as between the baseline value and SCS recorded at each subsequent time point for each group, were performed using the estimated marginal means via the `emmeans` package. To control the false discovery rate associated with multiple testing, the p -values for all the pairwise comparisons were adjusted using the Benjamini–Hochberg FDR method. The assumptions of the model were assessed by visual inspection of the residual plots, and the model was considered appropriate as the residuals were approximately normally distributed and homoscedastic.

The inflammation score was treated as an ordered factor. To assess the effects of the treatment and time on the inflammation score, a cumulative link mixed-effects model (CLMM) was fitted using the `ordinal` package, with fixed effects for the treatment, the time, and their interaction, and a random intercept for the cow to account for repeated measures. Time was defined as a categorical factor, with 0 h serving as the reference category. The estimated marginal means (`emmeans`) for each Treatment \times Time combination were obtained and contrasted at each time point versus 0 h. The resulting p -values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) method.

The biochemistry, hematology, and milk yield baseline characteristics (pre- and post-treatment) were summarized as the mean \pm standard deviation (SD) for each treatment group. To evaluate the effect of treatment while adjusting for the baseline value, a one-way ANCOVA model was fitted with the post-treatment value as the dependent variable, treatment group as the categorical predictor, and baseline pre-treatment value as a continuous covariate. Statistical significance was calculated for the main effect of treatment on the data after adjustment for the pre-treatment values. The model residuals were inspected for normality (QQ-plot and Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test). The adjusted least-squares means (`lsmeans`) for the post-treatment values in each group and their pooled standard errors (SEMs) were estimated from the ANCOVA model using the `emmeans` package.

3. Results

3.1. Microbiological Analysis

All the mastitis cases examined in this study were of bacterial monoinfection origin, with no fungal growth detected (Figure 1). In the Control group, *S. uberis* was the predominant pathogen (50.0%), followed by coagulase-negative staphylococci (CNS) (41.7%) and *E. coli* (8.3%). In the Pectin10 group, *S. uberis* remained the most frequent isolate (58.3%), while CNS accounted for 25.0% and *E. coli* for 16.7% of cases. Fisher's exact test revealed no statistically significant difference in the distribution of the mastitis pathogens between the Control and Pectin10 groups ($p > 0.05$). Post-treatment milk cultures from both groups yielded no pathogenic growth, indicating a 100% bacteriological cure rate in each group.

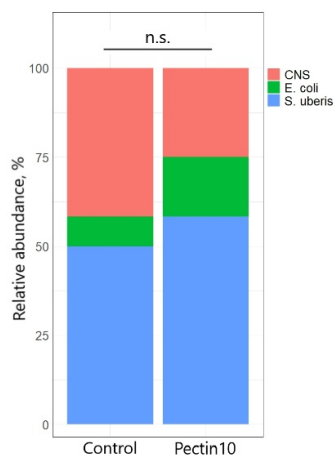


Figure 1. Distribution of mastitis-causing pathogens in dairy cows by treatment group. Relative abundance (%) of bacterial species isolated from mastitis cases in the Control and Pectin10 groups. All cases represented monoinfections. CNS = coagulase-negative staphylococci; *E. coli* = *Escherichia coli*; *S. uberis* = *Streptococcus uberis*. No significant (n.s.) difference was observed between groups (Fisher's exact test, p -value > 0.05).

3.2. Somatic Cell Count

The changes in the SCC for individual cows in the Control and Pectin10 groups across the entire experimental period, including the pre-treatment phase, are presented in Figure 2A. The temporal changes in the normalized SCS across the baseline assessment period (−72 h to −24 h), during multi-component drug administration in the Control group (0–12 h; shaded light blue), and throughout the six-day pectin treatment period in the Pectin10 group (0–144 h; shaded light orange), as well as the post-treatment follow-up period (up to 168 h), are shown in Figure 2B. No statistically significant differences in the SCS were detected between the groups at any time point. The SCS changes expressed as the difference from baseline are illustrated in Figure 2C. Both groups exhibited a similar overall pattern of SCS reduction during the treatment and follow-up period. In the Pectin10 group, a statistically significant reduction in the SCS compared to baseline was observed beginning at 96 h, whereas in the Control group, a significant reduction was detected 24 h later, starting at 120 h.

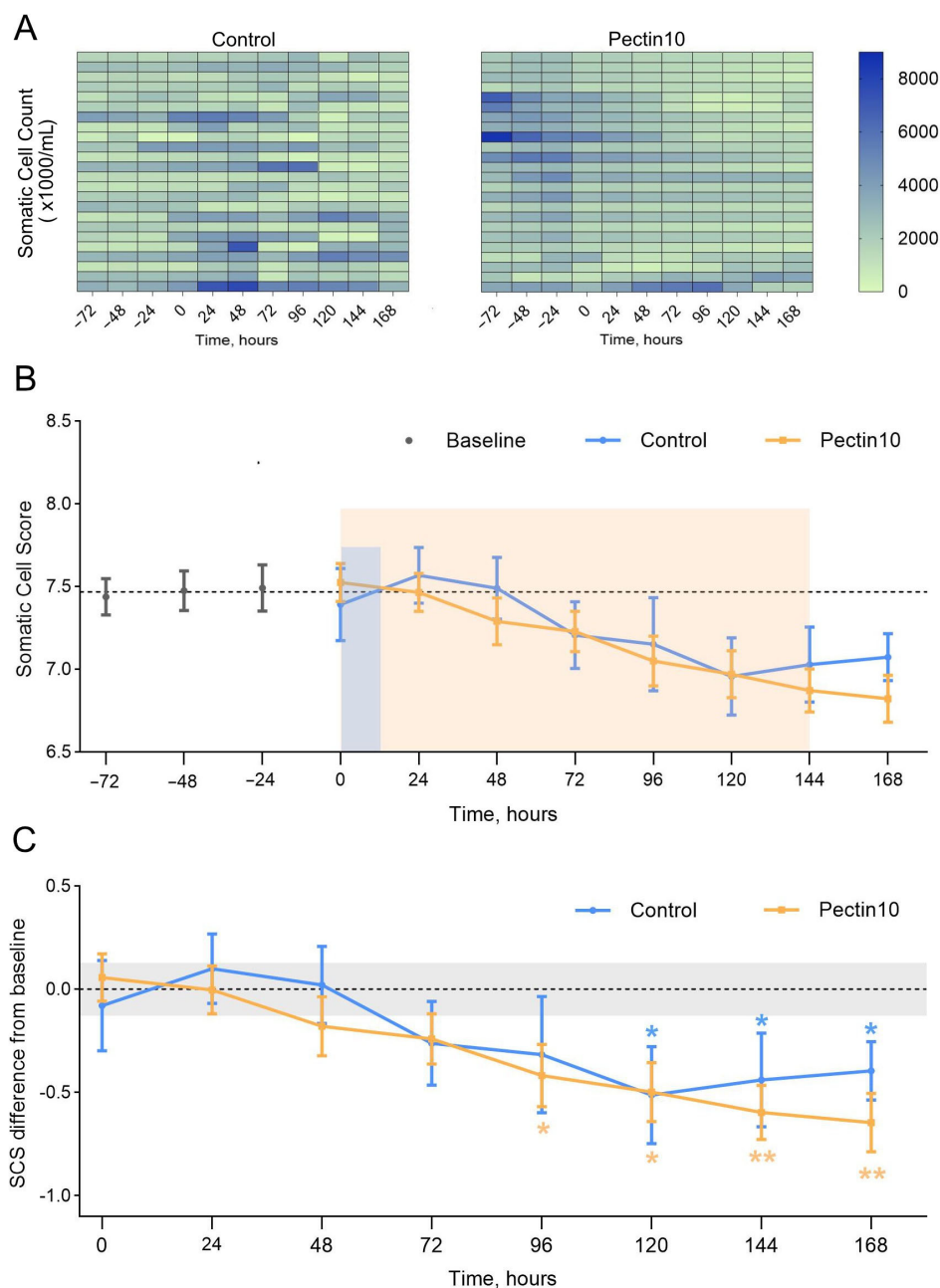


Figure 2. Temporal changes in the SCC and SCS in milk. (A) Heatmaps showing the individual cow SCC ($\times 1000/\text{mL}$) in the Control and Pectin10 groups from -72 h to 168 h. Each row represents one cow, with the color intensity indicating the SCC levels. (B) Mean SCS during the baseline assessment period (determined baseline marked with a dashed line) and throughout the experimental period for both treatment groups. The multi-component drug administration period (0–12 h) for the Control group is shaded light blue, while the pectin treatment period for the Pectin10 group (0–144 h) is shaded light orange. No significant differences were detected between the groups at any time point. Data are expressed as means \pm SEs. (C) Changes in the SCS during the experimental period, expressed as the difference from the baseline value (baseline 95% CI shaded light gray). Data are expressed as means \pm SEs. Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (LMM for repeated measures with FDR correction for multiple comparisons).

3.3. Clinical Score

The inflammatory response was assessed using the graded mastitis scoring system (0–3) throughout the study period. Figure 3A presents heatmaps illustrating the individual cow score changes (each row representing one cow) in the Control and Pectin10 groups,

covering both the pre-treatment and post-treatment phases. Notably, a score of three was not recorded in any animal at any time point in either group. Figure 3B shows the total number of cows with scores of zero, one, or two at each time point for both groups. Statistical comparisons were performed within each group, with all the time points evaluated against time point 0 h (treatment initiation). Both groups exhibited significant improvements in scores from 48 h onward, which were sustained throughout the observation period. Figure 3C presents boxplots comparing the score distributions between the treatment groups at each time point. No statistically significant differences were observed between the Control and Pectin10 groups at any time point. Overall, both groups demonstrated similar patterns of progressive resolution of mammary inflammation during the treatment and follow-up phases.

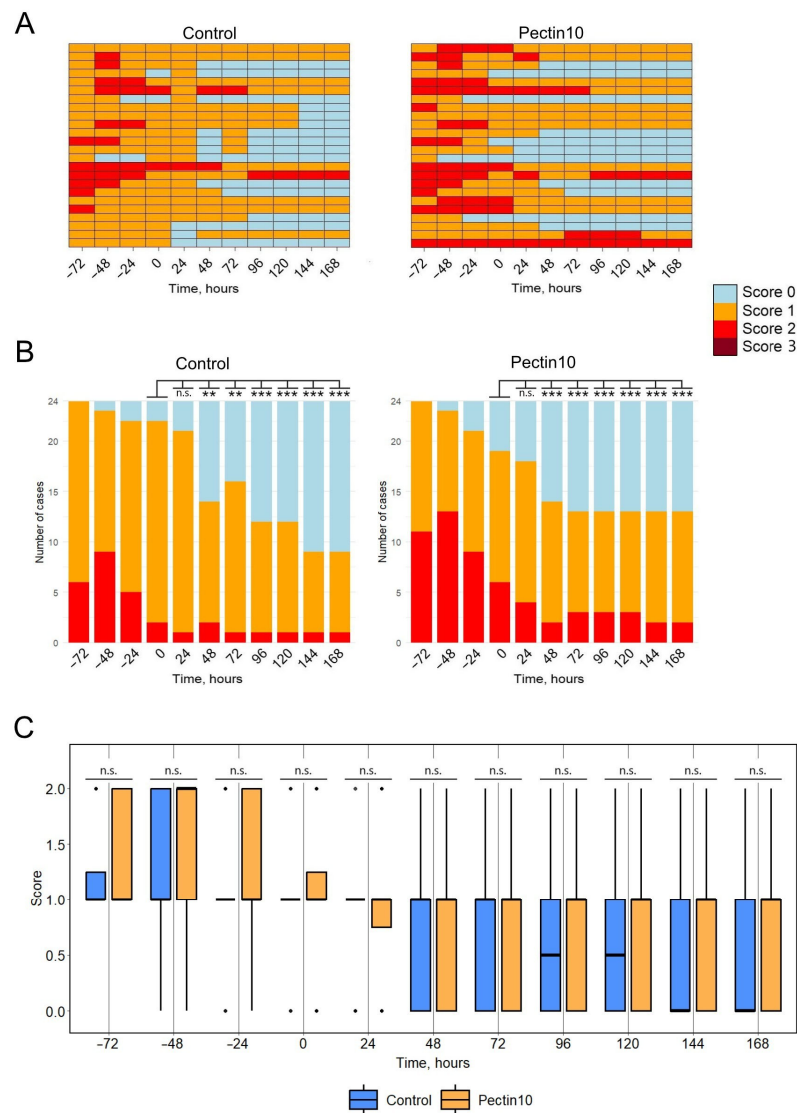


Figure 3. Temporal changes in mammary inflammation were assessed using mastitis scoring. (A) Heatmaps showing individual cow scores (0–2) in the Control and Pectin10 groups from –72 h to 168 h. Each row represents one cow. (B) Distribution of scores showing the total number of cases with scores of 0, 1, or 2 at each time point. Statistical significance indicates a comparison to time point 0 h (treatment initiation) within each group. (C) Boxplot comparisons of the score distributions between groups at each time point. No statistically significant differences (n.s.) were observed between the Control and Pectin10 groups at any time point. Statistical analysis: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n.s. = not significant (CLMM for repeated measures with FDR correction for multiple comparisons).

3.4. Milk Yield and TNF- α

There were no differences in productive performance, as the milk yield remained comparable between both groups after treatment (Table 1). Additionally, no significant differences in the serum TNF- α levels were observed between the treatment groups at the end of the follow-up period (time point 168 h, 48 h after treatment completion) (Table 1).

Table 1. Milk yield and serum TNF- α concentration in cows with clinical mastitis before and following treatment with either 10% pectin (Pectin10) or a multi-component intramammary antibiotic (Control).

Item	Pre-Treatment ¹		Post-Treatment ¹		ANCOVA ²			<i>p</i> -Value
	Control	Pectin10	Control	Pectin10	Control	Pectin10	SEM	
TNF- α , pg/mL	113 \pm 12	108 \pm 7	118 \pm 10	120 \pm 11	118	120	2.2	0.595
Milk yield, L/day	33.2 \pm 6.6	32.1 \pm 7.4	32.3 \pm 7.9	32.4 \pm 7.0	31.8	32.9	0.97	0.437

¹ Data are presented as the mean \pm SD for the pre-treatment and post-treatment levels in each group ($n = 24$ per group). ² Adjusted lsmeans and pooled SEM for the post-treatment data were estimated from the ANCOVA model. *p*-value refers to the effect of treatment on the post-treatment data, controlling for the baseline (pre-treatment) values.

3.5. Blood Biochemistry

No significant changes in the serum biochemical parameters were observed at the end of the follow-up period (168 h, i.e., 48 h after treatment completion) in either treatment group (Table 2). Similarly, the red blood cell indices and related hematological parameters (including hemoglobin and hematocrit), as well as the leukocyte counts, remained within the reference ranges in both groups before and after treatment, and no significant differences were found between the groups, indicating that both treatments were systemically well tolerated, with no detectable adverse effects on general health or hematological status.

Table 2. Serum biochemical parameters in cows with clinical mastitis before and following treatment with either 10% pectin (Pectin10) or a multi-component intramammary antibiotic (Control).

Item	Pre-Treatment ¹		Post-Treatment ¹		ANCOVA ²			<i>p</i> -Value
	Control	Pectin10	Control	Pectin10	Control	Pectin10	SEM	
Cholesterol, mmol/L	4.93 \pm 0.82	4.64 \pm 1.07	4.57 \pm 0.83	4.76 \pm 0.82	4.62	4.72	0.160	0.663
Bilirubin, μ mol/L	1.83 \pm 0.60	1.83 \pm 0.75	2.08 \pm 0.83	2.21 \pm 1.17	2.09	2.22	0.184	0.624
Urea, mmol/L	3.13 \pm 0.57	3.17 \pm 0.94	3.73 \pm 0.88	3.37 \pm 0.79	3.73	3.37	0.173	0.139
Creatinine, μ mol/L	88.9 \pm 7.3	88.1 \pm 11.8	89.7 \pm 8.6	90.1 \pm 10.0	89.7	90.0	1.83	0.893
Phosphorus, mmol/L	1.64 \pm 0.34	1.49 \pm 0.26	1.52 \pm 0.31	1.51 \pm 0.39	1.52	1.51	0.073	0.881
Calcium, mmol/L	2.33 \pm 0.19	2.32 \pm 0.16	2.26 \pm 0.16	2.32 \pm 0.16	2.26	2.32	0.033	0.222

¹ Data are presented as the mean \pm SD for the pre-treatment and post-treatment levels in each group ($n = 24$ per group). ² Adjusted lsmeans and pooled SEM for the post-treatment data were estimated from the ANCOVA model. *p*-value refers to the effect of treatment on the post-treatment data, controlling for the baseline (pre-treatment) values.

4. Discussion

The study conducted is one of the few experimental works evaluating the effectiveness of IMM pectin application in dairy cows under production conditions. Previous publications have mostly focused on the role of pectins in gut models, calf nutrition, or in vitro studies, while data on their local use in mastitis treatment are very limited. In this experiment, the effectiveness of pectin was compared for the first time with antibiotic therapy when applied directly into the udder, making this study an important starting point for further clinical and practical investigations.

Mastitis is a complex disease that can present as either a monoinfection or a mixed form, and its development involves the gastrointestinal tract, microbial metabolites, microbiota, and nutritional deficiencies [39]. The long-standing view of mastitis as solely an exogenous infection is incomplete, as increasing evidence supports the existence of an entero-mammary axis linking the gut and mammary gland health. Standard therapies for mastitis treatment are mainly based on antibiotics administered either intramammarily or systemically [14]. Although antibiotics are effective against common mastitis pathogens, their overuse carries the risk of microbial resistance and requires strict adherence to milk withdrawal periods. In recent years, there has been growing interest in alternative mastitis therapies that reduce antibiotic use. In this study, conducted under real dairy farm conditions, three different concentrations of pectin were tested. The clinical changes, SCC, blood, and biochemical parameters were also analyzed between the group receiving a 10% pectin solution and the Control group treated with a standard multicomponent preparation. The product used in the Control group contained a combination of several active substances with broad-spectrum activity against typical mastitis pathogens.

4.1. Clinical and Cytological Effectiveness, Mechanisms of Action and Immune Modulation

In light of the problems related to antimicrobial resistance and milk withdrawal periods, this study aimed to evaluate an alternative, non-antibiotic mastitis therapy using pectins. Intramammary pectin treatment proved to be as effective as antibiotic therapy, which was confirmed by the lack of statistically significant differences in many evaluated parameters. This is a noteworthy result, especially considering that the antibiotic preparation used represents a well-established standard in mastitis treatment. Achieving a therapeutic effect with a non-antibiotic agent highlights the potential of pectins as an alternative treatment strategy.

The results suggest that IMM administration of 10% pectin may be comparable to antibiotic therapy; however, this finding requires confirmation in studies with greater statistical power. The faster regression of clinical symptoms observed in the pectin group indicates that pectins may effectively modulate the inflammatory response in the udder. Specifically, the clinical signs resolved, on average, 1.6 days earlier in cows treated with the 10% pectin solution compared to the Control group ($p < 0.05$).

An objective confirmation of this difference in healing dynamics is the analysis of the changes in the SCC in milk. The SCC reflects the severity of inflammation in the mammary gland, where the higher the SCC, the stronger the inflammatory response and the higher the infiltration of leukocytes into the milk. In our study, a significantly faster decrease in the SCC was observed in the pectin-treated group compared to the Control group. As early as 48 h after the beginning of treatment, the average SCC in cows receiving 10% pectin began to drop more clearly than in cows treated with antibiotics (the difference between groups from day 2 onward was statistically significant). This indicates that in the pectin group, the inflammation subsided more quickly, while the udder responded with a reduction in inflammatory signs earlier than with standard treatment. In the Control group, the SCC also decreased, but the reduction was more gradual and delayed.

The faster normalization of the SCC in the milk of cows treated with pectin is consistent with the earlier resolution of clinical signs described above. Therefore, it can be assumed that IMM pectin application contributed to a more efficient reduction in the inflammatory response at the tissue level, leading to less leukocyte influx into the milk and quicker restoration of the udder's physiological condition.

The therapeutic effects of pectin likely result from multiple overlapping mechanisms. As plant-derived polysaccharides, pectins possess immunomodulatory properties, including interaction with pattern recognition receptors such as TLR2 and TLR4. These

interactions may downregulate the inflammatory cascade and result in a milder disease course [24,40]. While not directly bactericidal, this modulation may enhance host defense mechanisms and reduce tissue damage.

The anti-inflammatory effects of pectins have been documented beyond the context of mastitis. In human studies, citrus pectin supplementation significantly reduced the circulating levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) and increased the IL-10 levels [23]. Similar immunomodulatory effects were observed in animal models of colitis, allergy, and lung inflammation [24,40,41], supporting the broader relevance of these findings.

In vitro studies also demonstrate direct pectin-induced modulation of immune cell activity, such as reduced cytokine and free radical production in chicken monocytes [42]. While the data in bovines remain limited, these results support the rationale for pectin use in inflammatory conditions across species.

In addition to their biological activity, the physicochemical properties of pectins may play a complementary role. Their ability to form a gel-like, adhesive layer on mucosal surfaces could reduce bacterial adhesion, soothe local irritation, and facilitate mechanical clearance of pathogens during milking. Although in vitro gelation assays were not performed in this study, the capacity of pectins to undergo ionotropic gelation in the presence of divalent cations such as Ca²⁺ is well established. Milk and inflamed mammary tissues are rich in calcium ions, providing conditions that promote in situ gel formation following intramammary administration.

Studies in dermatological and mucosal models have demonstrated that pectin-based hydrogels form stable, bioadhesive films that protect epithelial surfaces, reduce transepithelial permeability, and support tissue regeneration [43]. We assumed that similar gelation occurs IMM, enabling pectin to coat the epithelium, reduce bacterial adhesion, and enhance barrier function. This may partially explain the rapid clinical and cytological improvement observed in the pectin-treated group. This dual action, biological and mechanical, may help explain the favorable clinical and cytological outcomes observed, despite the use of a simple 10% solution without additional active ingredients.

Furthermore, pectins and related polysaccharides have been implicated in tissue regeneration processes, including autophagy activation and epithelial repair [44]. Such mechanisms may have contributed to the faster stabilization of glandular function and the potentially lower risk of relapse observed in this study.

In summary, the observed efficacy of pectin appears to result from a synergistic combination of immunomodulatory effects, physical barrier formation, and support for tissue repair. This multi-level mechanism of action may offer significant advantages over conventional therapies that focus solely on pathogen eradication, particularly in light of increasing pressure to reduce antibiotic use in dairy production.

The data obtained provide a solid basis for planning larger-scale research. Pectin may prove to be a safe and effective alternative or complement to mastitis therapy, supporting efforts to reduce antibiotic use in veterinary medicine. Its potential economic benefits—no milk withdrawal period and fewer restrictions on milk sales—further enhance its attractiveness in farming practice.

4.2. Comparison with Other Polysaccharides (β -Glucan, Chitosan, Alginate)

Comparison of the obtained results with the effects found in other studies is very difficult, as intramammary use of pectins under farm or experimental conditions has not been thoroughly studied so far. However, there are studies in which immunomodulatory preparations, including natural polysaccharides (e.g., chitosan, β -glucans, alginate,

pectins), were used intramammarily as anti-inflammatory and antibacterial agents or as drug carriers.

A number of studies have evaluated the effects of administering various polysaccharides directly into the mammary gland during mastitis. Even in earlier research, attempts were made to use β -1,3-glucans (e.g., from yeast) as immunostimulants in the udder. Persson Waller et al. [15] administered β -1,3-glucan intramammarily to cows with chronic *S. aureus* infections, achieving only a moderate improvement in the local immune response without significant bacterial eradication. In our study, we isolated *S. uberis* and *E. coli*—that is, both streptococci and coliforms. Pectin accelerated the decrease in the SCC and clinical remission regardless of the type of bacteria, indicating a broader spectrum and effectiveness in both acute and subclinical infections. Another study showed that intramammary administration of β -glucan to sheep with mastitis triggered a local response—increased migration of leukocytes (neutrophils, macrophages) into the udder [45]. Our study shows that pectin significantly reduces the SCC levels within 48 h and accelerates the regression of clinical symptoms. This suggests that pectin induces faster and more effective inflammation control.

Although β -glucans exhibit some anti-inflammatory and immunostimulatory properties, their effectiveness in bacterial infections appears to depend on the experimental model. For example, better results were obtained in small ruminants in a fungal mastitis model, where IMM-applied β -glucan was as effective as conventional antifungal drugs [46]. Our results refer to cattle and bacterial mastitis, where 10% pectin proved effective under farm conditions, both clinically and cytologically, without the need for additional antifungal drugs. In the case of bacterial infections, especially those caused by Gram-negative bacteria, pectin shows a clear advantage. β -glucans primarily stimulate innate immunity by activating macrophages and neutrophils, but this may be insufficient in chronic, deep-seated infections.

Pectin, in addition to immunostimulation (as mentioned above), forms a hydrogel barrier on the epithelial surface, which hinders bacterial adhesion and neutralizes toxins. This combination of a physicochemical mechanism and immunomodulation may explain the faster and more comprehensive response observed in our study.

In the treatment of acute bacterial mastitis, pectin appears to offer faster and more comprehensive effects than β -glucans, particularly in reducing the SCC and regressing clinical symptoms.

β -glucans may be best suited as immune support during the dry period or in prevention, whereas pectin may be a better candidate for treating existing bacterial infections. In the literature, chitosan, similarly to pectin, is investigated as a polysaccharide for intramammary application due to its anti-inflammatory and antimicrobial properties (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, and *Aerococcus*) [12,44]. However, in practice, pectin turns out to be a simpler solution to apply, while being just as effective as chitosan. In our study, the rapid normalization of the SCC and regression of clinical symptoms suggest effective limitation of pathogen colonization or activity, confirming its therapeutic potential in mastitis treatment. Under farm conditions in cattle, 10% pectin alone proved to be clinically effective, achieving comparable cure rates and accelerated clinical remission compared to antibiotic therapy, without any additional compounds.

Chitosan acts mainly as an immunostimulant (stimulating phagocytes) and drug carrier (e.g., for matrine, berberine), which requires appropriate formulation and carrier stability [47]. Pectin combines immunomodulation with ease of preparation (soluble solution), forming a hydrogel protective barrier.

Pectin alone may provide equally effective infection elimination and faster clinical improvement in cattle, without the need for additional substances or more complex formulations. It does not require extra carriers or active compounds.

Alginates (e.g., sodium alginate derived from algae) are polysaccharides used in gel formulations and nanoparticles due to their ability to gel in the presence of calcium ions. Alginates themselves have low toxicity—in *in vitro* studies on mammary gland epithelial cells, alginate solutions showed no cytotoxic effect (similar to other natural polymers, such as carboxymethylcellulose and xanthan gum) [48]. Alginate is often combined with chitosan to create nanogels for controlled drug release. One example is a chitosan–alginate nanogel containing tilmicosin (a macrolide antibiotic). In an experiment on cows with staphylococcal mastitis, intramammary administration of this nanogel allowed for a 50% reduction in the antibiotic dose (150 vs. 300 mg/day) while achieving a higher cure rate (75% vs. 50%) in staphylococcal mastitis [49]. This shows that alginate, in combination with chitosan, can effectively act as a drug carrier, prolonging its action and improving its therapeutic efficacy. Our 10% pectin solution worked independently, without additional carriers or antibiotics, achieving bacteriological effectiveness comparable to standard therapy and faster clinical improvement (a clear drop in the SCC after just 48 h). Alginate–chitosan nanogels allow for optimized antibiotic dosing, whereas pectin demonstrates sufficient standalone anti-inflammatory and antibacterial activity.

In contrast to β -glucans, chitosan, and alginates, which show limited effectiveness in bacterial infections, pectin provided rapid reduction of the SCC and better control of clinical symptoms. As mentioned, pectins have documented anti-inflammatory and immunomodulatory effects; their antibacterial activity and ability to modulate immune responses have been demonstrated in various models [50]. In the context of mastitis treatment, it is worth noting that some plant-based intramammary preparations contain polysaccharides, which may play an active role. The rapid reduction in the SCC and resolution of clinical symptoms observed in this study after administration of a 10% pectin solution suggests the multi-level action of this polysaccharide in the mammary gland. As previously shown, pectins can modulate the host immune response by influencing the TLR2 and TLR4 receptors, thereby limiting the production of pro-inflammatory cytokines [23,24]. This effect may be particularly important in the early phase of inflammation, when excessive activation of the innate immune response exacerbates tissue damage.

Our observations also indicate local activation of defense mechanisms—a significant reduction in the SCC within 48 h after pectin infusion may suggest a rapid influx of leukocytes to the site of infection and enhanced phagocytic activity. A similar effect was previously noted with the use of β -glucans [15] and chitosan during the dry period, where an increase in the SCC and lactoferrin indicated activation of protective mechanisms [13].

Although polysaccharide therapies are more animal- and consumer-friendly (no withdrawal period, no risk of resistance), determining the effectiveness of polysaccharides such as pectin in acute mastitis cases requires further comparative studies with antibiotics. In our study, only the 10% pectin solution proved clinically effective—lower concentrations (2% and 4%) did not accelerate clinical remission, indicating that the effectiveness of these preparations depends on the concentration used.

4.3. Safety and Tolerance

An important observation was the absence of adverse effects related to pectin therapy during this study. None of the cows that received the 10% pectin solution intramammarily for 7 days showed any signs of local irritation in the treated quarters (e.g., increased pain, swelling not related to infection, or discharge suggesting an allergic reaction) or systemic symptoms indicating possible toxicity. No significant changes were observed in the hema-

tological profiles, which may be attributed to the moderate nature of the inflammation and the absence of a systemic leukocyte shift typically seen in acute mastitis. Pectin application was well tolerated, during and after the treatment period, while no abnormal behavior or changes in milk quality were noted, apart from those related to the inflammatory process itself. No significant differences in the milk TNF- α levels were observed between the Pectin10 and Control groups. The lack of a TNF- α rise in the Pectin10 group may reflect a controlled local immune response, consistent with the immunomodulatory properties of pectin that support the resolution of inflammation without triggering excessive cytokine production.

This safety profile is in line with the general characteristics of pectins as natural substances long used in the pharmaceutical industry. Pectins are classified as dietary fibers and recognized as safe; moreover, studies on their use in especially sensitive populations (e.g., in infant formula) have confirmed their lack of harmful effects [24]. The absence of adverse effects in this study indicates that IMM administration of pectins does not pose a health risk to cows and, at the same time, represents an attractive alternative in terms of food safety. Unlike antibiotics, pectins do not leave drug residues in milk and do not contribute to the selection of antimicrobial resistance. This safety aspect is particularly important in the context of efforts to reduce antibiotic use in food-producing animals.

An important aspect of evaluating alternative intramammary therapies is not only their clinical effectiveness but also their local tolerance and safety of use. Pectins, like other natural polysaccharides, show excellent local tolerance in the udder. In *in vitro* studies using mammary epithelial cell lines, pectin solutions did not exhibit cytotoxic effects, not even at high concentrations [48]. Although direct reports on intramammary administration of pectins are limited, experience with gel formulations (e.g., hydroxypropyl methylcellulose, carboxymethylcellulose, alginate) indicates that these polysaccharides do not damage teat tissues and do not induce inflammation in *ex vivo* studies [48]. In clinical practice, no irritations or discomfort were observed in cows after application of pectin solutions, which is consistent with the GRAS status of pectins commonly used in the food and pharmaceutical industries [49]. This high safety profile confirms that a 10% pectin solution can be safely used intramammarily, minimizing the risk of adverse effects.

From a clinical practice perspective, the pharmacokinetic properties of pectins after intramammary administration are extremely important. Intramammary polysaccharides do not enter the systemic circulation and remain primarily within the udder tissue, which eliminates concerns about milk residues and the need for withdrawal periods. Pectins are locally biodegraded by enzymes (e.g., lysozyme) or phagocytosed by macrophages, and any potential trace presence in milk does not negatively affect its composition (lactose, fat, protein) or sensory qualities [12]. Unlike antibiotics, pectins are not subject to residue limits, as they are classified as soluble dietary fiber with GRAS status. The intramammary pharmacokinetics of pectins are characterized by rapid transformation of the solution into a hydrogel, prolonged *in situ* retention, and minimal systemic absorption. This ensures a concentrated, long-lasting local effect without the risk of systemic toxicity [14,49].

4.4. Limitations of the Study and Directions for Further Research

The limitations of this study include its pilot nature, the relatively small number of animals, and the lack of a placebo group, which limit the interpretation of the absolute effectiveness of pectins. Another limitation is the absence of culture-based antimicrobial susceptibility testing. Without AST, we could not benchmark the efficacy against MDR/XDR phenotypes. Additionally, the pharmacokinetics of intramammary-administered pectin have not been established. Although pectin is not absorbed via the gastrointestinal tract and is generally considered safe, its persistence within the mammary gland and potential presence in milk remain unknown. These data are essential for estimating the minimum

effective dose, establishing withdrawal times, and ensuring consumer safety. Due to the lack of pharmacokinetic information, the current dosing scheme (e.g., frequency of administration, solution concentration) was based primarily on preliminary assumptions and empirical experience.

Despite these limitations, this study confirms the promising therapeutic potential of pectins in mastitis treatment. In the context of increasing microbial resistance and the need to reduce antibiotic use in food-producing animals, non-antibiotic mastitis therapies such as pectin are particularly relevant. Our results suggest that pectins may be effective without the use of traditional antibacterial drugs; however, this requires further validation.

Future studies should aim to optimize the dosing protocols by determining the minimum effective concentrations, ideal dosing frequency, and pharmacokinetics and metabolism of pectins in the mammary gland. Additionally, broader immunological profiling should be included, encompassing both pro- and anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-1 β , IL-6, IL-10) and pattern recognition receptors such as TLR2 and TLR4 to better characterize pectin's immunomodulatory effects.

Microbiome analysis before and after treatment could also provide insight into how pectin affects the intramammary microbial ecosystem and host–pathogen interactions. Moreover, given the observed need for daily pectin administration (seven doses) compared to only two doses in the antibiotic group, future work should explore improved delivery systems. These might include bioadhesive formulations, in situ gelling polymers, or nanoparticle-based carriers to reduce the treatment frequency while maintaining the therapeutic efficacy and minimizing the labor and compliance challenges.

Another mechanism worth exploring is pectin's potential role in modulating bacterial biofilms and supporting epithelial repair. Pectins have demonstrated biofilm-disrupting and anti-adhesive properties in vitro. These features may be relevant in chronic mastitis caused by persistent biofilm-forming pathogens such as *Staphylococcus aureus*. Pectin has also been shown to stabilize the epithelial barriers in intestinal models via interactions with Toll-like receptors and mucosal immune pathways. Although these effects were not directly assessed in this study, future investigations should include histopathological evaluation of epithelial healing and post-treatment biofilm analysis.

Lastly, a formal economic assessment and evaluation of market acceptance, including consumer perception of “antibiotic-free” labeling, remain important areas for future research.

5. Conclusions

This pilot clinical trial showed that intramammary administration of a 10% pectin solution provided a similar level of clinical effectiveness, with no statistically significant difference compared to standard antibiotic treatment, while also potentially leading to faster clinical improvement and quicker normalization of inflammation markers (SCC), with no adverse effects observed.

The results also have broader significance, aligning with the principles of the One Health concept, which aims to integrate human, animal, and environmental health. Intramammary application of pectins may represent an important step toward reducing antibiotic use in dairy cattle farming, thereby helping to lower the risk of developing antimicrobial resistance.

The use of pectins, as natural and safe substances, fits into global strategies aimed at producing antibiotic-residue-free milk and supports the protection of public health and the environment. Pectin, as a natural, safe, and effective compound, may play a key role in the future in reducing antibiotic use in dairy cattle.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agriculture15161760/s1>, Figure S1: Temporal changes in mammary inflammation assessed by mastitis scoring in the preliminary experiment.

Author Contributions: Conceptualization, M.K.; methodology, M.K., A.B. and T.G.; formal analysis, M.K.; investigation, M.K.; resources, M.K., A.B., T.G. and E.T.; data curation, M.K.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, A.B., T.G. and E.T.; visualization, M.K.; supervision, A.B. and T.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Lublin (Resolution No. 12/2024).

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AMR	Antimicrobial resistance
CLMM	Cumulative link mixed-effects model
FDR	False discovery rate
GRAS	Generally recognized as safe
IMM	Intramammary
LM	Low methoxyl
PBS	Phosphate-buffered saline
PCU	Population correction unit
SCC	Somatic cell count
SCS	Somatic cell score
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
YXT	Yi-Xiong-Tang

References

1. European Medicines Agency. *Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2022: Trends from 2010 to 2022: Thirteenth ESVAC Report*; European Medicines Agency: London, UK, 2023.
2. European Medicines Agency. European Sales and Use of Antimicrobials for Veterinary Medicine (ESUAvet). In *Annual Surveillance Report for 2023 (EMA/CVMP/ESUAVET/80289/2025)*; European Medicines Agency: London, UK, 2025.
3. Sordillo, L.M.; Streicher, K.L. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 135–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Damm, M.; Holm, C.; Blaabjerg, M.; Bro, M.N.; Schwarz, D. Differential Somatic Cell Count—A Novel Method for Routine Mastitis Screening in the Frame of Dairy Herd Improvement Testing Programs. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 4926–4940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. European Medicines Agency. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC): 2009–2023*; European Medicines Agency: London, UK, 2023.
6. Song, X.; Huang, X.; Xu, H.; Zhang, C.; Chen, S.; Liu, F.; Guan, S.; Zhang, S.; Zhu, K.; Wu, C. The Prevalence of Pathogens Causing Bovine Mastitis and Their Associated Risk Factors in 15 Large Dairy Farms in China: An Observational Study. *Vet. Microbiol.* **2020**, *247*, 108757. [[CrossRef](#)]
7. Steele, N.M.; Dicke, A.; De Vries, A.; Lacy-Hulbert, S.J.; Liebe, D.; White, R.R.; Petersson-Wolfe, C.S. Identifying Gram-Negative and Gram-Positive Clinical Mastitis Using Daily Milk Component and Behavioral Sensor Data. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 2602–2614. [[CrossRef](#)]
8. Bechtold, V.; Petzl, W.; Huber-Schlenstedt, R.; Sorge, U.S. Distribution of Bovine Mastitis Pathogens in Quarter Milk Samples from Bavaria, Southern Germany, between 2014 and 2023—A Retrospective Study. *Animals* **2024**, *14*, 2504. [[CrossRef](#)]






9. Suzuki, N.; Isobe, N. Determining Causal Pathogens and Inflammatory State of Mastitis in Dairy Cows via Gram Staining of Precipitates in Milk. *Front. Vet. Sci.* **2025**, *11*, 1492564. [[CrossRef](#)]
10. Bradley, A.J.; Leach, K.A.; Breen, J.E.; Green, L.E.; Green, M.J. Survey of the Incidence and Aetiology of Mastitis on Dairy Farms in England and Wales. *Vet. Rec.* **2007**, *160*, 253–258. [[CrossRef](#)]
11. Minzanova, S.T.; Mironov, V.F.; Arkhipova, D.M.; Khabibullina, A.V.; Mironova, L.G.; Zakirova, Y.M.; Milyukov, V.A. Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review. *Polymers* **2018**, *10*, 1407. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, H.; Wang, Z.; Yao, H.; Jiang, L.; Tong, J. Intramammary Infusion of Matrine-Chitosan Hydrogels for Treating Subclinical Bovine Mastitis—Effects on Milk Microbiome and Metabolites. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 950231. [[CrossRef](#)]
13. Lanctôt, S.; Fustier, P.; Taherian, A.R.; Bisakowski, B.; Zhao, X.; Lacasse, P. Effect of Intramammary Infusion of Chitosan Hydrogels at Drying-off on Bovine Mammary Gland Involution. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 2269–2281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yang, W.-T.; Ke, C.-Y.; Wu, W.-T.; Lee, R.-P.; Tseng, Y.-H. Effective Treatment of Bovine Mastitis with Intramammary Infusion of *Angelica dahurica* and *Rheum officinale* Extracts. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 7242705. [[CrossRef](#)]
15. Persson Waller, K.; Grönlund, U.; Johannisson, A. Intramammary Infusion of β 1,3-glucan for Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Vet. Med. Ser. B* **2003**, *50*, 121–127. [[CrossRef](#)]
16. Suresh, S.; Sankar, P.; Telang, A.G.; Kesavan, M.; Sarkar, S.N. Nanocurcumin Ameliorates *Staphylococcus aureus*-Induced Mastitis in Mouse by Suppressing NF- κ B Signaling and Inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *65*, 408–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Beukema, M.; Ishisono, K.; de Waard, J.; Faas, M.M.; de Vos, P.; Kitaguchi, K. Pectin Limits Epithelial Barrier Disruption by *Citrobacter rodentium* through Anti-Microbial Effects. *Food Funct.* **2021**, *12*, 881–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Daoud, Z.; Sura, M.; Abdel-Massih, R.M. Pectin Shows Antibacterial Activity against *Helicobacter pylori*. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2013**, *4*, 273–277. [[CrossRef](#)]
19. Lee, J.-H.; Lee, Y.-K.; Choi, Y.-R.; Park, J.; Jung, S.K.; Chang, Y.H. The Characterization, Selenylation and Anti-Inflammatory Activity of Pectic Polysaccharides Extracted from *Ulmus pumila* L. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 311–318. [[CrossRef](#)]
20. Sahasrabudhe, N.M.; Beukema, M.; Tian, L.; Troost, B.; Scholte, J.; Bruininx, E.; Bruggeman, G.; Van Den Berg, M.; Scheurink, A.; Schols, H.A.; et al. Dietary Fiber Pectin Directly Blocks Toll-Like Receptor 2-1 and Prevents Doxorubicin-Induced Ileitis. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 383. [[CrossRef](#)]
21. Blanco-Pérez, F.; Steigerwald, H.; Schülke, S.; Vieths, S.; Toda, M.; Scheurer, S. The Dietary Fiber Pectin: Health Benefits and Potential for the Treatment of Allergies by Modulation of Gut Microbiota. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2021**, *21*, 43. [[CrossRef](#)]
22. Rajan, D.K.; Divya, D.; Mohan, K. Potential Role of Plant Polysaccharides as Immunostimulants in Aquaculture—A Review. *Ann. Anim. Sci.* **2023**, *23*, 951–969. [[CrossRef](#)]
23. Vijay, A.; Kelly, A.; Miller, S.; Marshall, M.; Alonso, A.; Kouraki, A.; Probert, C.; Simpson, E.J.; Valdes, A.M. Supplementation with Citrus Low-Methoxy Pectin Reduces Levels of Inflammation and Anxiety in Healthy Volunteers: A Pilot Controlled Dietary Intervention Study. *Nutrients* **2024**, *16*, 3326. [[CrossRef](#)]
24. Donadio, J.L.S.; Fabi, J.P.; Sztejn, M.B.; Salerno-Gonçalves, R. Dietary Fiber Pectin: Challenges and Potential Anti-Inflammatory Benefits for Preterms and Newborns. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1286138. [[CrossRef](#)]
25. Yang, W.; Zerbe, H.; Petzl, W.; Brunner, R.M.; Günther, J.; Draing, C.; Von Aulock, S.; Schuberth, H.-J.; Seyfert, H.-M. Bovine TLR2 and TLR4 Properly Transduce Signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* Fails to Both Activate NF- κ B in Mammary Epithelial Cells and to Quickly Induce TNF α and Interleukin-8 (CXCL8) Expression in the Udder. *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 1385–1397. [[CrossRef](#)]
26. Huang, Y.; Shen, L.; Jiang, J.; Xu, Q.; Luo, Z.; Luo, Q.; Yu, S.; Yao, X.; Ren, Z.; Hu, Y.; et al. Metabolomic Profiles of Bovine Mammary Epithelial Cells Stimulated by Lipopolysaccharide. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mohnen, D. Biosynthesis of Pectins and Galactomannans. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1999; pp. 497–527; ISBN 978-0-08-091283-7.
28. Kandeel, S.A.; Megahed, A.A.; Constable, P.D. Evaluation of Hand-held Sodium, Potassium, Calcium, and Electrical Conductivity Meters for Diagnosing Subclinical Mastitis and Intramammary Infection in Dairy Cattle. *Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 2343–2353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Harte, F.M.; Montes, C.; Adams, M.; San Martin-Gonzalez, M.F. Solubilized Micellar Calcium Induced Low Methoxyl-Pectin Aggregation during Milk Acidification. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2705–2709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Yan, J.; Yang, R.; Yu, S.; Zhao, W. The Application of the Lytic Domain of Endolysin from *Staphylococcus aureus* Bacteriophage in Milk. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 2641–2653. [[CrossRef](#)]
31. Presentato, A.; Piacenza, E.; Scurria, A.; Albanese, L.; Zabini, F.; Meneguzzo, F.; Nuzzo, D.; Pagliaro, M.; Martino, D.C.; Alduina, R.; et al. A New Water-Soluble Bactericidal Agent for the Treatment of Infections Caused by Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. *Antibiotics* **2020**, *9*, 586. [[CrossRef](#)]
32. Purnomo, E.H.; Nabilah, U.U.; Sitanggang, A.B. Determination of Viscosity and Critical Concentrations of Commercial Low Methoxyl Pectin. *Int. J. Food Eng.* **2023**, *19*, 467–477. [[CrossRef](#)]
33. Pyörälä, S. Indicators of Inflammation in the Diagnosis of Mastitis. *Vet. Res.* **2003**, *34*, 565–578. [[CrossRef](#)]

34. Neculai-Valeanu, A.-S.; Ariton, A.-M. Udder Health Monitoring for Prevention of Bovine Mastitis and Improvement of Milk Quality. *Bioengineering* **2022**, *9*, 608. [[CrossRef](#)]
35. Balemi, A.; Gumi, B.; Amenu, K.; Girma, S.; Gebru, M.; Tekle, M.; Ríus, A.A.; D'Souza, D.H.; Agga, G.E.; Kerro Dego, O. Prevalence of Mastitis and Antibiotic Resistance of Bacterial Isolates from CMT Positive Milk Samples Obtained from Dairy Cows, Camels, and Goats in Two Pastoral Districts in Southern Ethiopia. *Animals* **2021**, *11*, 1530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kan, X.; Hu, G.; Liu, Y.; Xu, P.; Huang, Y.; Cai, X.; Guo, W.; Fu, S.; Liu, J. Mammary Fibrosis Tendency and Mitochondrial Adaptability in Dairy Cows with Mastitis. *Metabolites* **2022**, *12*, 1035. [[CrossRef](#)]
37. Čítek, J.; Brzáková, M.; Hanusová, L.; Hanuš, O.; Večerek, L.; Samková, E.; Jozová, E.; Hoštičková, I.; Trávníček, J.; Klojda, M.; et al. Somatic Cell Score: Gene Polymorphisms and Other Effects in Holstein and Simmental Cows. *Anim. Biosci.* **2022**, *35*, 13–21. [[CrossRef](#)]
38. Sobczyński, B.; Piwczyński, D.; Sitkowska, B.; Wójcik, P.; Kolenda, M. The Effectiveness of Using Bulls with Increased Immune Response in Terms of Milk Yield, Milk Contents, and Somatic Cell Count in Polish Holstein-Friesian Cows. *Ann. Anim. Sci.* **2024**, *24*, 791–802. [[CrossRef](#)]
39. Wang, Y.; Zhao, Y.; Tang, X.; Nan, X.; Jiang, L.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, L.; Yao, J.; Xiong, B. Nutrition, Gastrointestinal Microorganisms and Metabolites in Mastitis Occurrence and Control. *Anim. Nutr.* **2024**, *17*, 220–231. [[CrossRef](#)]
40. Bagnicka, E.; Brzozowska, P.; Żukowski, K.; Grochowska, R. The Association of Gene Polymorphisms with Milk Production and Mastitis Resistance Phenotypic Traits in Dairy Cattle. *Ann. Anim. Sci.* **2023**, *23*, 419–430. [[CrossRef](#)]
41. Steigerwald, H.; Albrecht, M.; Blissenbach, B.; Krause, M.; Wangorsch, A.; Schott, M.; Gonzalez-Menendez, I.; Quintanilla-Martinez, L.; Toda, M.; Vieths, S.; et al. Dietary Fiber Pectin Alters the Gut Microbiota and Diminishes the Inflammatory Immune Responses in an Experimental Peach Allergy Mouse Model. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 30503. [[CrossRef](#)]
42. Ávila, G.; De Leonardis, D.; Grilli, G.; Lecchi, C.; Ceciliani, F. Anti-Inflammatory Activity of Citrus Pectin on Chicken Monocytes' Immune Response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2021**, *237*, 110269. [[CrossRef](#)]
43. Nordin, N.N.; Aziz, N.K.; Naharudin, I.; Anuar, N.K. Effects of Drug-Free Pectin Hydrogel Films on Thermal Burn Wounds in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Polymers* **2022**, *14*, 2873. [[CrossRef](#)]
44. Tong, J.; Hou, X.; Cui, D.; Chen, W.; Yao, H.; Xiong, B.; Cai, L.; Zhang, H.; Jiang, L. A Berberine Hydrochloride-Carboxymethyl Chitosan Hydrogel Protects against *Staphylococcus aureus* Infection in a Rat Mastitis Model. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *278*, 118910. [[CrossRef](#)]
45. Ząbek, K.; Milewski, S.; Wójcik, R.; Siwicki, A.K. Effect of β -1,3/1,6-D-Glucan in Diet on Productivity and Humoral and Cellular Defense Mechanisms in Sheep. *Acta Vet. Brno* **2013**, *82*, 141–146. [[CrossRef](#)]
46. Mahmoud, S.H.; Nabhan, S. The Effectiveness of β -Glucan in the Treatment of Caprine Mastitis Induced by *Candida albicans*. *Iraqi J. Vet. Med.* **2024**, *48*, 81–87. [[CrossRef](#)]
47. Kamal, M.; Youssef, I.M.; Khalil, H.A.; Ayoub, M.A.; Hashem, N.M. Multifunctional Role of Chitosan in Farm Animals: A Comprehensive Review. *Ann. Anim. Sci.* **2023**, *23*, 69–86. [[CrossRef](#)]
48. Bhattarai, S.; Perumal, D.; Rathbone, M.J.; Bunt, C.R.; Alany, R.G. On the Biocompatibility and Teat Retention of in Situ Gelling Intramammary Formulations: Cattle Mastitis Prevention and Treatment. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1732. [[CrossRef](#)]
49. Zhou, K.; Wang, X.; Chen, D.; Yuan, Y.; Wang, S.; Li, C.; Yan, Y.; Liu, Q.; Shao, L.; Huang, L.; et al. Enhanced Treatment Effects of Tilmicosin against *Staphylococcus aureus* Cow Mastitis by Self-Assembly Sodium Alginate-Chitosan Nanogel. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 524. [[CrossRef](#)]
50. Wiese, M. The Potential of Pectin to Impact Pig Nutrition and Health: Feeding the Animal and Its Microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* **2019**, *366*, fnz029. [[CrossRef](#)]

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

Article

Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*

Marcin Kocik ¹, Artur Burmańczyk ^{2,*}, Michał Bednarski ³, Marta Sołtysiuk ⁴, Tomasz Grabowski ⁵ and Ewa Tomaszewska ⁶

¹ Private Veterinary Practice, Chopina 5, 33-100 Tarnów, Poland; kocikmj@gmail.com

² Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

³ Department of Epizootiology and Clinic of Bird and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Grunwaldzki Sq. 47, 50-366 Wrocław, Poland; michal.bednarski@upwr.edu.pl

⁴ Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 2, 10-917 Olsztyn, Poland; marta.soltysiuk@uwm.edu.pl

⁵ Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk, Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, Poland; tomasz.grabowski@gumed.edu.pl

⁶ Department Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland; ewarst@interia.pl

* Correspondence: artur.burmanczuk@up.lublin.pl

Abstract

Mastitis caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis* remains one of the leading causes of antimicrobial use in dairy cattle, contributing to resistance development and economic losses. This study evaluated the therapeutic potential of the natural flavonoid morin in clinical mastitis in dairy cows. The in vitro antimicrobial activity of morin (1–3% *w/v*) was assessed by disk diffusion, and the 3% formulation was selected for an in vivo field trial. Seventy-two Holstein–Friesian cows with mastitis caused by *E. coli* or *S. uberis* were randomly assigned to one of three intramammary treatments: 3% morin, phosphate-buffered saline, or an antibiotic, serving as a positive control. Somatic cell count (SCC) and clinical scores were monitored for seven days. In *E. coli* infections, morin significantly reduced somatic cell scores at 144 h and 168 h and improved clinical scores from 48 h onward, showing efficacy comparable to antibiotics. In *S. uberis* mastitis, morin induced clinical improvement at 96–168 h but resulted in slower and smaller SCC reduction than antibiotic control therapy. Phosphate-buffered saline produced no significant changes. These results indicate that morin exerts anti-inflammatory and supportive effects in bovine mastitis, particularly in Gram-negative infections, but is less effective against *S. uberis*. Further studies on pharmacokinetics, bacteriological cure rates, and optimized formulations are warranted to confirm its clinical utility.

Keywords: morin; mastitis; intramammary; *E. coli*; *S. uberis*



Academic Editor: Mo Salman

Received: 14 October 2025

Revised: 11 November 2025

Accepted: 12 November 2025

Published: 13 November 2025

Citation: Kocik, M.; Burmańczyk, A.; Bednarski, M.; Sołtysiuk, M.; Grabowski, T.; Tomaszewska, E. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture* **2025**, *15*, 2359. <https://doi.org/10.3390/agriculture15222359>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mastitis is one of the most frequent and economically relevant diseases in dairy cattle [1]. The cost of a single clinical case has been estimated at 179–500 USD per cow [2–4]. Environmental pathogens, particularly *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*, are major

etiological agents in dairy herds [5,6]. Analysis of the results obtained in 2013–2019 indicates that in north-eastern Poland in the years 2013–2019, the share of *S. uberis* bacteria in milk samples of clinically and sub-clinically changed quarters was 39–49% of isolation [7]. Another authors report that *S. uberis* was isolated in 38% and *E. coli* in 21% of cases of clinical mastitis from three regions of Poland [8]. Mastitis remains the primary indication for antibiotic use in dairy cattle, contributing to the development of antimicrobial resistance. Although antimicrobial consumption in Europe has recently decreased, the need for effective approaches that reduce reliance on antibiotics while maintaining udder health remains a major priority.

Mastitis is the leading reason for antibiotic use in dairy cows, and the treatment of clinical cases is the most common indication for their application, which entails costs due to milk losses and contributes to the selection of resistant strains [9,10]. Despite the observed decline in total sales of veterinary antimicrobials in Europe, the consumption driven by mastitis remains high [11]. This phenomenon, in the context of the global antimicrobial resistance problem and the One Health concept, highlights the need for rationalization of therapy and the search for different alternatives [1,12,13].

Natural plant-derived compounds with antimicrobial or immunomodulatory activity are being explored as supportive options in mastitis therapy [11,14]. Flavonoid-based bioactives have attracted particular attention due to their ability to modulate inflammatory pathways and their suitability for use in dairy cows without the risk of milk residues [15]. Morin (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone) is a naturally occurring flavonoid found in plants of the *Moraceae* family and other botanical sources. It exhibits documented anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory properties, including inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways [16]. In vitro studies in LPS-stimulated mammary epithelial cells have shown that morin reduces the expression of pro-inflammatory cytokines and helps preserve the integrity of the blood–milk barrier [17]. These biological effects provide a rationale for exploring morin as a supportive therapeutic option in bovine mastitis, particularly in infections where excessive inflammation drives clinical severity. However, clinical evidence on its effectiveness in dairy cows remains limited [16,18,19]. Therefore, the practical application of morin requires further investigation, especially clinical trials in target species. To date, there is a lack of in vivo data on its efficacy against mastitis caused by *E. coli* and *S. uberis*, which justifies the present study.

Given these gaps, we hypothesized that morin could be administered in mild and selected cases of clinical mastitis, and that its anti-inflammatory and antibacterial properties would reduce the severity of inflammatory changes in the mammary gland, manifested by a decrease in SCC in milk and improvement of the clinical condition of affected quarters. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of topical morin treatment in clinical mastitis in dairy cows caused by two common environmental pathogens: *E. coli* (Gram-negative rod) and *S. uberis* (Gram-positive streptococcus).

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The study enrolled Holstein–Friesian dairy cows (mean body weight 650 ± 50 kg; 3–7 years of age) from a single commercial herd in Liplas, Lesser Poland Voivodeship, Poland (49°57' N, 20°13' E). The trial was conducted from March 2025 to June 2025. Cows were kept in a deep-litter barn with straw and hay bedding. Stocking density was 80 to 100%, providing 9.3 to 13.9 m² per cow. Bedding replacement was irregular, and grooming was performed every two days. The grooved barn floor was maintained to reduce slipping. No effective heat-abatement system was in place, which could allow thermal stress during warmer periods. These conditions were consistent across all study groups.

The cows were housed in a deep-litter barn with straw and hay bedding, under 80–100% stocking density, and had access to 9.3–13.9 m² per cow. Bedding was replaced irregularly, and grooming was performed every two days. The barn floor was grooved and maintained to prevent slipping. No or improperly functioning heat abatement systems were present, which could contribute to thermal stress during warmer periods. These management practices and environmental factors were consistent for all cows throughout the whole study.

Cows were fed a balanced total mixed ration of protein concentrates, mixed cereals, maize and grass silages, straw, and mineral-vitamin supplements (Supplementary Table S1) offered ad libitum. Feed quality was generally good, with occasional mild spoilage. Feed bunk access averaged 0.56 to 0.75 m per cow, and bunks were cleaned regularly but not daily. Water was provided ad libitum at multiple locations (5–10 cm linear access per cow).

Eligibility of the cows was determined from monthly reports from the Polish Federation of Cattle Breeders and Dairy Farmers (SCC, age, days in milk, milk yield). Inclusion required multiparous cows \leq 100 days in milk with a first episode of moderate clinical mastitis confined to a single quarter; the primary criterion was SCC > 400,000 cells/mL in the affected quarter [20]. Exclusion criteria included acute severe systemic illness, chronic comorbidities (clinical/subclinical ketosis, hypocalcemia), nutritional deficiencies, other infections, and advanced signs (udder-skin cyanosis, pathological inter-milking discharge). Udders were palpated to detect focal induration/nodularity indicative of chronic IMM inflammation, which warranted exclusion.

2.2. In Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing of Morin

Morin (morin hydrate; cat. M4008, Sigma–Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma–Aldrich) to final concentrations of 1%, 2%, and 3% (*w/v*). Solutions were prepared in an ultrasonic bath (Sonic-2, POLSONIC, Warsaw, Poland) at 37 °C with continuous agitation for 30 min until visually homogeneous. The best stability and solubility of morin were achieved at a neutral pH. The solution was prepared immediately before use to ensure stability and sterility. Antimicrobial activity was assessed by the disk diffusion method. The test panel comprised wild bovine-milk isolates of *S. aureus* and *Streptococcus* spp., *E. coli* ATCC 25848, and *Listeria monocytogenes* ATCC 13932. Mueller–Hinton agar (OXOID, Besintyoke, UK) was used for *S. aureus* and *E. coli*. For *Streptococcus* spp. and *Listeria monocytogenes*, susceptibility was assessed on Mueller–Hinton agar supplemented with 5% defibrinated horse blood. Sterile 6 mm paper disks were impregnated with 10 μ L of morin solution (yielding nominal loads of 0.10, 0.20, and 0.30 mg per disk for the 1%, 2%, and 3% preparations, respectively) and placed onto inoculated plates. Plates were incubated at 35 \pm 2 °C for 18–24 h (with 5% CO₂ for *Streptococcus* spp.); zones of inhibition were measured in millimeters.

The results showed that morin produced weak zones of inhibition against all tested strains at all concentrations (Supplementary Figure S1), with the largest inhibition zone at the 3% concentration for *Listeria monocytogenes* (Figure 1). These findings confirm that morin does not exert strong direct bactericidal effects under standard in vitro conditions. Based on these in vitro findings, the 3% morin formulation was selected for the in vivo study.

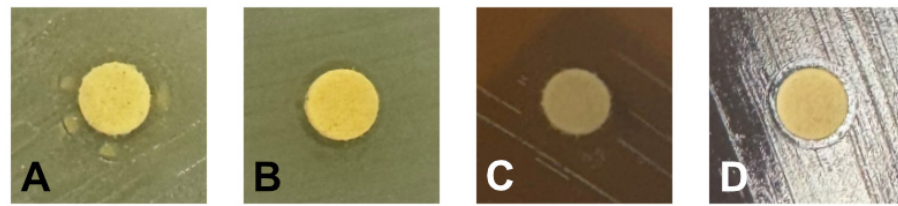


Figure 1. Disk-diffusion assays with 3% (*w/v*) morin against (A) *S. aureus*, (B) *E. coli* ATCC 25848, (C) *L. monocytogenes* ATCC 13932, and (D) *Streptococcus* spp. Clear inhibition zones are visible around morin disks. Results for 1% and 2% concentrations are provided in Supplementary Figure S1.

2.3. In Vivo Study Design

2.3.1. Enrollment and Pathogen Stratification

One hundred cows with clinical mastitis that met the predefined inclusion and exclusion criteria were initially enrolled. Herd records indicated that IMM infections in the study herd were predominantly caused by two environmental pathogens, *E. coli* and *S. uberis*. To confirm etiology, aseptic milk samples were collected at the screening time point (−72 h) into sterile, labeled tubes without preservatives, transported at 4 °C to a commercial microbiology laboratory, and the causative pathogen was detected by RT-qPCR using VetMAX™ MastiType Multi kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), enabling detection and differentiation of major 15 mastitis-causing pathogens, including *S. aureus*, non-aureus staphylococci, *E. coli*, *S. uberis*, and non-*E. coli* coliform bacteria, according to the manufacturer’s instructions. The same analysis was made post-treatment in all groups. Results were available within two days. All cases were mono-infections. Pathogen identification yielded 38 *E. coli* and 62 *S. uberis* cases. To ensure balanced group sizes, 36 cows were randomly selected within each pathogen stratum (total *n* = 72). No additional stratification by body weight, milk yield, or other production parameters was performed prior to randomization within each stratum.

To confirm the suitability of the antibiotic formulation used in the control group, antimicrobial susceptibility was determined using the standard disk diffusion method according to laboratory procedures. All disk diffusion assays were performed in duplicate, and both positive and negative control disks were included. The tests were conducted under standard laboratory conditions at the university microbiology laboratory, which routinely performs internal quality controls to ensure accuracy and reproducibility. The isolates exhibited high susceptibility to β -lactam antibiotics and bacitracin, whereas variable susceptibility and occasional resistance were observed among aminoglycosides, including neomycin. These results supported the selection of the fixed-combination treatment used in the Control group, containing tetracycline hydrochloride, neomycin sulfate, bacitracin, and prednisolone.

2.3.2. Pre-Treatment Observation and Baseline

Before allocation and group selection, all cows underwent a pre-treatment observation period at −72, −48, and −24 h, during which milk was sampled for SCC and verified using a 4 × 4Q Mastitis Detector (Dramiński S.A., Szabruk, Poland; a 4-quarter device for detecting milk resistance). All milk samples were collected and analyzed for SCC according to a standardized protocol, as described previously [21]. The mean SCC across these three time points within each pathogen stratum was used to define the baseline. Baseline SCS values were comparable between quarters infected with *E. coli* (mean 7.27, 95% CI: 7.16–7.39) and those infected with *S. uberis* (mean 7.05, 95% CI: 6.92–7.19), indicating that treatment groups in both infection types started from a similar disease-associated baseline level. Post-randomization checks confirmed no significant between-group differences in SCC at 0 h, ensuring baseline equivalence before treatment initiation.

2.3.3. Treatment Groups

Within each pathogen stratum, cows were randomized (1:1:1) to one of three treatment regimens. The Morin group received IMM infusions of 3% morin in PBS, administered seven times at 24 h intervals (0, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h) at a dose of 5 mL per treatment via sterile IMM tubing syringes. The second group received IMM phosphate-buffered saline (PBS) alone at the same dose and time points (the PBS group). A third group, which received a fixed-combination treatment formulation, served as the positive control (Control); the 8 g formulation (tetracycline hydrochloride 200 mg, neomycin sulfate 250 mg, bacitracin 2000 IU, prednisolone 10 mg) was injected at 0 h, followed by a second dose 12 h later (two injections in total). PBS and morin solutions were prepared daily. No concomitant medications were permitted in the Morin or PBS arms. All IMM administrations were delivered into the affected quarter immediately after the morning milking; before administration, the udder skin and teat orifice were disinfected with Oxy-Foam D (EcoLab Inc., Saint Paul, MN, USA). All IMM infusions were performed under sterile conditions by a specialist in ruminant diseases, using sterile disposable gloves and individual sterile syringes for each cow to prevent cross-contamination. The attending veterinarian responsible for herd health continuously monitored and was aware of the treatment assignments; however, clinical assessments were conducted using standardized scoring criteria to minimize potential observer bias.

2.4. Physical Clinical Examinations

Throughout the study, udder condition and general health were monitored by a single, independent veterinarian not otherwise involved in the trial, who performed 24 hourly clinical examinations and standardized local-tolerance assessments related to the IMM administrations (morin, PBS, or antibiotic). Mastitis severity in the treated quarter was scored once daily at morning milking using a validated 4-point scale: score 0—normal milk and udder with no abnormalities; score 1—few clots in milk, no visible swelling, redness, heat, or pain on palpation; score 2—numerous clots with visible milk–whey separation and mild swelling, redness, heat, and pain; score 3—systemic illness (e.g., pyrexia) with watery milk and marked swelling, redness, heat, pain, and/or hardness of the affected quarter [22,23]. Scoring was performed daily during treatment (0 to 144 h), and concluded 24 h after the final morin/PBS administration (168 h); the same schedule was applied to cows in the Control group receiving the IMM antibiotic.

2.5. Milk Samples Collection and Analyses

Milk was sampled from the affected quarters according to a standardized protocol, immediately after mastitis scoring and before any IMM treatment (morin, PBS, or antibiotic). In total, 15 samples per cow were collected from 72 h before treatment (−72 h) through 24 h after the final administration (168 h). Before sampling, the udder was thoroughly washed and dried, teat orifices were disinfected with 70% ethanol, and the first 3–4 streams of milk were discarded. For SCC analysis, 30 mL of milk was collected into 50 mL tubes containing Broad Spectrum Microtabs II (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA; bronopol 8 mg, natamycin 0.3 mg) to prevent spoilage and stabilize the sample during transport. Samples were kept on ice in insulated containers and transported chilled to the laboratory. Somatic cell counts were measured with a semi-automated BactoCount IBCm analyzer (Bentley Instruments) according to the manufacturer's instructions within 12 h of collection to ensure sample stability.

Herd milk yield was continuously recorded; data from the month preceding mastitis diagnosis (pre-treatment) and the month following treatment completion were used for analysis.

2.6. Statistical Analysis

The resulting sample size was verified using Mead's Resource Equation method [24]. For a design with three treatment groups (experimental unit = cow), the recommended range of E , the error degrees of freedom, is $10 \leq E \leq 20$, which corresponds to $n = 5\text{--}7$ per group. The experiment involved a sample of $n = 12$ per group for each pathogen stratum, which yields $E = 33$, exceeding the minimum requirement and providing adequate statistical power with a buffer against potential attrition and individual variability.

All analyses were conducted in R (v. 4.5.1). Statistical significance was set at $p < 0.05$; a statistical trend toward significance was shown when $0.05 < p < 0.1$. Analyses were performed separately within each pathogen stratum (*E. coli* and *S. uberis*); no pooling across strata and no multiplicity adjustment across strata were applied. All enrolled cows completed the study, and no missing data were recorded; therefore, all observations were included in the analyses.

For milk somatic cell data, SCC was \log_2 -transformed to obtain the somatic cell score (SCS), improving symmetry and normality, as confirmed by the Shapiro–Wilk test. SCS trajectories were analyzed with a linear mixed-effects model including fixed effects for Group, Time (categorical), and Group \times Time interaction, and a random intercept for Cow to account for repeated measures (lmer function from lmerTest package). Model adequacy was evaluated by visual inspection of residuals (approximate normality and homoscedasticity). Post hoc, estimated marginal means (emmeans) were used to assess within-group change versus a common baseline, as well as to perform pairwise between-group comparisons within each time point. All resulting p -values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR). Effect sizes (Cohen's d) were derived from the mixed model residual variance (σ^2), ensuring consistency with the model-based estimates and accounting for the repeated-measures structure. These effect sizes were used to quantify within-group change relative to baseline (baseline vs. each subsequent time point). Raw (non-relative to common baseline value) mean \pm 95% CI values per group and time point are reported at the end of the treatment or when statistically different. The complete SCS data (raw means with corresponding 95% CI) are presented in Supplementary Table S2.

Mastitis score distributions at time point 0 h were compared between three treatment groups ($n = 12$ per group) within each pathogen stratum using Fisher's exact test. Next, the ordinal clinical inflammation score was analyzed as an ordered outcome using a cumulative link mixed model (CLMM function from the ordinal package), with fixed effects for Group, Time (categorical; 0 h as reference), and Group \times Time interaction, plus a random intercept for Cow. From the fitted CLMM, estimated marginal means (on the latent scale) were obtained and contrasted at each post-baseline time versus 0 h within each group; p -values were also FDR-adjusted. Effect sizes were not computed for this variable due to its ordinal nature and limited interpretability.

3. Results

3.1. Somatic Cell Count

In cows infected with *E. coli* (Figure 2A), SCS dynamics differed markedly between treatment groups. In the Control group, values remained close to baseline until day 6, when a sharp and significant decline was observed at 144 h ($p < 0.001$, mean: 5.953, 95% CI: 5.059–6.846, ES: -2.103) and 168 h ($p < 0.001$, mean: 5.752, 95% CI: 5.063–6.441, ES: -2.422). The PBS group showed no significant changes at any time point (all $p > 0.05$, mean at 168 h: 7.483, 95% CI: 7.205–7.762). In the Morin group, SCS remained comparable to baseline during the first five days of treatment (24–120 h), but a progressive decrease became evident thereafter. At 144 h ($p = 0.008$, mean: 6.364, 95% CI: 5.738–6.989, ES: -1.449) and

168 h ($p = 0.023$, mean: 5.953, 95% CI: 5.059–6.846, ES: -1.263), Morin SCS was significantly reduced compared with baseline. Between-group comparisons further showed that groups did not differ during the early phase (0–120 h). However, at 144 h the PBS group displayed higher SCS than both Control and Morin, and by 168 h all groups differed. These findings indicate that Morin, like Control, was effective in reducing the SCS in *E. coli* mastitis.

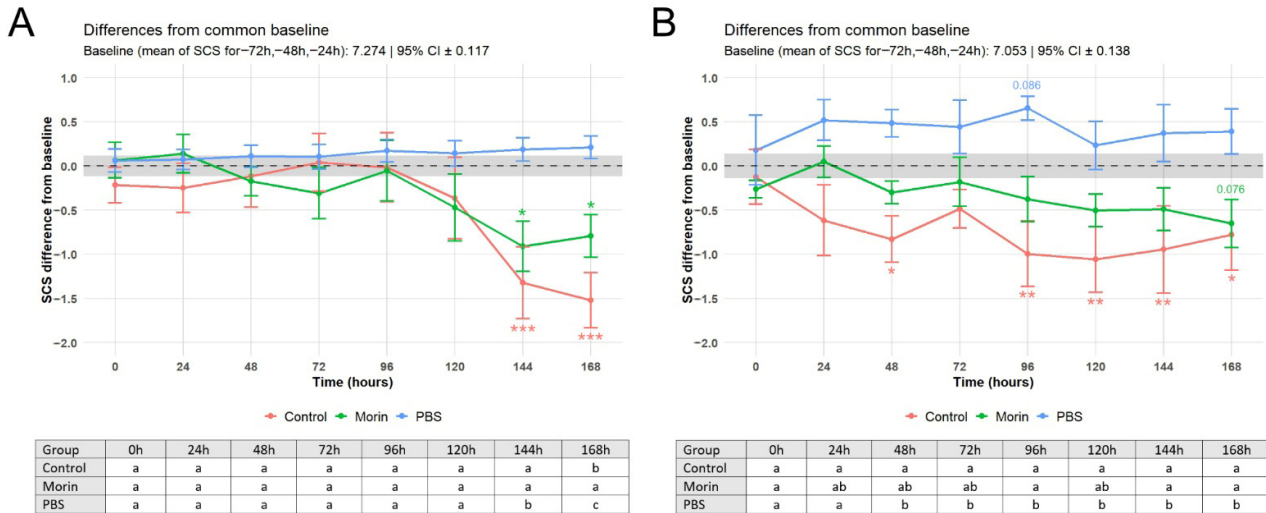


Figure 2. Changes in SCS over time relative to baseline (dotted line) in cows treated with 3% morin (Morin; IMM), IMM antibiotic (Control), or phosphate-buffered saline (PBS; IMM) for mastitis caused by (A) *E. coli* and (B) *S. uberis*. Asterixis denotes FDR-adjusted post hoc differences within-group vs. common baseline: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; numerical values denote trend p -values ($0.05 < p < 0.1$). The baseline 95% CI is shaded gray. Values are mean \pm SEM. Inset tables summarize between-group differences at each time point; within a column (time point), groups sharing the same letter do not differ significantly (FDR-adjusted $p > 0.05$).

In quarters infected with *S. uberis* (Figure 2B), the Control group exhibited a gradual and consistent decline in SCS, with significant reductions observed from 48 h onward ($p = 0.025$, mean: 6.274, 95% CI: 5.394–7.154, ES: -1.110) and sustained through 96–168 h (all $p = 0.033$, mean at 168 h: 7.483, 95% CI: 7.205–7.762, ES: -1.044). The PBS group showed no consistent improvement, with only a transient, non-significant increase in SCS at 96 h ($p = 0.086$), and all other time points remained comparable to baseline. In the Morin group, no significant changes from baseline were detected during the first 6 days (144 h), but a downward trend emerged toward the end of the observation period, reaching a late, small decrease with a trend at 168 h ($p < 0.076$, mean: 6.400, 95% CI: 5.797–7.004). Between-group comparisons indicated that PBS consistently exhibited higher SCS than Control from 48 h onward (48–168 h), whereas Morin remained intermediate, and converged with Control by 144–168 h.

3.2. Clinical Score

Post-randomization analysis (global Fisher’s exact test) confirmed that the Score values measured at the 0 h time point also did not differ significantly between the groups, both for *E. coli* and *S. uberis* subgroups, ensuring baseline equivalence prior to treatment initiation. Notably, a score of 3 was not recorded in any animal at any time point in either group.

In cows infected with *E. coli* (Figure 3A), in the Control group, clinical scores significantly decreased from 48 h onward ($p = 0.003$), with a sustained and marked reduction observed between 96 and 168 h (all $p < 0.001$). In the Morin group, improvement was evident already at 48 h ($p = 0.024$) and remained significant throughout days 3–7 ($p \leq 0.011$). In contrast, the PBS group showed no significant changes compared with baseline at any time point (all $p > 0.05$).

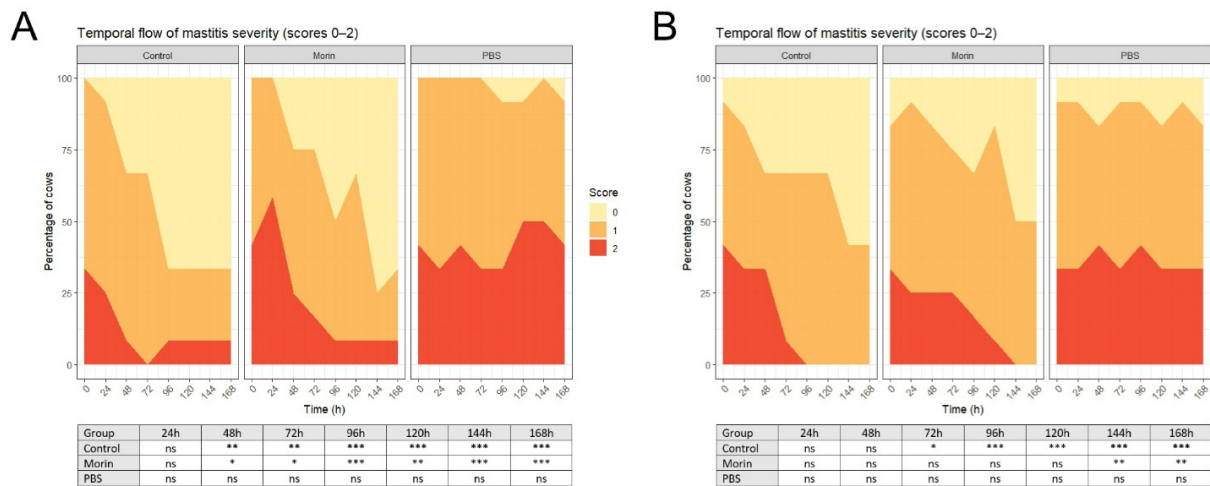


Figure 3. Temporal distribution of mastitis severity scores (0–2) over the study period for mastitis caused by (A) *E. coli* and (B) *S. uberis*. Panels show Control (antibiotic), Morin (3% IMM), and PBS (IMM) groups; stacked areas represent the proportion of cows at each score at each time point. Inset tables summarize within-group changes versus corresponding baseline at time 0 h (FDR-adjusted): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns—non-significant ($p > 0.05$).

In cows infected with *S. uberis* (Figure 3B), in the Control group, no significant differences from baseline were detected until day 6, when scores significantly decreased at 144 h and 168 h (both $p = 0.005$). In the Morin group, a significant reduction appeared at 96 h ($p = 0.038$), became stronger at 144 h, and remained significant at 168 h (both $p < 0.001$). In contrast, the PBS group showed no significant changes compared with baseline at any time point (all $p < 0.05$).

3.3. Treatment-Related Local Tolerance and Safety, and Post-Treatment Analyses

No treatment-related adverse local reactions, such as teat irritation, increased pain sensitivity, or abnormal milk appearance beyond mastitis-associated changes, were observed in any group. No significant differences in milk yield were observed before and after treatment in any group. Post-treatment RT-qPCR analysis revealed the presence of *S. uberis* in milk from all three groups, whereas *E. coli* was no longer detected in any of the milk samples in any group.

4. Discussion

Studies on the efficacy of morin were conducted against two major pathogens causing clinical mastitis [4]. However, mastitis caused by these pathogens differs in terms of pathogenesis. *E. coli* mastitis is associated with endotoxin-induced inflammation, during which antibiotic therapy is not necessarily required; the main focus is on anti-inflammatory treatment [19,21]. In contrast, *S. uberis* mastitis involves udder colonization, and therefore antimicrobial therapy is essential [6,8,21].

The results of this study show that the therapeutic effectiveness of morin in the treatment of mastitis depended on the etiological agent and was generally lower than that of standard antibiotic therapy. Clear differences were observed in the course of mastitis caused by *E. coli* and *S. uberis*. Infections with *E. coli* were characterized by a rapid and pronounced increase in SCS, while *S. uberis* more often led to subacute or chronic forms with milder clinical signs and persistently elevated SCS.

In *E. coli* infections, clinical improvement appeared relatively early (48–72 h), whereas a reduction in SCS occurred only after several days. This discrepancy between the resolution of clinical signs and the normalization of SCS is typical for such infections, where

clinical improvement usually precedes the cellular response in the mammary gland. In the antibiotic-treated group, clinical signs resolved more rapidly than in the morin group, particularly during the first days following *E. coli* infection. Cows receiving conventional therapy showed an earlier reduction in quarter swelling and redness. In the morin group, gradual clinical improvement was also observed, but the changes occurred more slowly.

A similar pattern was noted in the analysis of SCS. In *E. coli* infections, SCC in milk decreased to near-normal values in the antibiotic group by the end of the first week of treatment. In cows treated with morin, SCS remained elevated for a longer period, indicating a slower normalization of the inflammatory response. This finding is consistent with previous reports that in coliform mastitis, clinical recovery often precedes normalization of milk parameters.

In such cases, reducing antibiotic use aligns with current trends in the rationalization of antimicrobial therapy. For infections caused by Gram-negative pathogens, limiting antibiotic use in favor of supportive treatment may be considered, in line with the One Health concept and efforts to reduce the selective pressure for resistance. In mastitis caused by *E. coli*, the clinical picture typically reflects a brisk systemic inflammatory response: cows often present with high fever, depression, anorexia, occasional diarrhea, and signs of endotoxemia or incipient shock [25]. However, *E. coli* can cause both mild inflammation limited to a single quarter. [4]. Studies indicate that clinical mastitis caused by *E. coli* most often manifests as a short, single SCC peak on the lactation curve [26].

In contrast, mastitis caused by *S. uberis* usually has a milder and more chronic course. *S. uberis* less frequently induces a severe systemic reaction with fever. Overall, its clinical course tends to be milder and more prolonged than that of acute coliform mastitis [27,28]. In *S. uberis* infections, changes in SCC are more variable and prolonged. *S. uberis* can cause both acute mastitis (with an SCC spike similar to that of other pathogens) and subclinical infections that maintain elevated SCC over a longer period [26]. Overall, Gram-positive pathogens (streptococci, staphylococci) more often cause persistent, chronic elevation of SCC, whereas Gram-negative infections (e.g., *E. coli*) typically result in short-term SCC spikes associated with an acute episode of inflammation [28].

In this study, we specifically evaluated acute clinical environmental mastitis caused by *E. coli* and *S. uberis*. These infections are typically driven by a rapid inflammatory response and often show spontaneous clinical cure, especially in the case of *E. coli*, when inflammation is adequately managed through frequent milking and supportive therapy. In contrast, *S. aureus* mastitis is classified as contagious rather than environmental, is usually chronic and biofilm-associated, and rarely undergoes spontaneous cure due to bacterial intracellular persistence. Therefore, treatment strategies and expected clinical outcomes differ substantially between these pathogen groups.

Our observations from the present experiment reflect the well-known differences between Gram-negative and Gram-positive infections, with *S. uberis* more frequently presenting as subacute or chronic mastitis. Antibiotic therapy resulted in a gradual and systematic reduction in SCS, with clinical improvement occurring in parallel. The control IMM antibiotic was a combination therapy covering both Gram-negative (*E. coli*) and Gram-positive (*S. uberis*) pathogens, including tetracycline, neomycin, and bacitracin, with prednisolone to reduce inflammation. This reflects standard veterinary practice for clinical mastitis. The antimicrobial susceptibility profiles from Polish dairy herds show that *S. uberis* remains highly susceptible to bacitracin-based therapy, while exhibiting resistance to aminoglycosides such as neomycin [8]. This corresponds well with the fixed-combination antibiotic used as the Control treatment in our trial, where bacitracin likely contributed to the superior eradication of *S. uberis*. For *E. coli*, susceptibility to neomycin is variable,

which may explain why the antibiotic advantage over morin was less pronounced in coliform mastitis.

These findings, presented above, mirror the characteristic course of streptococcal mastitis, which is marked by prolonged elevation of SCS. Treatment with morin led to clinical improvement; however, the reduction in SCS was clearly slower and less pronounced than in the antibiotic group, indicating the limited effectiveness of this compound against streptococcal infections. This is consistent with previous reports showing that *S. uberis* has a high capacity to persist within mammary tissue and requires targeted antibiotic therapy [28]. In the case of *S. uberis*, the differences between treatment groups were less pronounced, reflecting the milder, chronic nature of these infections. Nevertheless, antibiotic therapy also led to faster improvement of local inflammatory signs and a more pronounced decrease in SCS compared with morin treatment. In the morin group, some cows maintained elevated SCS until the end of the observation period. These findings suggest that although morin supports the alleviation of inflammatory symptoms, its effectiveness in eradicating infection is lower than that of standard antibiotic therapy, particularly in mastitis caused by *S. uberis*.

A comparison of our findings with literature reports from recent years confirms many of the observed patterns. First, the treatment of *E. coli* mastitis represents a special case in veterinary practice. It has been shown that in mild and moderate forms of inflammation caused by Gram-negative rods, the rate of spontaneous cure is high, and antibiotic therapy does not always significantly increase the cure rate compared with no treatment. For example, in clinical studies of mastitis caused by coliforms, no difference in the rate of bacteriological cure was found between cows receiving an antibiotic and untreated cows in many cases. The rapid and strong inflammatory response induced by *E. coli* often leads to bacterial elimination by the immune system even before the antibiotic takes effect [29]. On the other hand, there are also reports indicating the benefits of antibiotic therapy in coliform mastitis. Schukken et al. observed a higher cure rate of *E. coli* in cows treated with antibiotics (89%) compared with untreated cows (53%), although the authors noted the limited sample size and the need for further studies [30]. In our experiment, in the morin group, many *E. coli* cases were successfully controlled, which is consistent with the above observations on the high tendency for spontaneous cure of coliform infections. It is likely that morin, through its anti-inflammatory action, created conditions that supported the cow's own defense mechanisms in combating the infection. The literature emphasizes the importance of supportive therapy in such situations. When antibiotics do not improve the prognosis (due to the high rate of spontaneous cure or bacterial resistance), symptomatic treatment becomes crucial [31]. In clinical practice, this is reflected, among other things, by the increasing use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the treatment of mastitis. According to a recent review, in Denmark, as many as 72% of veterinarians use anti-inflammatory treatment alone without antibiotics in mild cases of mastitis caused by Gram-negative pathogens [1,32]. NSAIDs, such as flunixin or meloxicam, reduce fever and pain and mitigate the effects of endotoxemia in coliform mastitis, which is often sufficient to improve the cow's condition and allow the immune system to eliminate the pathogens [1]. Our results for *E. coli* (with morin showing clinical effectiveness comparable to antibiotics in moderately severe cases) are therefore consistent with the trend toward reducing antibiotic use in Gram-negative mastitis while applying intensive anti-inflammatory therapy. On the other hand, the situation is different for Gram-positive pathogens. Environmental streptococci, such as *S. uberis*, although capable of causing mastitis of varying severity (from subclinical to severe), are known for their lower tendency to be spontaneously eliminated from the mammary gland. These infections often require active intervention, as Gram-positive bacteria can hide within mammary tissue, form biofilms, and maintain

chronic infection. Our data confirm that standard antibiotic therapy (bactericidal against *S. uberis*) was much more effective in eliminating infection than relying solely on the immunomodulatory effect of morin. The literature also indicates a significant advantage of antibiotic treatment in mastitis caused by streptococci. Comparative studies have reported significantly higher bacteriological cure rates in antibiotic-treated groups compared with untreated or placebo groups [29]. Moreover, the lack of effective treatment for streptococcal infection carries the risk of progression to a subclinical form with chronic elevation of SCC, which we observed in some cows receiving morin. Therefore, our results are not in contradiction with current recommendations; rather, they reinforce them. *S. uberis* remains a pathogen for which antibiotics are difficult to replace in effective treatment, although in the future, combining them with supportive therapies (e.g., using substances such as morin) may improve treatment outcomes.

A possible explanation for the observed differences is the distinct mechanism of action of morin compared with that of antibiotics and the resulting limitations. The antibiotic used in our study acted directly in a bactericidal manner, rapidly reducing the population of *E. coli* or *S. uberis* in the mammary gland. In contrast, morin is not a classical antimicrobial agent. The limited inhibition observed *in vitro* is consistent with previous reports indicating that its primary mechanism of action involves modulation of the host inflammatory response rather than direct antibacterial activity. As a natural flavonoid compound, morin exhibits documented antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties, with its influence on the host immune and inflammatory pathways likely being the key factor in the context of mastitis. This supports the rationale for evaluating morin as a supportive rather than curative therapy in mastitis [33].

Experimental models have shown that morin can significantly inhibit excessive inflammatory responses induced by endotoxins or bacteria. Jiang et al. [33] demonstrated in a murine model of LPS-induced (*E. coli* lipopolysaccharide) mastitis that morin administration reduced pathological changes in the mammary gland. It limited edema and neutrophil infiltration and significantly decreased the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and chemokines (CCL2, CXCL2) in the tissue [33]. At the same time, morin modulated key cellular signaling pathways: it inhibited the phosphorylation of transcription factors NF- κ B (p65 subunit) and MAPK kinases (ERK1/2, p38), as well as reduced the activation of the NLRP3 inflammasome [17,33]. These effects translated into reduced production of inflammatory mediators and protection of mammary cells from damage caused by the immune response. Importantly, morin also demonstrated the ability to stabilize the blood-milk barrier. In the presence of morin, the inflammation-associated decrease in tight junction proteins (claudin-3, occludin) in mammary epithelial cells did not occur [33]. The preservation of tight junction integrity prevents excessive vascular permeability and the leakage of blood components into milk, and may also limit the translocation of bacterial toxins (e.g., *E. coli* endotoxin) into the systemic circulation [33]. In the clinical context, this translates into a lower risk of acute systemic reaction (toxemia) in treated animals. These mechanisms explain why, in our study, cows receiving morin showed a milder manifestation of inflammatory symptoms than would be expected in untreated mastitis. While morin did not kill the pathogens, it inhibited the immune response, reducing the harmful excessive inflammation, and at the same time, as suggested by the cited studies, it did not completely impair the defense mechanisms responsible for pathogen elimination. Such immunomodulatory action may be particularly beneficial in *E. coli* infections, where the intense inflammatory response and associated endotoxemia account for most clinical signs. In the case of *S. uberis*, the reduced severity of inflammation (resulting from morin activity) also provided relief to the tissue and decreased SCC, but it did not guarantee bacterial elimination, as these pathogens can persist in the mammary

gland without antibiotic support. It is worth noting that studies on similar plant-derived compounds (e.g., cynarazoid C from *Cynanchum atratum*, peiminine, and farerol) have shown comparable effects, such as inhibition of NF- κ B/MAPK pathways and alleviation of mastitis symptoms in experimental models [33]. Morin, therefore, fits into the broader context of searching for natural inhibitors of the inflammatory response that could support the treatment of mastitis.

When discussing the results of this study, certain limitations should be taken into account. First, the sample size was relatively small, which reduces statistical power and requires caution when generalizing conclusions to the entire cow population. Second, this experiment was designed as a short-term, proof-of-concept study aimed at evaluating early clinical improvement and inflammatory response within the first seven days after treatment initiation. Therefore, it does not allow for long-term assessment of relapse rates or chronic outcomes, which should be addressed in future trials. Another limitation concerns pharmacological aspects. Morin is a poorly soluble polyphenolic compound, which may limit its bioavailability. In our experiment, it was administered intramammarily; however, pharmacokinetics and concentrations in mammary tissue were not determined. It cannot be excluded that alternative administration routes, higher doses, or novel formulations could improve efficacy, which requires further investigation. Finally, multicentre studies under farm conditions are needed to validate the obtained results on a larger scale and to confirm the practical usefulness of morin in mastitis therapy.

Despite these limitations, the results obtained carry important implications for veterinary practice and future research directions. First, they confirm the potential of morin as an agent that can alleviate the course of mastitis. This may have applications as a supportive therapy, for example, in combination with an antibiotic or, in selected cases, even as an alternative to antibiotic treatment. This is particularly relevant in mastitis caused by Gram-negative pathogens, where, as discussed earlier, the key challenge is controlling inflammation and endotoxemia. According to current reviews, there is growing pressure to develop mastitis therapies independent of antibiotics; however, many of these approaches still lack fully documented clinical efficacy. Our study provides new data in this area, suggesting that morin may in the future become a valuable therapeutic option in mastitis treatment. Intensive care (fluid therapy, frequent milking), combined with morin administration in a cow with moderate *E. coli* mastitis and a veterinarian's decision to withhold antibiotics, could lead to recovery with less systemic burden and without generating milk withdrawal, which has both economic and health significance. Moreover, the absence of detectable adverse local reactions suggested that IMM morin administration was well tolerated. However, further studies should include additional safety endpoints such as quarter milk yield and monitoring for subclinical tissue damage. Overall, the present findings bring us a step closer to this goal, demonstrating both the potential and the challenges of using morin in veterinary medicine.

It should be emphasized that this trial was conducted under commercial farm conditions with continuous on-farm monitoring. Although preliminary, these *in vivo* data validate efficacy under real-world exposure to environmental pathogens and multifactorial stressors (e.g., heat load, nutritional and periparturient challenges), alongside host-related determinants—such as genetic background and epigenetic regulation—that can modulate mastitis susceptibility and treatment response [34–36]. Hypothetically, morin could also enhance the effect of a reduced antibiotic dose, thereby limiting the use of chemotherapeutics while maintaining high treatment efficacy.

Before morin can enter practical use, further research is needed. Ideally, this should be performed under conditions of mastitis of varying severity, caused by different pathogens, and in cows at different stages of lactation, to confirm morin's effectiveness in diverse

scenarios. Such studies should monitor not only clinical and inflammatory parameters but also include regular milk cultures during and after therapy, in order to clearly determine whether morin ensures bacteriological cure. Future research should also establish the safety profile of morin, including whether it causes adverse effects in cows and whether potential residues in milk are safe for consumers. As a natural polyphenolic compound, morin likely does not carry the same risks as antibiotics (e.g., promoting resistant strains or leaving harmful residues in food); however, a formal evaluation of these aspects would be required before approval for use. Another future research direction should be the optimization of morin formulations.

Our results provide a starting point for more in-depth analyses. In the future, they will facilitate the design of clinical trials to determine the practical usefulness of morin under production conditions and indicate whether and how such therapy could be integrated into existing mastitis treatment protocols. The ultimate goal is to develop effective, safe, and environmentally friendly methods of combating mastitis that will reduce the dependence on antibiotics in dairy cattle farming [1].

5. Conclusions

This study demonstrated that morin, as a natural compound, can alleviate clinical signs of mastitis caused by *E. coli* and *S. uberis*. However, its efficacy in eliminating infection was lower than that of standard intramammary antibiotic therapy, particularly in *S. uberis* cases.

Morin may therefore serve as a supportive therapeutic option aimed at reducing udder inflammation and somatic cell counts, especially in Gram-negative infections where spontaneous cure rates are relatively high. Its use could contribute to lowering antibiotic consumption in dairy herds and improving cow welfare. Nevertheless, because a full bacteriological cure was not confirmed, morin should not be considered a replacement for antibiotics in infections with Gram-positive pathogens. Further research with extended follow-up and microbiological verification is needed to determine the appropriate clinical scenarios for its use. Morin may therefore serve as a supportive therapeutic option aimed at reducing udder inflammation and somatic cell counts, especially in Gram-negative infections where spontaneous cure rates are relatively high.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agriculture15222359/s1>, Figure S1: Disk-diffusion assays with 1, 2, and 3% (*w/v*) morin against *S. aureus*, *E. coli* ATCC 25848, *L. monocytogenes* ATCC 13932, and *Streptococcus* spp.; Table S1: Basal components and nutritional values of the diets (kg/day); Table S2: Raw SCS data with 95% CI values.

Author Contributions: Conceptualization, M.K.; methodology, M.K., A.B. and T.G.; formal analysis, M.K. and M.S.; investigation, M.K.; resources, M.K., A.B., T.G. and E.T.; data curation, M.K. and M.B.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, A.B., T.G. and E.T.; visualization, M.K.; supervision, A.B. and T.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Lublin (resolution No. 12/2024).

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

95% CI	95% Confidence interval
CLMM	Cumulative link mixed-effects model
ES	Effect size
FDR	False discovery rate
IMM	Intramammary
PBS	Phosphate-buffered saline
SCC	Somatic cell count
SCS	Somatic cell score

References

- Li, X.; Xu, C.; Liang, B.; Kastelic, J.P.; Han, B.; Tong, X.; Gao, J. Alternatives to Antibiotics for Treatment of Mastitis in Dairy Cows. *Front. Vet. Sci.* **2023**, *10*, 1160350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krebs, I.; Zhang, Y.; Wentz, N.; Leimbach, S.; Krömker, V. Severity of Clinical Mastitis and Bacterial Shedding. *Pathogens* **2023**, *12*, 1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Leite De Campos, J.; Gonçalves, J.L.; Kates, A.; Steinberger, A.; Sethi, A.; Suen, G.; Shutske, J.; Safdar, N.; Goldberg, T.; Ruegg, P.L. Variation in Partial Direct Costs of Treating Clinical Mastitis among 37 Wisconsin Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* **2023**, *106*, 9276–9286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wieland, M. Mastitis in Cattle. In *MSD Veterinary Manual*; MSD Publications: Telangana, India, 2024; Available online: <https://www.msdevetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/mastitis-in-cattle> (accessed on 6 November 2025).
- Bechtold, V.; Petzl, W.; Huber-Schlenstedt, R.; Sorge, U.S. Distribution of Bovine Mastitis Pathogens in Quarter Milk Samples from Bavaria, Southern Germany, between 2014 and 2023—A Retrospective Study. *Animals* **2024**, *14*, 2504. [[CrossRef](#)]
- Morales-Ubaldo, A.L.; Rivero-Perez, N.; Valladares-Carranza, B.; Velázquez-Ordoñez, V.; Delgadillo-Ruiz, L.; Zaragoza-Bastida, A. Bovine Mastitis, a Worldwide Impact Disease: Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Viable Alternative Approaches. *Vet. Anim. Sci.* **2023**, *21*, 100306. [[CrossRef](#)]
- Kaczorek-Lukowska, E.; Małaczewska, J.; Wójcik, R.; Duk, K.; Blank, A.; Siwicki, A.K. Streptococci as the New Dominant Aetiological Factors of Mastitis in Dairy Cows in North-Eastern Poland: Analysis of the Results Obtained in 2013–2019. *Ir. Vet. J.* **2021**, *74*, 2. [[CrossRef](#)]
- Dobrut, A.; Siemińska, I.; Sroka-Oleksiak, A.; Drożdż, K.; Sobońska, J.; Mroczkowska, U.; Brzychczy-Włoch, M. Molecular and Phenotypic Identification of Bacterial Species Isolated from Cows with Mastitis from Three Regions of Poland. *BMC Vet. Res.* **2024**, *20*, 193. [[CrossRef](#)]
- Zhang, T.; Niu, G.; Boonyayatra, S.; Pichpol, D. Antimicrobial Resistance Profiles and Genes in Streptococcus Uberis Associated with Bovine Mastitis in Thailand. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 705338. [[CrossRef](#)]
- Günther, J.; Koy, M.; Berthold, A.; Schuberth, H.-J.; Seyfert, H.-M. Comparison of the Pathogen Species-Specific Immune Response in Udder Derived Cell Types and Their Models. *Vet. Res.* **2016**, *47*, 22. [[CrossRef](#)]
- European Medicines Agency. *European Sales and Use of Antimicrobials for Veterinary Medicine (ESUAVet)*; Annual Surveillance Report for 2023 (EMA/CVMP/ESUAVET/80289/2025); Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2025; Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/european-sales-use-antimicrobials-veterinary-medicine-annual-surveillance-report-2023_en.pdf (accessed on 6 November 2025).
- Aksoy, A.; Alazragi, R.; Alabdali, A.Y.M.; Aljazzar, R.; El Sadi, S.; Alostaz, M.; El Hindi, M. Antibacterial Activity of Metallic-Core Gold and Silver Nanoparticles against Some Animal Pathogens. *Ann. Anim. Sci.* **2023**, *23*, 473–479. [[CrossRef](#)]
- Romanek, J.; Trzcińska, M.; Samiec, M. Multi-Faceted Characterization of Mesenchymal Stem Cells and Their Application as a Powerful Tool for Agrobiotechnology, Assisted Reproductive Technologies, and Veterinary and Regenerative Biomedicine—A Review. *Ann. Anim. Sci.* **2024**, *24*, 367–377. [[CrossRef](#)]
- Kovačević, Z.; Samardžija, M.; Tomanić, D. A Review of Recent Developments in Essential Oil-Based Alternatives in Mastitis Treatment in Dairy Cows. *Ann. Anim. Sci.* **2025**, *in press*. [[CrossRef](#)]
- Gutiérrez-Reinoso, M.A.; Uquilla, J.B.; Guamaní, J.L.; Caiza, Á.E.; Carrera, R.P.; Garcia-Herreros, M. Intramammary Infusion of Micronised Purified Flavonoid Fraction (MPFF) in Mastitis-Diagnosed Dairy Cows Naturally Infected by *Staphylococcus* Spp. in the Late Lactation. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Wang, J.; Guo, C.; Wei, Z.; He, X.; Kou, J.; Zhou, E.; Yang, Z.; Fu, Y. Morin Suppresses Inflammatory Cytokine Expression by Downregulation of Nuclear Factor- κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathways in Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Bovine Mammary Epithelial Cells. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 3016–3022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yu, S.; Liu, X.; Yu, D.; Changyong, E.; Yang, J. Morin Protects LPS-Induced Mastitis via Inhibiting NLRP3 Inflammasome and NF- κ B Signaling Pathways. *Inflammation* **2020**, *43*, 1293–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yu, J.; Wan, K.; Sun, X. Improved Transdermal Delivery of Morin Efficiently Inhibits Allergic Contact Dermatitis. *Int. J. Pharm.* **2017**, *530*, 145–154. [[CrossRef](#)]
19. Sales, L.S.; Hewitt, B.; Muchova, M.; Brighenti, F.L.; Kuehne, S.A.; Grant, M.M.; Milward, M.R. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Evaluation of Morin. *Arch. Oral Biol.* **2025**, *178*, 106343. [[CrossRef](#)]
20. Pyörälä, S. Indicators of Inflammation in the Diagnosis of Mastitis. *Vet. Res.* **2003**, *34*, 565–578. [[CrossRef](#)]
21. Kocik, M.; Burmańczuk, A.; Grabowski, T.; Tomaszewska, E. Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows: A Field Pilot Study. *Agriculture* **2025**, *15*, 1760. [[CrossRef](#)]
22. Balemi, A.; Gumi, B.; Amenu, K.; Girma, S.; Gebru, M.; Tekle, M.; Ríus, A.A.; D'Souza, D.H.; Agga, G.E.; Kerro Dego, O. Prevalence of Mastitis and Antibiotic Resistance of Bacterial Isolates from CMT Positive Milk Samples Obtained from Dairy Cows, Camels, and Goats in Two Pastoral Districts in Southern Ethiopia. *Animals* **2021**, *11*, 1530. [[CrossRef](#)]
23. Kan, X.; Hu, G.; Liu, Y.; Xu, P.; Huang, Y.; Cai, X.; Guo, W.; Fu, S.; Liu, J. Mammary Fibrosis Tendency and Mitochondrial Adaptability in Dairy Cows with Mastitis. *Metabolites* **2022**, *12*, 1035. [[CrossRef](#)]
24. Festing, M.F.W.; Altman, D.G. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR J.* **2002**, *43*, 244–258. [[CrossRef](#)]
25. Goulart, D.B.; Mellata, M. Escherichia Coli Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 928346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. De Haas, Y.; Veerkamp, R.F.; Barkema, H.W.; Gröhn, Y.T.; Schukken, Y.H. Associations Between Pathogen-Specific Cases of Clinical Mastitis and Somatic Cell Count Patterns. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 95–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cobirka, M.; Tancin, V.; Slama, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals* **2020**, *10*, 2212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lavon, Y.; Leitner, G.; Kressel, Y.; Ezra, E.; Wolfenson, D. Comparing Effects of Bovine Streptococcus and Escherichia Coli Mastitis on Impaired Reproductive Performance. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 10587–10598. [[CrossRef](#)]
29. Nankemann, F.; Leimbach, S.; Nitz, J.; Tellen, A.; Wente, N.; Zhang, Y.; Klocke, D.; Krebs, I.; Müller, S.; Teich, S.; et al. Antibiotic Treatment vs. Non-Antibiotic Treatment in Bovine Clinical Mastitis During Lactation with Mild and Moderate Severity. *Antibiotics* **2025**, *14*, 702. [[CrossRef](#)]
30. Schukken, Y.H.; Bennett, G.J.; Zurakowski, M.J.; Sharkey, H.L.; Rauch, B.J.; Thomas, M.J.; Ceglowski, B.; Saltman, R.L.; Belomestnykh, N.; Zadoks, R.N. Randomized Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a 5-Day Ceftiofur Hydrochloride Intramammary Treatment on Nonsevere Gram-Negative Clinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 6203–6215. [[CrossRef](#)]
31. Ruegg, P.L. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2018**, *34*, 413–425. [[CrossRef](#)]
32. Smith, G.W.; Davis, J.L.; Tell, L.A.; Webb, A.I.; Riviere, J.E. Extralabel Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2008**, *232*, 697–701. [[CrossRef](#)]
33. Jiang, A.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Wu, D.; Liu, Z.; Li, S.; Liu, X.; Han, Z.; Wang, C.; Wang, J.; et al. Morin Alleviates LPS-Induced Mastitis by Inhibiting the PI3K/AKT, MAPK, NF- κ B and NLRP3 Signaling Pathway and Protecting the Integrity of Blood-Milk Barrier. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *78*, 105972. [[CrossRef](#)]
34. Bagnicka, E.; Brzozowska, P.; Żukowski, K.; Grochowska, R. The Association of Gene Polymorphisms with Milk Production and Mastitis Resistance Phenotypic Traits in Dairy Cattle. *Ann. Anim. Sci.* **2023**, *23*, 419–430. [[CrossRef](#)]
35. Semik-Gurgul, E.; Ząbek, T.; Kawecka-Grochocka, E.; Zalewska, M.; Kościuczuk, E.; Bagnicka, E. Epigenetic States of Genes Controlling Immune Responsiveness in Bovine Chronic Mastitis. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 575–581. [[CrossRef](#)]
36. Korwin-Kossakowska, A.; Ropka-Molik, K.; Ząbek, T.; Szmatoła, T.; Lewczuk, D.; Kościuczuk, E.; Marczak, S.; Bagnicka, E. Gene Expression Adjustment of Inflammatory Mechanisms in Dairy Cow Mammary Gland Parenchyma during Host Defense against Staphylococci. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 903–913. [[CrossRef](#)]

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



INSTYTUT ZOO TECHNIKI
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF ANIMAL PRODUCTION

Editors of "Annals of Animal Science"

ul. Sarego 2, 31-047 Kraków, Poland
e-mail: katarzyna.skupniewicz@iz.edu.pl, Internet: <http://www.izoo.krakow.pl>

Redakcja
„Annals of Animal Science”
Instytut Zootechniki
ul. Sarego 2, 31-047 Kraków

Kraków, 25.03.2026

Redakcja „Annals of Animal Science” uprzejmie informuje, że artykuł pt. "A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows", autorów: Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz, Ewa Tomaszewska, o numerze DOI: 10.2478/aoas-2026-0025 został przyjęty do publikacji w czasopiśmie Annals of Animals Science w roku 2026.

Sekretarz Redakcji
Annals of Animal Science
Katarzyna Skupniewicz
mgr Katarzyna Skupniewicz

Adres do korespondencji:
32-083 BALICE, ul. Krakowska 1
tel.: +48 12 357 27 00, +48 666 081 111
www.iz.edu.pl
e-mail: sekretariat@iz.edu.pl

Adres siedziby:
31-047 KRAKÓW, ul. Sarego 2
tel.: +48 12 357 27 00, +48 666 081 111
KRS: 0000125481
NIP: 675-000-21-30
REGON: 000079728

A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows

Marcin Kocik¹, Artur Burmańczuk^{2*}, Tomasz Grabowski³, Włodzimierz Markiewicz⁴, Oktay Yilmaz⁵, Ewa Tomaszewska⁶

¹Private veterinary practice, Chopina 5, 33-100 Tarnów, Poland

²Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

³Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Gdansk, Gen. J. Hallera 107, 80-416, Gdańsk, Poland

⁴Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, 10-718 Olsztyn, Poland

⁵Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, ANS Campus, 03200 Afyonkarahisar, Türkiye

⁶Department Animal Physiology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

*Corresponding author: artur.burmanczuk@up.lublin.pl

DOI: 10.2478/aoas-2026-0025

Abstract

Clinical mastitis remains one of the major health and economic challenges in dairy herds, while the global effort to reduce antimicrobial use has increased interest in effective non antibiotic intramammary therapies. This study evaluated the efficacy of an intramammary formulation containing pectin, morin, and quercetin (PMQ) in dairy cows with mild to moderate clinical mastitis. Seventy-two multiparous Holstein–Friesian cows from a single commercial farm with confirmed intramammary infection caused by *Escherichia coli* or *Streptococcus uberis* were randomly assigned to receive PMQ once daily for seven days, a standard antibiotic treatment (positive control), or phosphate-buffered saline (negative control). Clinical signs and somatic cell counts (SCC) were monitored at 24-h intervals over a 7-day period. No improvement was observed in the negative control group. Both PMQ and the antibiotic treatment resulted in a significant reduction in somatic cell score beginning at approximately 72 h. Clinical recovery progressed in parallel with SCC reduction, with the antibiotic group showing the lowest probability of persistent inflammation; however, PMQ demonstrated a clear therapeutic effect superior to the negative control. These findings suggest that PMQ may represent a promising non-antibiotic intramammary option for the management of mild clinical mastitis, particularly in the context of efforts to promote responsible antibiotic use.

Key words: dairy cows, clinical mastitis, non-antibiotic therapy, pectin, morin, quercetin

Mastitis is one of the most common and economically significant diseases affecting dairy cows, leading to substantial financial losses in the livestock industry. It is also the primary reason for antibiotic use in cattle, which necessitates milk withdrawal during the treatment period and contributes to the selection of antimicrobial-resistant strains. In light of the growing global concern over antimicrobial resistance (AMR) and the principles of the "One Health" approach, there is an increasing emphasis on reducing antibiotic usage and exploring alternative treatment strategies for mastitis (Romanek et al., 2024; Tomanić et al., 2025).

In recent years, interest has grown in plant-derived compounds with antimicrobial and immunomodulatory properties as potential therapeutic agents for intramammary infections (Debruyne et al., 2025; Fan et al., 2025; Kovačević et al., 2025). Although pectin, morin, and quercetin have individually demonstrated beneficial anti-inflammatory and immunomodulatory effects relevant to mastitis, their complementary activities within a combined formulation have not yet been evaluated in a clinical field setting. This knowledge gap provides the rationale for investigating whether a pectin+morin+quercetin mixture may offer a promising non-antibiotic approach, as the three compounds possess pharmacological properties that could act synergistically to limit excessive inflammation in the bovine mammary gland (Kocik et al., 2025a). Their mechanism of action involves, among others, modulation of innate immune signaling through interactions with Toll-like receptors (TLRs) and inhibition of the activation of the transcription factor NF- κ B, leading to reduced secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 (Jiang et al., 2022). At the same time, these compounds help preserve the integrity of the mammary epithelial barrier by protecting intercellular junctions from inflammation-induced damage (Khan et al., 2020). In addition to modulating the host response, both pectin and morin exhibit direct antimicrobial activity. In the mammary environment, pectin forms a cross-linked hydrogel that prolongs contact with the tissue and physically hinders bacterial adhesion (Kocik et al., 2025a); morin, in turn, inhibits enzymes involved in bacterial adhesion, such as sortase A, thereby limiting biofilm formation by mastitis-associated pathogens (Huang et al., 2014).

Pilot studies have shown that intramammary administration of these natural compounds is safe and well-tolerated, with each component demonstrating efficacy in alleviating infectious inflammation of the mammary gland. For instance, quercetin significantly reduced somatic cell counts (SCC) in the milk of cows affected by mastitis (Burmańczuk et al., 2018), morin alleviated the inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS) (Khan et al., 2020), intramammary (IMM) infusions of 10% pectin reduced the clinical symptoms of mastitis as effectively as antibiotic therapy, without causing any adverse effects (Kocik et al., 2025a, 2025).

We hypothesize that this combination of multi-target compounds represents a promising therapeutic alternative, integrating infection control with modulation of the inflammatory response in cows with mastitis. This study aimed to evaluate the efficacy of intramammary administration of a pectin+morin+quercetin (PMQ) combination in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. Specific objectives included assessment of effects on udder health indicators (somatic cell count, clinical mastitis score) and comparison of therapeutic outcomes with standard antibiotic treatment.

Material and methods

All animal procedures were conducted in accordance with ethical standards and approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (approval No. 12/2024).

Pectin, morin, and quercetin (all from Sigma–Aldrich, Merck Group, Darmstadt, Germany) were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma–Aldrich) to final concentrations of 10%, 3%, and 0.5% (w/v), respectively, using a laboratory ultrasonic bath at 37 °C for approximately 30 min, until visually homogeneous. The concentrations of the active compounds in the multicomponent mixture were selected based on previously performed preliminary studies evaluating the effects of the individual components in mastitis treatment (Burmańczuk et al., 2018, Kocik et al., 2025a, 2025b). The resulting pectin–morin–quercetin (PMQ) solution was transferred into custom-prepared dermal tubing syringes. The solution was prepared fresh daily, immediately before use, to ensure stability and sterility.

General experimental schedule and workflow of the treatment trial is presented in Figure 1. The study enrolled multiparous Holstein–Friesian dairy cows (3–7 years of age) from a single commercial herd (Liplas village, Lesser Poland Voivodeship, Poland). Initial selection of cows for the experimental and control groups was based on monthly performance and health records provided by the Polish Federation of Cattle Breeders and Dairy Farmers (including SCC, age, days in milk, and milk yield). Inclusion criteria required multiparous cows ≤ 100 days in milk presenting with a first episode of moderate clinical mastitis affecting a single quarter. Herd records indicated that mastitis in the study herd were predominantly caused by two environmental pathogens, *E. coli* and *S. uberis*. The primary selection parameter was a SCC $> 400,000$ cells/mL in the affected quarter (Pyörälä, 2003). Exclusion criteria included acute severe systemic illness, chronic metabolic disorders (clinical or subclinical ketosis, hypocalcemia), nutritional deficiencies, concurrent infections, and advanced clinical signs such as udder-skin cyanosis or pathological discharge between milkings. Udders were palpated to detect focal induration or nodularity suggestive of chronic inflammatory changes, and cows exhibiting such findings were excluded. In total, 100 cows with clinical mastitis were initially screened. To confirm the etiology of mastitis in screened cows, aseptic milk samples were collected and transported to a commercial microbiology laboratory for by RT-qPCR analysis using VetMAX™ MastiType Multi kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which enable detection and differentiation of 15 major mastitis-causing pathogens. All screened cows were confirmed to have mastitis caused by *E. coli* or *S. uberis* monoinfection, with no fungal growth detected. From the cows that met the predefined enrollment criteria, 72 were randomly selected for the experiment.

During the three-day pre-treatment observation period, the 72 selected SCC and verified using a 4 × 4Q Mastitis Detector (Dramiński S.A., Szabruk, Poland; a 4-quarter device for detecting milk resistance) cows were milk-sampled and analyzed for SCC. The mean SCC across all cows and all three time points was used to establish the global baseline for the study. Following this period, and without additional stratification by age, body weight, milk yield, or other production parameters, cows were randomly assigned to one of three treatment groups (n = 24 per group). Post-randomization statistical analysis confirmed that neither the pre-treatment SCC values measured at the –24 h time point nor the distribution of mastitis pathogens differed significantly between the groups ($P > 0.05$ for both assays), ensuring baseline equivalence and

uniform pathogen distribution prior to treatment initiation, and indicating that cows in all treatment groups started from a comparable disease-associated baseline level.

The experimental PMQ group received seven IMM infusions of 5 mL of the prepared PMQ solution administered at 24-h intervals (0, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h). The positive control group (the PC group) received two IMM infusions at 0 and 12 h of a fixed-combination commercial formulation containing tetracycline hydrochloride (200 mg), neomycin sulfate (250 mg), bacitracin (2000 IU), and prednisolone (10 mg). The negative control group (the NC group) received IMM infusions of phosphate-buffered saline (PBS) at the same dose and time schedule as the PMQ group.

All IMM administrations were performed into the affected quarter immediately after the morning milking at 9:00 a.m. Before each administration, the udder skin and teat orifice were disinfected using a commercial disinfectant (Oxy-Foam D, EcoLab Inc., Saint Paul, MN, USA). Due to differences in treatment schedules between groups, the attending veterinarian responsible for treatment administration was aware of group allocation; however, the veterinarian was not otherwise involved in the research. All cows were continuously monitored for general health and for standardized local tolerance to the IMM administrations throughout the study period. No concomitant medications were permitted in the PMQ and NC groups. Importantly, no cow was withdrawn from the study due to clinical deterioration requiring rescue antibiotic therapy.

At each morning examination from 0 to 168 h (i.e., up to 24 h after the final IMM administration), mastitis severity in the treated quarter was assessed before daily treatment using a standardized 4-point scoring system: score 0, no clinical abnormalities; score 1, mild changes in milk without local inflammatory signs; score 2, moderate milk abnormalities with mild local inflammation; and score 3, severe mastitis with pronounced local inflammation and systemic signs (Balemi et al., 2021; Kan et al., 2022).

Milk from the affected quarters was collected at the same timepoints as mastitis scoring. Before sampling, teat orifices were disinfected with 70% ethanol. Samples were obtained into 50 mL tubes containing bronopol (8 mg) and natamycin (0.3 mg) as Broad Spectrum Microtabs II (Bentley Instruments) and kept chilled until analysis. Somatic cell counts were determined within 12 h of collection using a semi-automated analyser (BactoCount IBCm, Bentley Instruments, Chaska, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistics

All enrolled cows completed the study, and no missing data were recorded; therefore, all observations were included in the analyses. Statistical analyses were performed in R (version 4.5.0), with statistical significance defined as $P < 0.05$ for all tests.

Fisher's exact test was used to assess the relative distribution of mastitis pathogens isolated from milk samples, as well as to verify the distribution of mastitis scores between groups at the 0 h time point.

Somatic cell counts were \log_2 -transformed to obtain the somatic cell score (SCS) to improve data symmetry and approximate normality, as confirmed by the Shapiro–Wilk test, thereby meeting the assumptions of linear modeling. Temporal changes in SCS were analyzed using a linear mixed-effects model fitted with fixed effects for treatment group, time (categorical), and their interaction, and a random intercept for cow to account for repeated

measurements (lmer function, lmerTest package). Model assumptions were assessed by visual inspection of residuals for approximate normality and homoscedasticity. Post hoc analyses were performed using estimated marginal means (emmeans) to evaluate within-group changes relative to a common baseline and to conduct pairwise between-group comparisons at each time point. To control for multiple testing, p-values were adjusted using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) procedure.

Mastitis inflammation severity (mastitis score) was analyzed as an ordinal outcome. The effects of treatment and time were assessed using a cumulative link mixed-effects model (CLMM) fitted with the ordinal package, including fixed effects for treatment, time, and their interaction, and a random intercept for cow to account for repeated measurements. The distribution of mastitis scores within each treatment group at 0 h (treatment initiation) was used as the reference level, and contrasts at subsequent time points were performed relative to this baseline within each group. Resulting P-values were adjusted using the FDR method.

Results

Figure 2A shows individual cow trajectories and group mean responses for SCS as differences from pre-treatment baseline. In the NC group, SCS remained stable throughout the observation period, with no significant deviations from baseline at any time point ($P > 0.05$ for all comparisons). In contrast, both treatment groups (PC and PMQ) showed significant SCS reductions from 72h onward ($P < 0.01$ to $P < 0.001$), with progressive decline through 168h. Between-group comparisons (Figure 2B) revealed no significant differences among groups during the early observation period (0-96h). At 120h, PC differed from NC ($P < 0.05$). By 144h and 168h, both PC and PMQ groups demonstrated significantly lower SCS than NC ($P < 0.05$), with no difference between PC and PMQ.

The distribution of mastitis severity scores at baseline (0h) did not differ significantly between treatment groups, ensuring comparability prior to intervention ($P > 0.05$, Fisher's exact test). The NC group showed no significant changes in mastitis severity throughout the 168-hour observation period, with inflammation persisting at baseline levels (Figure 3A). In contrast, both treatment groups demonstrated significant improvements. The PC group exhibited significant reduction in severity scores starting at 72h ($P < 0.01$), with sustained improvement through 168h ($P < 0.001$). The PMQ group showed earlier response, with highly significant improvements emerging at 72h ($P < 0.001$) and maintained throughout the study period. Population-level predictions from the CLMM model illustrated these temporal patterns (Figure 3B). The predicted probability of inflammation (score ≥ 1) remained stable and near-maximal in the NC group (~97-99%) throughout the observation period, consistent with persistent untreated infection. Both treatment groups showed progressive declines in inflammation probability over time. The PC group demonstrated a gradual decrease from 95.5% at baseline to 45.0% at 168h, representing a 53% reduction in inflammation probability. The PMQ group exhibited a similar temporal pattern, declining from 96.1% to 64.1% (33% reduction). Notably, the PC group achieved lower final inflammation probability than PMQ, though both groups showed substantial improvement relative to untreated controls. The widening confidence intervals (CI 95%) over time in treated groups reflect increasing heterogeneity in treatment response, with some animals achieving complete resolution while others maintained moderate inflammation.

Discussion

The results indicate that the three-component PMQ (pectin+morin+quercetin) therapy was clinically effective and comparable to standard antibiotic treatment. Because bacteriological cure was assessed only descriptively and without sufficient power for statistical comparison, conclusions regarding pathogen clearance cannot be drawn. The discussion therefore focuses on clinical recovery and SCC dynamics, which were the primary validated outcomes of the study. Both the PC and PMQ groups showed a significant reduction in clinical mastitis scores within 72 h of treatment initiation, followed by a significant decrease in SCS within 96 h. A previous study by Kocik et al. (2025a) reported a 100% cure rate for both pectin and the antibiotic treatment. In the present study, both the PMQ and control groups achieved comparable clinical improvement. No significant differences in clinical scores were observed at any stage of the follow-up. At the same time, the PMQ group showed a trend toward faster regression of inflammatory symptoms. In a previous study using 10% pectin alone, clinical signs resolved on average 1.6 days earlier than with antibiotic therapy (Kocik et al., 2025a). Similarly, in the SCC analysis, a marked decrease in somatic cell count in the pectin group was observed after approximately 96 hours of treatment, whereas in the antibiotic group, this reduction occurred only after 120 hours (Kocik et al., 2025a). In our PMQ therapy, a similar trend toward slightly faster normalization of parameters compared to antibiotic treatment was observed. No adverse effects related to local tolerance of the PMQ formulation were observed, consistent with findings from previous studies on pectin (Kocik et al., 2025a) and morin (Kocik et al., 2025b). No signs of irritation or tissue damage were observed in the udder following infusion. Milk yield after treatment was comparable between the two groups, and the absence of antibiotics eliminates concerns related to drug residues and withdrawal periods. This suggests that PMQ therapy may serve as a safe alternative, avoiding the risks of antimicrobial resistance and milk withdrawal associated with conventional antibiotic use. The analysis of SCS changes and clinical presentation in the current study highlights differences related to infection etiology. Although our study did not stratify results by pathogen, previous research indicates that mastitis caused by *E. coli* is typically associated with a rapid, short-term inflammatory response, whereas infections caused by *S. uberis* tend to provoke a more prolonged, subacute or chronic reaction, often reflected by persistently elevated SCC (Kocik et al., 2025a, 2025b). According to the literature, cows with *E. coli* mastitis often exhibit an acute spike in milk leukocyte count (SCC peak) within the first few days, which then rapidly declines as the inflammatory response subsides (Sumon et al., 2020; Williamson et al., 2022). In the case of *S. uberis*, the changes are typically less abrupt but more prolonged over time. Our findings reflect this pattern: clinical improvement appeared earlier (around 48–72 hours), whereas normalization of cytological parameters (SCC) took longer, which is characteristic of infections caused by coliform bacteria (Kirkeby et al. 2021). In the antibiotic group, clinical symptoms resolved more rapidly than in the PMQ group, a difference that was particularly noticeable during the initial days of treatment in cases of *E. coli*-induced mastitis. In the PMQ-treated cows, the reduction of udder swelling and redness progressed gradually but at a slower pace.

We did not directly assess cytokine profiles in milk; however, comparisons with published studies suggest that PMQ exhibits anti-inflammatory properties. Unlike steroid

preparations or certain antibiotics combined with glucocorticoids, natural compounds such as pectin, morin, and quercetin inhibit the accumulation of inflammatory cells and the release of cytokines, while not inducing bacterial resistance or producing adverse effects in milk (Burmańczuk et al. 2018; Jiang et al. 2022, Kocik et al., 2025a). Previous reports indicate that oral or local administration of pectins does not elevate TNF- α levels in either blood or milk. Study results show no significant differences in TNF- α concentrations between pectin treatment and standard control therapy (Kocik et al., 2025a). Similarly, numerous in vitro studies and experimental models have demonstrated that quercetin reduces the synthesis of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and other pro-inflammatory cytokines (Xiong et al., 2019; Yu et al., 2022). Quercetin has the ability to inhibit NF- κ B activation, in part by modulating pathways mediated by Toll-like receptors, which leads to a reduction in the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6. This makes it a promising natural compound with anti-inflammatory properties. For example, in vitro studies have demonstrated that quercetin suppresses LPS-induced inflammatory responses by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway (Burmańczuk et al., 2018; Jiang et al., 2022). Regarding pectin, its potential to regulate immune responses is less well defined, as there is a lack of studies clarifying its effects on TLR signaling, NF- κ B activation, and cytokine profiles within mammary gland tissue. It should also be emphasized that the efficacy and safety of both approaches, particularly for pectin and morin, remain insufficiently documented. At present, they are better regarded as experimental or supportive therapies rather than fully validated alternatives to conventional anti-inflammatory and antimicrobial agents used in the treatment of mastitis.

Nevertheless, the results obtained are consistent with previous findings while also revealing some new insights. In a prototype in vivo study on spontaneous recovery, administration of a 10% pectin solution led to clinical improvement and a reduction in SCS comparable to that achieved with antibiotic treatment (Kocik et al., 2025a). Importantly, the anti-inflammatory effect of pectin was observed as early as 48 hours after administration, and cytological changes occurred more rapidly than in the antibiotic-treated group. In light of these findings, the PMQ therapy used in the present study showed a slightly slower onset of action (with significant changes around 72 hours), which may be attributed to differences in formulation or dosing, as well as the heterogeneous nature of the three-component mixture. In the case of morin alone, previous experiments (Kocik et al., 2025b) showed that a 3% morin solution significantly reduced symptoms of *E. coli*-induced mastitis, restoring clinical condition and lowering SCC, although more slowly than antibiotics. In contrast, in *S. uberis* infections, morin's effectiveness was limited: clinical improvement appeared only after 96–168 hours, and the reduction in SCC was noticeably weaker than with antibiotic treatment. Our findings similarly suggest that PMQ performs well against Gram-negative pathogens (with rapid clinical improvement in *E. coli* cases), but its efficacy against Gram-positive infections is moderate, echoing the results seen with morin alone. This aligns with the observation that PMQ helps alleviate inflammation even in *S. uberis* infections but does not clear the infection as effectively as strong antibiotics. As for quercetin, a previous study demonstrated that repeated intramammary administration significantly reduced SCS in cows with mastitis within eight days of therapy (Burmańczuk et al., 2018). Our observations confirm that quercetin (albeit in combination with other components) contributes to the reduction of inflammatory cells in milk. The combination of pectin, morin, and quercetin may have acted through complementary

mechanisms: for example, quercetin and morin may have enhanced the immunomodulatory effect, while pectin likely accelerated the formation of a protective barrier. The applied mixture achieved at least the level of effectiveness seen with each component individually, similar to previously studied pectin and morin, reducing both clinical symptoms and SCC. The key new findings stem from the assessment of the cumulative effect and confirmation of the safety of this combination (no adverse effects observed), as well as the indication that PMQ therapy can reduce inflammation levels to nearly those achieved by systemic antibiotics, while potentially shortening the time to improvement compared to no treatment.

In recent years, numerous natural compounds have been evaluated as alternatives to antibiotics in bovine mastitis therapy. These include immunomodulatory polysaccharides such as β -glucans, chitosan, and alginates, as well as various plant extracts (Do Nascimento et al., 2025). Although some of these agents can stimulate leukocyte recruitment or exert direct antimicrobial effects, their therapeutic outcomes remain inconsistent and often pathogen dependent. For instance, β -glucans show limited effectiveness in chronic Gram-positive infections, while chitosan and alginates possess antibacterial and wound-healing properties but may exhibit restricted penetration into deeper mammary tissue (Inchaisri et al., 2000; Kruk and Winnicka, 2022; Tomanić et al., 2023; Guamán et al., 2024; Godoy et al., 2025). These limitations underscore the need for better-defined, multi-target natural formulations. The PMQ approach, combining a polysaccharide (pectin) with two flavonoids (morin and quercetin), may help address some of these challenges. Pectin supports epithelial barrier integrity and reduces local inflammation, morin can limit biofilm formation, and quercetin provides complementary antioxidant and immunomodulatory effects. When administered together, these components may interact synergistically, offering more predictable and rapid mitigation of inflammatory symptoms than single-compound or crude plant-based preparations. In contrast to essential oils or homeopathic remedies, PMQ has a clearly defined composition and a mechanistic basis validated in experimental models, which strengthens its potential as a structured non-antibiotic therapeutic option.

The results discussed align with the global trend of reducing antibiotic use in veterinary medicine. The One Health concept, along with the growing resistance of pathogens, underscores the need to explore alternative therapeutic strategies (Kocik et al., 2025b). As suggested by Jiang et al. (2025), reducing antibiotic therapy is particularly justified in cases of Gram-negative infections, where anti-inflammatory effects may allow the host's immune system to resolve the infection naturally. Our observations are consistent with this approach, supportive treatment with PMQ produced outcomes comparable to those of antibiotics. The absence of antibiotic residues in milk following PMQ therapy is an additional advantage from both a public health and dairy farming perspective.

However, PMQ therapy also has limitations. Its effectiveness may be reduced in severe or chronic infections caused by Gram-positive pathogens such as *S. uberis*, which are known for their ability to persist within mammary tissue. In study of Kocik et al. (2025b), morin alone produced only a slower and less pronounced reduction in SCC compared to antibiotic treatment in *S. uberis* infections. It can therefore be assumed that in cases of severe mastitis or mixed infections, antibiotics remain necessary, while PMQ may serve primarily as a supportive therapy. Further research is needed to optimize PMQ dosing and formulation, to better understand the pharmacokinetics of its components, and to evaluate its application across

different forms of mastitis. Large-scale in vivo clinical trials are also required to assess its effectiveness at various stages of the disease and to compare it with other treatment modalities.

The present study has several important limitations. Most notably, the lack of pharmacokinetic data for PMQ components following intramammary administration prevents assessment of their tissue penetration, duration of action, and optimal dosing regimen. The trial involved a fixed treatment cycle, which does not allow conclusions about the flexibility of the therapy. Another limitation is the heterogeneity of infections and potential strain variability, combined with a relatively modest sample size (72 cows), and the absence of stratification by lactation stage, metabolic status, milk yield, or cow genotype, all of which may have influenced treatment response (Bagnicka et al., 2023). The observation period was limited to 7 days, without post-treatment bacteriological evaluation. Thus, it remains unclear whether pathogens were fully eliminated or what effect PMQ had on the udder microbiome and recurrence risk. No molecular analyses were performed either, PMQ's impact on cytokine expression, TLR signalling, or oxidative stress markers in glandular epithelium was not assessed. Such data could help elucidate mechanisms of action and provide objective validation. Finally, PMQ therapy requires frequent applications (seven doses per day), which limits its practicality. There is also a lack of comparisons between different ratios of PMQ components. Further studies should evaluate the efficacy, potential synergy, and formulation possibilities for extended-release delivery systems.

In conclusion, the results suggest that the three-component PMQ therapy may represent a promising alternative to antibiotic treatment in the management of clinical mastitis in dairy cows. The natural compounds used combine anti-inflammatory, antimicrobial, and barrier-protective effects, while avoiding complications associated with antibiotic use. However, overly broad generalizations should be avoided. The potential of PMQ is best realized as part of an integrated treatment strategy, particularly in mild infections, with ongoing monitoring of therapeutic outcomes and continued investigation into the method's limitations.

References

- Bagnicka E, Brzozowska P, Żukowski K, Grochowska R (2023) The association of gene polymorphisms with milk production and mastitis resistance phenotypic traits in dairy cattle. *Ann Anim Sci* 23:419–430
- Balemi A, Gumi B, Amenu K, Girma S, Gebru M, Tekle M, Rius AA, D'Souza DH, Agga GE Kerro Dego O (2021) Prevalence of mastitis and antibiotic resistance of bacterial isolates from CMT positive milk samples obtained from dairy cows, camels, and goats in two pastoral districts in southern Ethiopia. *Animals* 11:1530
- Burmańczuk A, Hola P, Milczak A, Piech T, Kowalski C, Wojciechowska B, Grabowski T (2018) Quercetin decrease somatic cells count in mastitis of dairy cows. *Res Vet Sci* 117:255–259
- Debruyne E, Ghumman NZ, Peng J, Tiwari HK, Gogoi-Tiwari J (2025) Alternative approaches for bovine mastitis treatment: A critical review of emerging strategies, their effectiveness and limitations. *Res Vet Sci* 185:105557
- do Nascimento GM, Rodrigues RA, Brugnera HC, Barbosa JC, Favaron FR, Rossi GAM, Bragança CRS, Schocken-Iturrino RP, de Ávila FA, Cardozo MV (2025) Antimicrobial

- activity of teat antiseptic formulations based on plant extracts for controlling bovine mastitis: in vitro and in vivo evaluation. *Vet Sci* 12:293
- Fan X, Qadeer A, Asiri M, Alzahrani FM, Alzahrani KJ, Alsharif KF, Khan MZ, Jiang X. (2025) Traditional Chinese medicine and plant-derived bioactive compounds as sustainable alternatives to antibiotics in bovine mastitis: a review. *Front Vet Sci* 12:1642647
- Godoy CA, Balic I, Moreno AA, Diaz O, Arenas Colarte C, Bruna Larenas T, Gamboa A, Caro Fuentes N (2025) Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan nanoparticles against *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis milk. *Pharmaceutics* 17:186
- Guamán SA, Elhadi A, Salama AAK, Manuelian CL, Caja G, Albanell E (2024) Beta-glucans improve the mammary innate immune response to endotoxin challenge in dairy ewes. *Animals* 14:3023
- Huang P, Hu P, Zhou SY, Li Q, Chen WM (2014) Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol* 68:47–52
- Inchaisri C, Persson Waller K, Johannisson A (2000) Studies on the modulation of leucocyte subpopulations and immunoglobulins following intramammary infusion of β 1,3-glucan into the bovine udder during the dry period. *J Vet Med B* 47:373–386
- Jiang L, Li Q, Liao H, Liu H, Wang Z (2025) Enhancing agricultural productivity in dairy cow mastitis management: Innovations in non-antibiotic treatment technologies. *Vet Sci* 12:662
- Jiang M, Lv Z, Huang Y, Cheng Z, Meng Z, Yang T, Yan Q, Lin M, Zhan K, Zhao G (2022) Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in bovine mammary epithelial cells by suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Front Vet Sci* 9:915726
- Kan X, Hu G, Liu Y, Xu P, Huang Y, Cai X, Guo W, Fu S, Liu J (2022) Mammary fibrosis tendency and mitochondrial adaptability in dairy cows with mastitis. *Metabolites* 12:1035
- Khan MZ, Khan A, Xiao J, Ma J, Ma Y, Chen T, Shao D, Cao Z (2020) Overview of research development on the role of NF- κ B signaling in mastitis. *Animals* 10:1625
- Kirkeby C, Schwarz D, Denwood M, Farre M, Nielsen SS, Gussmann M, Toft N, Halasa T (2021) Dynamics of somatic cell count (SCC) and differential SCC during and following intramammary infections. *J Dairy Sci* 104:3427–3438
- Kocik M, Burmańczuk A, Grabowski T, Tomaszewska E (2025a) Intramammary pectin therapy for clinical mastitis in dairy cows: A field pilot study. *Agriculture* 15:1760
- Kocik M, Burmańczuk A, Bednarski M, Sołtysiuk M, Grabowski T, Tomaszewska E (2025b) Therapeutic potential of morin in reducing somatic cell counts and clinical scores in bovine mastitis caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture* 15:2359
- Kovačević Z, Samardžija M, Tomanić D (2025) A review of recent developments in essential oil-based alternatives in mastitis treatment in dairy cows. *Ann Anim Sci*, In Press <https://doi.org/10.2478/aoas-2025-0086>
- Kruk K, Winnicka K (2022) Alginates combined with natural polymers as valuable drug delivery platforms. *Marine Drugs* 21:11.
- Pyörälä S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 34:565–578.
- Romanek J, Trzcińska M, Samiec M (2024). Multi-faceted characterization of mesenchymal stem cells and their application as a powerful tool for agrobiotechnology, assisted reproductive technologies, and veterinary and regenerative biomedicine – a review. *Ann Anim Sci* 24:367–377.

- Sumon S, Parvin M, Ehsan M, Islam, M (2020) Dynamics of somatic cell count and intramammary infection in lactating dairy cows. *J Adv Vet Anim Res* 7:314
- Tomanić D, Samardžija M, Kovačević Z (2023) Alternatives to antimicrobial treatment in bovine mastitis therapy: A review. *Antibiotics* 12:683
- Tomanić D, Kladar N, Kovačević Z (2025) Antibiotic residues in milk as a consequence of mastitis treatment: balancing animal welfare and One Health risks. *Vet Sci* 12:1159
- Williamson J, Callaway T, Rollin E, Ryman V (2022) Association of milk somatic cell count with bacteriological cure of intramammary infection – a review. *Agriculture*, 12:1437
- Xiong G, Ji W, Wang F, Zhang F, Xue P, Cheng M, Sun Y, Wang X, Zhang T (2019) Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF- κ B signaling pathway. *BioMed Res Int* 2019:628263.
- Yu C, Wang D, Yang Z, Wang T (2022) Pharmacological effects of polyphenol phytochemicals on the intestinal inflammation via targeting TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Sci* 23:6939

Received: 16 XII 2025

Accepted: 19 III 2026

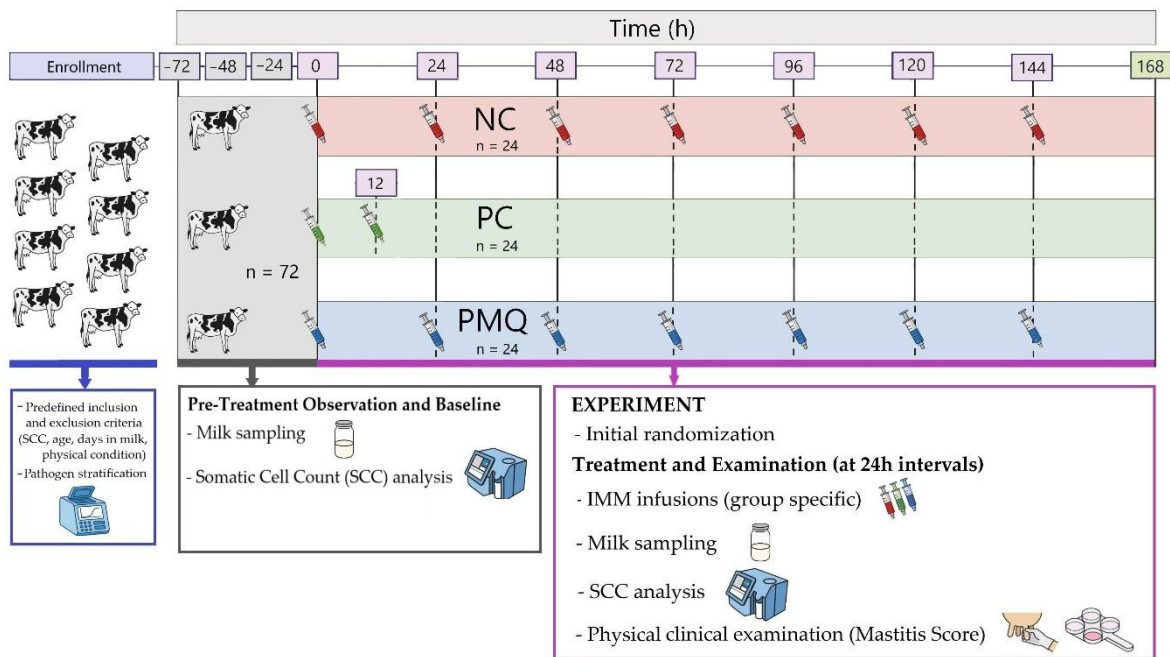


Figure 1. Experimental schedule. Seventy-two multiparous Holstein-Friesian cows with naturally occurring clinical mastitis ($n = 72$) meeting predefined inclusion criteria after pathogen stratification were enrolled to the study. Following a 72-hour pre-treatment observation period with baseline measurements of milk SCC (-72h, -48h, -24h), cows were randomized into three treatment groups ($n=24$ per group): NC (negative control, BPS administered at 24-hour intervals from 0h through 144h), PC (positive control, antibiotic administered at 0h and 12h), and PMQ (pectin + morin + quercetin administered at 24-hour intervals from 0h through 144h). Milk samples were collected and SCC analysis performed at 24-hour intervals from 0h through 168h, corresponding to 24 h after the final PMQ or PBS administration. Physical clinical examinations and mastitis severity scoring were conducted at each sampling time point. Syringe icons indicate treatment administration timepoints (group specific)

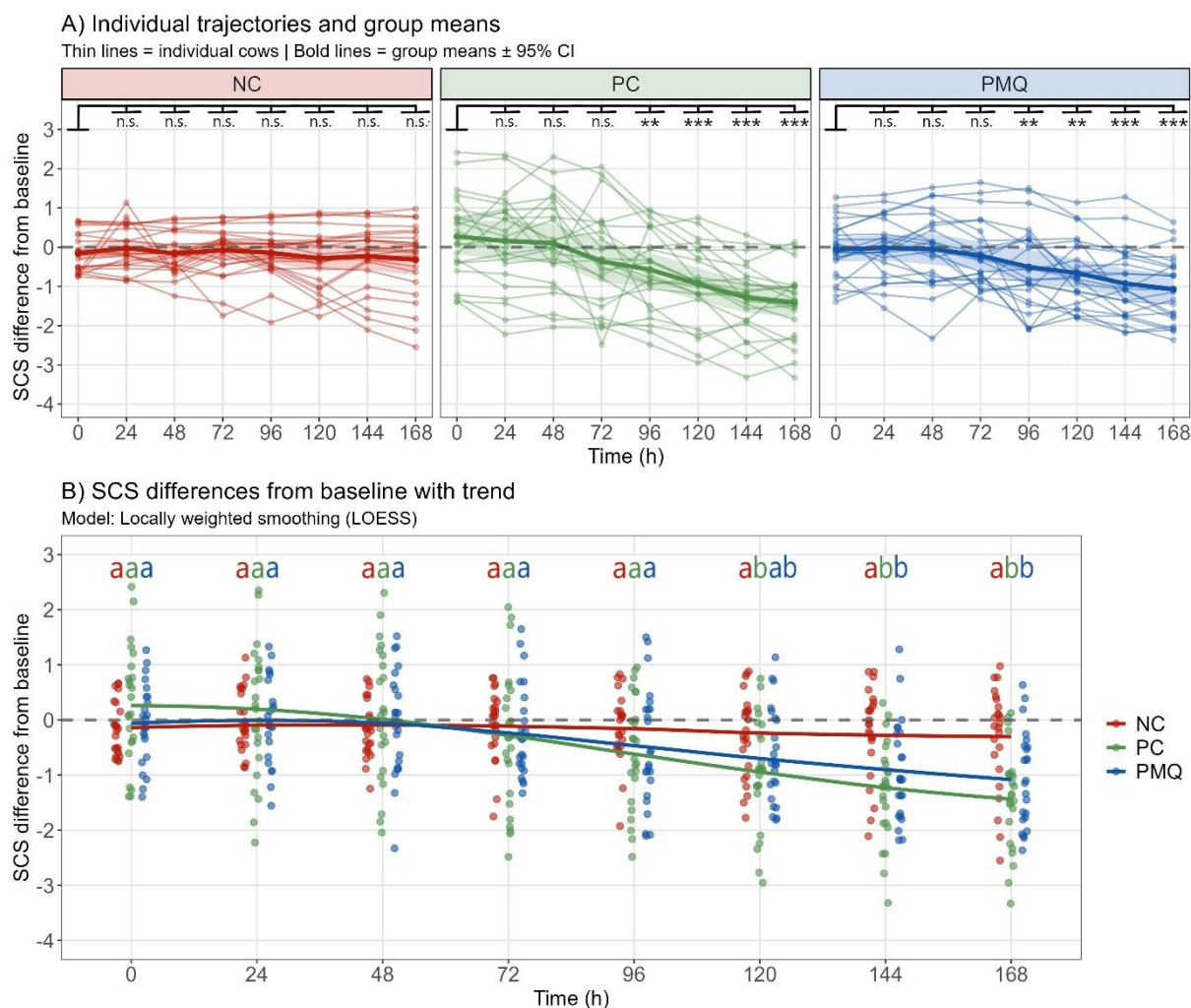


Figure 2. Somatic cell score (SCS) dynamics during treatment period. (A) Individual cow trajectories (thin lines) and group means (bold lines) with 95% confidence intervals (shaded ribbons) showing SCS differences from global pre-treatment baseline. Significance levels for within-group comparisons to baseline are indicated above each panel (n.s. = not significant, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; LMM for repeated measures with FDR adjustment for multiple comparison). (B) SCS differences from baseline with locally weighted smoothing (LOESS) trend lines. Points represent individual observations. Letters above time points indicate between-group comparisons; groups sharing the same letter do not differ significantly ($P > 0.05$; LMM for repeated measures with FDR adjustment for multiple comparison). NC = negative control (PBS), PC = positive control (antibiotic), PMQ = pectin + morin + quercetin

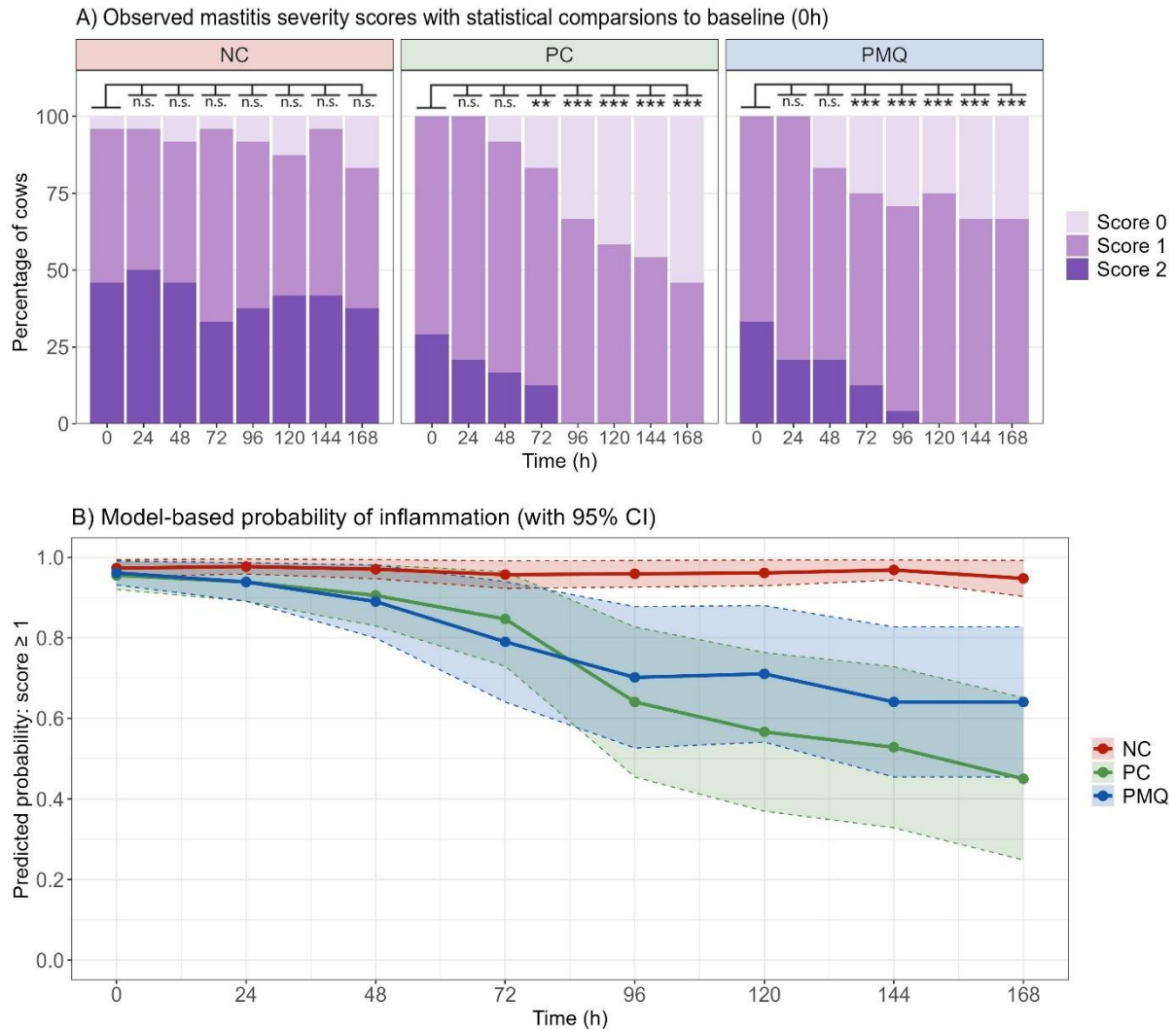


Figure 3. Temporal dynamics of mastitis severity and treatment response. (A) Observed distribution of mastitis scores (0 = none, 1 = moderate, 2 = severe) displayed as percentage of cows in each treatment group over the 168-hour observation period. Asterisks indicate significant within-group differences from baseline (0h) based on post-hoc comparisons (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s. = not significant; CLMM for repeated measures with FDR adjustment for multiple comparison). (B) Model-predicted probability of inflammation (mastitis score ≥ 1) from CLMM model. Solid lines represent population-averaged predictions, shaded ribbons indicate model 95% confidence intervals. NC = negative control (PBS), PC = positive control (antibiotic), PMQ = pectin + morin + quercetin

Wrocław 30.03.2026

dr Michał Bednarski


Katedra Epizootiologii z Klinika Ptaków i Zwierząt Egzotycznych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcin Kocik pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

Kocik, M., Burmańczuk, A., Bednarski, M., Sołtysiuk, M., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture*, 15(22), p.2359.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcin Kocik w powstanie wszystkich publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz w przygotowaniu tekstów odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu publikacji polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korekcie manuskryptów.



dr n. wet. Michał Bednarski

Prof. dr Oktay Yilmaz
Department of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Veterinary Medicine
Afyon Kocatepe University
03200 Afyonkarahisar
Türkiye

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcin Kocik pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz and Ewa Tomaszewska. A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Annals of Animal Science*. DOI: 10.2478/aoas-2026-00252026 2026.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcin Kocik w powstanie wszystkich publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz w przygotowaniu tekstów odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu publikacji polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korekcie manuskryptów.



dr hab. Artur Burmańczuk prof. uczelni
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcina Kocika pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

- 1) Kocik, M., Burmańczuk, A., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows: A Field Pilot Study. *Agriculture*, 15(16), p.1760.
- 2) Kocik, M., Burmańczuk, A., Bednarski, M., Sołtysiuk, M., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture*, 15(22), p.2359.
- 3) Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz and Ewa Tomaszewska. A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Annals of Animal Science*. DOI: 10.2478/aoas-2026-00252026 2026.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcina Kocika w powstaniu wszystkich publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz w przygotowaniu tekstów odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu publikacji polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korekcie manuskryptów.

Katedra Farmakologii, Toksykologii
i Ochrony Środowiska UP w Lublinie

Dr hab. Artur Burmańczuk
profesor uczelni

Prof. dr hab. Ewa Tomaszewska
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcin Kocik pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

- 1) Kocik, M., Burmańczuk, A., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows: A Field Pilot Study. *Agriculture*, 15(16), p.1760.
- 2) Kocik, M., Burmańczuk, A., Bednarski, M., Sołtysiuk, M., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture*, 15(22), p.2359.
- 3) Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz and Ewa Tomaszewska. A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Annals of Animal Science*. DOI: 10.2478/aoas-2026-00252026 2026.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcin Kocik w powstanie wszystkich publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz w przygotowaniu tekstów odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu publikacji polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korekcie manuskryptów.

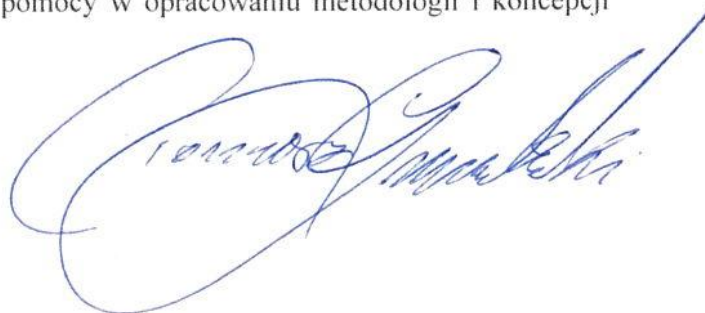
Ewa Tomaszewska

Prof. dr hab. Tomasz Grabowski
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcin Kocik pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

- 1) Kocik, M., Burmańczuk, A., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Intramammary Pectin Therapy for Clinical Mastitis in Dairy Cows: A Field Pilot Study. *Agriculture*, 15(16), p.1760.
- 2) Kocik, M., Burmańczuk, A., Bednarski, M., Sołtysiuk, M., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture*, 15(22), p.2359.
- 3) Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz and Ewa Tomaszewska. A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Annals of Animal Science*. DOI: 10.2478/aoas-2026-00252026 2026.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcin Kocik w powstanie wszystkich publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz w przygotowaniu tekstów odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu publikacji polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korekcie manuskryptów.



mgr Sołtysiuk Marta
Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcin Kocik pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

Kocik, M., Burmańczuk, A., Bednarski, M., Sołtysiuk, M., Grabowski, T. and Tomaszewska, E., 2025. Therapeutic Potential of Morin in Reducing Somatic Cell Counts and Clinical Scores in Bovine Mastitis Caused by *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. *Agriculture*, 15(22), p.2359.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcin Kocik w powstanie wszystkich publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz w przygotowaniu tekstów odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu publikacji polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korekcie manuskryptów.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sołtysiuk Marta', is written in a cursive style.

Dr hab. Włodzimierz Markiewicz Prof. UW-M

Katedra Farmakologii i Toksykologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
WYDZIAŁ MEDYCYN WETERYNARYJNEJ
Katedra Farmakologii i Toksykologii
10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 13
tel. 89 523 37 58, 89 523 34 96

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Marcina Kocika pod tytułem: „Wpływ kwercetyny, moryny i pektyn podawanych dowymieniowo na liczbę komórek somatycznych w mleku krów”.

Marcin Kocik, Artur Burmańczuk, Tomasz Grabowski, Włodzimierz Markiewicz, Oktay Yilmaz and Ewa Tomaszewska. A Non-Antibiotic Pectin–Morin–Quercetin Intramammary Therapy for Mild Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Annals of Animal Science*. DOI: 10.2478/aoas-2026-00252026 2026.

Oświadczam, że udział lek. wet. Marcina Kocika w powstaniu publikacji był wiodący (60%). Doktorant odegrał kluczową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich realizacji, analizie wyników, formułowaniu wniosków, a także w przygotowaniu oraz tłumaczeniu manuskryptu i opracowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój wkład w powstanie publikacji obejmował wsparcie w opracowaniu metodologii i koncepcji badań oraz korektę manuskryptu.

Włodzimierz
Markiewicz