



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Martyna Agata Połuszny

**Wpływ standaryzowanego wyciągu
i wybranych substancji czynnych z melisy
lekarskiej (*Melissa officinalis*) na aktywność
motoryczną izolowanych wycinków
przewodu pokarmowego różnych gatunków
zwierząt – badania *ex vivo***

The influence of a standardized extract and selected active
substances from lemon balm (*Melissa officinalis*) on the motor
activity of isolated specimens of the gastrointestinal tract of
various animal species - *ex vivo* studies

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Marta Mendel, prof. SGGW
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Warszawa, 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

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

Data 22-09-2025

Czytelny podpis promotora Martha Mendel

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

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

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

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

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

Data 06/10/2025

Czytelny podpis autora rozprawy Martyna Pośluszy

Szczególne podziękowania składam

*dr hab. Marcie Mendel, prof. SGGW
za umożliwienie rozwoju i opiekę naukową*

*firmie Norfeed za wsparcie finansowe oraz owocną współpracę podczas
realizacji badań*

*dr hab. Magdalenie Chłopecka - Słomińskiej, prof. SGGW
za życzliwość, poświęcony czas i cenne uwagi merytoryczne*

*Pani Marii Głowińskiej za pomoc podczas przeprowadzania doświadczeń
laboratoryjnych oraz wszystkim pracownikom Zakładu Farmakologii
i Toksykologii za pomoc, miłą atmosferę i wiarę w powodzenie tego
przedsięwzięcia*

*Mojej siostrze
Za pomoc i zrozumienie*

Spis treści

Streszczenie.....	9
Summary.....	11
Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi	13
Objaśnienie zastosowanych skrótów	15
1. Wstęp	17
1.1 Melisa lekarska – charakterystyka botaniczna i występowanie	17
1.2 Skład fitochemiczny wyciągu z liści melisy lekarskiej	18
1.3 Właściwości biologiczne wyciągu z melisy lekarskiej oraz jej składników	20
1.4 Charakterystyka kwasów fenolowych zawartych w wyciągu z liści melisy lekarskiej	22
1.5 Zastosowanie etnofarmakologiczne i etnoweterynaryjne melisy lekarskiej oraz uregulowania prawne dotyczące zastosowań melisy lekarskiej	24
1.6 Choroby zwierząt przebiegające z zaburzeniami czynnościowymi przewodu pokarmowego.....	25
1.7 Potencjalne wykorzystanie melisy w zapobieganiu i leczeniu chorób zwierząt	28
1.8 Możliwości wykorzystania badań <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i> w celu identyfikacji nowych leków i dodatków paszowych	30
2. Cele i hipotezy badawcze	33
2.1 Cele	33
2.2 Hipotezy badawcze.....	33
3. Materiały i metody	34
3.1 Materiały	34
3.1.1 Medium inkubacyjne i odczynniki	34
3.1.2 Substancje badane	34
3.1.3 Materiał zwierzęcy	35
3.2. Metody.....	35
3.2.1 Pobieranie i przygotowanie izolowanych wycinków jelit.....	35
3.2.2 Schemat doświadczeń.....	37
3.2.2.1 Doświadczenia oceniające wpływ wyciągu z liści melisy lekarskiej oraz wybranych kwasów fenolowych na aktywność spontaniczną i indukowaną farmakologicznie mięśniówki gładkiej jelit	38
3.2.2.2 Schemat doświadczeń mających na celu ustalenie mechanizmu działania kwasu rozmarynowego na mięśniówkę jelita czczego brojlera kurzego.....	38
3.2.3 Rejestracja i analiza danych	40

4. Wyniki	42
4.1 Wpływ standaryzowanego wyciągu i wybranych substancji czynnych z melisy lekarskiej (<i>Melissa officinalis</i>) na aktywność motoryczną izolowanych wycinków przewodu pokarmowego brojlerów kurzych, świni oraz owcy	42
4.2 Określenia mechanizmu działania kwasu rozmarynowego na jelito czcze brojlera kurzego (część dystalna i proksymalna)	45
4.2.1. Ocena udziału receptorów muskarynowych w reakcji jelita czczego brojlera kurzego kwasu rozmarynowego	45
4.2.2. Ocena udziału wapnia zewnątrzkomórkowego w reakcji jelita czczego brojlera kurzego kwasu rozmarynowego	48
5. Dyskusja	49
6. Podsumowanie i wnioski	59
7. Piśmiennictwo	60
8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu	76

Streszczenie

Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.) od stuleci znajduje zastosowanie w medycynie tradycyjnej oraz praktyce weterynaryjnej. Jej szerokie spektrum aktywności farmakologicznych wynika przede wszystkim z obecności kwasów fenolowych, w tym kwasu rozmarynowego, chlorogenowego i litospermowego, a także olejków eterycznych i flawonoidów. Związki te wykazują potwierdzone działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, uspokajające, przeciwdepresyjne oraz spazmolityczne. W ostatnich latach roślina ta zyskała również znaczenie w żywieniu zwierząt gospodarskich jako dodatek paszowy, pełniąc funkcję zarówno substancji poprawiającej smakowość paszy, jak i komponentu o potencjale prozdrowotnym.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu standaryzowanego wyciągu z liści melisy lekarskiej oraz jej głównych składników aktywnych z grupy kwasów fenolowych, tj. kwasu rozmarynowego, kwasu chlorogenowego i kwasu litospermowego, na motorykę przewodu pokarmowego wybranych gatunków zwierząt gospodarskich: brojlerów kurzych, świń i owiec. Dodatkowym zadaniem była próba identyfikacji mechanizmu działania kwasu rozmarynowego na mięśniówkę jelita czczego brojlera.

Eksperymenty przeprowadzono w warunkach *ex vivo* z wykorzystaniem izolowanych fragmentów jelita czczego i okrężnicy, rejestrując zmiany napięcia mięśniówki gładkiej okrężnej i podłużnej. Analizowano wpływ badanych substancji zarówno na aktywność spontaniczną, jak i na odpowiedź wywołaną farmakologicznie przy użyciu acetylocholiny.

Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno ekstrakt z melisy, jak i badane kwasy fenolowe istotnie modulują kurczliwość mięśniówki przewodu pokarmowego. Charakter działania był jednak zróżnicowany (zarówno prokinetyczny jak i miorelaksacyjny) w zależności od gatunku zwierzęcia, badanego odcinka jelita oraz warstwy mięśniowej. Badania mechanizmu działania kwasu rozmarynowego ujawniły, że jego efekt skurczowy w jelicie czczym brojlera zależy od aktywacji receptorów muskarynowych. Zastosowanie atropiny całkowicie znosiło odpowiedź, natomiast pirenzepina i 4-DAMP istotnie ją redukowały, co wskazuje na udział przewodnictwa cholinergicznego w reakcji indukowanej przez ten związek. Ponadto doświadczenia w środowisku pozbawionym jonów wapnia potwierdziły konieczność obecności Ca^{2+} w przestrzeni

zwnątrzkomórkowej dla wywołania skurczu, co wskazuje na jego kluczową rolę w inicjacji mechanizmu odpowiedzi.

Otrzymane wyniki sugerują, że melisa lekarska i jej składniki fenolowe mogą stanowić wartościowe dodatki paszowe modulujące motorykę przewodu pokarmowego zwierząt gospodarskich. Efekty działania wykazują jednak wysoką zmienność międzygatunkową, co odzwierciedla odmienności fizjologii przewodu pokarmowego u poszczególnych gatunków zwierząt. Kwas rozmarynowy charakteryzuje się wyraźnym działaniem prokinetycznym u ptaków, podczas gdy u świń i przeżuwaczy efekt ten jest bardziej złożony. Konieczne są dalsze badania w celu pełniejszego wyjaśnienia mechanizmu działania tego związku, ze szczególnym uwzględnieniem roli poszczególnych podtypów receptorów muskarynowych, kanałów jonowych oraz szlaków sygnalizacji wwnątrzkomórkowej.

Słowa kluczowe: Melisa lekarska, motoryka, drób, trzoda chlewna, owce

Summary

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) has been employed in traditional human and veterinary medicine for centuries. Its broad spectrum of pharmacological activities is attributed primarily to the presence of phenolic acids, including rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic acids, as well as essential oils and flavonoids. These bioactive constituents exhibit documented anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, sedative, antidepressant, and spasmolytic properties. In recent years, *M. officinalis* has also attracted attention in livestock nutrition as a functional feed additive, contributing both to enhanced feed palatability and to potential health-promoting effects.

The present study aimed to evaluate the influence of a standardized lemon balm leaf extract and its principal phenolic acids, i.e., rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic acids, on gastrointestinal motility in selected livestock species, namely broiler chickens, pigs, and sheep. An additional objective was to characterize the mechanism underlying the action of rosmarinic acid on the smooth muscle of the broiler jejunum.

Experiments were performed *ex vivo* using isolated jejunal and colonic specimens of circular and longitudinal smooth muscles, with continuous recording of smooth muscle tension. Both spontaneous contractile activity and pharmacologically induced responses to acetylcholine were assessed.

The findings demonstrated that both the lemon balm extract and the tested phenolic acids exert significant modulatory effects on gastrointestinal contractility. The character and intensity of these effects (prokinetic or myorelaxant), however, were dependent on animal species, intestinal region, and muscle layer. Mechanistic studies revealed that the contractile action of rosmarinic acid in the broiler jejunum is mediated by muscarinic receptor activation. Atropine completely abolished the response, while pirenzepine and 4-DAMP markedly reduced contractility, supporting the involvement of cholinergic pathways. Moreover, experiments conducted in a calcium-free buffer demonstrated that extracellular Ca^{2+} is indispensable for the contraction, indicating its central role in the initiation of this response.

Overall, the results indicate that *M. officinalis* and its phenolic constituents represent promising candidates for feed additives capable of modulating gastrointestinal motility in farm animals. Nevertheless, the effects are characterized by marked interspecies

variability, reflecting species-specific gastrointestinal physiology. Rosmarinic acid displays a distinct prokinetic action in poultry, whereas in pigs and ruminants, the effects are more complex. Further investigations are warranted to elucidate the precise mechanisms of action, with particular attention to the role of muscarinic receptor subtypes, ion channels, and intracellular signaling pathways.

Keywords: Lemon balm, motility, poultry, swine, sheep

Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi

Publikacja 1

Posluszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—*ex vivo study*. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

IF = 3,9

140 pkt MNiSzW

Publikacja 2

Posluszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M*. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

IF = 2,7

100 pkt MNiSzW

Publikacja 3

Posluszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M.* (2025). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, Vol. 82 No. 2 pp. 291-303, 2025

IF = 0,4 pkt

100 pkt MNiSzW

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi **IF= 7 pkt.**

wg. punktacji Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

*autor korespondencyjny

Objaśnienie zastosowanych skrótów

4-AP	4-aminopyrydyna
AAFCO	Stowarzyszenie Amerykańskich Urzędników Kontroli Pasz
ACh	acetylocholina
Ca-free M K-HS	modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita pozbawiony jonów wapnia
Ca ²⁺	jon wapniowy
CaCl ₂	chlorek wapnia
ChA	kwask chlorogenowy
DMSO	dimetylosulfotlenek
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
EMA	Europejska Agencja ds. Leków
ENS	Jelitowy układ nerwowy
GRAS	Ogólnie uznawane za bezpieczne
HPLC-MSn	wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z wielostopniową spektrometrią mas
HPLC-UV	wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją w ultrafiolecie
Isop	izoproterenol
KCl	chlorek potasu
KH ₂ PO ₄	diwodorofosforan potasu
LA	kwask litospermowy
M K-HS	modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita
MgSO ₄	siarczan magnezu

MIC	minimalne stężenie hamujące
MLN	motylina
NaCl	chlorek sodu
NaHCO ₃	Wodorowęglan sodu
NO	tlenek azotu
RA	kwask rozmarynowy
VIP	Wazoaktywny peptyd jelitowy
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia

1. Wstęp

1.1 Melisa lekarska – charakterystyka botaniczna i występowanie

Melissa officinalis L. (melisa lekarska) jest wieloletnią rośliną zielną, która należy do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*) (Awad i in., 2009). Rośnie do wysokości 30–125 cm w zależności od warunków, posiada miękkie, krótkie włoski otaczające łodygę i liście. Łodyga jest pionowa, rozgałęziona, o czworokątnym przekroju poprzecznym natomiast liście są ogonkowe, lekko jajowate, o wymiarach do 6x3cm, górne liście są bardziej klinowate, a dolne sercowate, ząbkowane u nasady (Komarov, 1977) (Ryc. 1). Kwiaty melisy lekarskiej są białe lub bladoróżowe, składające się z drobnych skupisk od 4 do 12 kwiatów. Nasiona są bardzo małe, mają ok. 1 do 1,5 mm długości, o jajowatym, ciemnobrązowym lub czarnym kolorze. Melisa lekarska ma system korzeniowy z wieloma korzeniami bocznymi, co sprawia, że roślina jest przystosowana do różnych warunków środowiskowych. Górne części rośliny obumierają na początku zimy, a nowe pędy wyrastają z zimujących korzeni już na początku wiosny. Melisa lekarska jest rośliną, która może szybko rosnąć w zakresie temperatur od 15 do 35°C i wymaga opadów od 500 do 600 mm równomiernie rozłożonych w całym sezonie wegetacyjnym (Saeb i Gholamrezaee, 2012), są to warunki które mogą być łatwo spełnione w wielu szerokościach geograficznych dzięki czemu jest to dość popularna roślina i można ją spotkać prawie na całym świecie.



Rycina 1 Melisa lekarska (zdjęcie własne)

1.2 Skład fitochemiczny wyciągu z liści melisy lekarskiej

Charakterystyka fitochemiczna wyciągu z liści melisy lekarskiej użytego do produkcji preparatu Nor-Balm[®] firmy Norfeed[®], wykorzystanego w opisanych badaniach została określona ilościowo za pomocą analizy HPLC-UV (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją w ultrafiolecie), która ujawniła obecność 6 składników z grupy kwasów fenolowych (Tab. 1). Uzupełniająca analiza za pomocą HPLC-MSn (wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas) potwierdziła obecność jeszcze jednego kwasu hydroksycynamonowego, tj. kwasu litospermowego (Tab. 1). Jako główny związek ekstraktu z liści melisy lekarskiej został zidentyfikowany kwas rozmarynowy (54 mg/g), a następnie kwas litospermowy (2,1 mg/g), kwas chlorogenowy (0,79 mg/g) i kwas kawowy (0,68 mg/g). Ok. 60% frakcji fenolowej pozostała niezidentyfikowana, jedynym zidentyfikowanym flawonoidem w tym ekstrakcie jest luteina-3'-glukuronidu, a jej ilość (1,43mg/kg) została uznana za nieistotną z punktu widzenia bezpieczeństwa. Obecność innych substancji aktywnych, takich jak olejki eteryczne czy inne flawonoidy, nie została potwierdzona w tym konkretnym produkcie. (Bampidis i in., 2020). Zgodnie ze specyfikacją, oceniany dodatek zawiera $\geq 10\%$ pochodnych kwasu hydroksycynamonowego (spektrofotometria UV), w tym $\geq 3\%$ kwasu rozmarynowego oznaczonego metodą HPLC (Bampidis i in., 2020).

Tabela 1. Skład preparatu Nor-Balm[®] wg analizy HPLC-UV i HPLC-MSn (źródło: Bampidis i in., 2020)

Nazwa kwasu	Ilość w (mg/g)	% w ekstrakcie z liści melisy lekarskiej
Kwas chlorogenowy	0,79	0,08
Kwas kawowy	0,68	0,07
Kwas p-kumarowy	<0,1	<0,01
Kwas ferulowy	<0,1	<0,01
Kwas m-kumarowy	<0,1	<0,01
Kwas rozmarynowy	54	5,4
Kwas litospermowy	2,1	0,21

Ponadto fitochemiczne analizy wyciągów z melisy lekarskiej wykazały obecność szerokiego spektrum związków bioaktywnych, obejmujących terpeny, związki fenolowe, flawonoidy oraz garbniki (Mencherini i in., 2007, Shakeri i in., 2016). Spośród substancji czynnych szczególną uwagę zwracają składniki lotne, takie jak geranial, neral, cytronellal i geraniol, a także triterpeny: kwas ursolowy i kwas oleanolowy, oraz polifenole – w tym kwas rozmarynowy, pochodne kwasu kawowego, a także luteolina, naryngina i hesperydyna (Argyropoulos i Müller, 2014, Shakeri i in., 2016). Uważa się, że działania terapeutyczne melisy lekarskiej wynikają głównie z obecności olejków eterycznych oraz związków fenolowych, które razem odpowiadają za jej właściwości farmakologiczne (Shakeri i in., 2016).

Tabela 2. Główne substancje czynne ziela melisy lekarskiej oraz ich działanie farmakologiczne

Grupa związków	Przykładowe substancje	Działanie farmakologiczne	Źródła
Polifenole	pochodne kwasu hydroksycynamonowego, kwas kawowy, kwas m-kumarowy, eriodiktio-7-O-glukozyd, kwas rozmarynowy, naringenina, hesperetyna, apigenina, luteolina, kwercetyna, rutozyd	Przeciwutleniające Przeciwzapalne Poprawa stosunku przyrostu masy ciała do spożywanej paszy Poprawa składu mikrobiologicznego jelit Przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, ściągające	Dastmalchi et al., 2008; Carnat i in., 1998; Fiesel, 2014; Kucera i Herrmann, 1967; Lobach i in., 2024; Sentkowska, 2016; Tian, 2021
Terpeny	Citrale, Cytronelal, Limonen, Geraniol, β -kariofilen, Tlenek β -kariofilenu Germakren D	Antybakteryjne antyoksydacyjne Przeciwwirusowe	Mimica-Dukić et al., 2010 Schnitzler et al., 2008

1.3 Właściwości biologiczne wyciągu z melisy lekarskiej oraz jej składników

Biorąc pod uwagę liczne działania biologiczne *Melissa officinalis*, podobnie jak wiele innych roślin leczniczych, oferuje interesującą alternatywę dla klasycznych leków (syntetycznych), zwłaszcza środków przeciwdrobnoustrojowych (Abdel-Naime i in., 2019; Sharifi-Rad i in., 2021). Najważniejsze działania farmakologiczne wyciągu z melisy lekarskiej przedstawiono w Tabeli 3.

Melissa officinalis ma długą historię stosowania w medycynie tradycyjnej w leczeniu zaburzeń przewodu pokarmowego dzięki swoim właściwościom spazmolitycznym (Aubert i in., 2019; Sharifi-Rad i in., 2021) i łagodzącym stres (Pineau i in., 2016; Rafieian-Kopaei i Nasri, 2013). Udokumentowano, że *Melissa officinalis* ma działanie uspokajające, przeciwgorączkowe, przeciwskurczowe, przeciw hipertensyjne, przeciwdziałające rozwojowi choroby Alzheimera i antyseptyczne (Carvalho i in., 2023; Miraj i in., 2017; Shakeri i in., 2016; Sharifi-Rad i in., 2021; Świąder i in., 2019; Zarei i in., 2015). Istotne właściwości przeciwdrobnoustrojowe *Melissa officinalis* są potwierdzone przede wszystkim przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i drożdżakom (Abdel-Naime i in., 2019). Wykazano również, że melisa jest bardzo silnym środkiem przeciwdepresyjnym. Araj-Khodaei i in. (2020) udowodnili, że roślina ma takie samo działanie jak fluoksetyna, która jest popularnym lekiem przeciwdepresyjnym z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny.

Tabela 3. Zestawienie najważniejszych działań farmakologicznych preparatów zawierających wyciąg z melisy lekarskiej

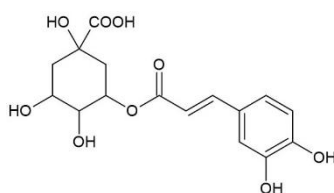
Działanie melisy	Zakres dawek lub stężeń	Formuła	Badany gatunek zwierząt (model badawczy)	Źródło
Spazmolityczne	- 25 i 50 mg/mL. - 25 i 50 mg/mL - 50 mg/mL	hydroetan olowy ekstrakt z liści -	- Mysz – odźwiernik - Mysz – jelito czcze - mysz – jelito kręte	Aubert i in., 2019

Zmniejszenie stresu i lęku, zmniejszenie częstości akcji serca, znaczne obniżenie średniego ciśnienia tętniczego	Inhalacja dwóch kropli przez 10 min	olejek eteryczny	Ludzie, badanie kliniczne	Veiskaramian i in., 2021
Działanie przeciw lękowe	30, 100, 300 mg/kg	ekstrakt	szczury	Ferreira i in., 2012
Przeciwdepresyjne	75 i 150 mg kg ⁻¹	ekstrakt z liści	myszy	Ghazizadeh i in., 2020
Przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i drożdży,	MIC 0,3-28,8 µg/mL w zależności od bakterii/grzyba	ekstrakt etanolowy	model <i>in vitro</i> oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodą oznaczania MIC	Abdel-Naime i in., 2019
Poprawa u chorych na demencję	Aplikacja na skórę Twarzy i ramion 2xdziennie	olejek eteryczny	Osoby z demencją	Ballard i in., 2002
Działanie cytoprotekcyjne	100-500 µg/ml	hydroetanolowego ekstraktu	komórki śródbłonna żyły pępowinowego człowieka	Safaeian i in., 2016
Działanie przeciwzapalne	200 oraz 400 mg/kg	olejek eteryczny	szczury	Bounihi i in., 2013
Poprawa koncentracji	600 mg ekstraktu z liści	ekstrakt z liści	Człowiek	Kennedy i in., 2003
Poprawa zdolności poznawczych	60 kropli	ekstrakt z liści	pacjenci z chorobą Alzheimera	Akhondzadeh, 2003

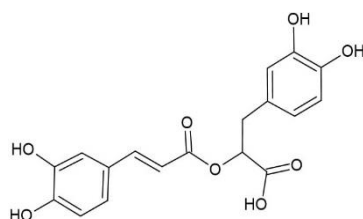
W kontekście potencjalnego zastosowania u zwierząt, warto podkreślić, że jako bardzo smaczne zioło dla wielu gatunków zwierząt, melisa lekarska może prowadzić do zwiększonego spożycia paszy i tym samym składników odżywczych (Windisch i in., 2008). Bezpieczeństwo komercyjnego suszonego wodnego ekstraktu etanolowego z liści *Melissa officinalis* L. (Nor-Balm[®]) jako dodatku do paszy zostało potwierdzone dla wszystkich gatunków zwierząt (Bampidis, 2020).

1.4 Charakterystyka kwasów fenolowych zawartych w wyciągu z liści melisy lekarskiej

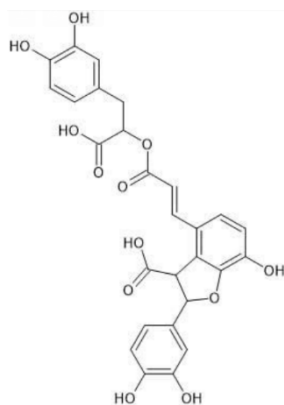
Kwasy fenolowe to grupa organicznych związków chemicznych, do której należą związki zawierające pierścień fenolowy i resztę kwasu karboksylowego (H. Al Mamari, H., 2022) (Ryc. 2-4). Zaliczane są do grupy polifenoli. Są związkami pochodzenia naturalnego, pozyskuje się je w większości z owoców oraz z niektórych innych części roślin. Często są odpowiedzialne za kwaśny i gorzki smak produktów roślinnych. Są wtórnymi metabolitami syntetyzowanymi głównie w szlaku szikimowym z fenyloalaniny lub tyrozyny. W roślinach pełnią kluczowe funkcje ochronne – działają przeciwutleniająco, przeciwdrobnoustrojowo, chronią przed promieniowaniem UV oraz uczestniczą w tworzeniu ligniny i odpowiedzi roślin na stres (Kumar i in., 2020, Chalker-Scott i Fuchigami; 2018). Dzięki tym właściwościom są istotne zarówno dla fizjologii roślin, jak i w kontekście ich zastosowań farmakologicznych (Kumar i Goel, 2019).



Rycina 2 Wzór chemiczny kwasu chlorogenowego



Rycina 3 Wzór chemiczny kwasu rozmarynowego



Rycina 4 Wzór chemiczny kwasu litospermowego

Kwasy rozmarynowy, litospermowy i chlorogenowy to przykłady kwasów fenolowych występujące w różnych roślinach, w tym w melisie lekarskiej (Hajimehdipoor, 2012; Yoo i in., 2014). Wszystkie z nich mogą wychwytywać wolne rodniki i redukować stres oksydacyjny, co może pomóc chronić komórki i tkanki przed uszkodzeniem (Cobellis i in., 2015, Naveed i in., 2018). Kwas chlorogenowy wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko różnym patogenom. Może być np. wykorzystany do zapobiegania lub kontrolowania zakażeń *Staphylococcus aureus* (Li i in., 2013). Według badań prowadzonych przez Xie i in. (2023), kwas chlorogenowy ma korzystny wpływ na parametry jakości tuszy, poprawia wartość odżywczą i smak wieprzowiny. Inne badania sugerują, że suplementacja diety kwasem chlorogenowym ma potencjał poprawy wydajności wzrostu i zmniejszenia częstości występowania biegunki u odsadzonych prosiąt, prawdopodobnie poprzez poprawę zdolności antyoksydacyjnych i poprawę funkcji trawienia i wchłaniania jelitowego (Chen i in., 2018). Stwierdzono, że kwas litospermowy ma działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające. Badano go również pod kątem działania hepatoprotekcyjnego (Chan i Ho, 2015). Zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* wykazano, że kwas litospermowy znacząco zmniejsza zakres uszkodzenia wątroby wywołanego przez CCl₄ poprzez usuwanie wolnych rodników i zwiększanie ilości endogennych przeciwutleniaczy w sposób zależny od dawki (Chan i Ho, 2015). Ponadto kwas litospermowy znacząco osłabił poziom martwiczego uszkodzenia wątroby dzięki hamowaniu aktywności apoptotycznej. (Chan i Ho, 2015). Ekstrakt z rozmarynu jako dodatek dietetyczny u owiec mlecznych poprawiał wydajność mleka, jakość i właściwości podpuszczkowe (Chiofalo i in., 2010). U świń kwas rozmarynowy zwiększał bogactwo i różnorodność biofilmu w okrężnicy oraz zwiększał odkładanie się tłuszczu w

mięśniach poprzez regulację metabolizmu lipidów (Zhang i in., 2023). U szczurów z rakiem jelita grubego kwas rozmarynowy w stężeniu 5 mg/kg masy ciała zaburzał powstawanie i rozwój guzów nowotworowych, a także zmniejszał ekspresję białek proapoptycznych (Venkatachalam i in., 2016). Podobnie u ludzi wykazano przeciwnowotworowe działanie kwasu rozmarynowego poprzez zwiększenie chemiowrażliwości komórek raka żołądka SGC7901 (Yu i in., 2019). Podawanie kwasu rozmarynowego (10 mg/kg, dziennie) szczurom w przewlekłym stresie zmniejszyło zachowania depresyjne u szczurów (Jin, 2013). Wszystkie wskazane wyniki wskazują, że kwasy fenolowe mają pozytywny wpływ na organizmy zwierząt i powinny być dalej badane, aby można było optymalizować ich stosowanie i efektywność.

1.5 Zastosowanie etnofarmakologiczne i etnoweterynaryjne melisy lekarskiej oraz uregulowania prawne dotyczące zastosowań melisy lekarskiej

Europejska Agencja ds. Leków (EMA) uznaje melisę lekarską za tradycyjny produkt leczniczy stosowany w celu znoszenia łagodnych objawów stresu, ułatwiający zasypianie, a także do objawowego leczenia łagodnych dolegliwości żołądkowo-jelitowych, w tym wzdęć. Według EMA preparaty z melisy mogą być wykorzystywane w formie: rozdrobnionej rośliny, sproszkowanej rośliny, płynnego wyciągu, nalewki lub suchego ekstraktu wodnego/etanolowego (EMA, 2013).

Pierwsze doniesienia dotyczące leczniczego zastosowania *M. officinalis* pochodzą sprzed ponad 2000 lat i znajdują się w „Historii Plantarum” (ok. 300 r. p.n.e.) i „Materia Medica” (ok. 50–80 r. p.n.e.) (Sharifi-Rad, 2021). Roślina jest znana od czasów starożytnej Grecji i była stosowana w medycynie ludowej różnych krajów, w tym Portugalii, Niemczech, a także Kubie. (Brendler i in., 2005). Aromatyczne zioła bogate w olejki eteryczne takie jak melisa lekarska (*Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*), a także rumianek (*Matricaria chamomilla* L., *Asteraceae*), bazylia słodka (*Ocimum basilicum* L., *Lamiaceae*) i krwawnik pospolity (*Achillea millefolium* L., *Asteraceae*) mają działanie przeciwdrobnoustrojowe, dlatego w medycynie etnoweterynaryjnej są stosowane jako naturalne środki dezynfekujące i antyseptyczne (Davidović i in., 2011). Na terenie Słowenii melisa lekarska wraz z innymi ziołami była tradycyjnie wykorzystywana do produkcji likieru używanego w celach odżywczych oraz w leczeniu problemów trawiennych i bólów brzucha u ludzi (Lumpert i Kreft, 2017).

Podobnie jak w medycynie, istnieją również silne dowody na etnoweterynaryjne zastosowanie melisy lekarskiej (Lans i in., 2007). Liście z melisy były stosowane

w Kolumbii Brytyjskiej u koni, kóz, krów, owiec i psów z problemami gastrycznymi takimi jak zapalenie żołądka i jelit lub niestrawność. W przypadku psów stosowano 28,35g ziela melisy zagotowanego w szklanym garnku z 250ml wody, a następnie zaparzonego przez 10–15 min (stosowana dawka to 59,15ml/9-11kg masy ciała, doustnie przez 2 dni) (Lans i in., 2007). W Maroku Rifenowie (ludność zamieszkująca góry Rif) wykorzystywali melisę lekarską podając ją owcom w celu zwalczania inwazji endo- i ektopasożytniczych (Chaachouay i in., 2022).

1.6 Choroby zwierząt przebiegające z zaburzeniami czynnościowymi przewodu pokarmowego

Zaburzenia żołądkowo-jelitowe mogą stanowić poważne zagrożenie zarówno dla dobrostanu zwierząt, jak i powodować straty ekonomiczne w hodowli zwierząt. Ponadto zaburzenia wpływające na motorykę są ważne dla skuteczności i wydajności trawienia i wchłaniania składników odżywczych, a także dla homeostazy mikrobiomu jelitowego (Ferket, 2011; Lee i in., 2013; Sensoy, 2021). Nasilenie aktywności spontanicznej mięśni gładkich przewodu pokarmowego powoduje przyspieszenie perystaltyki jelit, co jest przyczyną osłabienia wchłaniania substancji odżywczych oraz nierzadko biegunek, co w dłuższej perspektywie prowadzi do spadków przyrostów, wyniszczenia, a nawet śmierci. Z drugiej strony, obniżenie aktywności spontanicznej mięśni gładkich przewodu pokarmowego prowadzi do zaparć, które powodują spadek apetytu i ogólnego samopoczucia, a to z kolei może prowadzić do dalszych, poważnych konsekwencji zdrowotnych i produkcyjnych. U drobiu wiele czynników zakaźnych, głównie *Salmonella enterica* (Ding i in., 2021), ale także pasożytów: kokcydia, nicienie lub glisty bezpośrednio wpływają na pasaż jelitowy (Bindari i Gerber, 2022; Hoerr i in., 1986; Jeni i in., 2021; McDougald Larry, 1998). Jedną z najczęstszych chorób przewodu pokarmowego owiec jest zakażenie wywołane przez bakterie *Clostridium perfringens*, które może pojawić się wtórnie do osłabionej perystaltyki jelit. U osobników chorujących dominującymi objawami są przede wszystkim biegunka, która związana jest m. in. z nadmierną perystaltyką jelit (Mohammadabadi, 2017; Schefer i in., 2021). W przypadku intensywnej hodowli trzody chlewnej jednym z najpoważniejszych zagrożeń jest biegunka poodsadzeniowa. Jest ona związana z nadmiernym rozwojem enterotoksycznej *Escherichia coli* w jelicie świń. Młode zwierzęta w okresie poodsadzeniowym są dużo wrażliwsze na odwodnienie, przez co nawet krótki okres lub małe nasilenie biegunek może mieć dla nich śmiertelne skutki (Fairbrother i in., 2005). Spożywanie siary, a

następnie mleka po urodzeniu, dostarcza prosiętom składników odżywczych i związków chemicznych, które są niezwykle ważne jako bodźce i substraty dla przewodu pokarmowego. Jednak podczas odsadzania połączony wpływ różnych czynników stresogennych powoduje przerwę we wzroście i rozwoju przewodu pokarmowego, przez co nowo odsadzone prosię doświadcza zahamowania wzrostu, narażając się jednocześnie na większe ryzyko rozwoju wtórnych chorób. Głównym skutkiem procesu odsadzania jest niskie i zmienne spożycie paszy, niemniej jednak istnieje wiele interwencji żywieniowych i zarządczych (Pluske, 2016), które mogą łagodzić negatywne konsekwencje tego okresu. Należą do nich m.in. stosowanie wysoko strawnych i smakowitych składników paszowych oraz dodatków funkcjonalnych. Zaburzenia motoryki mięśni gładkich są często przewlekłe i wymagają długotrwałego leczenia przyczynowego i objawowego. Są one jednocześnie przyczyną i skutkiem różnego rodzaju chorób. Dlatego też substancje o wysokiej skuteczności i bezpieczeństwie, a także bez okresu karencji są przedmiotem zainteresowania wielu badaczy roślin jako potencjalnych źródeł leków i dodatków paszowych modulujących kurczliwość mięśni gładkich i perystaltykę.

Tab. 4. Główne patogeny i pasożyty wywołujące infekcje/inwazje przewodu pokarmowego u kur, owiec i świń

Gatunek zwierzęcia	Patogen/pasożyt	Choroba/zaburzenia	Źródło
Kura	<i>Ascaridia galli</i> (nicienie)	Askarioza – zaburzenia trawienia, spadek masy ciała, biegunki	Ruhnke i in., 2017
	<i>Eimeria</i> spp. (kokcydia)	Kokcydioza – biegunki, krwawienia jelitowe, śmiertelność	Muñoz i in., 2024
	<i>Salmonella enterica</i>	Salmonelloza – biegunki, spadek produkcji jaj, zakażenia ogólnoustrojowe	Eigaard i in., 2006
	<i>Histomonas meleagridis</i> (Czarna Główka)	Nastroszone pióra, opadające skrzydła, senność, utrata masy ciała, pienista biegunka o barwie siarki, często też chorują bezobjawowo	Hess i in. 2015

Owce	<i>Clostridium perfringens</i> typ C i D	Enterotoksemia – krwotoczne zapalenie jelit, wysoka śmiertelność u młodych jagniąt	Uzał i in., 2008
	<i>Hemonchoza</i> (nicień <i>Haemonchus contortus</i>)	Twardy ciemny kał względu na krew utajoną, anemia, eozynofilia, hipoproteinemia, bladość błon śluzowych, obrzęk podżuchwowy	Adduci i in., 2022
	<i>Strongyloides spp.</i>	Biegunka, niedożywienie, zwłaszcza u młodych zwierząt	Thamsborg i in., 2016
	<i>Eimeria spp.</i> (kokcydioza)	Kokcydioza – biegunki, krwawienia jelitowe	Sodi i in., 2023
Świnie	<i>Escherichia coli</i>	Biegunka poodsadzeniowa – biegunki, odwodnienie, spadek przyrostów masy ciała	Rhouma i in., 2017
	<i>Dyzenteria świń</i> (czerwonka) <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Śluzowo-krwotoczna biegunka, zmniejszone tempo wzrostu	Mahu i in., 2016
	<i>Strongyloides spp</i>	Głównie w okresie noworodkowym do 2. tygodnia życia, anoreksja, anemia, biegunka, zahamowanie wzrostu, utratę masy ciała, a w niektórych przypadkach nagła śmierć	Pinilla i in., 2020; Thamsborg i in., 2016;
	Mikrosporydioza (<i>Enterocytozoon bieneusi</i>)	Biegunka	Jeong i in., 2007
	<i>Cystoisospora suis</i> ,	Bezkrwawa biegunka, słabe przyrosty masy ciała	Pinilla i in., 2020; Shrestha i in., 2015

1.7 Potencjalne wykorzystanie melisy w zapobieganiu i leczeniu chorób zwierząt

Pomimo wprowadzania nowych rozwiązań w rolnictwie i produkcji zwierzęcej, wciąż nierozwiązane pozostają liczne problemy hodowlane oraz pojawiają się nowe wyzwania, takie jak zmiany klimatyczne, oporność na antybiotyki, pozostałości antybiotyków w żywności oraz choroby, w tym biegunki u młodych zwierząt (Luppi i in., 2023). W intensywnym systemie produkcji większość problemów zdrowotnych jest złożona i zależy od wielu czynników, m.in. dużego zagęszczenia zwierząt na małym obszarze, stresu cieplnego, zanieczyszczenia pasz mykotoksynami, obecności bakterii chorobotwórczych i/lub pasożytów oraz inne sytuacje prowadzące do zwiększonego poziomu stresu u zwierząt. Dodatkowo, obecnie obserwowane są nowe trendy, a wymagania żywieniowe ewoluują. Zrównoważona produkcja białka zwierzęcego staje się kluczową kwestią zapewnienia zdrowej diety oraz zaspokojenia rosnącego zapotrzebowania na wysokiej jakości produkty. Przewiduje się, że globalne zapotrzebowanie na mięso wzrośnie o 35% do 2050 roku (Godfray i in., 2018). Wybór gatunków zwierząt hodowlanych przeznaczonych na mięso jest uzależniony od warunków środowiskowych, klimatu oraz preferencji kulturowych głęboko zakorzenionych w społeczeństwach (Newton i Blaustein-Rejto, 2021).

Produkcja trzody chlewnej jest jednym z najważniejszych sektorów hodowlanych na świecie. Wieprzowina stanowi ponad jedną czwartą całkowitego spożycia białka na świecie oraz ok. 35% całkowitej produkcji mięsa (Govoni i in., 2022). Hodowla owiec jest rosnącym sektorem produkcji nie tylko ze względu na wełnę, ale również na mięso (Theodoridis i in., 2021). Jest to tradycyjna gałąź hodowli zwierząt o istotnym znaczeniu ekonomicznym, społecznym, kulturowym i środowiskowym, szczególnie dla ekonomicznie wrażliwych regionów Europy. Hodowla owiec zapewnia dochody i miejsca pracy na obszarach górskich i marginalnych, gdzie gospodarka wiejska jest słabo zróżnicowana (Pulina i in., 2018).

Spożycie mięsa drobiowego i jaj wzrosło w ciągu ostatnich kilku dekad i oczekuje się, że będzie nadal rosnąć. Według analiz rynkowych z 2023 roku Polskiego Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi Polska od 2014 r. jest największym producentem mięsa drobiowego w Unii Europejskiej, gdzie mięso kurcząt stanowi 81,6%, indyków 15,3%, a drobiu wodnego 3,2%. Szacuje się, że w 2023 r. produkcja mięsa drobiowego w Polsce wyniosła ponad 3,1 mln ton, co stanowi wzrost o 2,0% w porównaniu z rokiem 2022. Wysokie zagęszczenie obsady oznacza wyższe ryzyko infekcji, co wtórnie przyczynia się do problemów zdrowotnych brojlerów, a poszukiwanie nowych rozwiązań i protokołów

terapeutycznych dla chorób istotnych ekonomicznie wzbudza coraz większe zainteresowanie. Problemy żywieniowe i trawienne odgrywają główną rolę w hodowli drobiu, powodując zwiększoną zachorowalność, śmiertelność i zmniejszoną produktywność (Nighot i Nighot, 2018).

W kontekście zdrowia jelit prowadzi to do błędnego koła, które jest kombinacją obniżonej odporności i zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej (Martel i in., 2022). Skutkuje to wyciekiem składników odżywczych oraz sprzyja rozwojowi patogenów i ich przenikaniu przez barierę jelitową. Złożoność problemu sprawia, że nie istnieje jedno rozwiązanie mogące przerwać to błędne koło.

Zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dodatek paszowy to substancja, mikroorganizm lub preparat, który dodaje się do paszy lub wody w celu wpływania korzystnie na właściwości paszy, wyniki produkcyjne zwierząt, barwienie produktów pochodzenia zwierzęcego itp. Dodatki paszowe zaszeregowane są do następujących kategorii (wg Rozporządzenia 1831/2003/WE):

1. Dodatki technologiczne – np. konserwanty, przeciwutleniacze, emulgatory
2. Dodatki sensoryczne – np. aromaty, barwniki
3. Dodatki odżywcze – np. witaminy, minerały, aminokwasy
4. Dodatki zootechniczne – np. probiotyki, enzymy poprawiające strawność
5. Kokcydiostaty i histomonostaty

Zioła i ekstrakty roślinne zaliczane do dodatków sensorycznych lub zootechnicznych (w zależności od funkcji), aby mogły być legalnie stosowane jako dodatki paszowe, muszą być zgłoszone do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz zatwierdzone i wpisane do unijnego rejestru dodatków paszowych.

Melisa lekarska (*Melissa officinalis*) została zgłoszona do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności w kontekście jej stosowania jako dodatku paszowego. EFSA wydała kilka opinii naukowych na temat bezpieczeństwa i skuteczności ekstraktów z melisy lekarskiej stosowanych jako dodatki sensoryczne w paszach dla zwierząt. Urząd ocenił bezpieczeństwo i skuteczność suchego ekstraktu wodno-etanolowego z liści melisy lekarskiej, zawierającego $\geq 10\%$ pochodnych kwasu hydroksycynamonowego, w tym $\geq 3\%$ kwasu rozmarynowego i stwierdził, że dodatek ten jest bezpieczny dla wszystkich gatunków zwierząt przy maksymalnym proponowanym poziomie 100 mg/kg pełnoporcjowej paszy (Bampidis i in., 2020).

Dzięki swoim wielokierunkowym właściwościom, produkty roślinne jako dodatki paszowe stanowią obiecującą alternatywę w poprawie zdrowia zwierząt. Ulepszenie technik hodowlanych i procedur zarządzania jest konieczne z wielu powodów, obejmujących zrównoważony rozwój środowiskowy, efektywność ekonomiczną, dobrostan zwierząt oraz ogólne bezpieczeństwo żywnościowe (Govoni i in., 2022; De Paula Vieira i Anthony, 2020). Aby sprostać wymaganiom rynku, hodowla zwierząt musi być wydajna, stosunkowo tania i opłacalna, ale jednocześnie dostarczać produkty bezpieczne, ekologiczne (obecnie jest to częsta preferencja konsumentów) i wysokiej jakości. Wraz z zakazem stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w Unii Europejskiej pojawiły się problemy, które wcześniej były eliminowane dzięki stosowaniu tych chemioterapeutyków. Dodatkowo zgodnie z decyzją Komisji Europejskiej z maja 2020 r., stosowanie antybiotyków w Unii Europejskiej ma zostać znacznie ograniczone do 2030 roku (Amicarelli, 2020; Penker, 2024). Jednak wzrost wskaźników zakażeń może prowadzić do zwiększenia terapeutycznego stosowania antybiotyków, co jest sprzeczne z wysiłkami na rzecz redukcji stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych u zwierząt. Analiza bieżącej sytuacji wskazuje, że istnieje pilna potrzeba znalezienia alternatywnych metod poprawy zdrowia zwierząt, a tym samym ograniczenia stosowania antybiotyków. Niniejsze badania są badaniami wstępnymi, które w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania naturalnych leków i suplementów wspierających zdrowie zwierząt oraz kontrolujących objawy kliniczne w przypadku chorób przebiegających z zaburzeniami motoryki przewodu pokarmowego.

1.8 Możliwości wykorzystania badań *in vitro* i *ex vivo* w celu identyfikacji nowych leków i dodatków paszowych

Opracowanie nowego produktu leczniczego to długi i kosztowny proces, w szczególności ze względu na wymogi regulacyjne dotyczące jakości, bezpieczeństwa i skuteczności. Istnieje wspólny interes w zwiększeniu efektywności opracowywania leków i dostarczaniu społeczeństwu nowych, lepszej jakości produktów leczniczych znacznie szybciej. Jednym z możliwych sposobów na redukcję czasu i kosztów, a także uwzględnienie kwestii ochrony zwierząt, jest wprowadzenie nowych alternatywnych metod do pozaklinicznych, głównie przedklinicznych badań (Ukelis i in., 2008). Badania motoryki jelit zwierząt *in vivo* są trudne technicznie do przeprowadzenia szczególnie w przypadku małych zwierząt, ciężkie do interpretacji ze względu na wpływ ruchów mięśni szkieletowych, poziomu stresu i innych czynników zewnętrznych, a także napotyka

wiele problemów etycznych. Przyjmuje się, że testy na zwierzętach powinny być ograniczone, udoskonalone lub zastąpione, o ile jest to możliwe. Modele *in vitro* oraz *ex vivo* stanowią cenną alternatywę do klasycznych badań na zwierzętach i mogą być wykorzystywane w badaniach przesiewowych (Anadón i in., 2014), również dla testowania wpływu różnych substancji na motorykę przewodu pokarmowego (Mendel i in., 2016a). Izolowane od zwierząt laboratoryjnych wycinki przewodu pokarmowego od dekad są używane do oceny wpływu ksenobiotyków na motorykę ze względu na dobrze poznany model, łatwość w hodowli, stosunkowo niskie koszty oraz krótkie cykle reprodukcyjne (Daniel, i in., 2001, Low, 2012). Małe ssaki często wymagają większych dawek leków, podawanych częściej niż w przypadku dużych ssaków. Możliwa jest również sytuacja odwrotna, dlatego niektóre małe ssaki laboratoryjne (takie jak myszy i szczury) mogą okazać się niewłaściwym modelem w niektórych badaniach toksykologicznych czy farmakologicznych (Mordenti, 1986).

Zastosowanie modeli opartych na tkankach różnych gatunków zwierząt, o zróżnicowanej anatomii i fizjologii, pozwala zminimalizować ryzyko błędu ekstrapolacji wyników do gatunków docelowych. Modele dużych zwierząt oferują szereg korzyści translacyjnych. W szczególności świnia jest prawdopodobnie jednym z najprzydatniejszych modeli układów i narządów człowieka, w tym przewodu pokarmowego (Patterson i in., 2008; Ziegler i in., 2016). Cielęta stanowią uznany model eksperymentalny w badaniach nad zakaźnymi chorobami przewodu pokarmowego człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem salmonellozy. Są one szeroko wykorzystywane w eksperymentach dotyczących zakażeń wywołanych przez bakterie z rodzaju *Salmonella* oraz w analizach mechanizmów interakcji żywicieli–patogen. Wyniki uzyskiwane w tych modelach mają istotne znaczenie translacyjne, umożliwiając przeniesienie wniosków zarówno na grunt medycyny człowieka, jak i medycyny weterynaryjnej oraz praktyk hodowlanych w rolnictwie. (Elfenbein i in. 2013). Pomimo licznych zalet modeli dużych zwierząt, kilka kluczowych ograniczeń utrudnia ich powszechne wykorzystanie. Najpoważniejszym ograniczeniem tych modeli są wysokie koszty utrzymania i hodowli zwierząt. Gatunki dużych zwierząt, takich jak owce, świnie, bydło czy konie wymagają większych, bardziej wyspecjalizowanych pomieszczeń i sprzętu, co wiąże się z wyższymi wydatkami na paszę, opiekę weterynaryjną i zabiegi chirurgiczne. Ponadto, dłuższe cykle reprodukcyjne i wolniejsze tempo wzrostu sprawiają, że praca na dużych zwierzętach jest wolniejsza i droższa (Ziegler i in., 2016). Nowszym pomysłem jest wykorzystanie tkanek zwierząt poddawanych rutynowemu ubojowi, np. krów (Mendel i in., 2015), świń (Posłuszny i in.,

2025a, Szadkowska i in., 2023), broilerów kurzych (Połuszný i in., 2023) czy owiec (Połuszný i in., 2025b). Powoduje to, że badania nie generują dodatkowych kosztów związanych z hodowlą zwierząt, a także jest to zgodne z zasadą 3R (zastąpienie (Replacement), ograniczenie (Reduction) i doskonalenie (Refinement) metod badawczych z użyciem zwierząt w celu minimalizacji ich cierpienia i ograniczenia liczby wykorzystywanych zwierząt (Törnqvist i in., 2014)) – żadne zwierzę nie jest uśmiercane wyłącznie do celów badawczych. W przypadku wycinków z przewodu pokarmowego wykorzystywane są tkanki, które w rzeźniach w większości są utylizowane.

2. Cele i hipotezy badawcze

2.1 Cele

1. Określenie charakteru oddziaływania standaryzowanego wyciągu z liści melisy lekarskiej (*Melissa officinalis*) oraz głównych substancji czynnych tej rośliny na kurczliwość mięśniówki gładkiej różnych wycinków przewodu pokarmowego wybranych gatunków zwierząt (świnia, kura, owca)
2. Próba określenia mechanizmu działania kwasu rozmarynowego na jelito czcze brojlera kurzego (część dystalna i proksymalna).
3. Potwierdzenie przydatności alternatywnego modelu *ex vivo* opartego na wykorzystaniu tkanek zwierząt rzeźnych do badań oceniających wpływ ksenobiotyków na motorykę przewodu pokarmowego

2.2 Hipotezy badawcze

1. Melisa lekarska i kwasy fenolowe mogą być stosowane u zwierząt, u których wystąpi biegunka w celu wyeliminowania bolesnych skurczów jelit, a także spowolnienia perystaltyki (hamowania biegunki) w przypadku potwierdzenia działania antyspazmotycznego i miorelaksacyjnego badanych związków.
2. Melisa lekarska i kwasy fenolowe mogą być stosowane do zwalczania atonii jelit u świń, owiec i brojlerów kurzych w przypadku potwierdzenia działania prokinetycznego badanych związków.
3. Kwas rozmarynowy zmienia aktywność motoryczną mięśniówki gładkiej jelit brojlerów kurzych poprzez oddziaływanie na receptory muskarynowe i/lub mobilizację wapnia pozakomórkowego.
4. Badania *ex vivo* przeprowadzane z poszanowaniem zasad 3R stanowią wiarygodną alternatywę do badań na zwierzętach, pozwalają ograniczyć testy na żywych zwierzętach oraz dostarczają wiarygodnych danych odnośnie oddziaływania ksenobiotyków na tkanki zwierząt, w tym przypadku kurczliwość tkanek przewodu pokarmowego.
5. Otrzymane wyniki mogą posłużyć ostrożnej i wstępnej ekstrapolacji do innych gatunków zwierząt, odpowiednio wyniki uzyskane na modelu owcy do innych przeżuwaczy, świni do gatunków wszystkożernych, a broilery kurze do innych ptaków.

3. Materiały i metody

3.1 Materiały

3.1.1 Medium inkubacyjne i odczynniki

Jako medium inkubacyjne zastosowano modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita (M K-HS) o składzie 123.76 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.156 mM MgSO₄, 14.5 mM NaHCO₃, 2.75 mM KH₂PO₄ oraz 12.5 mM glukozy. pH M K-HS utrzymywano na poziomie 7,35 do 7,45, przez cały eksperyment dodawany był karbogen (95% O₂/5% CO₂). Temperaturę utrzymywano na poziomie 38°C.

W doświadczeniach oceniających mechanizm działania kwasu rozmarynowego dodatkowo wykorzystano bufor bez jonów wapnia (M K-HS bez wapnia) o składzie: 123.76 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.156 mM MgSO₄, 14.5 mM NaHCO₃, 2.75 mM KH₂PO₄ oraz 12.5 mM glukozy.

3.1.2 Substancje badane

Wyciąg z liści melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.) (Nor-balm[®]) został wyprodukowany i standaryzowany na zawartość kwasu rozmarynowego (EFSA i in., 2020) przez firmę Nor-Feed. Szczegóły dotyczące produkcji ekstraktu zostały opisane w załączonym artykule „Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis* — *ex vivo* study” autorstwa Połuszný i in., 2023.

Głównymi substancjami czynnymi melisy lekarskiej z grupy kwasów fenolowych są kwas rozmarynowy (RA) (Sigma-Aldrich, Bratysława, Słowacja), kwas chlorogenowy (ChA) (Sigma-Aldrich, Chengdu, Chiny) i kwas litospermowy (LA) (PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy) (Carocho i in., 2015; EFSA i in., 2020). Ekstrakt testowano w zakresie stężeń: od 0,1 µg/ml do 0,1 mg/ml, natomiast składniki aktywne oceniano w zakresie stężeń od 0,001 do 100 µM. Jako substancje referencyjne o działaniu skurczowym i rozkurczowym użyto odpowiednio acetylocholiny (ACh, 10 µM) i izoproterenol (Isop, 1 µM) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Niemcy).

Do badania mechanizmu działania RA zostały użyte następujące blokery: atropina jako nieselektywny antagonist receptorów muskarynowych w stężeniu 1 µM; pirenzepina jako selektywny bloker receptorów muskarynowych M₁ (30 nM) oraz 4-DAMP jako selektywny antagonist receptorów muskarynowych M₃ (10 nM).

3.1.3 Materiał zwierzęcy

Wycinki jelit pobierano od rutynowo poddawanych ubojowi zwierząt w rzeźniach (Rzeźnia miejska GS Samopomoc Chłopska, Mszczonów (świnie); Super drób, Karczew (broiler kurzy), Meat-farm, Stefanowo (Owce). Wszystkie osobniki przeszły pozytywnie badanie przed- i poubojowe prowadzone przez urzędowego lekarza weterynarii. W doświadczeniu wykorzystano tkanki brojlerów rasy Ross (*Gallus domesticus*), wieku od 35 do 45 dni w momencie uboju, owiec rasy Uhruskiej w wieku 5 miesięcy oraz świń o zróżnicowanym wieku i rasie.

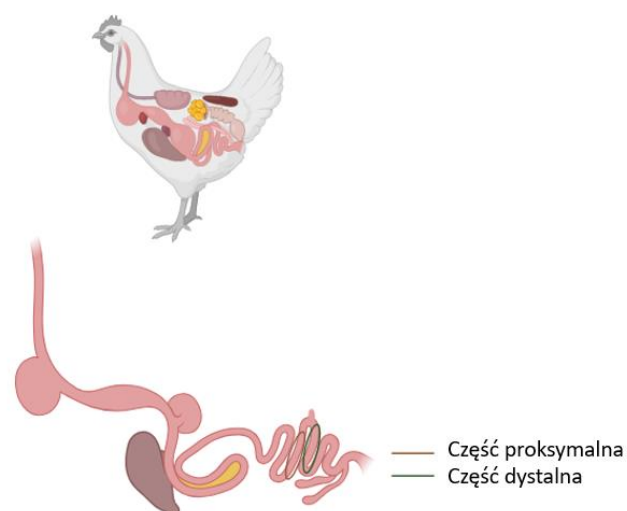
3.2. Metody

3.2.1 Pobieranie i przygotowanie izolowanych wycinków jelit

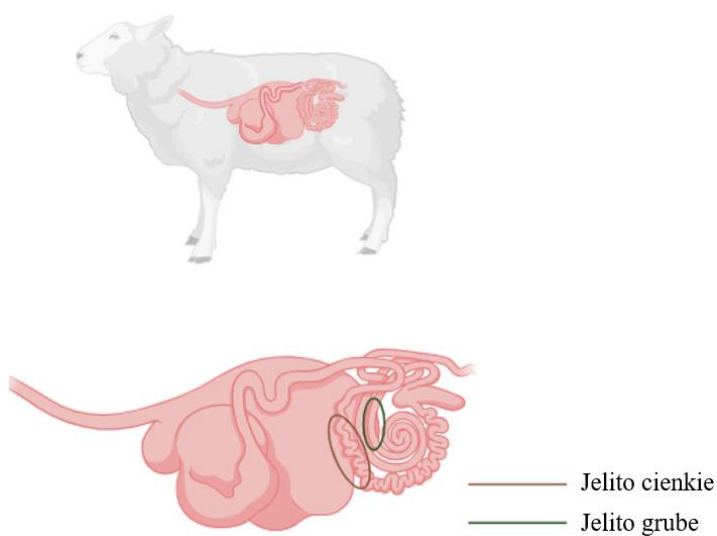
Próbki pobierano od zwierząt rzeźnych, w czasie możliwie najkrótszym od skrwawienia i otwarcia jamy brzusznej lub otrzewnowej.

W przypadku brojlerów kurzych pobierano ok 5 cm wycinek jelita czczego w części proksymalnej i takiej samej długości odcinek w części dystalnej. Za punkt graniczny pomiędzy obiema częściami jelita czczego uznano uchyłek Meckela (Ryc. 5) (Pośluszny i in., 2023) W przypadku owiec pobierano ok 10 cm wycinek z początkowej części jelita czczego oraz takiej samej długości odcinek proksymalnej części okrężnicy spiralnej. (Ryc. 6) (Pośluszny i in. 2025b). Natomiast w przypadku trzody chlewnej pobierano ok 10 cm wycinek jelita czczego za dwunastnicą, tak aby nie miały kontaktu z trzustką i takiej samej długości odcinek jelita grubego za jelim ślepym (Ryc. 7) (Pośluszny i in. 2025a).

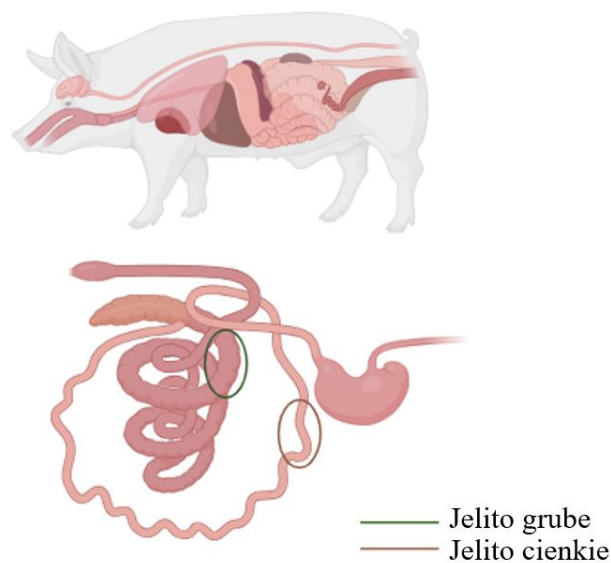
Bezpośrednio po pobraniu, jelita przepłukiwano zimnym roztworem fizjologicznym (0-4°C) w celu usunięcia zawartości przewodu pokarmowego i umieszczano w zimnym M K-HS (0-4°C). Tkanki przechowywano w warunkach chłodniczych do czasu preparacji wycinków w laboratorium, maksymalnie godzinę od uboju (czas transportu). W laboratorium każdy kawałek jelita był rozcinany wzdłuż osi długiej, następnie segmenty o długości ok. 5 × 20 mm wycinano równolegle do podłużnych lub okrężnych włókien mięśni gładkich (w zależności od tego która warstwa jelit była badana). Do eksperymentów użyto wyłącznie tkanki bez widocznych zmian patologicznych na błonie śluzowej i surowiczej.



Rycina 5 Poglądowy schemat układu pokarmowego broilera kurzego z zaznaczonymi odcinkami jelit z których były pobierane wycinki do badań. Schemat wykonano przy pomocy programu <https://BioRender.com>



Rycina 6 Poglądowy schemat układu pokarmowego owcy z zaznaczonymi odcinkami jelit z których były pobierane wycinki do badań. Schemat wykonano przy pomocy programu <https://BioRender.com>



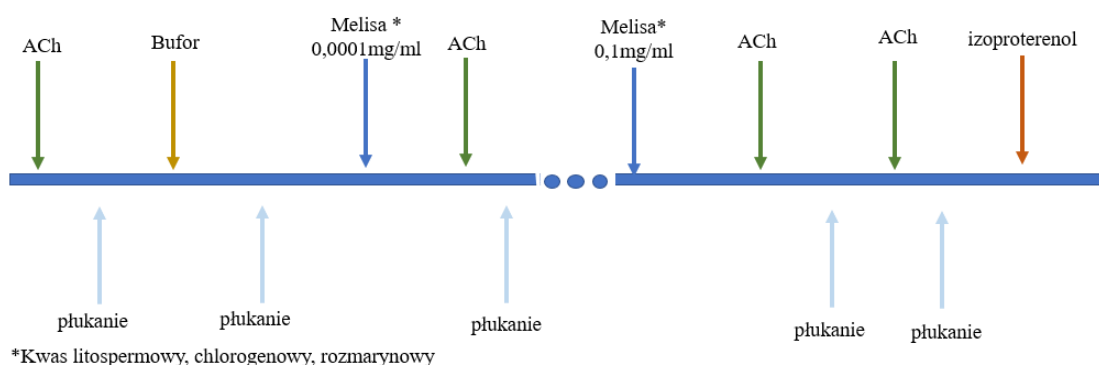
Rycina 7 Poglądowy schemat układu pokarmowego świni z zaznaczonymi odcinkami jelit z których były pobierane wycinki do badań. Schemat wykonano przy pomocy programu <https://BioRender.com>

3.2.2 Schemat doświadczeń

W celu umożliwienia tkankom adaptacji warunków *in vitro* we wszystkich doświadczeniach wycinki jelit były poddawane preinkubacji przez 45 min w M K-HS z dodatkiem karbogenu, w temperaturze 38 °C. Dodatkowo, aby zapewnić tkankom wystarczającą ilość składników odżywczych, medium w komorach inkubacyjnych było wymieniane na świeży M K-HS co 10-15 min. Po 45 min preinkubacji tkanki poddawano dodatkowemu napięciu (0.01 N, w dwóch etapach) odpowiadającemu rozmiarowi tkanki. Po zakończeniu wstępnej inkubacji aktywność mięśni była weryfikowana poprzez dodanie acetylocholiny (ACh) (1 i 10 μ M). We właściwej części eksperymentu wykorzystywano tylko te wycinki, które prawidłowo i powtarzalnie reagowały na ACh, a także wykazywały aktywność spontaniczną. Dodatkowo przed rozpoczęciem właściwej części eksperymentu podawany był rozpuszczalnik substancji badanej, tj. M K-HS dla ekstraktu z melisy i DMSO (0,5%) dla wszystkich trzech kwasów (kontrola negatywna).

3.2.2.1 Doświadczenia oceniające wpływ wyciągu z liści melisy lekarskiej oraz wybranych kwasów fenolowych na aktywność spontaniczną i indukowaną farmakologicznie mięśniówki gładkiej jelit

Po wymianie buforu i ustabilizowaniu aktywności spontanicznej do komory podawano wyciąg z liści melisy lub jeden z kwasów fenolowych, odpowiednio w zakresie stężeń 0,0001-0,1mg/dl i 0,001-100μM (Ryc. 8). Reakcja była rejestrowana przez 5 min, a następnie dodawano do komory ACh (10μM). Po 5 min bufor był wymieniany i schemat powtarzano z substancją badaną w wyższym stężeniu. Wpływ wyciągu i kwasów fenolowych był oceniany w sposób niekumulatywny. Pod koniec eksperymentu podawane były ACh i Isop w celu sprawdzenia reaktywności i żywotności jelit.



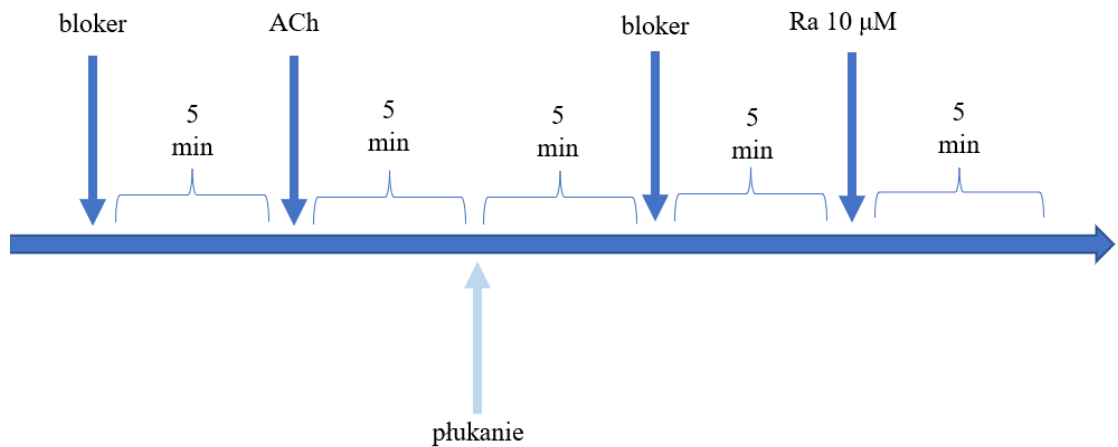
Rycina 8. Schemat przebiegu doświadczeń oceniających wpływ wyciągu z melisy lekarskiej i kwasów fenolowych na aktywność motoryczną mięśniówki gładkiej jelit wybranych gatunków zwierząt

3.2.2.2 Schemat doświadczeń mających na celu ustalenie mechanizmu działania kwasu rozmarynowego na mięśniówkę jelita czczego brojlera kurzego

3.2.2.3

Badanie udziału receptorów muskarynowych w reakcji wywoływanej przez RA

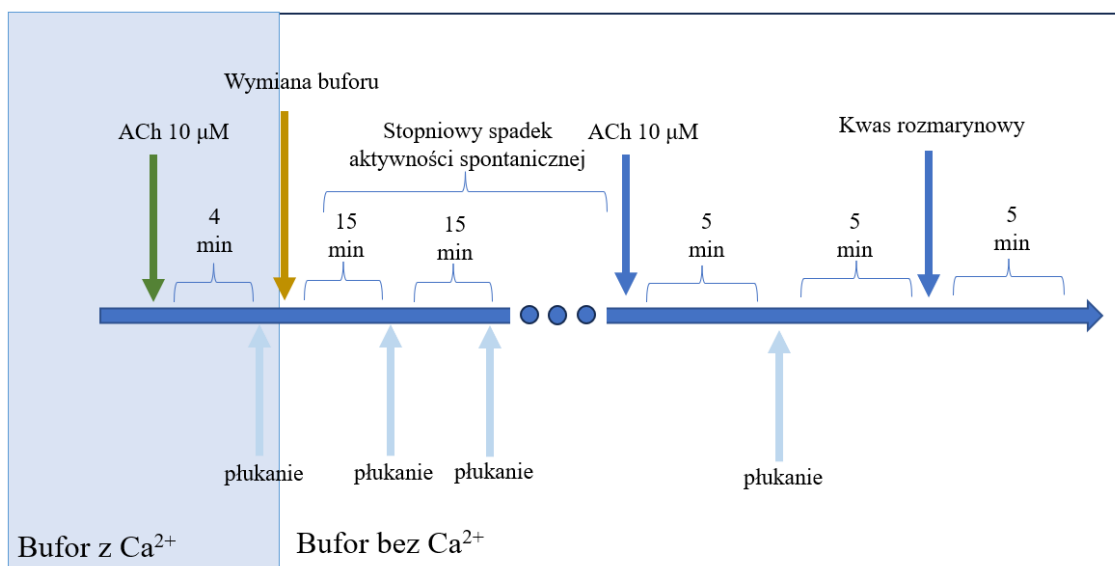
Po wymianie buforu i ustabilizowaniu aktywności spontanicznej do komory podawano jeden z blokerów receptorów muskarynowych, tj. atropinę (1 μM), pirenzepina (30 nM), lub 4-DAMP (10 nM) i przez kolejnych 5 min rejestrowano aktywność mięśniówki. Następnie podawano ACh (10μM). Po wymianie buforu i stabilizacji aktywności motorycznej podawano ten sam bloker i 5 min później RA (100 μM), po osiągnięciu stabilnej odpowiedzi wycinków wymieniano bufor (Ryc. 9).



Rycina 9. Schemat przebiegu doświadczeń oceniających udział receptorów muskarynowych w reakcji mięśniówki jelit brojlerów kurzych wywoływanej przez RA

Badanie udziału wapnia zewnątrzkomórkowego w reakcji wywoływanej przez RA

We właściwej części eksperymentu bufor M K-HS był wymieniany na modyfikowany roztwór Krebsa-Henseleita bez jonów Ca^{2+} . Inkubacja trwała tak długo, aż spontaniczna aktywność motoryczna została zahamowana (płukanie wolnym od Ca^{2+} m K-HS co 15-20 min). Po całkowitym zahamowaniu aktywności spontanicznej podawana była acetylocholina, reakcję obserwowaną przez 5 min, po czym wymieniano w komorach bufor na nową porcję M K-HS bez Ca. Po kilku min od wypłukania podawany był kwas rozmarynowy i reakcja była także rejestrowana przez ok 5 min. (Ryc. 10)



Rycina 10. Schemat przebiegu doświadczenia ocenającego udział wapnia zewnątrzkomórkowego w reakcji wywołanej przez RA

3.2.3 Rejestracja i analiza danych

Każdy wycinek jelita zawieszono oddzielnie w indywidualnej komorze zestawu do inkubacji izolowanych tkanek (Schuler Organ Bath, Hugo Sachs Elektronik, March, Niemcy). Podczas eksperymentu aktywność jelit mierzono jako zmiany napięcia. Aktywność motoryczna była rejestrowana (PowerLab, ADInstruments, Sydney, Australia) i wizualizowana za pomocą programu Chart v7.0 (ADInstruments, Sydney, Australia). Analizę danych przeprowadzono za pomocą programu Chart v8.1. i Microsoft Office Excel. Działanie wszystkich badanych substancji i ekstraktu opierało się na zmianach napięcia pasm mięśni gładkich mierzonych 5 min przed i 5 min po zastosowaniu danej substancji i obliczanych jako AUC (pole pod krzywą). Wszystkie wyniki wyrażono jako procent reakcji kontrolnej, czyli odpowiedzi jelit na podanie M K-HS lub DMSO (0,5%) w przypadku analizy aktywności spontanicznej oraz skurczu mięśni gładkich spowodowanego przez ACh (10 μ M) lub KCl (80 mM) dodanego na początku eksperymentu w przypadku analizy wpływu substancji na skurcz indukowany odpowiednio ACh lub KCl. Reakcję wywołaną przez M K-HS, DMSO (0,5%) lub ACh (10 μ M) definiowano jako 100% (kontrola). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z 5 do 6 niezależnych eksperymentów. W celu przeprowadzenia analizy statystycznej wykonano jednokierunkową analizę wariancji przy użyciu oprogramowania TIBCO

StatSoft, Inc. (2019), STATISTICA (wersja 13.3 www.statsoft.com). Do porównania parami zastosowano test Dunnetta, wykorzystując jako odniesienie efekt M K-HS, DMSO (0,5%) lub ACh (10 μ M) rozpuszczonego w DMSO (0,5%). Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną. Szczegółowy opis materiałów oraz metod znajduje się w publikacji nr 1, 2 oraz 3 w sekcji „*Materials and methods*”.

4. Wyniki

4.1 Wpływ standaryzowanego wyciągu i wybranych substancji czynnych z melisy lekarskiej (*Melissa officinalis*) na aktywność motoryczną izolowanych wycinków przewodu pokarmowego brojlerów kurzych, świni oraz owcy

Charakter oddziaływania standaryzowanego wyciągu z liści melisy lekarskiej oraz wybranych kwasów fenolowych na spontaniczną i indukowaną acetylocholina kurczliwość mięśniówki gładkiej był zmienny i zależał od: (i) gatunku zwierzęcia, którego tkanki stanowiły przedmiot badania, (ii) fragmentu przewodu pokarmowego, z którego pochodziły badane wycinki (jelito czcze, okrężnica), (iii) ułożenia włókien mięśni gładkiej (wycinki mięśniówki podłużnej, wycinki mięśniówki okrężnej).

Uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane w publikacjach:

1. (Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—*ex vivo* study),
2. (Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study)
3. (Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids on isolated jejunum and colon segments in pigs).

Podsumowanie wpływu wyciągu i substancji czynnych przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Porównanie działania wyciągu z melisy lekarskiej i kwasów fenolowych na spontaniczną i indukowaną aktywność motoryczną różnych odcinków jelita brojlera kurzego (A), świni (B) i owcy (C)

A.

BROJLER	Aktywność spontaniczna		Aktywność indukowana ACh	
	Część proksymalna	Część dystalna	Część proksymalna	Część dystalna
Wyciąg z melisy lekarskiej	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑
Kwas rozmarynowy	↑↑↑	↑↑↑	↓↓	↓↓
Kwas chlorogenowy	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
Kwas litospermowy	-	↑↑	↓↓	↑↑

B.

ŚWINIA		Jelito czcze		Okrężnica	
		Mięśniówka okrężna	Mięśniówka podłużna	Mięśniówka okrężna	Mięśniówka podłużna
Aktywność spontaniczna	Wyciąg z melisy lekarskiej	↓↓	↑↑↑	-	↑↑
	Kwas rozmarynowy	↑↑	-	↑↑	↑↑↑
	Kwas chlorogenowy	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	Kwas litospermowy	↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Aktywności indukowane ACh	Wyciąg z melisy lekarskiej	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	Kwas rozmarynowy	↑↑*	↓↓	↓↓	↓↓
	Kwas chlorogenowy	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	Kwas litospermowy	↓↓	↓↓	↑↑↑	↓↓↓

C.

OWCA		Jelito czcze		Okreźnica	
		Mięśniówka okrężna	Mięśniówka podłużna	Mięśniówka okrężna	Mięśniówka podłużna
Aktywność spontaniczna	Wyciąg z melisy lekarskiej	↑↑	↓↓	↓↓↓	↓↓
	Kwas rozmarynowy	↓	↓↓	↓↓	↓↓
	Kwas chlorogenowy	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↓↓
	Kwas litospermowy	↓	↓	↓↓	↓
Aktywność indukowany ACh	Wyciąg z melisy lekarskiej	↓↓↓	↓↓*	↓↓	↓↓
	Kwas rozmarynowy	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	Kwas chlorogenowy	↓↓	-	↓↓	↓↓
	Kwas litospermowy	↓	-	↓↓	↓

- oznacza brak istotnego wpływu

* oznacza aktywność dwufazową

↑↑↑ oznacza wynik >150% reakcji kontrolnej

↑↑ oznacza wynik 126-150% reakcji kontrolnej

↑ oznacza wynik 101-125% reakcji kontrolnej

↓↓↓ oznacza wynik <50% reakcji kontrolnej

↓↓ oznacza wynik 50-74% reakcji kontrolnej

↓ oznacza wynik 75-100% reakcji kontrolnej,

gdzie 100% oznacza wielkość odpowiedzi na podanie substancji kontrolnej, tj. rozpuszczalnika lub ACh, odpowiednio dla wyników dotyczących spontanicznej i indukowanej aktywności motorycznej.

4.2 Określenia mechanizmu działania kwasu rozmarynowego na jelito czcze brojlera kurzego (część dystalna i proksymalna)

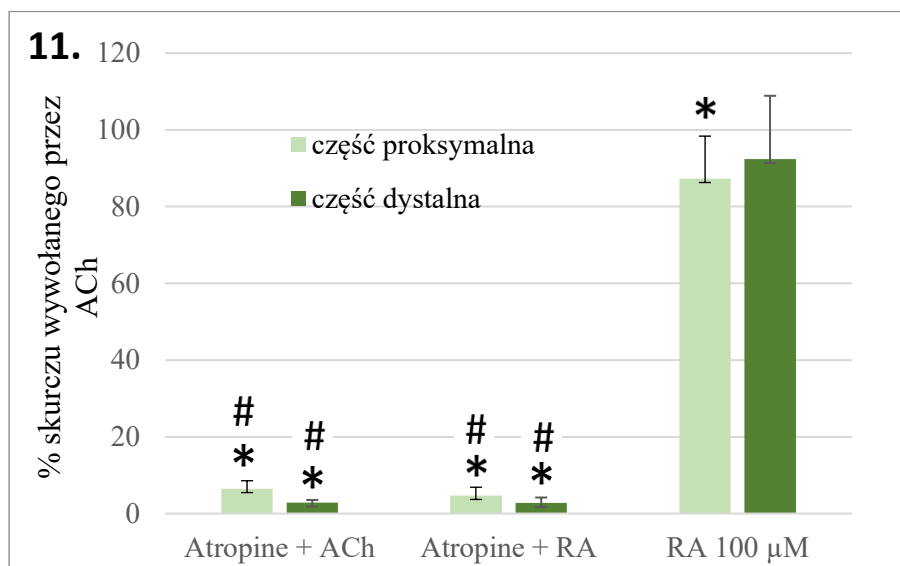
4.2.1. Ocena udziału receptorów muskarynowych w reakcji jelita czczego brojlera kurzego kwasu rozmarynowego

Podanie nieselektywnego blokera receptorów muskarynowych, tj. atropiny ($1\text{ }\mu\text{M}$) do komory inkubacyjnej znacząco hamowało reakcję obu odcinków jelita czczego brojlera kurzego (części dystalnej i części proksymalnej) na acetylocholinę oraz na kwas rozmarynowy (Ryc. 11). W obecności atropiny ($1\text{ }\mu\text{M}$) w komorze inkubacyjnej reakcja jelita na acetylocholinę została zmniejszona do $6,47\pm 2,08\%$ w przypadku części proksymalnej oraz $2,85\pm 0,7\%$ w przypadku części dystalnej w stosunku do wstępnej (kontrolnej) reakcji na acetylocholinę (które zostało przyjęte jako 100%). Reakcja prowokowana podaniem kwasu rozmarynowego ($100\text{ }\mu\text{M}$) w obecności atropiny wynosiła $4,68\pm 2,20\%$ i $2,74\pm 1,44\%$ reakcji kontrolnej powodowanej acetylocholiną, odpowiednio dla części proksymalnej i dystalnej jelita czczego. Siła skurczu mięśni gładkich powodowanego przez kwas rozmarynowy ($100\text{ }\mu\text{M}$), tj. $87,28\pm 11,10\%$ oraz $92,36\pm 16,52\%$ reakcji kontrolnej odpowiednio dla części proksymalnej i dystalnej była znacząco różna od reakcji w obecności atropiny (Ryc. 11).

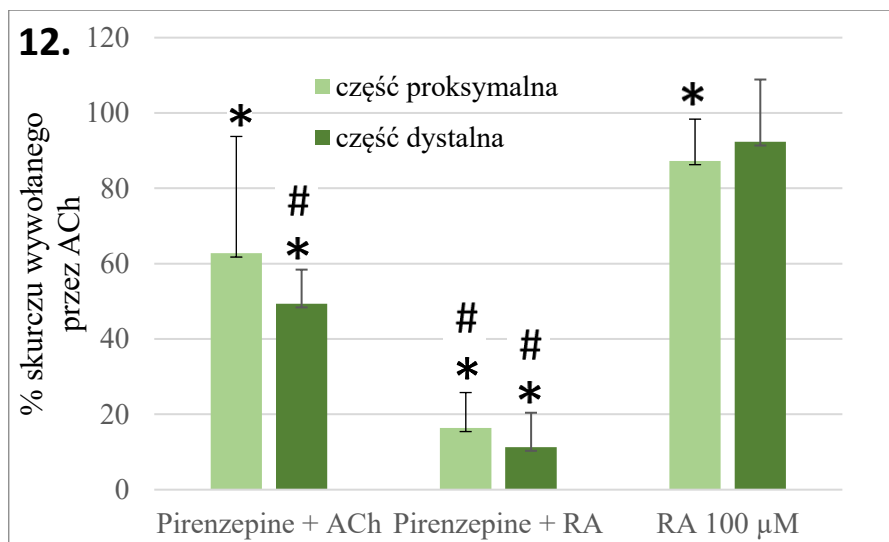
Zastosowanie pirenzepiny (30 nM), selektywnego blokera receptorów muskarynowych M_1 , istotnie zmniejszało odpowiedź jelita czczego brojlera kurzego zarówno w części proksymalnej jak i dystalnej na podanie acetylocholiny oraz kwasu rozmarynowego (Ryc. 12.). Po podaniu pirenzepiny reakcja jelita na acetylocholinę została zmniejszona do $62,76\pm 31,01\%$ w przypadku części proksymalnej oraz $49,39\pm 9,03\%$ w przypadku części dystalnej, w stosunku do reakcji kontrolnej. Natomiast reakcja wywoływana przez kwas rozmarynowy ($100\text{ }\mu\text{M}$) w obecności pirenzepiny wynosiła $16,42\pm 9,36\%$ i $11,31\pm 9,11\%$ reakcji kontrolnej, odpowiednio w przypadku części proksymalnej i dystalnej jelita czczego, co było statystycznie słabszą reakcją niż skurcz wywołany podaniem RA.

4-DAMP (10 nM), który jest selektywnym blockerem receptorów muskarynowych M_3 , podany do komory inkubacyjnej silnie hamował reakcję mięśni gładkich jelita czczego brojlera kurzego (części dystalnej i części proksymalnej) na acetylocholinę oraz na kwas rozmarynowy. Po podaniu 4-DAMP w stężeniu 10 nM reakcja jelita na acetylocholinę w części proksymalnej została zmniejszona do $9,66\pm 24,9\%$, a w części dystalnej do

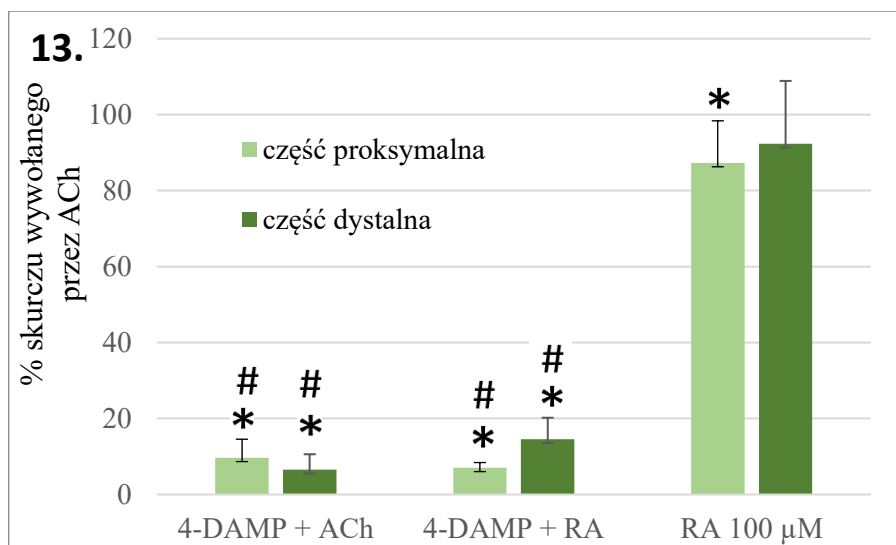
6,53±4,08% w stosunku do wstępnej reakcji na acetylocholinę, wyrażonej jako 100%. Reakcja wywołana przez kwas rozmarynowy (100 µM) w obecności 4-DAMP i wynosiła 7,03±1,39% oraz 14,57±5,64% reakcji kontrolnej, odpowiednio dla części proksymalnej i dystalnej jelita czczego, co było znacząco słabszą reakcją w stosunku do reakcji wywołanej przez RA bez preinkubacji z 4-DAMP (Ryc. 13).



Rycina 11. Wpływ atropiny (1 µM) na działanie kwasu rozmarynowego (100 µM) na wycinki jelita czczego kury. Wyniki wyrażono jako % reakcji wywołanej przez ACh, a odpowiedź na podanie ACh (10µM) uznano za 100%. Wyniki są średnią z 6 niezależnych eksperymentów (± S.D.); *p ≤ 0,05 vs ACh, # p ≤ 0,05 vs RA



Rycina 12. Wpływ pirenzepiny (30 nM) na działanie kwasu rozmarynowego (100 μM) na wycinki jelita czczego kury. Wyniki wyrażono jako % reakcji wywołanej przez ACh, a odpowiedź na podanie ACh (10μM) uznano za 100%. Wyniki są średnią z 6 niezależnych eksperymentów ($\pm$ S.D.); * $p \leq 0,05$ vs ACh, # $p \leq 0,05$ vs RA

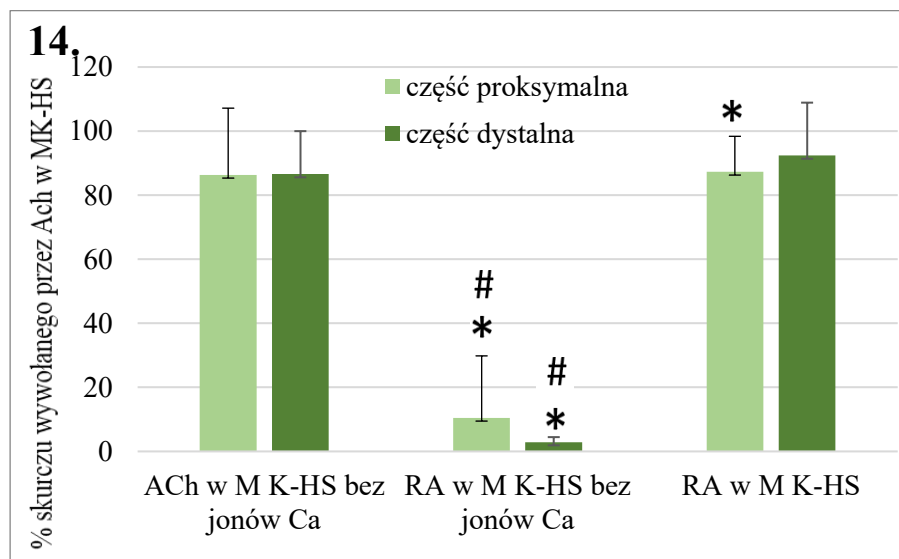


Rycina 13. Wpływ 4-DAMP (10 nM) na działanie kwasu rozmarynowego (100 μM) na wycinki jelita czczego kury. Wyniki wyrażono jako % reakcji wywołanej przez ACh, a odpowiedź na podanie ACh (10μM) uznano za 100%. Wyniki są średnią z 6 niezależnych eksperymentów ($\pm$ S.D.); * $p \leq 0,05$ vs ACh, # $p \leq 0,05$ vs RA

4.2.2. Ocena udziału wapnia zewnątrzkomórkowego w reakcji jelita czczego brojlera kurzego kwasu rozmarynowego

Wymiana medium inkubacyjnego na bufor M K-HS pozbawiony jonów Ca^{2+} nie zmieniła istotnie siły skurczu wywołanego przez acetylocholinę zastosowaną w dawce referencyjnej ($10 \mu\text{M}$). Reakcja na acetylocholinę po wstępnej inkubacji mięśni gładkich jelita czczego brojlera kurzego w M K-HS bez Ca^{2+} wyniosła $86,34\% \pm 20,83\%$ w przypadku części proksymalnej oraz $86,56\% \pm 13,43\%$ skurczu wywołanego przez acetylocholinę w tej samej dawce podanej podczas inkubacji jelit w klasycznym M K-HS (Ryc. 14).

Reakcja wywoływana przez kwas rozmarynowy zastosowany podczas inkubacji wycinków w M K-HS bez Ca^{2+} była znacząco różna od reakcji wywoływanej podczas inkubacji w klasycznym M K-HS. Inkubacja części proksymalnej jelita czczego brojlera kurzego w M KHS bez Ca^{2+} powodowała, że reakcja na RA ($100 \mu\text{M}$) wynosiła tylko $10,48\% \pm 19,34\%$ skurczu wywołanego przez acetylocholinę zastosowaną w M K-HS, a w przypadku części dystalnej było to $2,90\% \pm 1,56\%$ reakcji kontrolnej.



Rycina 14. Wpływ buforu pozbawionego jonów wapnia na działanie kwasu rozmarynowego ($100 \mu\text{M}$) na wycinki jelita czczego kury. Wyniki wyrażono jako % reakcji wywołanej przez ACh w M K-HS, a odpowiedź na podanie ACh ($1 \mu\text{M}$) uznano za 100%. Wyniki są średnią z 6 niezależnych eksperymentów ($\pm \text{S.D.}$); * $p \leq 0,05$ vs ACh, # $p \leq 0,05$ vs RA

5. Dyskusja

Europejskie oczekiwania społeczne, w tym instytucji rządowych, dotyczące poprawy dobrostanu zwierząt przy zachowaniu wydajności produkcji i ograniczeniu stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych i przeciwpasożytniczych, doprowadziły do wprowadzenia przez Unię Europejską zakazu stosowania antybiotyków w paszach dla zwierząt jako stymulatorów wzrostu (European Parliament, 2003; Anadón, 2006; Collignon i McEwen, 2019). Podobnie konsumenci coraz większą uwagę zwracają na pochodzenie, sposób produkcji lub pozyskiwania i jakość żywności. Rośnie zapotrzebowanie na produkty ekologiczne i wytwarzane w sposób tradycyjny, co zazwyczaj oznacza produkcję z bardzo mocno ograniczonym lub bez wykorzystania syntetycznych chemioterapeutyków w hodowli i produkcji zwierzęcej. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że ponad 80% ludności krajów rozwijających się polega w codziennym leczeniu na tradycyjnych środkach leczniczych, takich jak zioła (WHO, 2019). Czynniki te dodatkowo zwiększają zainteresowanie oraz potrzebę wdrażania alternatywnych stymulatorów wzrostu oraz stosowania roślin leczniczych w zapobieganiu i leczeniu chorób zwierząt (Radkowska, 2013). Oprócz leczenia przyczynowego, w tym opartego na terapii przeciwbakteryjnej i przeciwpasożytniczej, istnieje także potrzeba wdrażania leczenia objawowego, które zmniejsza lub łagodzi objawy kliniczne chorób zarówno zakaźnych, jak i niezakaźnych.

W kontekście hodowli zwierząt, rosnące znaczenie zyskuje stosowanie suszonych ziół, wyciągów roślinnych i olejków eterycznych zarówno w celach profilaktycznych, jak i terapeutycznych (Bullitta, 2018; Kuralkar, 2021). Melisa lekarska stanowi przykład rośliny o obiecujących właściwościach sprzyjających utrzymaniu i poprawie stanu zdrowia zwierząt. Badania na owcach rasy Arabi wykazały poprawę przyrostów masy ciała, spożycia paszy i współczynnika konwersji przy wysokim udziale melisy w diecie (Wedah, 2020). Jest ona chętnie zjadana przez świny, krowy i kury (Grela i in., 2013), co daje możliwość zwiększenia pobrania paszy i uzasadnia jej wykorzystania jako dodatku paszowego.

Rośliny bogate w związki fenolowe takie jak kwas rozmarynowy czy chlorogenowy (np. rozmaryn, bylica, głóg, ale również melisa), wywołują rozkurczowe działanie na mięśnie gładkie, co sugeruje możliwość ich zastosowania jako naturalnych regulatorów motoryki jelit (Aqel, 1992; Ekiert i in., 2021; Jalilzadeh-Amin i in. 2011; Hernández-Pérez i in., 2014). Przytoczone obserwacje wspierają rozwój ziołowych preparatów poprawiających zdrowie przewodu pokarmowego i ograniczających potrzebę

stosowania antybiotyków w zamian za wprowadzenie leczenia objawowego czy wspierającego. Ze względu na niepełne dane dotyczące wpływu roślin leczniczych i ich składników na tkanki różnych gatunków zwierząt, konieczne są dalsze badania farmakologiczne ich wpływu na motorykę przewodu pokarmowego. Nowo zdobyta wiedza pomogłaby rozszerzać zastosowanie preparatów ziołowych w weterynarii. Należy tu podkreślić, że zmiany w kurczliwości przewodu pokarmowego prowadzą do różnych skutków zdrowotnych. Zwiększona motoryka, czyli hipermotoryka mięśni gładkich jelita czczego i okrężnicy, może powodować osłabienie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Z kolei hipomotoryka, czyli zmniejszona lub niewystarczająca kurczliwość przewodu pokarmowego, negatywnie wpływa na prawidłowy tranzyt pokarmu i składników odżywczych. Taki stan może wydłużyć czas zalegania pokarmu, zaburzać skład mikrobiomu, sprzyjać nadmiernemu namnażaniu bakterii patogennych, zaburzać fermentację i ostatecznie osłabiać zdrowie jelit (Deane, 2018).

Melissa officinalis jest znana z działania uspokajającego, przeciwgorączkowego, spazmolitycznego i przeciw nadciśnieniowego (Sharifi-Rad, 2021). Według Europejskiej Agencji Leków (EMA), *Melissa officinalis* L. jest klasyfikowana jako tradycyjny produkt ziołowy stosowany w łagodzeniu objawów stresu psychicznego, wspomagająco przy zasypianiu i objawowo przy łagodnych dolegliwościach ze strony przewodu pokarmowego, takich jak wzdęcia (EMA, 2013). Bezpieczeństwo komercyjnego ekstraktu z liści melisy (Nor-Balm®), użytego w niniejszym badaniu, zostało potwierdzone przez EFSA jako dodatek sensoryczny do pasz dla wszystkich gatunków zwierząt (Bampidis, 2020). W Stanach Zjednoczonych melisa została zaliczona do roślin ogólnie uznawanych za bezpieczne (GRAS), jednak nie figuruje oficjalnie na liście zatwierdzonych dodatków paszowych przez Stowarzyszenie Amerykańskich Urzędników Kontroli Pasz (AAFCO).

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu ekstraktu z liści *Melissa officinalis* oraz jego głównych składników fenolowych (kwasu rozmarynowego, kwasu chlorogenowego i kwasu litospermowego) na motorykę przewodu pokarmowego trzech różnych gatunków zwierząt gospodarskich – świń (*Sus scrofa domesticus*), owiec (*Ovis aries*) i kur (*Gallus gallus domesticus*). Uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie wniosków dotyczących potencjalnych właściwości przeciwskurczowych ekstraktu z melisy oraz jego wpływu na motorykę jelit, zarówno w ujęciu fizjologicznym, jak i terapeutycznym.

U wszystkich trzech badanych gatunków zwierząt zaobserwowano, że wyciąg z *Melissa officinalis* oraz jego składniki wykazują aktywność biologiczną wpływającą na kurczliwość mięśni gładkich przewodu pokarmowego. U świń i owiec dominował efekt przeciwskurczowy, szczególnie widoczny w odpowiedzi na stymulację acetylocholiną, co wskazuje na potencjalne oddziaływanie tych związków na układ cholinergiczny jelit. Kwas rozmarynowy i kwas litospermowy istotnie zmniejszały odpowiedź skurczową wywołaną przez ACh, co sugeruje ich potencjał jako naturalnych środków spazmolitycznych. U świń efekt ten był szczególnie widoczny w mięśniówce okrężnej jelita czczego i okrężnicy, co może mieć zastosowanie w leczeniu biegunek o podłożu motorycznym, np. w przebiegu enteropatii proliferacyjnej czy zakażeń *Clostridium perfringens* (Luppi, 2023). W przypadku owiec, ekstrakt z melisy oraz jego składniki również wykazały aktywność przeciwskurczową, w prawie wszystkich przypadkach. Obserwowane efekty były zależne od dawki i wykazywały zróżnicowaną siłę działania pomiędzy poszczególnymi związkami. Co interesujące, w przypadku obu gatunków zaobserwowano różnice w reakcji mięśniówki podłużnej i okrężnej, co może wskazywać na złożony mechanizm działania melisy, zależny od lokalizacji receptorów cholinergiczych, ich gęstości oraz różnic w unerwieniu warstw mięśniowych. Odmienne wyniki mogą sugerować również odmienny profil interakcji między badanymi metabolitami rośliny, a jelitowym układem nerwowym u poszczególnych gatunków zwierząt. Analizując różnice międzygatunkowe, należy zwrócić uwagę na odmienność anatomiczną i fizjologiczną przewodu pokarmowego świń, owiec i kur. Różnice w szybkości pasażu i strukturze jelita wpływają na to, czy związki aktywne (np. fenolowe) szybciej, wolniej czy w głębszych warstwach oddziałują na mięśnie gładkie przewodu pokarmowego. U ptaków z unikalną anatomią przewodu pokarmowego (żołądek gruczołowy oraz mięśniowy, krótki przewód pokarmowy), wpływ związków roślinnych może mieć inne implikacje zarówno w kontekście trawienia, jak i absorpcji składników odżywczych. Kury mają bardzo krótki czas pasażu, tzn. cała treść pokarmowa przechodzi przez przewód pokarmowy w ciągu zaledwie 3–5 godzin, przez co związki aktywne mają bardzo ograniczony zakres działania na mięśnie gładkie (Moran i in., 2022). Tymczasem u świń jako zwierząt monogastrycznych i wszystkożernych, trawienie w dużym stopniu opiera się na precyzyjnej regulacji perystaltyki, a pasaż treści trwa ok. 30–40 godzin (Moran i in., 2022; Rayner i Wenham, 1986). W przypadku drobiu proces trawienia obejmuje przede wszystkim fermentację w jelitach ślepych, w której uczestniczą drobne i rozpuszczalne frakcje pokarmowe. Częstki o większej średnicy są szybko wydalone

przez kloakę, co skutkuje relatywnie krótkim czasem retencji treści pokarmowej w przewodzie pokarmowym. Taka organizacja trawienia sprzyja przewadze mechanizmów pobudzających perystaltykę jelit nad długotrwałą fermentacją mikrobiologiczną. U świń niestrawione resztki pokarmowe, po krótkim pasażu przez jelito ślepe, ulegają długotrwałej ekspozycji na mikroflorę w obrębie całej okrężnicy (Moran, 1982). Tak znaczna różnica w jakości i czasie trwania fermentacji może przekładać się na odmienne reakcje mięśni gładkich na badane kwasy fenolowe i wyciąg z melisy lekarskiej. U owiec, będących przedstawicielami przeżuwaczy, aktywność motoryczna przewodu pokarmowego jest bardziej złożona. W żwaczu i czepcu zachodzi trawienie bakteryjne treści pokarmowej, zawartość może zostać zwrócona do jamy ustnej i ponownie przeżuta. Po przeżuciu i ponownym połknięciu pokarm omija poprzednie komory i trafia do ksiąg, gdzie jest rozdrabniany przez skurcze mięśni. Ostatecznie trafia do trawieńca, który jest podobny do żołądka innych zwierząt. Tak skomplikowania motoryka początkowej części przewodu pokarmowego może sugerować również odmiennie odbierane bodźce w dalszych częściach przewodu pokarmowego w stosunku do zwierząt monogastrycznych, mimo że jelito cienkie i grube tych gatunków są zbudowane anatomicznie podobnie (McAnally i in., 1944).

W literaturze naukowej opisano liczne przykłady roślin wykazujących odmienne działanie farmakologiczne lub toksykologiczne w zależności od gatunku zwierzęcia, co przynajmniej częściowo wynika z różnic anatomicznych i fizjologii przewodu pokarmowego (Butterweck, 2003; Fornal, 2001; Moritz i Aboling; 2024; Rabee, i in., 2025; Salgado i in., 2011 Yamato i in., 2005).

Rozwój i organizacja przewodu pokarmowego oraz unerwienia śródściennego różnią się istotnie pomiędzy gatunkami gospodarskimi, co ma znaczenie dla funkcji trawiennych i indukowanej farmakologicznie reaktywności mięśniówki gładkiej. U owiec jako przeżuwaczy, w okresie noworodkowym przewód pokarmowy funkcjonuje w sposób zbliżony do układu monogastrycznego, a mleko kierowane jest bezpośrednio do trawieńca przez rynienkę przełykową (Wardrop i Coombe, 1961). Wraz z wprowadzeniem paszy stałej następuje intensywny rozwój brodawek żwacza, kolonizacja mikrobiologiczna oraz przebudowa neuronów jelitowego układu nerwowego (ENS), której neurochemiczna organizacja charakteryzuje się przewagą neuronów cholinergicznym kontrolujących motorykę i VIP-ergicznym (których głównym neuroprzekaźnikiem jest wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP)) odpowiedzialnych za relaksację mięśni (Baldwin i Connor, 2017, Weyns, 1988). U świń,

rozwój jelita po urodzeniu obejmuje wysoką aktywność enzymów trawiących laktozę, dynamiczną przebudowę kosmków i reorganizację ENS w okresie odsadzania (Pluske, 2016). Neuroprzeżytnictwo w jelicie cienkim świń opiera się głównie na neuronach VIP-ergicznych i serotoninergetycznych, modułujących sekrecję i perystaltykę, natomiast w jelicie grubym dominują neurony, gdzie neuroprzeżytnikiem jest tlenek azotu, hamujące skurcze segmentalne (Barbiers i in., 1993; Kovsca Janjatovic i in., 2012). Testy czynnościowe potwierdziły, że blokada syntazy NO w mięśniach okrężnicy świni prowadzi do znacznego ograniczenia relaksacji mięśniowej, co wskazuje na udział NO w hamowaniu motoryki (Stebbing i in., 2012). U kur, których przewód pokarmowy rozwija się intensywnie już w stadium embrionalnym, ENS jest w pełni skolonizowany przez komórki pochodzenia grzebienia nerwowego przed wykluciem (Maruccio, i in., 2008). Od momentu wyklucia tempo rozwoju przewodu pokarmowego piskląt przewyższa tempo przyrostu masy ciała, zarówno fizycznie (masa względna), jak i morfologicznie (wysokość i obwód kosmków jelitowych oraz ich objętość) (Jin, i in., 2008). Po wykluciu obserwuje się gwałtowny wzrost aktywności enzymów trawiennych oraz rozwój mikroflory jelit ślepych (Jin, i in., 2008). Neuroprzeżytnictwo u ptaków opiera się w dużej mierze na serotoninie i histaminie, które odgrywają kluczową rolę w kontroli motoryki żołądka mięśniowego i jelit (Lyte i in., 2022). Tlenek azotu uczestniczy w kontroli motoryki przewodu pokarmowego ptaków i prawdopodobnie jest również produkowany w połączeniach neuronowo-neuronaczyniowych i nerwowo-naczyniowych. (Li i in., 1994, Martinez i in., 1993). Różnice te, zarówno w zakresie rozwoju morfologicznego, jak i w neurochemii ENS, mogą powodować odmienną odpowiedź farmakologiczną i fizjologiczną na bodźce trawienne oraz środki modułujące motorykę przewodu pokarmowego, w tym tu badane substancje, tj. wyciąg z liści melisy oraz wybranych kwasów fenolowych.

Istnieje wiele dowodów na to, że motylina (MLN) może być silnym mediatorem działania leków ziołowych na motorykę przewodu pokarmowego (Cho i in., 2023; Jia i in., 2022, Tang i in., 2022; Zhu i in., 2020). Pozwala to domniemywać, że również wyciąg z melisy lekarskiej oraz badane kwasy fenolowe wpływają na aktywność motoryczną jelit poprzez modulację poziomu MLN. Jednak weryfikacja tego mechanizmu nie była przedmiotem niniejszej pracy ze względu na ograniczony udział komponentu hormonalnego w wykorzystanym modelu eksperymentalnym. Motylina jest hormonem żołądkowo-jelitowym, wytwarzanym w górnym odcinku jelita cienkiego. Jej najlepiej poznana

funkcją jest udział w regulacji ruchów perystaltycznych, a zmiany poziomu MLN są związane z chorobami przewodu pokarmowego (Cho i in., 20203).

Najbardziej różnorodne efekty oddziaływania wyciągu z melisy i jej składników odnotowano u brojlerów kurzych. Ekstrakt z melisy, wykazywał działanie przeciwskurczowe wobec spontanicznej aktywności motorycznej jelita czczego, ale jednocześnie działanie prokinetyczne wobec aktywności wywołanej ACh natomiast kwas rozmarynowy i litospermowy nasilały skurcze spontaniczne i hamowały aktywność indukowaną ACh. Mięśnie gładkie wykazują zmienną reakcję na różne substancje, w zależności od regionu jelita, na przykład przedstawiony w tej pracy wyciąg z melisy lekarskiej w przypadku owcy czy świni, kwas rozmarynowy w przypadku broilera kurzego, a także serotonina w przypadku szczura (żołądek jest bardzo wrażliwy na serotoninę, podczas gdy jelito cienkie jest niewrażliwe na działanie tej bioaminy) (Weyns, 1988). Podobnie odmienne wyniki oddziaływania kwasu medikagenowego (co do siły i częściowo charakteru) zaobserwowano w badaniach saponin (Mendel et al., 2016c) i wybranych flawonoidów (Mendel et al., 2016b) na wycinkach trawieńca i dwunastnicy krowy. W przypadku wpływu kwasu rozmarynowego na skurcze indukowane ACh na okrężną mięśniówkę jelita czczego świni efekt był dwufazowy, w niższych dawkach zaobserwowano obniżenie siły skurczu, a w wyższych nasilenie, odwrotną sytuację zaobserwowano we wpływie wyciągu z melisy lekarskiej w mięśniówce podłużnej jelita czczego owcy, gdzie w niższych dawkach podanie wyciągu spowodowało nasilenie siły skurczu wywołanego ACh, a w wyższych dawkach jego osłabienie. Podobnie dwufazowe działanie zaobserwowano w przypadku chińskiej herbaty MJT (produkowanej z rośliny zielnej *Dracocephalum rupestre* Hance (pszczelnik skalny)) na opróżnianie żołądka i ruchy jelita cienkiego u szczurów (*in vivo*). Niskie i średnie stężenia promowały motorykę przewodu pokarmowego, podczas gdy wysokie stężenie wykazało efekt przeciwny (Wu i in., 2023).

Różnice w charakterze i sile oddziaływania wyciągu z melisy i jej wybranych składników w zależności od badanego gatunku zwierząt potwierdzają, że błędem jest bezpośrednia ekstrapolacja międzygatunkowa, zarówno w odniesieniu do oczekiwanych efektów, jak i dawek je wywołujących. Obserwacje z przeprowadzonych doświadczeń potwierdzają konieczność prowadzenia badań farmakokinetycznych w zakresie skuteczności i bezpieczeństwa preparatów ziołowych w odniesieniu do gatunków docelowych. Jest to zgodne z obserwacjami dotyczącymi leków syntetycznych, np. w przypadku leków przeciwpasożytniczych (lewamizolu, albendazolu, fenbendazolu, moksydektyny,

doramektyny i iwermektyny) nawet w obrębie grupy przeżuwaczy (owce, kozy, bydło) zauważalna jest duża różnica w farmakokinetyce i farmakodynamice tych substancji (Myers, 2020). Przykłady różnej wrażliwości i konieczności stosowania zróżnicowanego reżimu dawkowania roślin leczniczych u zwierząt przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Przykłady różnego dawkowania ziół u zwierząt domowych (Brendieck-Worm i in., 2015; Brendieck-Worm, 2021; Brendieck-Worm i Melzig, 2021; Heinrich i in. 2018; Katerere i Luseba, 2010; Samuelsson i Bohlin, 2009; Rotblatt, 2000; Schulz i in. 2012; Wynn i in., 2007):

Ziolo	Gatunek zwierzęcia	Dawkowanie	Powód zróżnicowanego dawkowania
Allium sativum L.	bydło	20 g/dzień/zwierzę	Fermentacja żwaczowa zapobiega działaniu toksycznemu związków disiarczkowych
	kury	1-3% w paszy	
Curcuma longa L.	bydło	10–30 g/dzień/zwierzę	Fermentacja żwaczowa nasila degradację substancji czynnych i powoduje konieczność wyższego dawkowania
	kury	0,5-1% w paszy	
	psy	15-20 mg/kg m.c./dzień	
Echinacea spp.	konie	500–1000 mg 2 x dzień	Zróżnicowana biodostępność substancji czynnych oraz wrażliwość układu odpornościowego
	psy	50–100 mg/kg/dzień (w podzielonych dawkach)	
	świnie, drób	0,5-2% w paszy	
Silybum marianum L.)	bydło	5-15 g/dzień	Niższa dawka stosowana u monogastrycznych wynika z wyższej biodostępności substancji czynnych i wrażliwości komórek wątroby
	świnie	200-500 mg/kg paszy	
	psy	ok. 20 mg/kg m.c.	
Thymus vulgaris L.	drób	0,1-0,5% w paszy	Wyższa toksyczność olejków eterycznych dla monogastrycznych, w tym ptaków
	przeżuwacze	1-2% w paszy	

Z punktu widzenia praktyki hodowlanej, szczególne znaczenie może mieć zastosowanie melisy lekarskiej jako surowca roślinnego o potwierdzonej smakowości. Jej obecność w dawce pokarmowej może przyczyniać się do zwiększenia dobrowolnego pobierania paszy przez zwierzęta gospodarskie, co, w połączeniu z wykazaną aktywnością spazmolityczną, może pozytywnie wpływać na efektywność wykorzystania składników odżywczych. W świetle uzyskanych wyników eksperymentalnych, efekt ten wydaje się szczególnie istotny w odniesieniu do przeżuwaczy, takich jak owce. Należy jednak podkreślić konieczność zachowania ostrożności przy stosowaniu wyższych dawek ekstraktów zawierających kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy oraz kwas litospermowy, gdyż wykazano, że w zwiększonych stężeniach związki te mogą indukować odpowiedź proskurczową mięśniówki gładkiej jelita czczego i okrężnicy, co zostało udokumentowane w badaniach przeprowadzonych *in vitro* na modelu świńskim (Tab. 5).

Interpretując wyniki badań *in vitro*, należy uwzględnić ograniczenia związane z brakiem integracji takich układów regulacyjnych jak oś podwzgórze–przysadka–nadnercza, autonomiczny układ nerwowy czy mikrobiom jelitowy. Układy te, w warunkach *in vivo*, w sposób istotny modulują funkcjonowanie przewodu pokarmowego, w tym również aktywność motoryczną jelit.

Dotychczasowe badania wykazały, że mięśnie gładkie przewodu pokarmowego ssaków i ptaków wykazują ekspresję wszystkich pięciu podtypów receptorów muskarynowych (So i in., 2003; Suguro i in., 2010). Spośród nich, szczególne znaczenie funkcjonalne przypisuje się podtypom M1, M2 i M3. Dane eksperymentalne uzyskane w doświadczeniach z wykorzystaniem gryzoni oraz psów wskazują, że pomimo przewagi liczebnej receptorów M2, to receptory M3 odgrywają kluczową rolę w regulacji motoryki przewodu pokarmowego (Michel i Whiting, 1988; Abrams i in., 2006; Eglen i Harris, 1993; Uchiyama i Chess-Williams, 2004). Podtyp M3 stanowi jedyny receptor muskarynowy jednoznacznie zaangażowany w inicjację odpowiedzi skurczowej mięśni gładkich pod wpływem agonistów muskarynowych w warunkach *in vitro* (Preiksaitis i Laurier, 1998; Lin i in., 1997; Honda i in., 1993; Shi i Sarna, 1997; Ehlert i in., 1999). Receptory M1, obecne głównie w neuronach splotów śródściennych oraz komórkach gruczołowych, odpowiadają za modulację wydzielania śliny i soku żołądkowego oraz wzmacnianie transmisji cholinergiczej w obrębie jelit, co może pośrednio wpływać na

nasilanie perystaltyki (Stadelmann i in., 1998; Tobin i in., 2009). W świetle powyższego, w pierwszym etapie badań własnych przeprowadzono ocenę ogólnego udziału receptorów muskarynowych w odpowiedzi skurczowej jelita czczego brojlera kurzego wywołanej przez kwas rozmarynowy. Zastosowanie nieselektywnego antagonisty receptorów muskarynowych, tj. atropiny, pozwoliło wykazać, że blokada tych receptorów istotnie redukuje amplitudę skurczów, co wskazuje, iż kwas rozmarynowy wywiera swoje działanie kurczliwe właśnie poprzez aktywację receptorów muskarynowych (Ryc. 11). W kolejnym etapie zastosowano selektywnego antagonistę receptora M1 (pirenzepinę). Zahamowanie kurczliwości mięśni po podaniu tej substancji było bardziej wyraźne w przypadku kwasu rozmarynowego niż acetylocholinę (Ryc. 12), co sugeruje, że receptor M1, choć tradycyjnie kojarzony z funkcją wydzielniczą, może również współuczestniczyć w odpowiedzi skurczowej wywołanej przez badany związek. Następnie przeprowadzono testy z użyciem selektywnego antagonisty receptora M3, tj. 4-DAMP. Obserwowano wyraźne zahamowanie skurczów, zbliżone do efektu działania atropiny (Ryc. 13), co jednoznacznie potwierdza, że receptory M3 odgrywają kluczową rolę w transmisji sygnału skurczowego w mięśniówce jelita czczego brojlera kurzego indukowanej przez kwas rozmarynowy.

W dalszej części eksperymentu skoncentrowano się na określeniu roli jonów wapnia (Ca^{2+}) jako głównego czynnika inicjującego mechanizm skurczu w mięśniach. Zgodnie z obowiązującym paradygmatem fizjologii mięśni gładkich, wzrost stężenia cytoplazmatycznego jonów Ca^{2+} jest warunkiem koniecznym do wystąpienia odpowiedzi skurczowej (Bitar i in., 1986; McFadzean i Gibson, 2002). W celu identyfikacji źródeł wapnia, zastosowano roztwór M K-HS pozbawiony jonów Ca^{2+} . Uzyskane wyniki wykazały istotne różnice w odpowiedzi skurczowej pomiędzy preparatami inkubowanymi w środowisku z obecnością wapnia a próbkami pozbawionymi tego składnika (Ryc. 14), co sugeruje udział pozakomórkowego napływu Ca^{2+} w odpowiedzi skurczowej indukowanej przez kwas rozmarynowy. Dla porównania rozmarynian etylu (estrowa pochodna kwasu rozmarynowego) indukuje przeciwny efekt - relaksację pierścieni aorty szczura między innymi poprzez blokadę zarówno uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych, jak i napływu Ca^{2+} pozakomórkowo (Wicha i in., 2015), co dowodzi wykorzystywania tego samego szlaku wpływu na kurczliwość, ale w przeciwny sposób.

Dostępne dane wskazują, że kwas rozmarynowy oraz ekstrakty z rozmarynu mogą hamować aktywność acetylocholinoesterazy (AChE) w ośrodkowym układzie nerwowym gryzoni i ryb (Capatina i in., 2020, Rahbardar i Hosseinzadeh, 2020). Enzym ten odpowiada za rozkładanie acetylcholiny, dlatego jego zahamowanie prowadzi do wzrostu stężenia ACh i nasilenia sygnalizacji cholinergiczej. Choć te dane pochodzą głównie z badań mózgu, można wykorzystać je próbując interpretować wyniki uzyskane z doświadczeń na wycinkach jelit, w których jednym z dominujących elementów regulujących motorykę jest jelitowy układ nerwowy. Podążając za koncepcją Capatina i in. (2020) można przyjąć, że RA zwiększa lokalnie stężenie ACh w jelicie i działa presynaptycznie, tzn. nie tylko bezpośrednio na receptory mięśniówki, ale także poprzez zwiększanie uwalniania lub dostępności neuroprzekaźnika w zakończeniach nerwowych ENS. Pomimo uzyskanych wyników, mechanizm działania kwasu rozmarynowego pozostaje nie w pełni wyjaśniony. W szczególności wymaga dalszych badań rola poszczególnych podtypów kanałów jonowych oraz potencjalne interakcje RA z innymi szlakami sygnalizacyjnymi w mięśniach gładkich. Przyszłe eksperymenty powinny obejmować zarówno analizy farmakologiczne z selektywnymi blokerami, jak i podejścia molekularne umożliwiające pełniejsze zrozumienie tego złożonego mechanizmu.

Podsumowując, zioła, w tym *Melissa officinalis*, są obecnie stosowane w przemyśle paszowym głównie jako dodatki sensoryczne i środki poprawiające stan zdrowia. Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie badane substancje (kwas chlorogenowy, kwas rozmarynowy, kwas litospermowy), a także cały wyciąg z melisy lekarskiej wykazują silny wpływ na wycinki jelita czczego oraz okrężnicy owiec, świń i brojlerów kurzych w warunkach *in vitro*, co potencjalnie otwiera możliwości ich wykorzystania jako naturalnych modulatorów motoryki przewodu pokarmowego. Otrzymane dane sugerują, że związki te mogą przyczyniać się do poprawy funkcji trawiennych zwierząt gospodarskich, jednak wymagają dalszych badań w warunkach *in vivo* w celu pełnego określenia ich działania oraz bezpieczeństwa stosowania.

6. Podsumowanie i wnioski

- A. Ekstrakt z melisy lekarskiej oraz jego główne kwasy fenolowe wywierają znaczący, ale zróżnicowany wpływ na aktywność motoryczną jelit brojlerów kurzych, świń i owiec, zależny od gatunku, odcinka jelita oraz rodzaju mięśniówki.
- B. Mechanizm działania kwasu rozmarynowego obejmuje udział receptorów muskarynowych M1 i M3, co potwierdzono poprzez zastosowanie selektywnych blokerów oraz warunkowany jest obecnością wapnia zewnątrzkomórkowego, co wskazuje na kluczową rolę napływu Ca^{2+} w inicjowaniu skurczów jelitowych wywoływanych przez tę substancję.
- C. Dokładny mechanizm działania kwasu rozmarynowego nie został w pełni wyjaśniony; konieczne są dalsze badania nad udziałem innych receptorów i kanałów jonowych w regulacji motoryki jelit.
- D. Wyniki badań potwierdzają, że ekstrakt z melisy lekarskiej oraz jego główne kwasy fenolowe mogą modulować perystaltykę przewodu pokarmowego, co sugeruje możliwość ich praktycznego zastosowania w żywieniu zwierząt w celu poprawy zdrowia i efektywności trawienia.
- E. Zioła i ich aktywne składniki mogą stanowić potencjalne dodatki paszowe wspierające funkcjonowanie przewodu pokarmowego, jednak ich efekt nie jest uniwersalny i wymaga weryfikacji w odniesieniu do poszczególnych gatunków zwierząt.
- F. Zastosowanie alternatywnego modelu izolowanych wycinków przewodu pokarmowego pozyskanych od zwierząt poddawanych ubojowi, stwarza szansę na prowadzenie wiarygodnych, szybkich i stosunkowo nisko kosztownych badań przedklinicznych pozwalających ocenić potencjał badanych substancji do modyfikowania kurczliwości różnych odcinków przewodu pokarmowego.

7. Piśmiennictwo

- Abdel-Naime, W. A., Fahim, J. R., Fouad, M. A., & Kamel, M. S. (2019). Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies of *Melissa officinalis*. *South African Journal of Botany*, 124, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.011>
- Abrams, P., Andersson, K., Buccafusco, J. J., Chapple, C., de Groat, W. C., Fryer, A. D., ... Wein, A. J. (2006). Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 565–578.
- Adduci, I., Sajovitz, F., Hinney, B., Lichtmannsperger, K., Joachim, A., Wittek, T., & Yan, S. (2022). Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals*, 12(18), 2339. <https://doi.org/10.3390/ani12182339>
- Akhondzadeh, S. (2003). *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(7), 863–866. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.7.863>
- Amicarelli, V., & Bux, C. (2020). Food waste measurement toward a fair, healthy and environmental-friendly food system: a critical review. *British Food Journal*, 123(8), 2907–2935. <https://doi.org/10.1108/bfj-07-2020-0658>
- Anadón, A. (2006). WS14 The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(s1), 41–44.
- Anadón, A., Martínez, M. A., Castellano, V., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2014). The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 10(1), 67-79.
- Aqel, M. B. (1992). A Vascular Smooth Muscle Relaxant Effect of *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Pharmacognosy*, 30(4), 281–288. <https://doi.org/10.3109/13880209209054014>
- Araj-Khodaei, M., Noorbala, A. A., Yarani, R., Emadi, F., Emaratkar, E., Faghihzadeh, S., ... Naseri, M. (2020). A double-blind, randomized pilot study for comparison of *Melissa officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. with Fluoxetine for the treatment of depression. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03003-5>
- Argyropoulos, D., & Müller, J. (2014). Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*, 52, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.020>
- Aubert, P., Guinobert, I., Blondeau, C., Bardot, V., Ripoche, I., Chalard, P., & Neunlist, M. (2019). Basal and Spasmolytic Effects of a Hydroethanolic Leaf Extract of *Melissa*

officinalis L. on Intestinal Motility: An Ex Vivo Study. *Journal of Medicinal Food*, 22(7), 653–662. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0154>

Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., Trudeau, V. L., & Arnason, J. T. (2009). Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research*, 23(8), 1075–1081. <https://doi.org/10.1002/ptr.2712>

Baldwin, R. L., VI, & Connor, E. E. (2017). Rumen Function and Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 33(3), 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.001>

Ballard, C. G., O'Brien, J. T., Reichelt, K., & Perry, E. K. (2002). Aromatherapy as a Safe and Effective Treatment for the Management of Agitation in Severe Dementia. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 63(7), 553–558. <https://doi.org/10.4088/jcp.v63n0703>

Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Kouba, M., Kos Durjava, M., ... Dusemund, B. (2020). Safety and efficacy of a dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves when used as a sensory additive for all animal species. *EFSA Journal*, 18(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6016>

Barbiers, M., Timmermans, J.-P., Scheuermann, D. W., Adriaensen, D., Mayer, B., & De Groodt-Lasseel, M. H. A. (1993). Distribution and morphological features of nitrergic neurons in the porcine large intestine. *Histochemistry*, 100(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/bf00268875>

Bindari, Y. R., & Gerber, P. F. (2022). Centennial Review: Factors affecting the chicken gastrointestinal microbial composition and their association with gut health and productive performance. *Poultry Science*, 101(1), 101612. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101612>

Bitar, K. N., Bradford, P., Putney, J. W., Jr., & Makhoul, G. M. (1986). Cytosolic Calcium During Contraction of Isolated Mammalian Gastric Muscle Cells. *Science*, 232(4754), 1143–1145. <https://doi.org/10.1126/science.3704641>

Bounihi, A., Hajjaj, G., Alnamer, R., Cherrah, Y., & Zellou, A. (2013). In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of *Melissa officinalis* L. Essential Oil. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/101759>

Brendieck-Worm, C., Klarer, F., & Stöger, E. (2015). *Heilende Kräuter für Tiere: Pflanzliche Hausmittel für Heim-und Nutztiere*. Haupt.

Brendieck-Worm, C. (2021). Waldapotheke für Tiere. *Heilpflanzen*, 01(01), 34–37. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731876>

Brendieck-Worm, C., & Melzig, M. F. (2021). *Phytotherapie in der Tiermedizin*.

Brendler, T., Gruenwald, J., Kligler, B., Keifer, D., Abrams, T. R., Woods, J., ... Hackman, D. A. (2005). Catherine Ulbricht, PharmD, MBA(C), Column Editor Lemon Balm

(*Melissa officinalis* L.). *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 5(4), 71–114. https://doi.org/10.1080/j157v05n04_08

Bullitta, S., Re, G. A., Manunta, M. D. I., & Piluzza, G. (2018). Traditional knowledge about plant, animal, and mineral-based remedies to treat cattle, pigs, horses, and other domestic animals in the Mediterranean island of Sardinia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0250-7>

Butterweck, V. (2003). Mechanism of Action of St John's Wort in Depression. *CNS Drugs*, 17(8), 539–562. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317080-00001>

Capatina, L., Boiangiu, R. S., Dumitru, G., Napoli, E. M., Ruberto, G., Hritcu, L., & Todirascu-Ciornea, E. (2020). Rosmarinus officinalis Essential Oil Improves Scopolamine-Induced Neurobehavioral Changes via Restoration of Cholinergic Function and Brain Antioxidant Status in Zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants*, 9(1), 62. <https://doi.org/10.3390/antiox9010062>

Carnat, A. P., Carnat, A., Fraisse, D., & Lamaison, J. L. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72(5), 301–305. [https://doi.org/10.1016/s0031-6865\(97\)00026-5](https://doi.org/10.1016/s0031-6865(97)00026-5)

Carvalho, F., Coimbra, A. T., Silva, L., Duarte, A. P., & Ferreira, S. (2023). Melissa officinalis essential oil as an antimicrobial agent against *Listeria monocytogenes* in watermelon juice. *Food Microbiology*, 109, 104105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104105>

Chaachouay, N., Azeroual, A., Bencharki, B., Douira, A., & Zidane, L. (2022). Ethnoveterinary medicinal plants for animal therapy in the Rif, North of Morocco. *South African Journal of Botany*, 147, 176–191. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.12.037>

Chalker-Scott, L., & Fuchigami, L. H. (2018). The Role of Phenolic Compounds in Plant Stress Responses. In *Low Temperature Stress Physiology in Crops* (pp. 67–80). CRC Press. Retrieved from <https://doi.org/10.1201/9781351074186-6>

Chan, K. W. K., & Ho, W. S. (2015). Anti-oxidative and hepatoprotective effects of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 34(2), 673–680. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4068>

Chen, J., Li, Y., Yu, B., Chen, D., Mao, X., Zheng, P., ... He, J. (2018). Dietary chlorogenic acid improves growth performance of weaned pigs through maintaining antioxidant capacity and intestinal digestion and absorption function. *Journal of Animal Science*, 96(3), 1108–1118. <https://doi.org/10.1093/jas/skx078>

Chiofalo, B., Riolo, E. B., Fasciana, G., Liotta, L., & Chiofalo, V. (2010). Organic management of dietary rosemary extract in dairy sheep: effects on milk quality and clotting properties. *Veterinary Research Communications*, 34(S1), 197–201. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9376-3>

- Cho, M.-S., Park, J.-W., Kim, J., & Ko, S.-J. (2023). The influence of herbal medicine on serum motilin and its effect on human and animal model: a systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1286333>
- Cobellis, G., Acuti, G., Forte, C., Menghini, L., De Vincenzi, S., Orrù, M., ... Trabalza-Marinucci, M. (2015). Use of *Rosmarinus officinalis* in sheep diet formulations: Effects on ruminal fermentation, microbial numbers and in situ degradability. *Small Ruminant Research*, 126, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.018>
- Collignon, P. J., & McEwen, S. A. (2019). One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Daniel, E. E., Kwan, C. Y., & Janssen, L. (2001). Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscles. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 45(2), 141–158. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(01\)00131-9](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(01)00131-9)
- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H. J., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.007>
- Davidović, V., Joksimović-Todorović, M., Maksimović, Z., Hristov, S., Stanković, B., & Relić, R. (2011). A REVIEW OF PLANTS USED IN ETHNOVETERINARY MEDICINE. *Macedonian Journal of Animal Science*, 1(2), 377–382. <https://doi.org/10.54865/mjas112377d>
- De Paula Vieira, A., & Anthony, R. (2020). Recalibrating Veterinary Medicine through Animal Welfare Science and Ethics for the 2020s. *Animals*, 10(4), 654. <https://doi.org/10.3390/ani10040654>
- Deane, A. M., Chapman, M. J., Reintam Blaser, A., McClave, S. A., & Emmanuel, A. (2018). Pathophysiology and Treatment of Gastrointestinal Motility Disorders in the Acutely Ill. *Nutrition in Clinical Practice*, 34(1), 23–36. <https://doi.org/10.1002/ncp.10199>
- Ding, J., Zhou, H., Luo, L., Xiao, L., Yang, K., Yang, L., ... Meng, H. (2021). Heritable Gut Microbiome Associated with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum Infection in Chickens. *mSystems*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.01192-20>
- Eglen, R. M., & Harris, G. C. (1993). Selective inactivation of muscarinic M2 and M3 receptors in guinea-pig ileum and atria in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 109(4), 946–952. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13712.x>
- Eigaard, N. M., Schou, T. W., Permin, A., Christensen, J. P., Ekstrøm, C. T., Ambrosini, F., ... Bisgaard, M. (2006). Infection and excretion of *Salmonella* Enteritidis in two different chicken lines with concurrent *Ascaridia galli* infection. *Avian Pathology*, 35(6), 487–493. <https://doi.org/10.1080/03079450601071696>

Ekiert, H., Świątkowska, J., Knut, E., Klin, P., Rzepiela, A., Tomczyk, M., & Szopa, A. (2021). *Artemisia dracunculus* (Tarragon): A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.653993>

Elfenbein, J. R., Endicott-Yazdani, T., Porwollik, S., Bogomolnaya, L. M., Cheng, P., Guo, J., ... Andrews-Polymenis, H. (2013). Novel Determinants of Intestinal Colonization of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Identified in Bovine Enteric Infection. *Infection and Immunity*, 81(11), 4311–4320. <https://doi.org/10.1128/iai.00874-13>

EMA European Medicines Agency (2013), Community herbal monograph on *Melissa officinalis* L., folium. London, UK,

Fairbrother, J. M., Nadeau, É., & Gyles, C. L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 17–39. <https://doi.org/10.1079/ahr.2005105>

Ferket P.R (2011)., Strategies for finding alternatives to growth promoters, Pages 447–460 in XXII *Latin American Poultry Congress*

Ferreira, V., Taiwo, A., Leite, F., Lucena, G., Barros, M., Silveira, D., & Silva, M. (2012). Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(2), 189. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.93846>

Fiesel, A., Gessner, D. K., Most, E., & Eder, K. (2014). Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Veterinary Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0196-5>

Fornal, C. (2001). Effects of Standardized Extracts of St. John's Wort on the Single-Unit Activity of Serotonergic Dorsal Raphe Neurons in Awake Cats Comparisons with Fluoxetine and Sertraline. *Neuropsychopharmacology*, 25(6), 858–870. [https://doi.org/10.1016/s0893-133x\(01\)00297-4](https://doi.org/10.1016/s0893-133x(01)00297-4)

Ghazizadeh, J., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., Farajdokht, F., Fakhari, A., Mahmoudi, J., ... Sadigh-Eteghad, S. (2020). *Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. *Experimental Physiology*, 105(4), 707–720. <https://doi.org/10.1113/ep088254>

Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., ... Jebb, S. A. (2018). Meat consumption, health, and the environment. *Science*, 361(6399). <https://doi.org/10.1126/science.aam5324>

Govoni, C., Chiarelli, D. D., Luciano, A., Pinotti, L., & Rulli, M. C. (2022). Global assessment of land and water resource demand for pork supply. *Environmental Research Letters*, 17(7), 074003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac74d7>

Grela, E.; Klebaniuk, R.; Kwiecien, M.; Pietrzak, K. (2013). Fitobiotyki w produkcji zwierzęcej [Phytobiotics in animal production]. *Prz. Hod.*, 3, 21–24.

H. Al Mamari, H. (2022). Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. In *Biochemistry*. IntechOpen. Retrieved from <https://doi.org/10.5772/intechopen.98958>

Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A., Hamedani, M., & Shekarchi, M. (2012). Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 37. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93316>

Heinrich M, Barnes J, Prieto-Garcia J, Gibbons S, Williamson EM, (2018) Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, 3rd Edition, Eds: *Elsevier*, 2018

Hernández-Pérez, A., Bah, M., Ibarra-Alvarado, C., Rivero-Cruz, J., Rojas-Molina, A., Rojas-Molina, J., & Cabrera-Luna, J. (2014). Aortic Relaxant Activity of *Crataegus gracilior* Phipps and Identification of Some of Its Chemical Constituents. *Molecules*, 19(12), 20962–20974. <https://doi.org/10.3390/molecules191220962>

Hess, M., Liebhart, D., Bilic, I., & Ganas, P. (2015). *Histomonas meleagridis*—New insights into an old pathogen. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.018>

Hoerr, F. J., Current, W. L., & Haynes, T. B. (1986). Fatal Cryptosporidiosis in Quail. *Avian Diseases*, 30(2), 421. <https://doi.org/10.2307/1590550>

Honda, K., Takano, Y., & Kamiya, H. (1993). Pharmacological Profiles of Muscarinic Receptors in the Longitudinal Smooth Muscle of Guinea Pig Ileum. *Japanese Journal of Pharmacology*, 62(3), 257–261. <https://doi.org/10.1254/jjp.62.257>

Jalilzadeh-Amin, G., Maham, M., Dalir-Naghadeh, B., & Kheiri, F. (2011). In vitro effects of *Artemisia dracunculus* essential oil on ruminal and abomasal smooth muscle in sheep. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1155-6>

Jeni, R. E., Dittoe, D. K., Olson, E. G., Lourenco, J., Seidel, D. S., Ricke, S. C., & Callaway, T. R. (2021). An overview of health challenges in alternative poultry production systems. *Poultry Science*, 100(7), 101173. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101173>

Jeong, D.-K., Won, G.-Y., Park, B.-K., Hur, J., You, J.-Y., Kang, S.-J., ... Lee, J. H. (2007). Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bienersi* in pigs with diarrhea. *Parasitology Research*, 102(1), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0740-3>

Jia, Q., Li, L., Wang, X., Wang, Y., Jiang, K., Yang, K., ... Ling, J. (2022). Hesperidin promotes gastric motility in rats with functional dyspepsia by regulating Drp1-mediated ICC mitophagy. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.945624>

Jin, S.-H., Corless, A., & Sell, J. L. (1998). Digestive system development in post-hatch poultry. *World's Poultry Science Journal*, 54(4), 335–345. <https://doi.org/10.1079/wps19980023>

Jin, X., Liu, P., Yang, F., Zhang, Y., & Miao, D. (2013). Rosmarinic Acid Ameliorates Depressive-Like Behaviors in a Rat Model of CUS and Up-Regulates BDNF Levels in the Hippocampus and Hippocampal-Derived Astrocytes. *Neurochemical Research*, 38(9), 1828–1837. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1088-y>

Katerere DR, Luseba D, (2010) Ethnoveterinary Botanical Medicine: Herbal Medicines for Animal Health, Eds. *CRC Press*

Kennedy, D. O., Wake, G., Savelev, S., Tildesley, N. T. J., Perry, E. K., Wesnes, K. A., & Scholey, A. B. (2003). Modulation of Mood and Cognitive Performance Following Acute Administration of Single Doses of Melissa Officinalis (Lemon Balm) with Human CNS Nicotinic and Muscarinic Receptor-Binding Properties. *Neuropsychopharmacology*, 28(10), 1871–1881. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300230>

Komarov, V. L., (1963). Flora of the USSR. Flora of the USSR XXI. *Keter publishing House Jerusalem Ltd.*

Kovsca Janjatovic, A., Valpotic, H., Kezic, D., Lacković, G., Gregorovic, G., Sladoljev, S., ... Valpotic, I. (2012). Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development. *European Journal of Histochemistry*, 56(3), 30. <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.e30>

Kucera, L. S., & Herrmann, E. C. (1967). Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae). I. Tannin of Melissa officinalis. *Experimental Biology and Medicine*, 124(3), 865–869. <https://doi.org/10.3181/00379727-124-31872>

Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>

Kumar, S., Abedin, Md. M., Singh, A. K., & Das, S. (2020). Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. In *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* (pp. 517–532). Singapore: Springer Singapore. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22

Kuralkar, P., & Kuralkar, S. V. (2021). Role of herbal products in animal production – An updated review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114246. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114246>

Lans, C., Turner, N., Khan, T., Brauer, G., & Boepple, W. (2007). Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-11>

- Lee, B., Bello-Pérez, L. A., Lin, A. H., Kim, C. Y., & Hamaker, B. R. (2013). Importance of Location of Digestion and Colonic Fermentation of Starch Related to Its Quality. *Cereal Chemistry*, 90(4), 335–343. <https://doi.org/10.1094/cchem-05-13-0095-fi>
- Li, Z. S., Young, H. M., & Furness, J. B. (1994). Nitric oxide synthase in neurons of the gastrointestinal tract of an avian species, *Coturnix coturnix*. *Journal of anatomy*, 184(Pt 2), 261.
- Li, G., Wang, X., Xu, Y., Zhang, B., & Xia, X. (2013). Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. *European Food Research and Technology*, 238(4), 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2140-5>
- Lin, S., Kajimura, M., Takeuchi, K., Kodaira, M., Hanai, H., & Kaneko, E. (1997). Expression of Muscarinic Receptor Subtypes (Effect of M3 Selective Antagonist on Gastric Motility and in Rat Gastric Smooth Muscle Emptying). *Digestive Diseases and Sciences*, 42(5), 907–914. <https://doi.org/10.1023/a:1018808329603>
- Lobach, A. R., Schmidt, F., Fedrizzi, D., & Müller, S. (2024). Toxicological safety evaluation of an aqueous lemon balm (*Melissa officinalis*) extract. *Food and Chemical Toxicology*, 187, 114565. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114565>
- Low, M. J. (2012). Mouse Models in Gastroenterology Research. *Gastroenterology*, 143(6), 1410–1412. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.011>
- Lumpert, M., & Kreft, S. (2017). Folk use of medicinal plants in Karst and Gorjanci, Slovenia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0144-0>
- Luppi, A., D’Annunzio, G., Torreggiani, C., & Martelli, P. (2023). Diagnostic Approach to Enteric Disorders in Pigs. *Animals*, 13(3), 338. <https://doi.org/10.3390/ani13030338>
- Lyte, J. M., Martinez, D. A., Robinson, K., Donoghue, A. M., Daniels, K. M., & Lyte, M. (2022). A neurochemical biogeography of the broiler chicken intestinal tract. *Poultry Science*, 101(3), 101671. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101671>
- Mahu, M., De Pauw, N., Vande Maele, L., Verlinden, M., Boyen, F., Ducatelle, R., ... Pasmans, F. (2016). Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Veterinary Research*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0353-x>
- Martel, J., Chang, S.-H., Ko, Y.-F., Hwang, T.-L., Young, J. D., & Ojcius, D. M. (2022). Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 33(4), 247–265. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.01.002>
- Martinez, V., Jimenez, M., Gonalons, E., & Vergara, P. (1993). Mechanism of action of CCK in avian gastroduodenal motility: evidence for nitric oxide involvement. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 265(5), G842–G850. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1993.265.5.g842>

- Maruccio, L., Lucini, C., Russo, F., Antonucci, R., & Castaldo, L. (2008). The development of avian enteric nervous system: Distribution of artemin immunoreactivity. *Acta Histochemica*, 110(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.10.001>
- McAnally, R. A., & Phillipson, A. T. (1944). DIGESTION IN THE RUMINANT. *Biological Reviews*, 19(2), 41–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1944.tb00301.x>
- McDougald, L. R. (1998). Intestinal protozoa important to poultry. *Poultry Science*, 77(8), 1156–1158. <https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1156>
- McFadzean, I., & Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704468>
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., & Aquino, R. (2007). Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products*, 70(12), 1889–1894. <https://doi.org/10.1021/np070351s>
- Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Karlik, W. (2015). The utility of bovine isolated abomasum strips as an alternative experimental model. *Toxicology Letters*, 238(2), S321. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.916>
- Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., Sobczak-Filipiak, M., Bielecki, W., & Karlik, W. (2016a). Bovine isolated abomasum specimens-a useful tool in preclinical in vitro studies. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Sciences*, 2(1).
- Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Karlik, W. (2016b). Modification of abomasum contractility by flavonoids present in ruminants' diet: in vitro study. *Animal*, 10(9), 1431–1438. <https://doi.org/10.1017/s1751731116000513>
- Mendel, Marta, Chłopecka, M., Dziekan, N., & Karlik, W. (2016c). The effect of alfalfa saponins on the contractility of bovine isolated abomasum and duodenum preparations. *Livestock Science*, 188, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.017>
- Michel, A. D., & Whiting, R. L. (1988). Methoctramine reveals heterogeneity of M2 muscarinic receptors in longitudinal ileal smooth muscle membranes. *European Journal of Pharmacology*, 145(3), 305–311. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90434-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90434-7)
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., & Simin, N. (2004). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2485–2489. <https://doi.org/10.1021/jf030698a>
- Miraj, S., Rafieian-Kopaei, & Kiani, S. (2016). *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(3), 385–394. <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>
- Mohammadabadi, M. R. (2017). ROLE OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN PATHOGENICITY OF SOME DOMESTIC ANIMALS. *JOURNAL OF ADVANCES IN AGRICULTURE*, 7(3), 1117–1121. <https://doi.org/10.24297/jaa.v7i3.6325>

Moran, E. T. (1982). *Comparative Nutrition of Fowl & Swine: The Gastrointestinal Systems*. Guelph, Ont.: E.T. Moran: Office for Educational Practice, University of Guelph.

Moran, E. T., Jr., & Bedford, M. R. (2022). Large intestinal dynamics differ between fowl and swine: Anatomical modifications, microbial collaboration, and digestive advantages from fibrolytic enzymes. *Animal Nutrition*, 11, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.07.004>

Mordenti, J. (1986). Dosage Regimen Design for Pharmaceutical Studies Conducted in Animals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(9), 852–857. <https://doi.org/10.1002/jps.2600750906>

Moritz, R., & Aboling, S. (2024). Incidence of Photosensitization in Husbandry Animals: A Meta-Study on the Effects of Feed Diversity and Feed Choice. *Agriculture*, 14(7), 1137. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071137>

Muñoz, V., Ma, T., Li, Y., Rasmussen, P., & Torgerson, P. (2024). *Global and Regional Prediction of Coccidiosis and Ascaridiosis Prevalence in Extensive Backyard Chickens in Low-Income and Middle-Income Countries*. Elsevier BV. Retrieved from Elsevier BV website: <https://doi.org/10.2139/ssrn.4857948>

Myers, M. J., Howard, K. D., & Kawalek, J. C. (2020). Pharmacokinetic comparison of six anthelmintics in sheep, goats, and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(1), 58–67. <https://doi.org/10.1111/jvp.12897>

Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., ... XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>

Newton, P., & Blaustein-Rejto, D. (2021). Social and Economic Opportunities and Challenges of Plant-Based and Cultured Meat for Rural Producers in the US. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.624270>

Nighot, M., & Nighot, P. (2018). Pathophysiology of avian intestinal ion transport. *World's Poultry Science Journal*, 74(2), 347–360. <https://doi.org/10.1017/s004393391800003x>

Patterson, J. K., Lei, X. G., & Miller, D. D. (2008). The Pig as an Experimental Model for Elucidating the Mechanisms Governing Dietary Influence on Mineral Absorption. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 651–664. <https://doi.org/10.3181/0709-mr-262>

Penker, M. (2024). Emerging Policies and Contradictions in the EU: A Fair, Healthy and Environmentally Friendly Food System by 2030. *Journal of Rural Problems*, 60(1), 41–48. <https://doi.org/10.7310/arfe.60.41>

Pineau, S., Legros, C., & Mattei, C. (2016). The Medical use of Lemon Balm (*Melissa officinalis*) and Valerian (*Valeriana officinalis*) as Natural Sedatives: Insight into their

Interactions with GABA Transmission. *International Journal of Clinical Pharmacology & Pharmacotherapy*, 1(2). <https://doi.org/10.15344/2456-3501/2016/112>

Pinilla, J. C., Morales, E., Delgado, N. U., & Florez, A. A. (2020). Prevalence and risk factors of gastrointestinal parasites in backyard pigs reared in the Bucaramanga Metropolitan Area, Colombia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29(4). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020094>

Pluske, J. R. (2016). Invited review: Aspects of gastrointestinal tract growth and maturation in the pre- and postweaning period of pigs. *Journal of Animal Science*, 94(suppl_3), 399–411. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9767>

Posłuszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., Benarbia, M. el A., & Mendel, M. (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study. *Poultry Science*, 102(11), 103045. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103045>

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabria, M. E. A., & Mendel, M. (2025a). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, Vol. 82 No. 2 pp. 291-303, 2025, DOI: 10.32383/appdr/207551

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benarbia, M. el A., & Mendel, M. (2025b). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—Ex Vivo Study. *Animals*, 15(5), 626. <https://doi.org/10.3390/ani15050626>

Preiksaitis, H. G., & Laurier, L. G. (1998). Pharmacological and Molecular Characterization of Muscarinic Receptors in Cat Esophageal Smooth Muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2), 853–861. [https://doi.org/10.1016/s0022-3565\(24\)37456-7](https://doi.org/10.1016/s0022-3565(24)37456-7)

Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., ... Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715–6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>

Rabee, A. E., El Shereef, A. A., Nassar, M. S., El-Rayes, M. A. H., Mohammed, R. S., & Bakr, S. A. (2025). Effect of garlic powder supplementation on rumen microbiota and histology, and blood metabolites in Barki lambs. *BMC Veterinary Research*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04521-5>

Radkowska I., (2013) Wykorzystanie ziół i fitogenicznych dodatków paszowych w żywieniu zwierząt gospodarskich, *Wiadomości Zootechniczne*, R. LI, 4: 117–124

Rafieian-Kopaei, M., & Nasri, H. (2013). Re: Erythropoietin Ameliorates Oxidative Stress and Tissue Injury following Renal Ischemia/Reperfusion in Rat Kidney and Lung. *Medical Principles and Practice*, 23(1), 95–95. <https://doi.org/10.1159/000350842>

Rahbardar, M. G., & Hosseinzadeh, H. (2020). Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(9), 1100–1112. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.45269.10541>

Rayner, V., & Wenham, G. (1986). Small intestinal motility and transit by electromyography and radiology in the fasted and fed pig. *The Journal of Physiology*, 379(1), 245–256. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016251>

Regulation of the pean Parliament and of the Council (EC) 1831/2003 of September 22, 2003 on additives for use in animal nutrition.

Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., & Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>

Rotblatt, M. (2000). Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. *Annals of Internal Medicine*, 133(6), 487. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-133-6-200009190-00031>

Ruhnke, I., Andronicos, N. M., Swick, R. A., Hine, B., Sharma, N., Kheravii, S. K., ... Hunt, P. (2017). Immune responses following experimental infection with *Ascaridia galli* and necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathology*, 46(6), 602–609. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1330536>

Saeb, K., & Gholamrezaee, S. (2012). Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S547–S549. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60271-8](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60271-8)

Safaeian, L., Sajjadi, S., Javanmard, S., Montazeri, H., & Samani, F. (2016). Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H₂O₂-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(5), 383. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.192488>

Salgado, B., Monteiro, L., & Rocha, N. (2011). *Allium* species poisoning in dogs and cats. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(1), 4–11. <https://doi.org/10.1590/s1678-91992011000100002>

Samuelsson, G., & Bohlin, L. (2009). *Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy*.

Schefer, S., Oest, M., & Rohn, S. (2021). Interactions between Phenolic Acids, Proteins, and Carbohydrates—Influence on Dough and Bread Properties. *Foods*, 10(11), 2798. <https://doi.org/10.3390/foods10112798>

Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A., & Reichling, J. (2008). *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15(9), 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.04.018>

Schulz, V., Hänsel, R., & Tyler, V. E. (2012). *Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine*. Springer Science & Business Media.

Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>

Sentkowska, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2014). Polyphenolic Composition and Antioxidative Properties of Lemon Balm (*Melissa officinalis*L.) Extract Affected by Different Brewing Processes. *International Journal of Food Properties*, 18(9), 2009–2014. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.960932>

Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>

Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Akram, M., Abbaass, W., Semwal, P., ... Calina, D. (2021). [Retracted] Phytochemical Constituents, Biological Activities, and Health-Promoting Effects of the *Melissa officinalis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1). <https://doi.org/10.1155/2021/6584693>

Shi, X., & Sarna, S. (1997). Inflammatory modulation of muscarinic receptor activation in canine ileal circular muscle cells. *Gastroenterology*, 112(3), 864–874. <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v112.pm9041248>

Shrestha, A., Abd-Elfattah, A., Freudenschuss, B., Hinney, B., Palmieri, N., Ruttkowski, B., & Joachim, A. (2015). *Cystoisospora suis* – A Model of Mammalian Cystoisosporosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00068>

Sodi, I., Martini, M., Salari, F., & Perrucci, S. (2023). Gastrointestinal Parasite Infections and Environmental Sustainability of the Ovine Sector: *Eimeria* spp. Infections and Nitrogen and Phosphorus Excretions in Dairy Sheep in Italy. *Pathogens*, 12(12), 1459. <https://doi.org/10.3390/pathogens12121459>

Stebbing, J. F., Brading, A. F., & Mortensen, N. J. M. (1995). Nitroergic inhibitory innervation of porcine rectal circular smooth muscle. *Journal of British Surgery*, 82(9), 1183–1187. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800820911>

Suguro, M., Matsuyama, H., Tanahashi, Y., Unno, T., Kitazawa, T., Yamada, M., & Komori, S. (2010). Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Ca²⁺ Sensitization of Intestinal Smooth Muscle Contraction: Studies with Receptor Knockout Mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(4), 443–451. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0458>

Szadkowska, D., Chłopecka, M., Strawa, J. W., Jakimiuk, K., Augustynowicz, D., Tomczyk, M., & Mendel, M. (2023). Effects of *Cirsium palustre* Extracts and Their Main Flavonoids on Colon Motility—An Ex Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17283. <https://doi.org/10.3390/ijms242417283>

Tang, Z., Wang, Y., & Huang, Y. (2022). Astragalus polysaccharide inhibits apoptosis and inflammation to alleviate chronic atrophic gastritis through NF-κB signaling pathway in rats. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.121921>

Świąder K., Wijaya C.H., Startek K., (2019) The therapeutic properties of lemon balm (*Melissa officinalis* L.): reviewing novel findings and medical indications, *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 92, pp. 327-335

Thamsborg, S. M., Ketzis, J., Horii, Y., & Matthews, J. B. (2016). Strongyloidesspp. infections of veterinary importance. *Parasitology*, 144(3), 274–284. <https://doi.org/10.1017/s0031182016001116>

Theodoridis, A., Vouraki, S., Morin, E., Rupérez, L. R., Davis, C., & Arsenos, G. (2021). Efficiency Analysis as a Tool for Revealing Best Practices and Innovations: The Case of the Sheep Meat Sector in Europe. *Animals*, 11(11), 3242. <https://doi.org/10.3390/ani11113242>

Tian, C., Liu, X., Chang, Y., Wang, R., Lv, T., Cui, C., & Liu, M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal of Botany*, 137, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022>

Tobin, G., Giglio, D., & Lundgren, O. (2009). Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *Acta physiologica Polonica*, 60(1), 3.

Törnqvist, E., Annas, A., Granath, B., Jalkestén, E., Cotgreave, I., & Öberg, M. (2014). Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing. *PLoS ONE*, 9(7), e101638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101638>

Uchiyama, T., & Chess-Williams, R. (2004). Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *Journal of Smooth Muscle Research*, 40(6), 237–247. <https://doi.org/10.1540/jsmr.40.237>

Ukelis, U., Kramer, P.-J., Olejniczak, K., & Mueller, S. O. (2008). Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(1), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.02.002>

Uzal, F. A., & Songer, J. G. (2008). Diagnosis of *Clostridium Perfringens* Intestinal Infections in Sheep and Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(3), 253–265. <https://doi.org/10.1177/104063870802000301>

Veiskaramian, A., Gholami, M., Yarahmadi, S., Amanolahi Baharvand, P., & Birjandi, M. (2021). Effect of aromatherapy with Melissa essential oil on stress and hemodynamic parameters in acute coronary syndrome patients: A clinical trial in the emergency department. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 44, 101436. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101436>

Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., & Namasivayam, N. (2016). Biochemical and molecular mechanisms underlying the chemopreventive efficacy of rosmarinic acid in a

rat colon cancer. *European Journal of Pharmacology*, 791, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.051>

Wardrop, I., & Coombe, J. (1961). The development of rumen function in the lamb. *Australian Journal of Agricultural Research*, 12(4), 661. <https://doi.org/10.1071/ar9610661>

Wedah, H.A.; Mohamed, A.S.; Al-Yassiri, A.J (2020). Effect of Added Different Levels of Melissa Leaves Powder to Diet on Some Productive Traits of Arabi Sheep. *Plant Arch.*, 20, 543–545.

Weyns, A. A. L. M. (1988). The enteric nervous system in the ruminant stomach of the sheep (*Ovis aries*).

Wicha, P., Tocharus, J., Nakaew, A., Pantan, R., Suksamrarn, A., & Tocharus, C. (2015). Ethyl rosmarinate relaxes rat aorta by an endothelium-independent pathway. *European Journal of Pharmacology*, 766, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.003>

Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry1. *Journal of Animal Science*, 86(suppl_14), E140–E148. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0459>

World Health Organization, (2019) WHO global report on traditional and complementary medicine

Wu, L., Jin, X., Zheng, C., Ma, F., Zhang, X., Gao, P., ... Zhang, L. (2023). Bidirectional Effects of Mao Jian Green Tea and Its Flavonoid Glycosides on Gastrointestinal Motility. *Foods*, 12(4), 854. <https://doi.org/10.3390/foods12040854>

Wynn, S. G., & Fougère, B. J. (2007). Veterinary Herbal Medicine: A Systems-Based Approach. In *Veterinary Herbal Medicine* (pp. 291–409). Elsevier. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-02998-8.50024-x>

Xie, K., Sun, Y., Deng, L., Yu, B., Luo, Y., Huang, Z., ... He, J. (2023). Effects of Dietary Chlorogenic Acid Supplementation on Growth Performance, Meat Quality, and Muscle Flavor Substances in Finishing Pigs. *Foods*, 12(16), 3047. <https://doi.org/10.3390/foods12163047>

Yamato, O., Kasai, E., Katsura, T., Takahashi, S., Shiota, T., Tajima, M., ... Maede, Y. (2005). Heinz Body Hemolytic Anemia With Eccentrocytosis from Ingestion of Chinese Chive (*Allium tuberosum*) and Garlic (*Allium sativum*) in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(1), 68–73. <https://doi.org/10.5326/0410068>

Yoo, H. G., Lee, B. H., Kim, W., Lee, J. S., Kim, G. H., Chun, O. K., ... Kim, D.-O. (2014). Lithospermum erythrorhizon Extract Protects Keratinocytes and Fibroblasts Against Oxidative Stress. *Journal of Medicinal Food*, 17(11), 1189–1196. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.3088>

Yu, C., Chen, D., Liu, H., Li, W., Lu, J., & Feng, J. (2019). Rosmarinic acid reduces the resistance of gastric carcinoma cells to 5-fluorouracil by downregulating FOXO4-

targeting miR-6785-5p. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2327–2334. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.061>

Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., Taheri, S., & Hosseini, N. (2015). A Brief Overview of the Effects of *Melissa officinalis* L. Extract on the Function of Various Body Organs. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(7). <https://doi.org/10.17795/zjrms1007>

Zhang, Q., Gong, J., Xiang, H., Hu, R., Yang, X., Lv, J., ... Wu, S. (2023). Effects of main active components of rosemary on growth performance, meat quality and lipid metabolism in finishing pigs. *Animal Nutrition*, 15, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.05.015>

Zhu, J., Tong, H., Ye, X., Zhang, J., Huang, Y., Yang, M., ... Gong, Q. (2020). The Effects of Low-Dose and High-Dose Decoctions of *Fructus aurantii* in a Rat Model of Functional Dyspepsia. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/msm.919815>

Ziegler, A., Gonzalez, L., & Blikslager, A. (2016). Large Animal Models: The Key to Translational Discovery in Digestive Disease Research. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(6), 716–724. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.09.003>

8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu

Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study

Martyna A. Pośluszný ^{*}, Magdalena Chłopecka^{*}, Sorphon Suor-Cherer[†], Sekhou Cisse ^{‡,†},
Mohamed el Amine Benarbia ^{‡,†} and Marta Mendel ^{†,*}

^{*}Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Warsaw, Poland; [†]Nor-Feed SAS, 49070 Beaucouzé, France; and [‡]FeedIntech, 49070 Beaucouzé, France

ABSTRACT *Melissa officinalis* (lemon balm) has a long history of being used in traditional medicine for the treatment of gastrointestinal tract disorders in human thanks to its spasmolytic and stress reducing effects. These pharmacological properties have been confirmed in laboratory animals. Unfortunately, in the case of veterinary medicine, the effect of lemon balm on gut contractility has been never subjected to a detailed investigation. On the other hand, there is urgent need of new drugs that could be safely used in animals for both, causative and symptomatic treatment. In broiler chicken, one of the major health concerns includes gastrointestinal disorders with gut hypermotility. Thus, it is crucial to verify the potential utility of *Melissa officinalis* extract in gastrointestinal dysmotilities. The aim of the study was to analyze the effect of lemon balm extract and some of its active ingredients on chicken intestine motility. The study was performed on isolated proximal and distal jejunum preparations collected from broiler chicken which underwent routine slaughter procedure. The effect of lemon balm and 3 phenolic acids

(rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic) was verified under isometric conditions, toward spontaneous and acetylcholine (ACh)-induced smooth muscle activity. Surprisingly, *M. officinalis* turned out to be rather a myocontractile agent as it increased ACh-provoked contractility of proximal and distal jejunum strips and also intensified the spontaneous activity of distal jejunum. Only in the case of proximal intestine lemon balm extract diminished the force of spontaneous motoric activity up to approx. Sixty-seven percent of the control conditions. None of the tested phenolic acids displayed analog effect with the whole plant extract. In fact in the case of ACh-induced contractility, the acids had the opposite, that is, myorelaxant, effect than the extract, with a small exception of lithospermic acid in distal jejunum. Thus, it is impossible to assign one or more individual constituents to the effect of the whole *Melissa officinalis* extract. The obtained results do not support the use of lemon balm extract in broiler diseases which are accompanied by gut motility disturbances, including diarrhea.

Key words: broiler, intestine, contractility, *Melissa officinalis*, rosmarinic acid

2023 Poultry Science 102:103045
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103045>

INTRODUCTION

Melissa officinalis (lemon balm) has a long history of being used in traditional medicine for the treatment of gastrointestinal (GI) tract disorders in human thanks to its spasmolytic (Aubert et al., 2019; Sharifi-Rad et al., 2021) and stress reducing effects (Nasri and Rafieian-Kopaei, 2013; Pineau et al., 2016; Frag et al., 2023). Additionally, in the combination with valerian, lemon balm is effective in the treatment of restlessness and

dyssomnia in children (Müller and Klement, 2006). It is documented that *Melissa officinalis* has sedative, antipyretic, antispasmodic, antihypertensive, anti-Alzheimer, and antiseptic effects (Zarei et al., 2015; Shakeri et al., 2016; Miraj et al., 2017; Świąder et al., 2019; Sharifi-Rad et al., 2021; Carvalho et al., 2023). Significant antimicrobial properties of the aerial parts of *M. officinalis* are confirmed primarily against gram-positive bacteria and yeasts (Abdel-Naime et al., 2019). It has been also proven that lemon balm can be useful in the fight against COVID-19 (Prasanth et al., 2021). Vasorelaxant effects of *Melissa officinalis* extract with rosmarinic acid as the most abundant constituent was confirmed toward isolated thoracic aortic rings (Ersoy et al., 2008). In clinical trials with infants, lemon balm, as a component of a herbal medicine containing standardized extracts of *Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare*, and *Melissa*

© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Received March 14, 2023.

Accepted August 15, 2023.

¹Corresponding author: marta_mendel@sggw.edu.pl

officinalis, has proven to be effective as a medicine that relieves colic-related symptoms (Savino et al., 2005). *Melissa* was also shown to be a very potent antidepressant agent. A study of Araj-Khodaei et al. (2020) demonstrated that the plant had an equal effect as fluoxetine which is a popular anti-depressant from the group of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). According to Emamghoreishi and Talebianpour (2015), the antidepressant-like activity of lemon balm was compared to imipramine (a tertiary amine tricyclic antidepressant) and may have a potential clinical value for the treatment of depression. The observation of the effect of *Melissa officinalis* essential oil on trauma revealed its ability to reduce edema proving its potential anti-inflammatory activities. This assumption is in compliance with the traditional application of the plant in various diseases associated with inflammation and pain (Bounihi et al., 2013). Similarly to human medicine, there is also strong evidence for ethnoveterinary use of *Melissa officinalis* (Lans et al., 2007). Herbs, including *Melissa officinalis*, show prebiotic effects and supports the immunity of the whole body (Radkowska, 2013; Shakeri et al., 2016). Mind these pharmacological activities, *Melissa officinalis*, as in the case of many other medicinal plants (MPs), offer an interesting alternative to standard medicines, especially antimicrobials (Abdelatif et al., 2014; Abdel-Naime et al., 2019; Sharifi-Rad et al., 2021). Besides, as a highly palatable herb for animals, lemon balm may lead to increased nutrient intake (Windisch et al., 2008). The safety of a commercial dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves (Nor-Balm) as a feed additive was confirmed for all animal species (EFSA et al., 2020). The introduction of phytogenic feed additives is also in line with the popularity of the organic farming system which is increasing with consumers' awareness (Poultry, 2023).

Noteworthy, gastrointestinal disorders might pose a serious threat both to the welfare of the animal and economic losses for the farmer. Furthermore, GI disorders affecting motility are important for digestion and nutrient uptake, as well as for gut microbiome homeostasis (Ferket, 2011; Lee et al., 2013; Sensoy, 2021). In poultry, many infectious agents, mainly *Salmonella enterica* (Ding et al., 2021) and parasites: coccidia, nematodes, or roundworms but also diseases like bursal disease, directly affect intestinal transit (Hoerr et al., 1986; McDougald Larry, 1998; El Jeni et al., 2021; Bindari and Gerber, 2022). Motility disorders are often chronic and require causative and symptomatic medication over a long period of time. Thus, substances of high efficacy and safety, as well as no withdrawal period are of interest. Consequently, there is a constant need to search for new, effective, and inexpensive tools to react on or prevent gastrointestinal disturbances. Of note, herbal remedies and feed additives are very welcomed by modern societies (Radkowska, 2013). Plant extracts are promising candidates for products bringing relief to patients with functional GI diseases both as a symptomatic medication and as a feed additive for long-term consumption. To address the expectations of consumers and farmers, a

study aimed at the verification of the utility of standardized *Melissa officinalis* extract (Nor-balm) and its main active substances from the group of phenolic acids, that is, rosmarinic acid, chlorogenic acid, and lithospermic acid (EFSA et al., 2020) to control GI contractility was carried out on an alternative model of isolated chicken intestine.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Modified Krebs-Henseleit solution (M K-HS) was used as an incubation medium. This solution contained 123.76 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.156 mM MgSO₄, 14.5 mM NaHCO₃, 2.75 mM KH₂PO₄, and 12.5 mM glucose, all purchased from Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland. The pH of M K-HS was maintained at 7.35 to 7.45 through the whole experiment, with addition of carbogen (95% O₂/5% CO₂). Temperature conditions were set to 38°C. Acetylcholine chloride (ACh) and isoproterenol hemisulfate salt (Isop) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) were used as a myocontractile and myorelaxant reference agents, respectively.

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaf extract (Nor-balm) was produced and standardized on the content of rosmarinic acid (EFSA et al., 2020) by the company Nor-Feed. The main active substances of lemon balm from the group of phenolic acids are rosmarinic acid (RA) (Sigma-Aldrich, Bratislava, Slovakia), lithospermic acid (LA) (PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Germany), and chlorogenic acid (ChA) (Sigma-Aldrich, Chengdu, China) (Carocho et al., 2015; EFSA et al., 2020). The extract was tested over a range of concentrations: 0.1 µg/mL to 0.1 mg/mL, whereas the active ingredients were evaluated in the concentration range of 0.001 to 100 µM. In case of rosmarinic the range of tested concentrations reflects the concentrations of Nor-balm of 1 µg/mL and higher. The other acids were examined at the concentrations higher than those found in the extract. However, all active ingredients were evaluated at the same range of doses to compare the effect between each other. The stock solutions and serial dilutions of the extract were prepared in the incubation medium, RA, ChA and LA were first dissolved in dimethyl sulfoxide—DMSO (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). Further dilutions were made in distilled water. The final concentration of DMSO in the tissue incubation chambers never exceeded 0.5%.

All solvents used in high-performance liquid chromatography (HPLC) were of HPLC grade. Methanol and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water from a Millipore Milli-Q water system was used to prepare mobile chromatographic phases. Analytical standards which were used to confirm MEO active compounds identification (chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic

acid) were purchased from Extrasynthese (Genay, France).

Lemon Balm Leaf Extract Characterization

Sample Preparation Lemon balm leaf extract was weighed (50 mg) and solubilized in 1 mL of methanol. After 5 min of sonication bath (S30H, Elmasonic, Singen, Germany), the mixture was centrifuged for 10 min at $13,000 \times g$ and the supernatant has been recovered for HPLC-MSn analysis and HPLC-UV analysis.

High-Performances Liquid Chromatography Analysis HPLC-UV analysis (Waters Separations Module 2695 equipped with a Waters dual-wavelength UV/Visible Detector 2489) were performed following the methodology employed by Dastmalchi et al. (2008) and using a Zorbax SB-C18 analytical column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m). Each analysis has been performed on 5 different batches of lemon balm leaf extract. The injection volume was 10 μ L. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) of formic acid in deionized water (A) and 0.1% (v/v) of formic acid in acetonitrile (B) at a flow rate of 1 mL/min. The initial condition was 10% (B), and 90% (A). A gradient program was performed as follows: 10 to 35% B in 20 min, constant 3% B for 3 min, 35 to 100% B in 3 min, and constant 100% B for 1 min before returning to initial condition for 1 min. The objective here was to determine the HPLC-UV profile of lemon balm leaf extract hydroxycinnamic acids and confirm the identification of its active compounds via the comparison of their retention times to those of authentic standards under identical analysis conditions and by comparison of their UV spectra with the profile of each lemon balm leaf extract peak. As all authentic standards of hydroxycinnamic acids were not available, HPLC-MSⁿ analysis was performed in parallel to complete the identification of lemon balm leaf extract hydroxycinnamic acids. Analyses was performed on a 2695 HPLC module coupled to a 2489 UV/Visible Detector (Waters, Saint-Quentin en Yveline, France) and an Esquire 3000 plus mass spectrometer (Bruker, Wissembourg, France), following the same HPLC conditions as described in HPLC-UV part. Metabolites were identified using both positive and negative ionization modes. The ion source temperature was maintained at 340°C. A full scan was carried out within the m/z range of 50 to 1,500 using a collision energy of 1 V. Spectral data were analyzed using DataAnalysis software (Bruker). Identification of lemon balm leaf extract compounds was carried out by comparing HPLC-MSn analysis data of each compound detected with those reported in literature data, especially via the SciFinder database (American Chemical Society—SciFinder. Available online: <http://sciFinder-n.cas.org/>).

Quantification of Lemon Balm Leaf Extract Hydroxycinnamic Acids Different concentrations of rosmarinic acid (0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, and 0.0125 mg/mL) were prepared and analyzed following the same methodology as described in HPLC-UV part. The area under the curve has been monitored for each concentration

and the calibration curve has been done by plotting the absorbance (A_{280 nm}) as a function of the area under the curve. Then, a 60 mg of lemon balm leaf extract were prepared and analyzed following the same methodology as described in HPLC-UV part. The area under the curve has been monitored for each active compound identified in lemon balm leaf extract. Then, the compounds were quantified using the calibration curve prepared just before. The concentration of each compound was determined following the formula below:

$$C = \frac{\text{area under curve} - b}{a}$$

With:

B = intercept of the calibration curve.

A = slope of the calibration curve.

Results are expressed in rosmarinic acid equivalent.

Isolation and Preparation of Isolated Intestines Strips

The intestine specimens were collected from routinely slaughtered Ross breed chickens (*Gallus gallus domesticus*) which had undergone ante- and postmortem inspection by the official veterinarian. The chickens were 35- to 45-days old at the time of slaughtering. The specimens were collected from at least 5 different chickens, both proximally and distally to Meckel's diverticulum. Immediately after collection, intestines were flushed to evacuate the gut content and placed in ice-cold M K-HS. The tissues were kept on ice until the time of dissection, which occurred maximally 1 h after slaughter (transportation time). In the laboratory, each intestine piece was opened and sections of about 5 $\times$ 20 mm in size were cut parallel to the longitudinal smooth muscle fibers. Only intestine samples with no visible pathological changes on the mucosa and serosa were used for the experiments.

Data Registration, Expression, and Statistical Analysis

Each intestine strip was suspended separately in the individual chamber of a set for isolated tissue incubation (Schuler Organ Bath, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) The slices were proximally connected to an isometric force transducer (F30, type 372, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) and distally to a hook fixed on a tissue holder. During the experiment the reactivity of the specimens was measured as changes in tension. The registered signal was converted by a bridge amplifier (DBA, type 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany), and then by an analogue-digital registration set (PowerLab, ADInstruments, Sydney, Australia). The motor activity of the samples was recorded and visualized by Chart v7.0 program (ADInstruments, Sydney, Australia). Data analysis was performed by using Chart v8.1. program and Microsoft Office Excel.

The effect of all the examined substances and the extract was based on changes in the smooth muscle strips' tension measured 5 min before and 5 min after the application of any substance and calculated as AUC (area under the curve). All results are expressed as percentage of the control reaction, that is, intestine response to M K-HS or DMSO (0.5%) treatment in case of spontaneous activity analysis and smooth muscle contraction caused by ACh (10 μ M) added at the beginning of the experiment in case of reactivity analysis. The reaction induced by M K-HS, DMSO (0.5%) and acetylcholine in the reference dose were defined as 100% (control). The results are presented as the mean values of 5 to 6 independent experiments. One-way ANOVA was conducted using TIBCO StatSoft, Inc. (2019), STATISTICA (data analysis software system), version 13.3 www.statsoft.com. Dunnett test was used for pairwise comparison using the effect of M K-HS, DMSO (0.5%) or ACh (10 μ M) dissolved in DMSO (0.5%) as a reference. *P* value of <0.05 was considered significant.

The Course of Experiments

To allow the tissue to adapt to the in vitro conditions, the strips were preincubated before each experiment for 45 min in M K-HS at 38°C with no added tension. In order to provide the tissues with a sufficient amount of nutrients the chambers were flushed with fresh, warm M K-HS every 10 to 15 min. The stabilization of pH and oxygen supply for the tissue was ensured by continuous gassing with carbogen. After the initial incubation, a slight load corresponding to tissue size (0.01 N tension) was applied twice, 15 min apart. Upon the end of the preincubation, the activity of intestinal muscle was checked by adding ACh (1 μ M) at least twice. Only the strips that reacted to ACh properly and repeatedly, as well as exhibited clear spontaneous contractility were included in the subsequent experiment. Before the beginning of the experiment, the solvent of the test substance was administered, that is, M K-HS for the lemon balm extract and DMSO (0.5%) for all 3 acids (negative control). After buffer exchange the strips were challenged with ACh (10 μ M) and motor activity was recorded for 3 to 5 min. After the medium was flushed and the spontaneous work stabilized either the extract or one of the active ingredients was added, the response was observed for 5 min and next ACh (10 μ M) was applied. Five minutes later the buffer was exchanged and the treatment with the tested substance at the higher concentration was proceeded. Consequently, the effect of the extract and 3 acids toward spontaneous and ACh-provoked contractility was assessed in a noncumulative manner. At the end of the experiment, ACh and Isop were administered to verify intestine reactivity and vitality.

RESULTS

Lemon Balm Leaf Extract Characterization

Lemon balm leaf extract hydroxycinnamic content has been quantified by HPLC-UV analysis which

Table 1. The results of HPLC-UV analysis.

Peak	Hydroxycinnamic acid derivatives	Rt (min)	Quantity (mg/g)	% in lemon balm leaf extract
1	Chlorogenic acid	7.9	0.79	0.08
2	Caffeic acid	10.4	0.68	0.07
3	p-Coumaric acid	13.9	<0.1	<0.01
4	Ferulic acid	14.8	<0.1	<0.01
5	m-Coumaric acid	15.8	<0.1	<0.01
6	Rosmarinic acid	17.6	54	5.4

identified 6 components (Table 1; Figures 1 and 2). The complementary analysis by HPLC-MSⁿ confirmed the presence of one more hydroxycinnamic acid (Table 2; Figure 1B). Rosmarinic acid has been identified as the major extract compound of lemon balm leaf (54 mg/g), followed by lithospermic acid (2.1 mg/g), chlorogenic acid (0.79 mg/g), and caffeic acid (0.68 mg/g).

The Effect of *Melissa Officinalis*, Chlorogenic Acid, Rosmarinic Acid, and Lithospermic Acid on the Spontaneous Motor Activity of Chicken Isolated Jejunum Strips

Control treatment with the solvent, that is, M K-HS and DMSO (0.5%) in case of the lemon balm and active ingredients, respectively, generated no significant change of the spontaneous contractility of both proximal and distal jejunum segment (Figures 3 and 4). The extract of *Melissa officinalis* provoked significant disturbances of the spontaneous motor activity of chicken jejunum. In case of the proximal segment, remarkable changes were observed when the extract was administered at the concentration of 0.001 mg/mL or higher. The effect was always myorelaxant in character and the size of the reaction ranged from 86.67 ± 4.72 (for 0.001 mg/mL) to 67.44 ± 3.50 (for 0.1 mg/mL) % the control treatment (Figure 3A). In the case of distal jejunum preparation, the changes in contractility were noted at the same range of doses but the effect was opposite to that noted in the proximal segment, that is, myocontractile. When used at the concentration of 0.001 mg/mL the extract caused a reaction amounting to $121.24 \pm 4.63\%$ of the control treatment. The most pronounced contraction was noticed when the extract was added at the highest concentration (0.1 mg/mL) and reached then $146.96 \pm 3.88\%$ of the control reaction (Figure 3B).

Rosmarinic acid affected significantly the spontaneous motoric activity of both proximal and distal chicken jejunum segments. Regardless of the origin of the strips, the evoked reaction was always myocontractile and at the range of concentrations 0.01 up to 100 μ M. The size of induced contractions of proximal jejunum preparations was dose-dependent and ranged from 115.49 ± 7.58 to $157.33 \pm 1.83\%$ of the control treatment for RA in a dose of 0.01 and 100 μ M, respectively (Figure 4A). In the case of distal jejunum specimens, the magnitude of provoked contractions was comparable and amounted

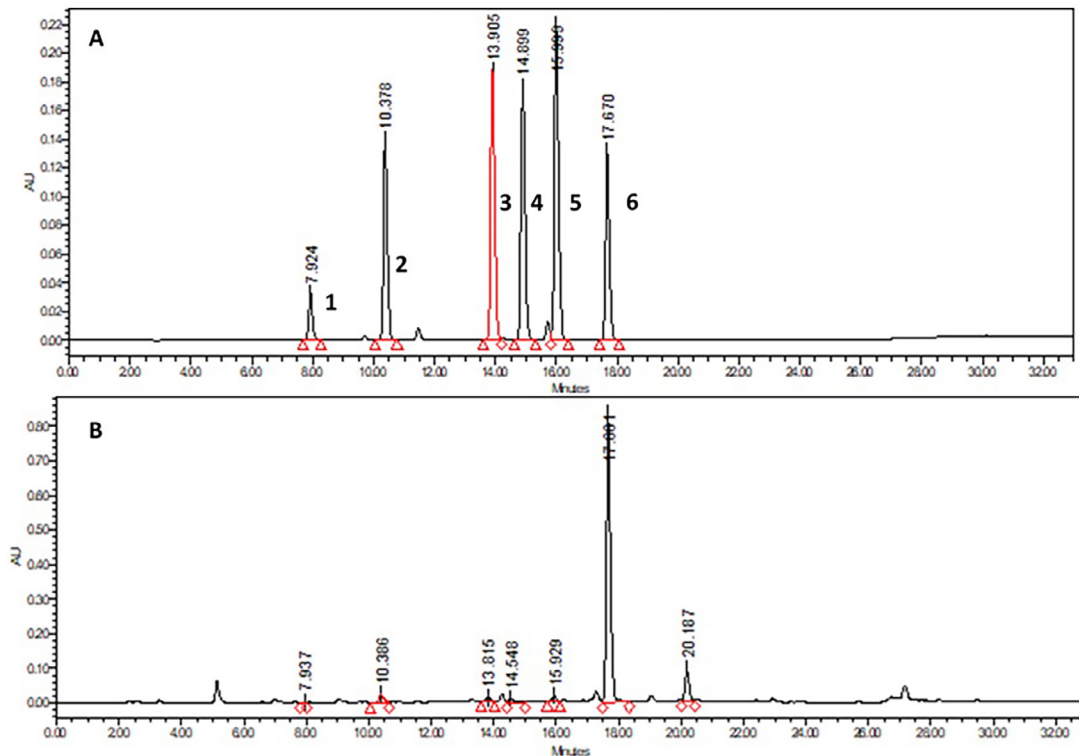


Figure 1. Lemon balm leaf extract hydroxycinnamic profile in HPLC UV analysis: hydroxycinnamic acids analytical standards (A), hydroxycinnamic acids in Lemon balm leaf extract (B).

to 114.03 ± 7.02 and $164.75 \pm 3.91\%$ of the control reaction for RA used in the concentration of 0.01 and 100 μM , respectively (Figure 4B). Chlorogenic acid turned out to be a potent myorelaxant agent in both jejunum strips. In the case of proximal intestine segments significant change of spontaneous contractility was observed when ChA was added in the concentration of 0.1 μM or higher. The size of the induced reaction amounted to 85.62 ± 4.04 and $65.13 \pm 9.36\%$ of the control treatment for ChA in a dose of 0.1 and 100 μM , respectively (Figure 4A). In case of distal jejunum preparations, the first notable change in spontaneous motoric activity was recorded when ChA was used in

the concentration of 0.01 μM and amounted then to $87.04 \pm 6.60\%$ of the control reaction. The strongest inhibition of the contractility was measured when ChA was applied in the highest tested concentration (100 μM) and reached then $64.60 \pm 5.98\%$ of the control treatment (Figure 4B). The least marked effect was observed for lithospermic acid. LA did not provoke any significant change of the spontaneous motoric activity of proximal jejunum segments (Figure 3B). However, it did modify the contractility of distal jejunum specimens when applied in a dose of 1, 10 or 100 μM . The provoked reactions were always myocontractile and their size ranged from $124.41 \pm$

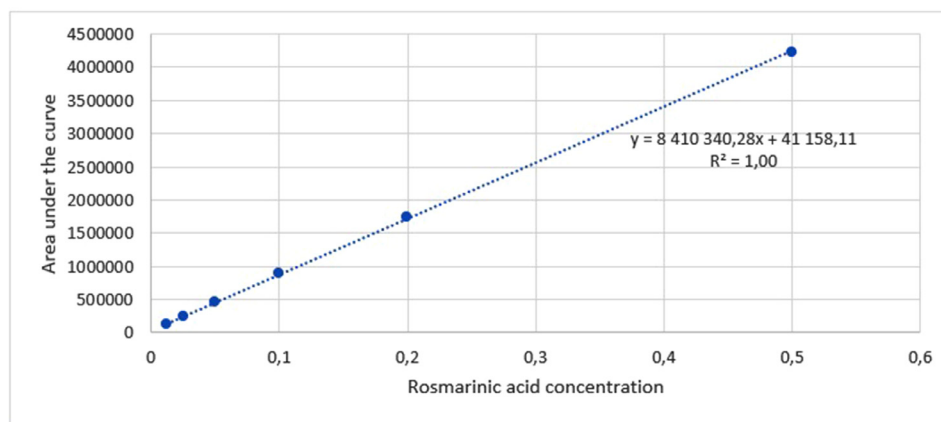


Figure 2. The calibration curve of rosmarinic acid.

Table 2. The results of the complementary HPLC-MSⁿ analysis.

Peak	Hydroxycinnamic acid derivatives	Rt (min)	Quantity (mg/g)	% in lemon balm leaf extract
7	Lithospermic acid	20.19	2.1	0.21

5.26 (1 μ M) to 140.37 ± 10.46 (100 μ M) of the control treatment (Figure 4B).

The Effect of *Melissa Officinalis*, Chlorogenic Acid, Rosmarinic Acid, and Lithospermic Acid on Acetylcholine-Induced Contraction of Chicken Isolated Jejunum Strips

Control treatment with the solvent, that is, M K-HS and DMSO (0.5%) in case of the lemon balm and active ingredients, respectively, produced no significant change of the ACh-induced contractility of both proximal and distal jejunum segments (Figures 5 and 6). The extract of *Melissa officinalis* provoked a significant increase of

the ACh-induced contraction of chicken jejunum. In case of the proximal segment, the remarkable amplification of the reaction was observed when the extract was administered at a concentration of 0.005 mg/mL or higher. The size of produced reaction ranged from 120.93 ± 7.13 (for 0.005 mg/mL) to 141.90 ± 15.17 (for 0.1 mg/mL) % the control treatment (Figure 5A). In the case of distal jejunum preparation the remarkable change of the ACh-induced contractility was registered in a range of 0.001 mg/mL to 0.1 mg/mL (Figure5A). When used in the concentration of 0.001 mg/mL the extract caused a reaction amounting to $119.92 \pm 11.70\%$ of the control treatment. The most pronounced contraction was noticed when the extract was added in the highest

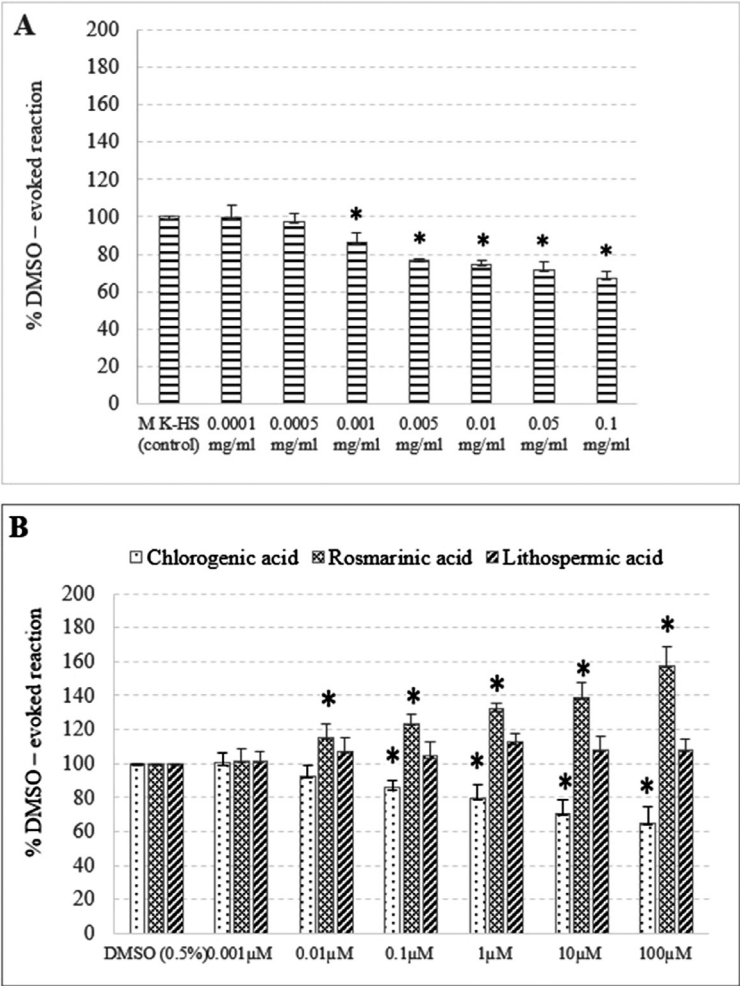


Figure 3. The effect of *Melissa officinalis* leaf extract (A), chlorogenic, rosmarinic, and lithospermic acids (B) on the spontaneous contractility of chicken jejunum—proximal part. The results are expressed as % of spontaneous activity after applied of the control—solvent. Results shown are the mean of 5 experiments, $\pm$ standard deviation. * $P \leq 0.05$ vs. M K-HS/DMSO (0.5%).

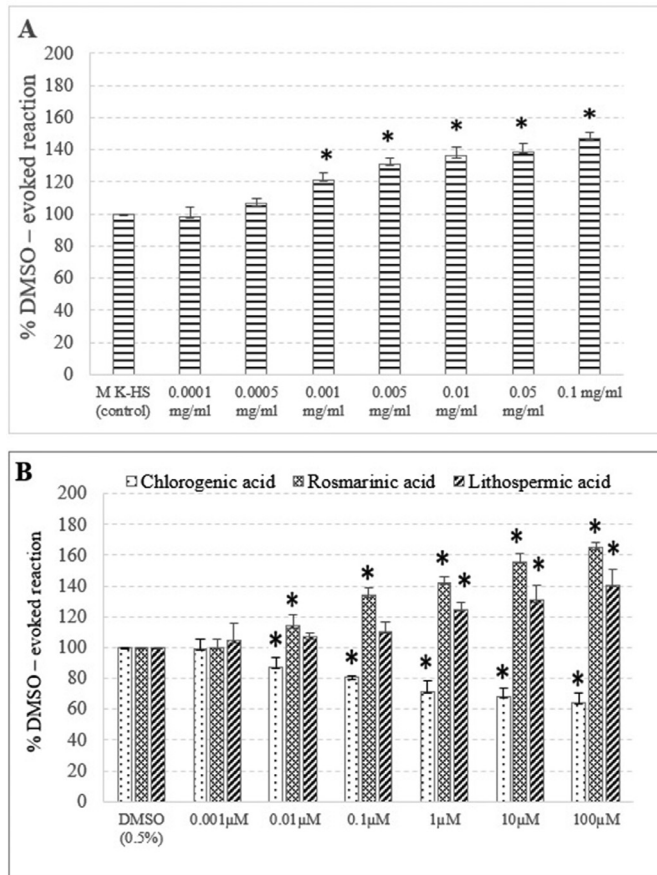


Figure 4. The effect of *Melissa officinalis* extract (A), chlorogenic, rosmarinic, and lithospermic acids (B) on the spontaneous contractility of chicken jejunum—distal part. The results are expressed as % of spontaneous activity after applied of the control—solvent. Results shown are the mean of 5 experiments, $\pm$ standard deviation. * $P \leq 0.05$ vs. M K-HS/DMSO (0.5%).

concentration (0.1 mg/mL) and reached then $150.98 \pm 6.95\%$ of the control reaction (Figure 6A).

Rosmarinic acid significantly affected the ACh-induced contractility of both proximal and distal chicken jejunum segments (Figures 5 and 6). Regardless of the origin of the strips, the evoked reaction was always antispasmodic and remarkable in the range of concentrations 0.1 up to 100 μ M in the proximal part and 0.001 to 100 μ M in the distal part of chicken jejunum. The degree of reduction of ACh-evoked contractions of proximal jejunum preparations was dose-dependent and ranged from 79.49 ± 8.25 to $59.42 \pm 6.59\%$ of the control treatment for RA in a dose of 0.1 and 100 μ M, respectively (Figure 5B). In case of distal jejunum specimens, the magnitude of decreased contractions was comparable and amounted to 88.30 ± 7.11 and $59.70 \pm 3.30\%$ of the control reaction for RA used in the concentration of 0.01 and 100 μ M, respectively (Figure 6B). Chlorogenic acid also decreased the force of ACh-induced contractions in both jejunum strips (Figures 5 and 6). In the case of proximal intestine segments, a significant change of ACh-induced contraction was observed when ChA was added in the concentration of 0.001 μ M or higher. Whereas, in the distal part, the

reduction of contraction size was evident only at the concentration of 0.01 μ M or higher. The provoked reactions were always myorelaxant and their size ranged from 80.57 ± 6.88 (0.001 μ M) to 53.44 ± 10.46 (100 μ M) of the control treatment in the case of proximal jejunum specimens (Figure 5B) and 79.30 ± 9.80 (0.1 μ M) to 61.94 ± 7.69 (100 μ M) of the control treatment in case of distal jejunum specimens (Figure 6B). The most interesting effect was observed for lithospermic acid. LA provokes a significant decrease in the ACh-induced contraction of proximal jejunum segments and remarkable increase of distal jejunum segments (Figures 5 and 6). In the proximal segment significant change of ACh-induced contraction was observed when LA was added in the concentration of 0.001 μ M or higher and ranged from 80.57 ± 6.88 (0.001 μ M) to 53.44 ± 10.46 (100 μ M) of the control treatment (Figure 5B). The opposite, that is, myocontractile effect, in distal segments was remarkable when LA was administered in the concentration of 0.01 μ M or higher. The magnitude of the contraction reached then 79.30 ± 9.80 to 61.94 ± 7.69 of the control treatment, for LA in a dose of 0.01 and 100 μ M, respectively (Figure 6B).

DISCUSSION

Interest in animal welfare is growing, both among consumers and government bodies. The challenge for modern poultry producers is to take this interest into account while maintaining the productivity of their flocks. Noteworthy, consumers are also increasingly paying attention to the origin and quality of food. The demand for organic and traditionally produced products is growing. Some measures have been already taken in some part of the world like the ban of antibiotic usage as growth promoters (European Parliament, 2003; Anadón, 2006; Collignon and McEwen, 2019). Consumers are also increasingly paying attention to the origin and quality of food. The demand for organic and traditionally produced products is growing. Moreover, the World Health Organization estimated that over 80% of the people in developing countries rely on traditional remedies such as herbs for their daily needs (World Health Organization, 2019). These factors additionally enhance the interest and need of the implementation of alternative growth stimulants and the use of botanicals in the prevention and control of animals' diseases (Radkowska, 2013). In addition to treatment, most frequently antimicrobial therapy, there is also a need to implement symptomatic treatment that would reduce or relieve clinical signs of both infectious and noninfectious diseases. In the case of poultry production, this need is often recognized in regard to gastrointestinal disorders whose clinical course has significant implications toward intestine motility. Current therapy for some poultry gastrointestinal disorders is directed toward the moderation of smooth muscle contractions. The search of natural feed additives with this property is an important field of a research. Thus, the study presented here was focused

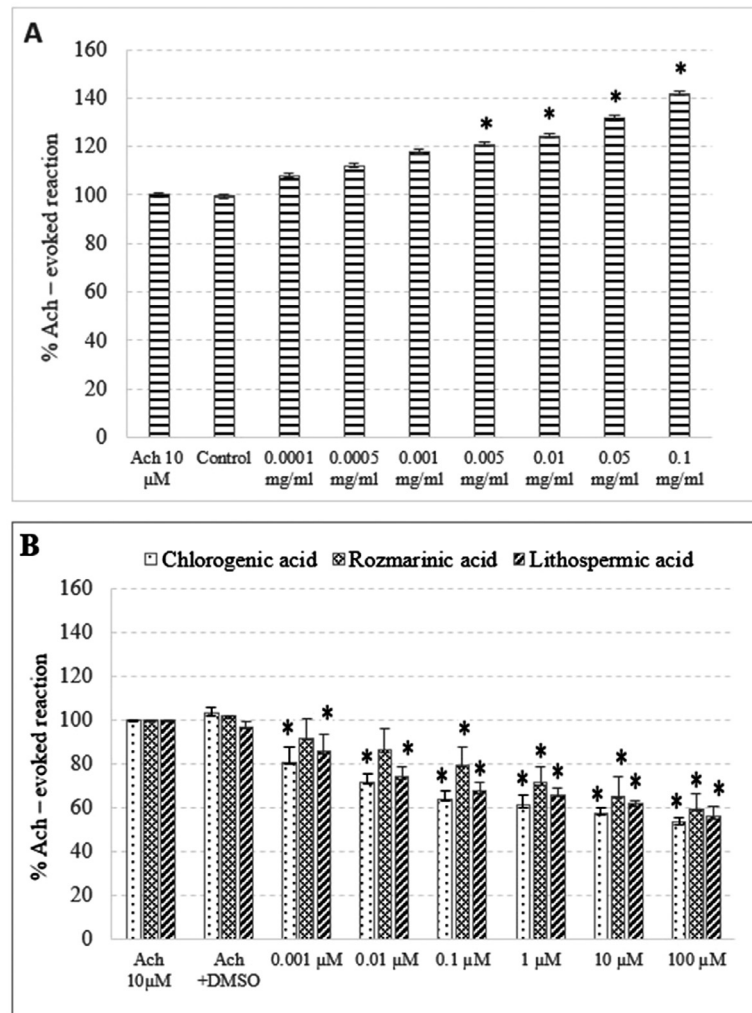


Figure 5. The effect of *Melissa officinalis* extract (A), chlorogenic, rosmarinic, and lithospermic acids (B) on the ACh-evoked reaction of chicken jejunum—proximal part. The results are expressed as % of ACh-induced contraction which is considered as a control reaction and defined as 100%. Results shown are the mean of 5 experiments, $\pm$ standard deviation. * $P \leq 0.05$ vs. ACh.

on the verification of the effect of lemon balm leaf extract (Nor Balm) and some of its constituents on broiler chicken jejunum contractility. The outcomes of the in vitro trials revealed that all tested preparations are potent modifiers of chicken intestine motor activity. Of note, the character and magnitude of the effect of *Melissa officinalis* extract and 3 phenolic acids differed remarkably between jejunum segments and the type of contractility, that is, spontaneous vs. ACh-induced. Surprisingly, lemon balm leaf extract turned out to be a myocontractile agent as it increased ACh-provoked contractility of both proximal and distal jejunum strips and also intensified the spontaneous activity of distal jejunum segments. Only in the case of the proximal intestine the preparations lemon balm extract diminished the force of spontaneous motoric activity (Figure 3A). None of the tested phenolic acids displayed an analogous effect with the whole plant extract. Indeed in the case of ACh-induced contractility, the acids had the opposite effect to the extract (Figures 5B and 6B) with a small exception of LA in distal jejunum. Thus, it is impossible to assign one or more individual constituents to the effect of the whole *Melissa officinalis* extract. The results

presented herein are in contrast to previously reported data. In an in vitro study on isolated ileum of rats, it was showed that the essential oil of *Melissa officinalis* has the effect of relieving intestinal spasms caused by potassium chloride, serotonin, and acetylcholine (Sadraei et al., 2003). Also, in mice *M. officinalis* decreased the frequency of spontaneous phasic contractions of jejunum smooth muscles (Aubert et al., 2016). A study in humans showed a significantly lower incidence of crying in infants with infantile colic when they were administered a solution consisting of chamomile, lemon balm, and lactic bacteria (Martinelli et al., 2017). On the other hand, there is also evidence of the inhibitory activity of *M. officinalis* extract on acetylcholinesterase activity (Pereira et al., 2014). This observation could explain the ability of lemon balm leaf extract to increase the magnitude of ACh-induced contraction in the proximal and distal jejunum of chicken broilers (Figures 5A and 6A). Notably, data supporting the antispasmodic activity of lemon balm preparation refer to human and laboratory animal tissues which might explain the discrepancies between the observations of others and our own. Another possible explanation of the

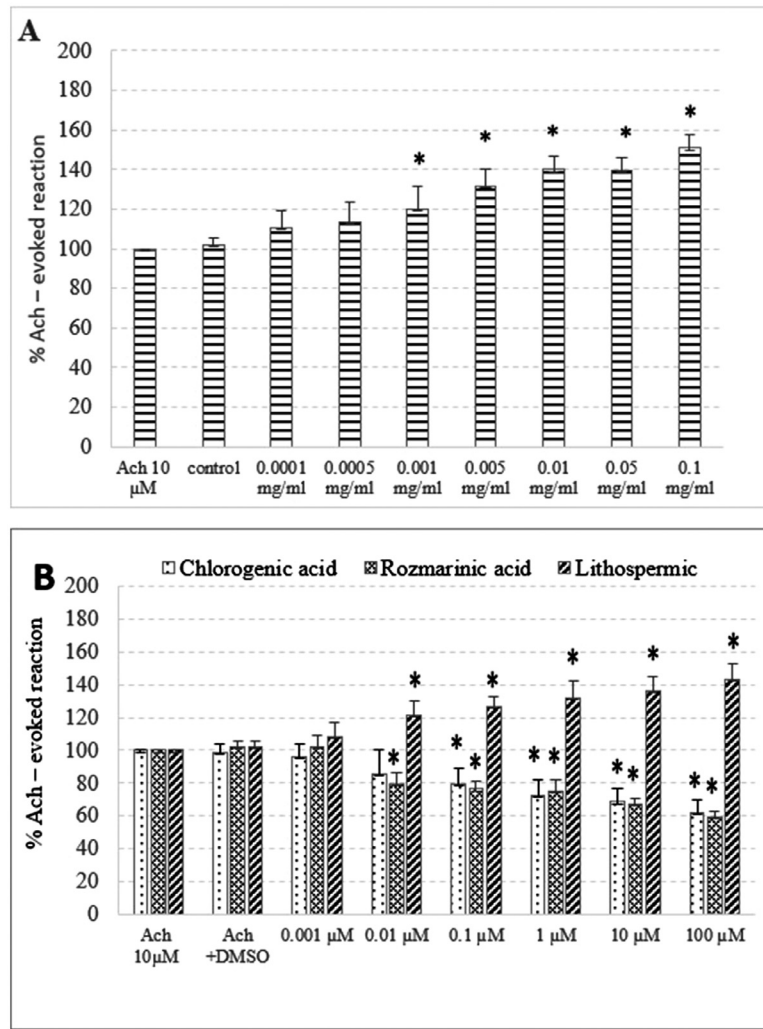


Figure 6. The effect of *Melissa officinalis* extract (A), chlorogenic, rosmarinic, and lithospermic acids (B) on the ACh-evoked reaction of chicken jejunum—distal part. The results are expressed as % of ACh-induced contraction which is considered as a control reaction and defined as 100%. Results shown are the mean of 5 experiments, $\pm$ standard deviation. * $P \leq 0.05$ vs. ACh.

contrary findings is the use of various preparation and fractions of *Melissa officinalis*. Different compositions of plant material subjected to experiments (e.g., standardized vs. nonstandardized extract vs. essential oils) are another potential cause of contradictory outcomes of preclinical and clinical trial.

As with the standardized extract of *Melissa officinalis*, all tested acids had a strong impact on chicken jejunum smooth muscle contractility. In the case of spontaneous activity of proximal part of chicken jejunum rosmarinic acid had a slight contractile effect, chlorogenic acid caused a very strong but opposite reaction, that is, myorelaxation from dose of 0.001 μ M, whereas lithospermic acid displayed no significant effect. In case of distal intestine preparations RA and LA showed remarkable myocontractile effect on the spontaneous contractility which is coherent with the effect of *Melissa officinalis* extract and suggests their contribution to the final impact of the plant. Uniquely, ChA caused the opposite—myorelaxant effect on distal jejunum parts. Different effects of the same substance on different parts of the gastrointestinal tract is a frequent

phenomenon, which is often used in medicine (Ebeid and Al-Homidan, 2022). In a similar experiment on rabbit ileum, rosmarinic acid demonstrated significant spasmolytic activity without changing the frequency of smooth muscle contractions (Bazylo et al., 2009). Moreover, RA contained in thyme significantly decreased the amplitude of contractions of isolated rat aorta (Bazylo et al., 2009). In the case of chlorogenic acids there is some evidence that the basal tone of rat ileal smooth muscle increases without any effect on the peak contractile tension and myosin light chain phosphorylation, what suggest that ChA displays no clear effect on smooth muscle contractility (Berman et al., 2019). When the results of phenolic acids are compared to the impact of the whole lemon balm extract which caused a significant myorelaxant effect it might be concluded that the mechanism of *Melissa officinalis* extract is more complicated and it contains other significant substances that model smooth muscles of the chicken jejunum.

To understand the effect of lemon balm on strong contractions that are not peristaltic movements, the impact

of lemon balm on acetylcholine-induced activity of the smooth muscle of the chicken's jejunum was studied. These types of smooth muscle contractions of the gastrointestinal tract can be painful and occur, for example, with diarrhea. Quite unexpectedly, lemon balm extract increased the strength of ACh-induced contractions of chicken jejunum smooth muscle in both the proximal and distal parts. Therefore, lemon balm is probably not a suitable preparation for the use in the presence of harmful contractions. This information contradicts common knowledge about lemon balm, which was considered as a plant with a calming effect and reducing the force of contractions (Miraj et al., 2017). However, in the experiment of Forster et al. (1980) on ileum of pigs where the alcoholic extract of lemon balm was tested, *Melissa officinalis* had no effect on the strength of acetylcholine-induced contraction, which is supportive for the data presented herein. In contrast, in a study on rat isolated ileum, *Melissa officinalis* had an inhibitory effect on the contraction induced by carbachol and KCl (Khalaja and Khanib, 2018). Acids also had a similar impact on proximal and distal part of chicken jejunum. Chlorogenic and rosmarinic acids caused remarkable decrease in the force of contraction induced by ACh of mouse urinary bladder, consisting also of smooth muscles. In our experiment, rosmarinic acid in high doses always caused a reaction, while in the study on rat trachea, rosmarinic acid as the main component of thyme extract did not affect contractility (Engelbertz et al., 2012). Of note, in case of rat uterus KCl-induced tension of smooth muscle was antagonized by tree leaves extracts of *Lepechinia caulescens* of which one of the main active substances is rosmarinic acid. Lithospermic acid strongly increased the force of carbachol-induced contraction in both parts of the chicken jejunum with the exception of ACh-evoked contractility of proximal part of jejunum (Figure 3B). The myorelaxant activity of LA in this case remains in line with the finding of Kamata et al. (1994) and Nagal et al. (1996) who observed vasodilatory effect of lithospermic acid and its derivative, that is, 8-epiblechnic acid, respectively. This effect is similar to the effect caused by the lemon balm extract. However, bearing in mind very low concentration of LA in *Melissa officinalis* extract, its activity toward smooth muscle should not determine the effect of lemon balm leaf extract.

CONSLUSIONS

To sum up, herbs, including *Melissa officinalis*, are currently used in the feed industry mainly as sensory additives and health enhancers. There is also a growing desire for alternatives to antibiotics to prevent and treat diseases. The obtained results show that all tested substances (chlorogenic acid, rosmarinic acid, lithospermic acid) as well as the whole dry extract of *Melissa officinalis* exhibited a strong effect on chicken jejunum strips under in vitro conditions. The analysis of present data suggests that the mechanism of action of lemon balm is

complicated, it cannot be unequivocally explained by the action of the tested acids, some of which represent the active substances from the group of phenolic acids. The observations of the effects lead to the conclusion that the action is different for the proximal and distal parts of the jejunum of the chicken. In view of the obtained results, further studies involving other constituents of *M. officinalis* extract, including its essential oil, are crucial to understand the overall impact of the plant on GI contractility of broiler chicken.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Nor-feed and Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences.

DISCLOSURES

All authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Abdellatif, F., H. Boudjella, A. Zitouni, and A. Hassani. 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. EXCLI J. 13:772–781.
- Abdel-Naime, W. A., J. R. Fahim, M. A. Fouad, and M. S. Kamel. 2019. Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies of *Melissa officinalis*. S. Afr. J. Bot. 124:228–234.
- Anadón, A. 2006. The UE ban of antibiotics as feed additives. Alternatives and consumer safety. J. Vet. Pharmacol. Ther. 29:41–44.
- Araj-Khodaei, M., A. A. Noorbala, R. Yarani, F. Emadi, E. Emaratkar, S. Faghihzadeh, and M. Naseri. 2020. A double-blind, randomized pilot study for comparison of *Melissa officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. with fluoxetine for the treatment of depression. BMC Complement. Med. Ther. 20:207.
- Aubert, P., I. Guinobert, C. Blondeau, V. Bardot, I. Ripoché, P. Chalard, and M. Neunlist. 2019. Basal and spasmolytic effects of a hydroethanolic leaf extract of *Melissa officinalis* L. on intestinal motility: an ex vivo study. J. Med. Food 22:653–662.
- Aubert, P., I. Guinobert, A. Guillot, M. Dubourdeaux, and M. Neunlist. 2016. Antispasmodic and spasmolytic activity of *Melissa officinalis* EPS upon mice gastrointestinal tract: an ex vivo pilot study. Planta. Med. 82:S1–S381, doi:10.1055/s-0036-1596945.
- Bazylo, A., M. Zygmunt, J. Sapa, H. Strzelecka, and B. Filipiek. 2009. Determination of spasmolytic and antispasmodic activities of thyme extracts and one of their major components, rosmarinic acid, in isolated rabbit ileum and isolated rat aorta. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 51:49–54.
- Berman, S. E., J. L. Huston, A. W. Lail, N. B. Piquette, and E. R. Injeti. 2019. Chlorogenic acid increases basal tone with no effect on relaxation of rat ileal smooth muscles by mechanisms independent of PKG mediated effects on myosin light chain phosphorylation. FASEB J. 33(S1):812–819.
- Bindari, Y. R., and P. F. Gerber. 2022. Centennial review: factors affecting the chicken gastrointestinal microbial composition and their association with gut health and productive performance. Poult. Sci. 101:101612.
- Bounihi, A., G. Hajjaj, R. Alnamer, Y. Cherrah, and A. Zellou. 2013. In vivo potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil. Adv. Pharmacol. Sci. 2013:1–7.
- Carocho, M., L. Barros, R. Calhella, A. Ćirić, M. Soković, C. Santos-Buelga, P. Morales, and I. Ferreira. 2015. *Melissa officinalis* L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. Food Funct. 6:2240–2248.

- Carvalho, F., A. T. Coimbra, L. Silva, A. P. Duarte, and S. Ferreira. 2023. Melissa officinalis essential oil as an antimicrobial agent against *Listeria monocytogenes* in watermelon juice. *Food Microbiol.* 109:104105.
- Collignon, P. J., and S. A. McEwen. 2019. One health—its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Trop. Med. Infect. Dis.* 4:22.
- Dastmalchi, K., H. J. D. Dorman, P. P. Oinonen, Y. Darwis, I. Laakso, and R. Hiltunen. 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT* 41:391–400.
- Ding, J., H. Zhou, L. Luo, L. Xiao, K. Yang, L. Yang, Y. Zheng, K. XU, C. He, C. Han, H. Luo, C. Qin, F. T. Akinyemi, C. Gu, Z. Zhou, Q. Huang, and H. Meng. 2021. Heritable gut microbiome associated with *Salmonella enterica* serovar pullorum infection in chickens. *Msystems* 6:10–1128.
- Ebeid, T. A., and I. H. Al-Homidan. 2022. Organic acids and their potential role for modulating the gastrointestinal tract, antioxidative status, immune response, and performance in poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 78:83–101.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP). 2020V. Bampidis, V., G. Azimonti, M. D. L. Bastos, H. Christensen, M. Kouba, M. K. Durjava, M. López-Alonso, S. L. Puente, F. Marcon, B. Mayo, A. Pechová, M. Petkova, F. Ramos, Y. Sanz, E. Roberto Villa, R. Woutersen, P. Brantom, A. Chesson, J. Westendorf, L. Gregoret, P. Manini, and B. Dusemund. 2020. Safety and efficacy of a dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves when used as a sensory additive for all animal species. *EFSA J.* 18:e06016.
- El Jeni, R., D. K. Dittoe, E. G. Olson, J. Lourenco, D. S. Seidel, S. C. Ricke, and T. R. Callaway. 2021. An overview of health challenges in alternative poultry production systems. *Poult. Sci.* 100:101173.
- Emamghoreishi, M., and M. S. Talebianpour. 2015. Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. *DARU J. Pharm. Sci.* 17:42–47.
- Engelbertz, J., M. Lechtenberg, L. Studt, A. Hensel, and E. J. Verspohl. 2012. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. *J. Ethnopharmacol.* 141:848–853.
- Ersoy, S., I. Orhan, N. N. Turan, G. Şahan, M. U. S. T. A. F. A. Ark, and F. Tosun. 2008. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine* 15:1087–1092.
- European Parliament. 2003. Regulation of the Pean Parliament and of the Council (EC) 1831/2003 of September 22, 2003 on additives for use in animal nutrition.
- Farag, M. R., C. Zizzadoro, M. Alagawany, S. M. Abou-Zeid, S. A. Mawed, M. S. El Kholy, and W. M. Elhady. 2023. In ovo protective effects of chicoric and rosmarinic acids against Thiachlopid-induced cytotoxicity, oxidative stress, and growth retardation on newly hatched chicks. *Poult. Sci.* 102:102487.
- Ferket, P. R. 2011. Strategies for finding alternatives to growth promoters. Pages 447–460 in XXII Latin American Poultry Congress.
- Forster, H. B., H. Niklas, and S. Lutz. 1980. Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Med.* 40:309–319.
- Hoerr, F. J., W. L. Current, and T. P. Haynes. 1986. Fatal cryptosporidiosis in quail. *Avian Dis.* 30:421–425.
- Kamata, K., M. Noguchi, and M. Nagai. 1994. Hypotensive effects of lithospermic acid B isolated from the extract of *Salviae miltiorrhizae* Radix in the rat. *Gen. Pharmacol.* 25:69–73.
- Khalaja, A., and S. Khanib. 2018. Spasmolytic effects of hydro-alcoholic extract of *Melissa officinalis* on isolated rat ileum. *J. Rep. Pharm. Sci.* 7:260–269.
- Lans, C., N. Turner, T. Khan, G. Brauer, and W. Boepple. 2007. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3:1–22.
- Lee, B. H., L. A. Bello-Pérez, A. H. M. Lin, C. Y. Kim, and B. R. Hamaker. 2013. Importance of location of digestion and colonic fermentation of starch related to its quality. *Cereal Chem.* 90:335–343.
- Martinelli, M., D. Ummarino, F. P. Giugliano, E. Sciorio, C. Tortora, D. Bruzzese, D. De Giovanni, I. Rutigliano, S. Valenti, C. Romano, A. Campanozzi, E. Miele, and A. Staiano. 2017. Efficacy of a standardized extract of *Matricaria chamomilla* L., *Melissa officinalis* L. and tyndallized *Lactobacillus acidophilus* (HA122) in infantile colic: an open randomized controlled trial. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 29:e13145.
- McDougald Larry, R. 1998. Intestinal protozoa important to poultry. *Poult. Sci.* 77:1156–1158.
- Miraj, S., M. Rafieian-Kopaei, and S. Kiani. 2017. *Melissa officinalis* L.: a review study with an antioxidant prospective. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* 22:385–394.
- Müller, S. F., and S. Klement. 2006. A combination of valerian and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dysomnia in children. *Phytomedicine* 13:383–387.
- Nagal, M., M. Noguchi, T. Iizuka, K. Otani, and K. Kamata. 1996. Vasodilator effects of des (α -carboxy-3, 4-dihydroxyphenethyl) lithospermic acid (8-epiblechnic acid), a derivative of lithospermic acids in *salviae miltiorrhizae* radix. *Biol. Pharm. Bull.* 19:228–232.
- Nasri, H., and M. Rafieian-Kopaei. 2013. Oxidative stress and aging prevention. *Oxidative stress and aging prevention. Int. J. Prev. Med.* 1:1101–1102.
- Pereira, R. P., A. A. Boligon, A. S. Appel, R. Fachineto, C. S. Ceron, J. E. Tanus-Santos, M. L. Athayde, and J. B. T. Rocha. 2014. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. *Ind. Crops Products* 53:34–45.
- Pineau, S., C. Legros, and C. Mattei. 2016. The medical use of lemon balm (*Melissa officinalis*) and valerian (*Valeriana officinalis*) as natural sedatives: insight into their interactions with GABA transmission. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 1:2.
- Prasanth, D. S. N. B. K., M. Murahari, V. Chandramohan, G. Bhavya, A. Lakshmana Rao, S. P. Panda, G. S. N. Koteswara Rao, G. Chakravarhi, N. Teja, P. Suguna Rani, G. Ashu, C. Purnadurganjal, P. Akjil, G. V. Bhavani, and T. Jaswitha. 2021. In-silico strategies of some selected phytoconstituents from *Melissa officinalis* as SARS CoV-2 main protease and spike protein (COVID-19) inhibitors. *Mol. Simul.* 47:457–470.
- Radkowska, I. 2013. Wykorzystanie ziół i fitogenicznych dodatków paszowych w żywieniu zwierząt gospodarskich. *Wiadomości. Zootech.* 51:117–124.
- Sadraei, H., A. Ghannadi, and K. Malekshahi. 2003. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* 74:445–452.
- Savino, F., F. Cresi, E. Castagno, L. Silvestro, and R. Oggero. 2005. A randomized double-blind placebo-controlled trial of a standardized extract of *Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare* and *Melissa officinalis* (ColiMil®) in the treatment of breastfed colicky infants. *Phytother. Res.* 19:335–340.
- Sensoy, I. 2021. A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Curr. Res. Food Sci.* 4:308–319.
- Shakeri, A., A. Sahebkar, and B. Javadi. 2016. *Melissa officinalis* L. — a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 188:204–228.
- Sharifi-Rad, J., C. Quispe, J. Herrera-Bravo, M. Akram, W. Abbaass, P. Semwal, and D. Calina. 2021. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the *Melissa officinalis*. *Phytother. Res.* 35:95–121.
- Świąder, K., C. H. Wijaya, and K. Startek. 2019. The therapeutic properties of lemon balm (*Melissa officinalis* L.): reviewing novel findings and medical indications. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 92:327–335.
- USDA-ERS., Poultry & Eggs. 2023. Accessed July 2023. <https://www.ers.usda.gov/topics/animal-products/poultry-eggs/>.
- Windisch, W., K. Schedle, C. Pitzner, and A. Kroismayr. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86:140–148.
- World Health Organization. 2019. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>.
- Zarei, A., S. Changizi-Ashtiyani, S. Taheri, and N. Hosseini. 2015. A brief overview of the effects of *Melissa officinalis* L. extract on the function of various body organs. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 17, doi:10.17795/zjrms1007.

Article

Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—Ex Vivo Study

Martyna A. Pośluszny ¹, Magdalena Chłopecka-Słomińska ¹, Sorphon Suor Cherer ², Sekhou Cisse ^{2,3}, Mohammed el Amine Benarbia ^{2,3} and Marta Mendel ^{1,*}

- ¹ Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 166, Nowoursynowska St., 02-786 Warsaw, Poland; martyna_posluszny@sggw.edu.pl (M.A.P.); magdalena_chlopecka@sggw.edu.pl (M.C.-S.)
- ² Nor-Feed SAS, 3 Rue Amédéo Avogadro, 49070 Beaucouzé, France; sorphon.suor-cherer@norfeed.net (S.S.C.); sekhoul.cisse@norfeed.net (S.C.); amine.benarbia@norfeed.net (M.e.A.B.)
- ³ Joint Lab ANR FeedInTech (FIT: SONAS/Nor-Feed), 49070 Beaucouzé, France
- * Correspondence: marta_mendel@sggw.edu.pl

Simple Summary: Sheep farming plays a vital role in wool production and rural culture but faces challenges, such as environmental impacts, antibiotic use, and animal welfare concerns. This study investigates the potential of *Melissa officinalis* extract and its main phenolic acids (rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic) as health-promoting feed additives by evaluating their effects on sheep intestinal motility. Using isolated jejunum and colon preparations from sheep, this study assessed the impact of the extract and phenolic acids on spontaneous and acetylcholine-induced contractions of smooth muscle under isometric conditions. Results showed that *Melissa officinalis* extract, rosmarinic, and lithospermic acids significantly reduced spontaneous contractility, while chlorogenic acid had mixed effects, including myocontractile activity in some cases. All tested compounds decreased acetylcholine-induced contractions. The findings suggest that *Melissa officinalis* extract and its phenolic acids have a myorelaxant effect, highlighting their potential to modulate intestinal motility and serve as a symptomatic treatment for diarrhea-related conditions in sheep.



Academic Editor: Tadaaki Satou

Received: 11 January 2025

Revised: 17 February 2025

Accepted: 19 February 2025

Published: 21 February 2025

Citation: Pośluszny, M.A.; Chłopecka-Słomińska, M.; Cherer, S.S.; Cisse, S.; Benarbia, M.e.A.; Mendel, M. Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—Ex Vivo Study. *Animals* **2025**, *15*, 626. <https://doi.org/10.3390/ani15050626>

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/>).

Abstract: Background: Modern societies and policymakers increasingly emphasize the advancement of organic farming practices and the preservation of rural culture. Sheep farming faces several challenges, including environmental impacts, antibiotic usage, and public concerns regarding animal welfare. The purpose of this study was to investigate the effects of *Melissa officinalis* extract and its principal phenolic acids on the motility of the sheep jejunum and colon, with the goal of assessing their potential as health-promoting feed additives, particularly in animals with dysmotilities. Methods: The trials were performed on isolated jejunum and colon preparations collected from sheep undergoing routine slaughter. The effect of extracts from *Melissa Officinalis* and three major phenolic acids (rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic) was evaluated to identify their ability to modify the spontaneous and pharmacologically-induced contractility of circular and longitudinal smooth muscle. Results: Regarding spontaneous contractions: *Melissa officinalis* extract, rosmarinic acid, and lithospermic acid caused a significant decrease in spontaneous contractility in the jejunum and colon, while chlorogenic acid exhibited myocontractile effects except for colon circular preparations where the effect was myorelaxant as in the other acids. In the case of ACh-induced contractions, all acids and the *Melissa officinalis* extract caused mostly a significant decrease in the magnitude of acetylcholine-induced contractions in both longitudinal and circular smooth muscle strips of the colon and jejunum. Conclusions: The findings suggest a predominantly myorelaxant effect of the *Melissa officinalis* extract

and its major phenolic acids on the smooth muscle of the sheep jejunum and colon. These results underscore the potential application of the *Melissa officinalis* extract as a feed additive to modulate intestinal motility and address challenges in livestock production.

Keywords: sheep; *Melissa officinalis*; lemon balm; rosmarinic acid; chlorogenic acid; lithospermic acid; jejunum; colon; contractility

1. Introduction

Sheep farming is a vital production sector not only for wool but for meat [1]. Currently, organic farming has become more important; it ensures healthy farming and healthy food for today and tomorrow by protecting soil, water, and climate, promoting biodiversity, and not contaminating the environment with chemical inputs or genetic engineering [2]. Antimicrobials are essential in animal health programs, but their use has been scrutinized because of the rise of antimicrobial resistance globally [3]. Ensuring the safety, health, and overall well-being of animals raised for food is both an ethical obligation and a critical component of providing safe food products; as such, the number of animals raised without antibiotics is growing worldwide [4]. To meet the market's needs, sheep farming has to be efficient, relatively cheap, and cost-effective, but also provide safe, ecologically friendly, and good quality meat and wool. With the European Union ban on antibiotic growth promoters, previously eliminated problems have started to reappear [5]. However, the rise of infection rates may lead to the increased therapeutical use of antibiotics, which is opposite to the efforts to reduce antimicrobials in animals. It demonstrates an urgent need to find alternative ways to improve animal health and thus decrease the application of antimicrobials. This is reflected in the main focus of current research, which has shifted from developing new therapeutic agents to working together to improve animal health, welfare, and sustainable food production. Herbs may play a crucial role in sheep nutrition, offering benefits such as enhanced feed efficiency, immune support, and improved growth. *Pimpinella anisum* has been shown to serve as an effective natural feed additive, improving feed utilization efficiency [6]. Rich in antioxidants, vitamins, and minerals, herbs strengthen immunity and enhance disease resistance. Phyto-biotic additives from *Leuzea carthamoides* and *Echinacea purpurea* have been linked to increased body weight and improved livestock health [7]. Additionally, certain herbs enhance feed palatability, as seen with *Ilex paraguariensis*, which improves feed intake and wool growth [8]. Moreover, herbal preparations, plant extracts, and isolated phytoconstituents offer the possibility to modify numerous intestine functions under physiological and pathological conditions. The utility of medicinal plants to control gut functionality is also demonstrated by animal behavior. Ruminants, both wild and domestic, exhibit self-medicating behaviors, selectively foraging on plants with bioactive compounds to mitigate health challenges. Empirical evidence suggests that ruminants adaptively increase the intake of plant secondary metabolites with antiparasitic properties in response to gastrointestinal infections, thereby enhancing their overall health and fitness. Notable examples of medicinal foraging include the consumption of *Pistacia lentiscus*, *Lysiloma latisiliquum*, *Phillyrea latifolia*, and various Poaceae species, which are known for their bioactive potential in alleviating gastrointestinal distress [9–11]. In the case of gut dysmotilities, which often accompany infectious and invasive diseases, controlling contractility is an essential element of symptomatic therapy [12]. Therefore, it seems crucial to understand the impact of herbal products that have beneficial effects on animals towards intestine motility. Consequently, the aim of this study is to verify the impact of a standardized *Melissa officinalis* extract and some of its main constituents on

the spontaneous and pharmacologically-induced contractility of sheep jejunum and colon. Furthermore, this study aims to identify specific health conditions in which the herb would be most effective as a symptomatic therapeutic agent.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

A modified Krebs–Henseleit solution (MK-HS) was used for the transportation and as an incubation medium for the segments of sheep intestines. This solution was prepared by dissolving 123.76 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.156 mM MgSO₄, 14.5 mM NaHCO₃, 2.75 mM KH₂PO₄, and 12.5 mM glucose (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) in distilled water. The pH of the buffer was kept at 7.35–7.45 thanks to the continuous delivery of carbogen (95% O₂/5% CO₂). The MK-HS temperature was maintained at 38 °C to simulate the physiological body temperature of the animal. Acetylcholine chloride (ACh) was used as a myocontractile agent, and isoproterenol hemisulfate salt (Isop) (both from Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) as a relaxant control substance. The primary solution and subsequent dilutions of ACh and Isop were dissolved in the incubation buffer.

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaf extract (Nor-balm[®]) was manufactured by the company Nor-Feed[®] (Beaucouzé, France), as described previously in [13], and standardized for the content of rosmarinic acid [14]. It was evaluated in the set of concentrations from 0.1 µg/mL to 0.1 mg/mL. The primary solutions and progressive dilutions of the extract were made using the MK-HS. Given that the main phenolic acids in lemon balm are rosmarinic acid (RA), chlorogenic acid (ChA) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and lithospermic acid (LA) (PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Germany) [13], their effect was studied additionally to the trials on the extract. Each phenolic acid was tested in the range of 0.001 to 100 µM, with each acid in a separate set of experiments. The stock solutions of RA, ChA, and LA were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and subsequently diluted with distilled water, ensuring that the final DMSO concentration in the tissue incubation chambers did not exceed 0.5%.

2.2. Animals, Isolation, and Preparation of Smooth Muscle Segments

Intestinal segments were obtained from 5-month-old Uhruska sheep of both sexes (approx. 35 kg b.w.), routinely slaughtered, and subjected to ante-mortem and post-mortem examinations conducted by an official veterinarian. The experiments were performed between January and May, and the animals were slaughtered always on the day of the trial. The absence of exclusion criteria in animal selection aimed to ensure a representative population and evaluate the effects of the test substances independently of specific group selection parameters. The specimens were collected each time from at least five different sheep, both the small intestine (proximal part of the jejunum) and the colon (proximal part of the spiral colon) regions. Immediately following collection, the intestines were flushed to remove gut contents, immersed in ice-cold (0–4 °C) MK-HS, and transported to the laboratory (max. 45 min). There, the intestinal specimens were cut open longitudinally and pinned on the dish to be dissected by a scalpel blade into smaller, thin, flat, and rectangle-shaped strips (5 × 20 mm) parallel to the orientation of the longitudinal and circular smooth muscle fibers, depending on the experimental requirements.

2.3. The Course of Experiments

To enable the tissues' adaptation to in vitro conditions, the samples were preincubated before every experiment for 45 min in the MK-HS at 38 °C without applying any tension. Flushing the chambers with fresh, warm MK-HS was conducted every 15 min to ensure

sufficient tissue nutrients. During the preincubation period, spontaneous contractility of the smooth muscle was monitored. After 45 min of preincubation, tension (0.01 N) was carefully applied to all tested muscle strips for 15 min, after which the tension (0.01 N) was increased another time. Strips reacting properly to ACh (1 μ M) twice and exhibiting distinct and rhythmic spontaneous contractility were employed for the trial. The solvent of the test substance was administered before the actual experiment, i.e., MK-HS for the lemon balm extract and DMSO (0.5%) for all three acids (negative control). Following buffer exchange, the tissue strips were exposed to ACh (10 μ M), and motor activity was recorded for 5 min. The medium was then flushed and, after stabilization of spontaneous contractility, either the extract or one of the active compounds was introduced. The response was monitored for 5 min, after which another dose of ACh (10 μ M) was applied. Five minutes later, the buffer was replaced, and treatment with a higher concentration of the test substance was initiated. This procedure allowed for the non-cumulative assessment of the extract and three acids on both spontaneous and ACh-induced contractility. The experiment concluded with the administration of ACh and isoproterenol to confirm intestinal reactivity and vitality.

2.4. Data Registration and Expression

Specimens were placed in the incubation chambers of 5 mL each, filled with the MK-HS, and saturated with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Five to six strips from five to six different animals were suspended separately in individual chambers. The preparations were placed parallel to the orientation of the longitudinal or circular smooth muscle fibers, depending on the experimental requirements, and fixed with one end (distal) attached to a steel hook on a tissue holder and the other (proximal) to a silk thread connected to an isotonic force transducer (F30, type 372, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). During the experiment, the specimens' reactivity was measured for tension changes by using a bridge amplifier (DBA, type 660, Hugh Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The transducer apparatus was connected to an analog–digital registration set (PowerLab, ADInstruments, Sydney, Australia). The motor activity of the samples was recorded by the Chart v7.0 program (ADInstruments, Sydney, Australia). Data analysis was performed using Chart v8.1 programs (ADInstruments, Sydney, Australia) and Microsoft Office Excel. All generated data went through critical statistical analysis.

2.5. Statistical Analysis

The impact of all tested substances was determined by measuring alterations in the tension of the smooth muscle preparations 5 min before and after applying any substance, quantified as the area under the curve (AUC). All results are presented as a percentage of the control reaction, defined by the intestine's response to MK-HS or DMSO (0.5%) in the case of spontaneous activity analysis, and smooth muscle contraction induced by ACh (10 μ M) at the start of the reactivity analysis, respectively. Reactions to MK-HS, DMSO (0.5%), and acetylcholine at control doses were stated at 100% (control). Results are expressed as mean values from a minimum of five replicates of experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA through TIBCO StatSoft, Inc. (Tulsa, OK, USA, 2019), STATISTICA (data analysis software system), version 13.3 (<https://www.statsoft.pl/statistica-i-tibco-software/>, accessed on 10 January 2025). The Dunnett test was used for pairwise comparisons, with the effects of MK-HS, DMSO (0.5%), and ACh (10 μ M) in DMSO (0.5%) serving as references. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. The Effect of the Standardized *Melissa officinalis* Extract on the Spontaneous Motoric Activity of Ovine Jejunum and Colon Specimens

The effects of the standardized extract of *Melissa officinalis* were dose-dependent (Figure 1A,B). A fascinating biphasic response was observed for the jejunum circular smooth muscle, where the reaction was myocontractile in the concentration from 0.001 to 0.01 mg/mL, ranging from 126.11 ± 21.10 to $124.11 \pm 14.40\%$ of the control reaction. However, when administered in higher concentrations (0.05 and 0.1 mg/mL), the effect was myorelaxant, ranging from 81.97 ± 6.48 to $55.16 \pm 10.31\%$ of the control response (Figure 1A). In the case of the jejunum longitudinal smooth muscle and both types of colon segments, the reaction provoked by lemon balm was myorelaxant. The size of the response observed in the longitudinal smooth muscle of the jejunum came to 84.17 ± 2.16 and $55.02 \pm 6.03\%$ of the control reaction for the application of the extract in the concentration of 0.001 and 0.1 mg/mL, respectively (Figure 1A). In the case of the colon, the effect was similar in circular and longitudinal smooth muscle (Figure 1B). The use of the extract resulted in the reduction of spontaneous contractility. The myorelaxant effect was significant when lemon balm was applied in the concentration of 0.005 mg/mL or higher. and reached from $92.10 \pm 3.05\%$ (0.005 mg/mL) up to $48.88 \pm 8.60\%$ (0.1 mg/mL) of the control reaction for circular muscle. A notable decrease in the intensity of the spontaneous activity in colon longitudinal smooth muscle preparations was measured if lemon balm was used at the concentration of 0.001 mg/mL or higher, and then reached from $86.72 \pm 7.76\%$ (0.001 mg/mL) up to $56.34 \pm 3.53\%$ (0.1 mg/mL) of the control reaction (Figure 1B).

3.2. The Effect of RA, ChA, and LA on the Spontaneous Motoric Activity of Ovine Jejunum and Colon Specimens

Control treatment with the solvent, DMSO (0.5%), generated no significant change in the spontaneous contractility of the sheep's longitudinal and circular jejunum and colon segments (Figure 2A–D).

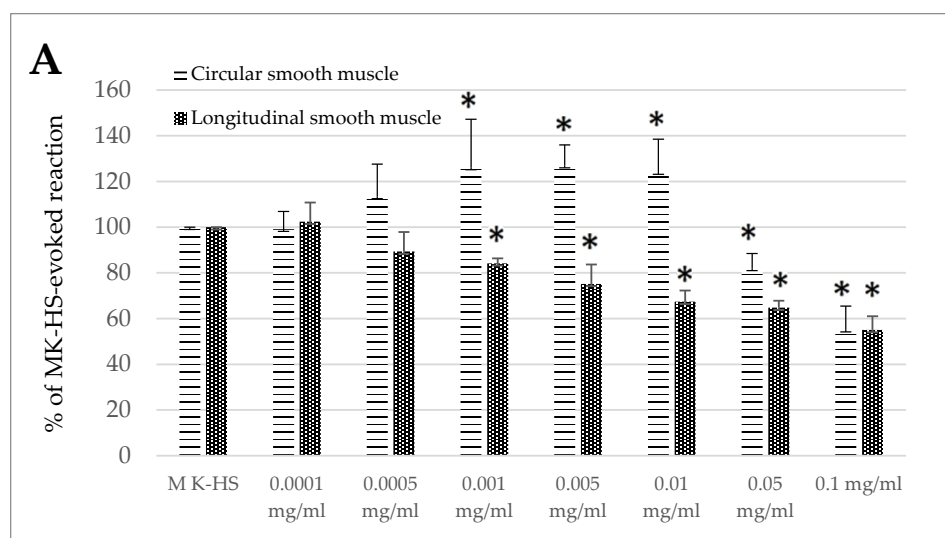


Figure 1. Cont.

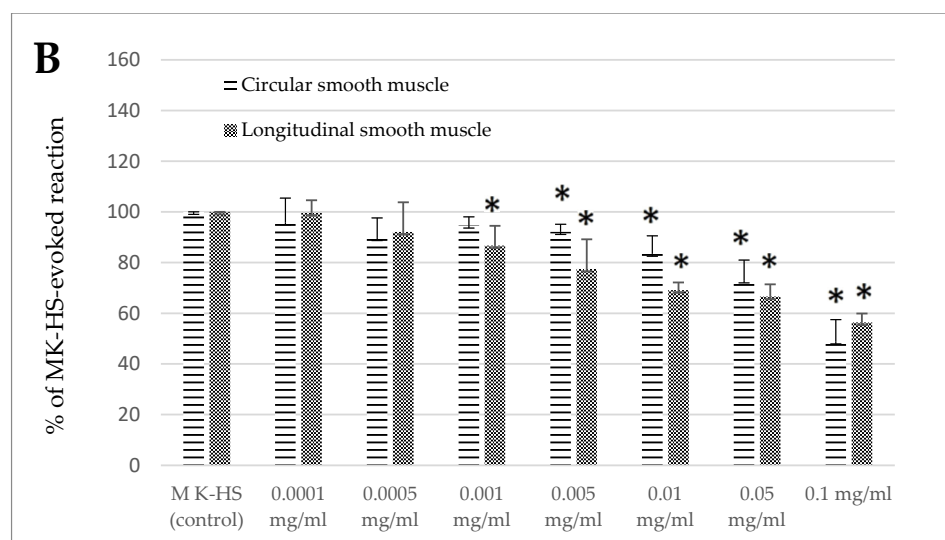


Figure 1. The effect of the *Melissa officinalis* extract on the spontaneous contractility of ovine jejunum (A) and colon (B)—circular and longitudinal smooth muscle. The results are presented as a percentage of spontaneous activity relative to the control (solvent). Data represent the mean $\pm$ standard deviation from six independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs. MK-HS.

In the case of rosmarinic acid, a remarkable modification of the spontaneous contractility was noticed in the jejunum circular smooth muscle and the colon segments of both origins; the reaction was always myorelaxant. The decrease of spontaneous contractility in the jejunum circular specimens was significant only when RA was used in the highest tested concentration (100 μ M) and came to $77.86 \pm 8.38\%$ of the control reaction. By contrast, in the case of longitudinal smooth muscle preparations, the change ranged from $84.00 \pm 8.80\%$ (1 μ M) to $62.85 \pm 8.11\%$ (100 μ M) of the control reaction (Figure 2A,B). The analysis of the motoric patterns of the colon smooth muscle showed a decrease in spontaneous contractility, which ranged from $92.50 \pm 7.44\%$ (0.001 μ M) to $66.74 \pm 5.23\%$ (100 μ M) and from $78.87 \pm 10.28\%$ (10 μ M) to $67.44 \pm 7.06\%$ (100 μ M) of the control reaction for the circular and longitudinal smooth muscle preparations, respectively (Figure 2C,D).

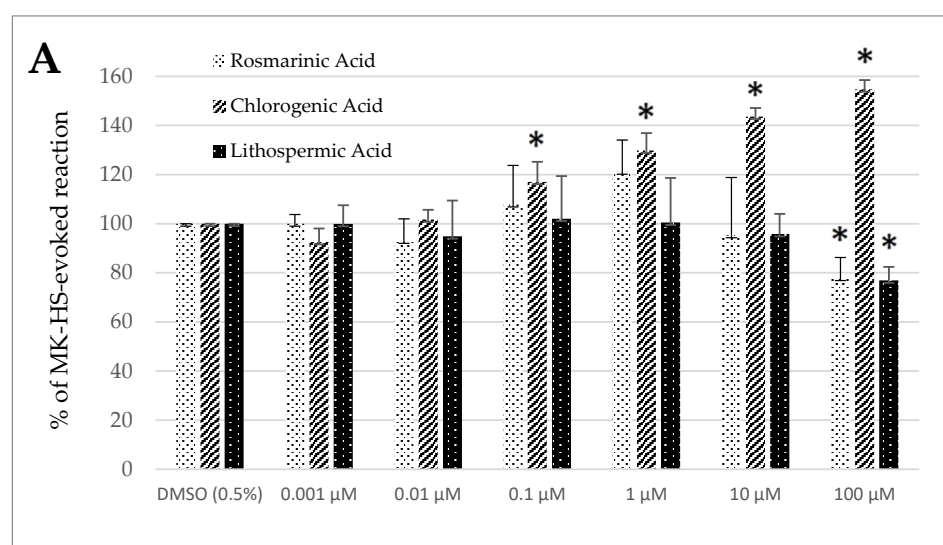


Figure 2. Cont.

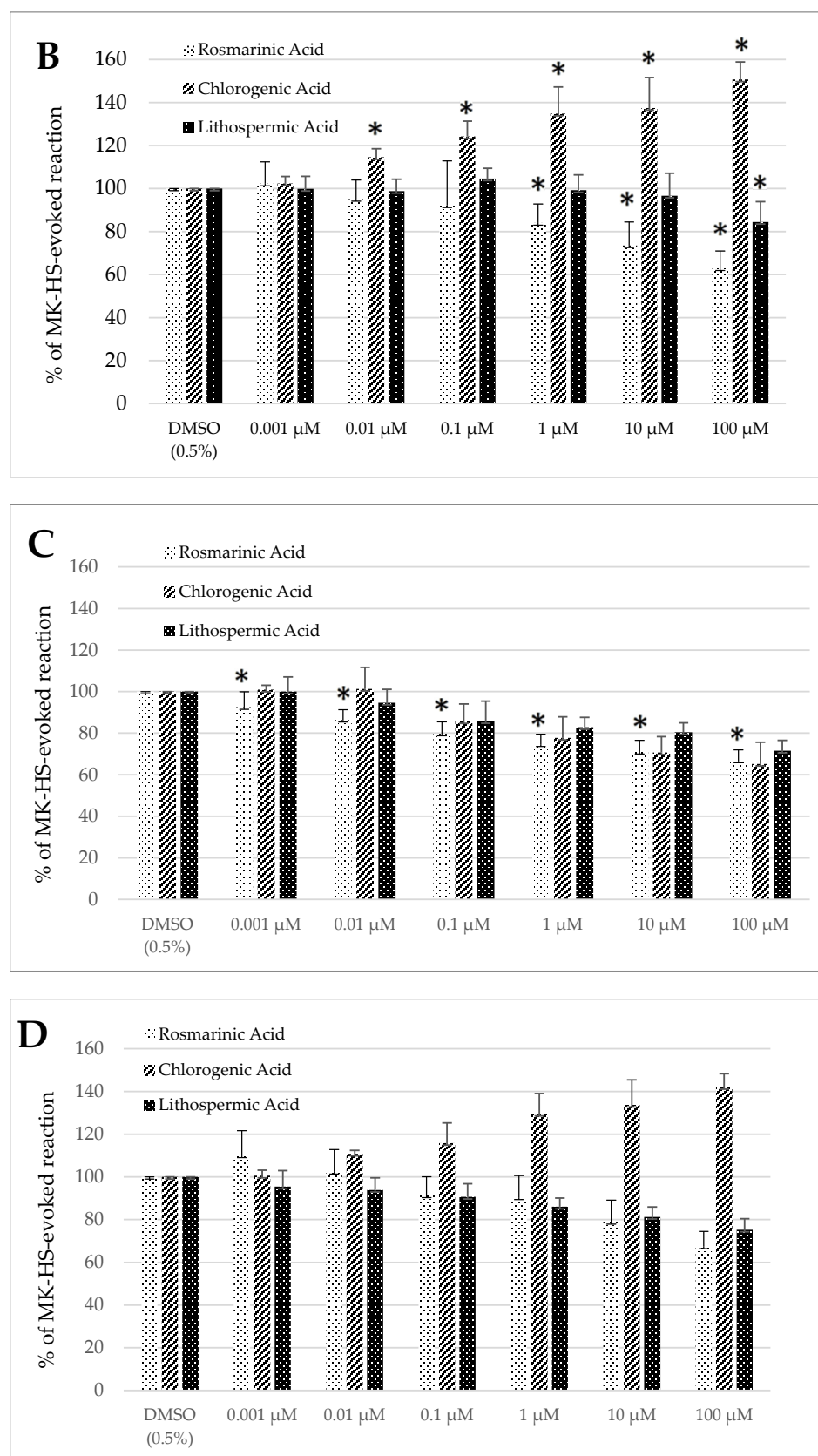


Figure 2. The effect of rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic acids, on the spontaneous contractility of ovine jejunum (A,B) and colon (C,D)—circular (A,C) and longitudinal (B,D) smooth muscle. The results are presented as a percentage of spontaneous activity relative to the control (solvent). Data represent the mean $\pm$ standard deviation from five independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%).

In the case of chlorogenic acid, the effect was myocontractile, except for the colon's circular smooth muscle. Remarkable changes were observed when the ChA was administered at 0.1 μM or higher concentration in the jejunum circular smooth muscle. The size of the response induced by ChA ranged from $117.07 \pm 8.13\%$ (0.1 μM) to $154.76 \pm 3.75\%$ (100 μM) of the control reaction in the jejunum longitudinal smooth muscle and from $114.55 \pm 3.96\%$ (0.01 μM) to $150.73 \pm 8.10\%$ (100 μM) of the control treatment in the jejunum circular smooth muscle (Figure 2A,B). A similar effect was observed in colon preparations consisting of longitudinally oriented fibers. ChA induced myocontractile reaction, which force ranged from $110.87 \pm 1.52\%$ (0.01 μM) to $142.06 \pm 6.26\%$ (100 μM) of the control treatment with DMSO (0.5%) (Figure 2D). In the case of the colon circular smooth muscle specimens, the effect was opposite, i.e., myorelaxant. The magnitude of changes in spontaneous contractility varied from $85.74 \pm 8.32\%$ (0.1 μM) to $65.17 \pm 10.46\%$ (100 μM) of the control reaction (Figure 2C).

Lithospermic acid provoked a significant decrease in the spontaneous motor activity of both the jejunum and the colon smooth muscle. In the case of the jejunum smooth muscle, the effect was observed only when LA was used in the highest concentration i.e., 100 μM . It amounted then to $76.89 \pm 5.51\%$ and $84.49 \pm 9.41\%$ of the response to DMSO (0.5%) for circular longitudinal smooth muscle strips, respectively (Figure 2A,B). In the case of the colon segments consisting of circularly oriented fibers, the size of inhibited contractility ranged from $85.81 \pm 9.65\%$ to $71.52 \pm 5.02\%$ of the control treatment for LA applied in a dose of 0.1 and 100 μM , respectively (Figure 2C). The reduction of motility patterns in the colon longitudinal strips was significant if LA was used at the concentration of 0.1 μM and greater, and dropped at the maximum dose (100 μM) to $75.29 \pm 5.13\%$ of the control reaction (Figure 2D).

3.3. The Effect of the Standardized *Melissa officinalis* Extract on Acetylcholine-Induced Contractility of Ovine Jejunum and Colon Specimens

The standardized *Melissa officinalis* extract had clear antispasmodic effects towards the ovine jejunum and colon segments (Figure 3A,B). The only exception was when it was applied in a specific concentration of 0.005 mg/mL in the jejunum longitudinal smooth muscle. In this situation, using lemon balm significantly increased ACh-induced contractions. The measured reaction came to $121.39 \pm 15.69\%$ of the control response to ACh (Figure 3A). However, even in the case of the jejunum longitudinal segments, the application of the *Melissa officinalis* extract at higher concentrations resulted in a clear myorelaxant effect. The extract reduced the response to ACh to $89.14 \pm 3.85\%$ and $73.84 \pm 10.56\%$ of the control treatment when used in a dose of 0.05 and 0.1 mg/mL, respectively (Figure 3A).

In the jejunum preparations consisting of circular smooth muscle fibers, a notable reduction of ACh-induced contraction was provoked by the *Melissa* extract used in the concentration range of 0.0005–0.1 mg/mL, reaching the maximum decrease to the level of $49.35 \pm 6.69\%$ of the control reaction to ACh (Figure 3A). In the case of the colon circular smooth muscle, remarkable alteration of ACh-induced contraction was registered when the extract was used in a concentration of 0.001 mg/mL or higher, amounting to $87.20 \pm 3.70\%$ and a maximum of $52.53 \pm 8.18\%$ of the control reaction, for the extract used in the concentration of 0.001 mg/mL and 0.1 mg/mL, respectively (Figure 3B). Noteworthy, the colon specimens containing longitudinal smooth muscle turned out to be less susceptible to the *Melissa* extract than the circular oriented fibers. The range of effective concentrations of the lemon balm extract for the colon longitudinal smooth muscle was between 0.05 and 0.1 mg/mL, and the size of the myorelaxant amounted then to $81.66 \pm 2.11\%$ and $67.56 \pm 8.34\%$ of the control reaction, respectively (Figure 3B).

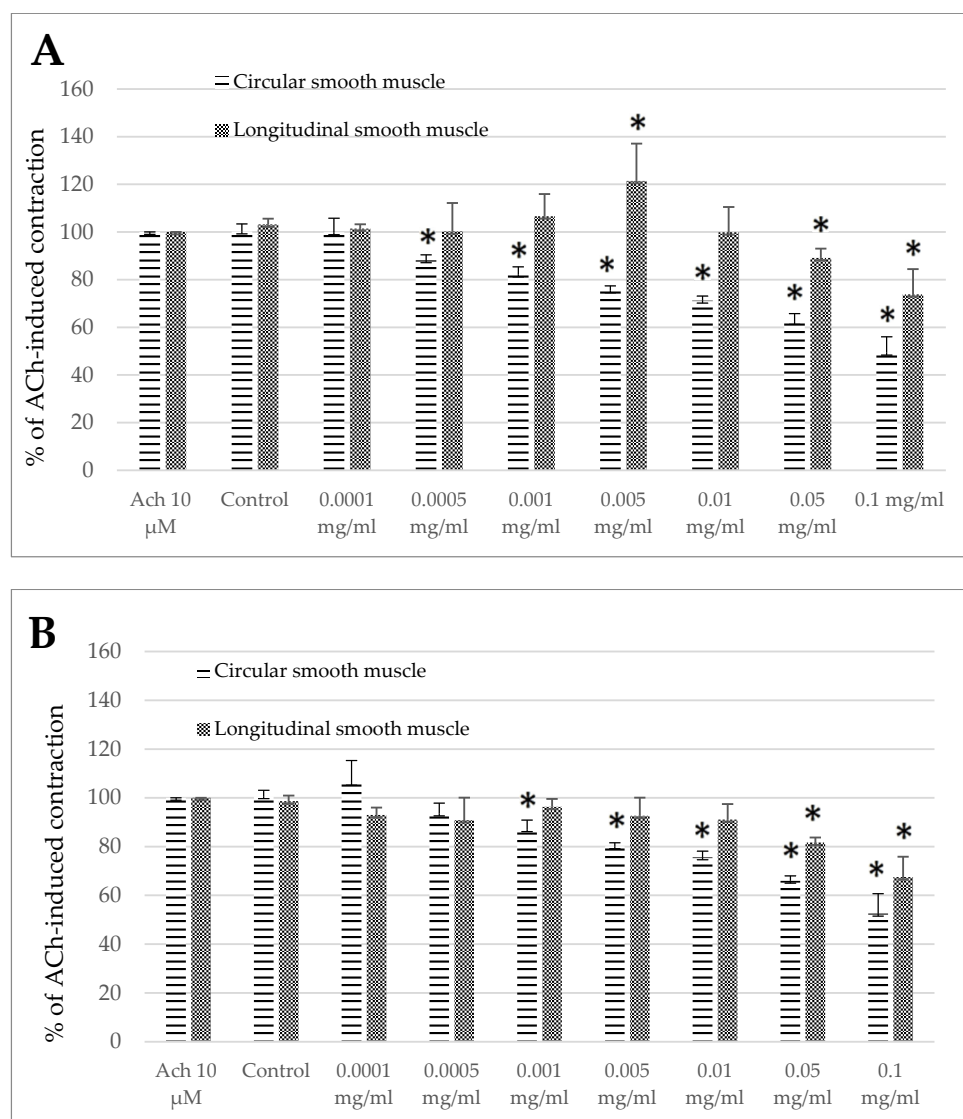


Figure 3. The effect of the *Melissa officinalis* extract on the ACh-evoked reaction of ovine jejunum (A) and colon (B)—circular and longitudinal smooth muscle. The data are expressed as a percentage of ACh-induced contraction, which is defined as 100%. The control reaction (Control) represents the response of the strips to ACh dissolved in MK-HS. Data represent the mean $\pm$ standard deviation from 6 independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs. ACh.

3.4. The Effect of Phenolic Acids on Acetylcholine-Induced Contractility of Ovine Jejunum and Colon Specimens

Noteworthy, the control treatment with the solvent (DMSO 0.5%) produced a significant change in the size of ACh-induced contractility neither in the jejunum nor in the colon preparation (Figure 4A–D) of both longitudinal and circular segments.

Rosmarinic acid notably influenced the ACh-induced contractility in both segment types and muscle layers (Figure 4A–D). Regardless of the strip origin, the observed effect was antispasmodic and statistically significant across a broad concentration range. For the jejunum specimens, the reduction in contractile activity reached a magnitude of $81.06 \pm 5.91\%$ and $51.97 \pm 5.33\%$ for the circular smooth muscle and $90.12 \pm 6.85\%$ and $63.41 \pm 7.74\%$ for the longitudinal smooth muscle of the control reaction for RA used in the concentration of 0.01 and 100 μ M, respectively (Figure 4A,B). In the case of the colon specimens, the antispasmodic reaction was noteworthy in the range of concentration from 0.01 to 100 μ M in the circular smooth muscle and from 1 to 100 μ M in the longitudinal smooth

muscle. The maximum inhibition of ACh-induced concentration was recorded when RA was applied in the highest dose and amounted then to $55.79 \pm 7.95\%$ and $67.12 \pm 4.20\%$ of the control ACh treatment in the colon circular and longitudinal smooth muscle strips, respectively (Figure 4C,D).

For chlorogenic acid only in the jejunum longitudinal strips, no significant changes in ACh-induced contractions were observed (Figure 4B). However, in all other cases (the jejunum circular smooth muscle and both types of the colon specimens), ChA provoked a notable decrease in ACh-induced contractions. In the circular smooth muscle of the jejunum, a pronounced reduction in the response was observed when ChA was applied at concentrations of $0.01 \mu\text{M}$ or greater. The magnitude of the resulting reaction varied from $88.00 \pm 4.90\%$ ($0.01 \mu\text{M}$) to $61.01 \pm 4.99\%$ ($100 \mu\text{M}$) the control treatment (Figure 4A). While in the colon circular strips, the effective doses started with $0.01 \mu\text{M}$. The magnitude of ACh-induced contraction was decreased up to $83.62 \pm 7.63\%$ and even $57.82 \pm 4.20\%$ of the control reaction for ChA applied in the concentration of 0.01 and $100 \mu\text{M}$, respectively (Figure 4C). Finally, in the case of the colon longitudinal smooth muscle, the reaction induced by ChA was significant in the concentration range of 0.001 to $100 \mu\text{M}$ and amounted to $81.17 \pm 7.54\%$ and even $73.26 \pm 21.03\%$ of the control reaction, respectively (Figure 4D).

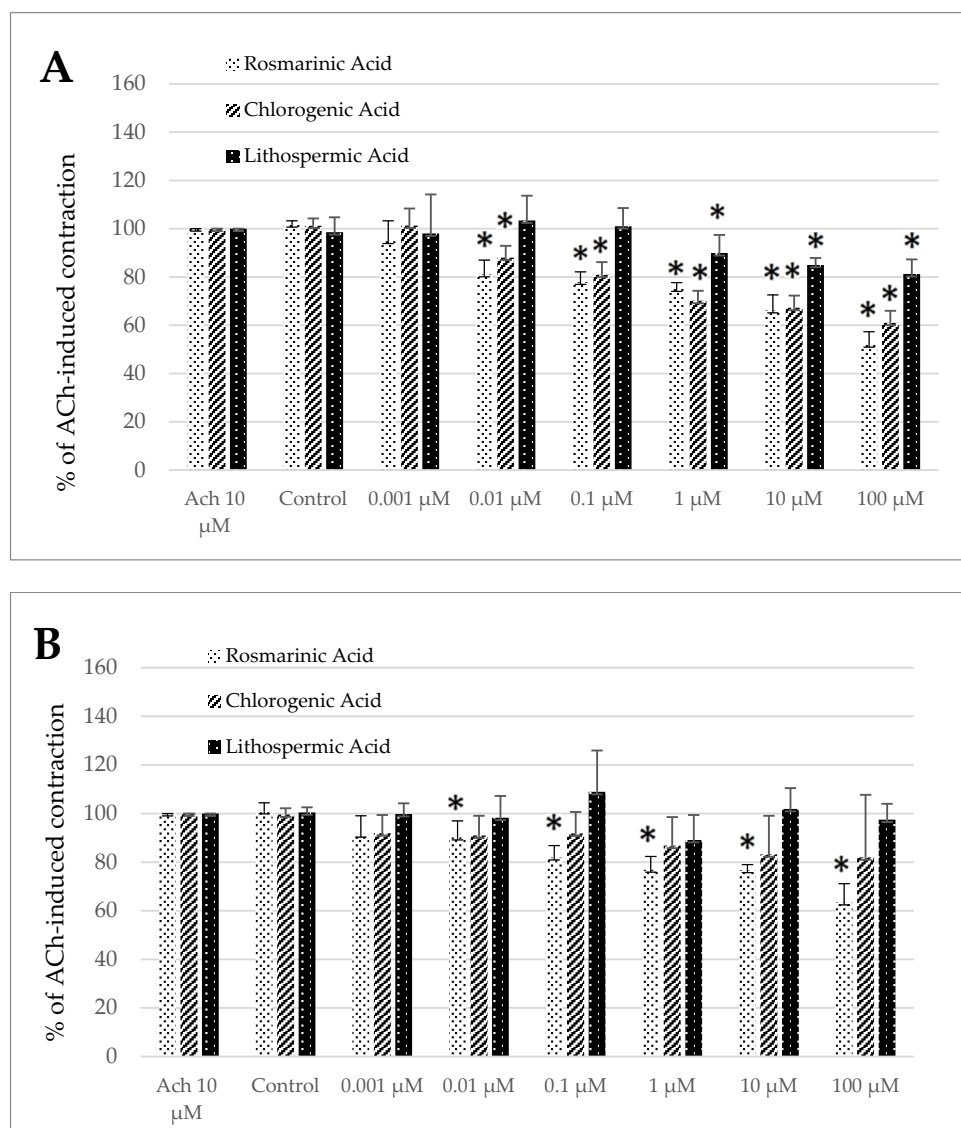


Figure 4. Cont.

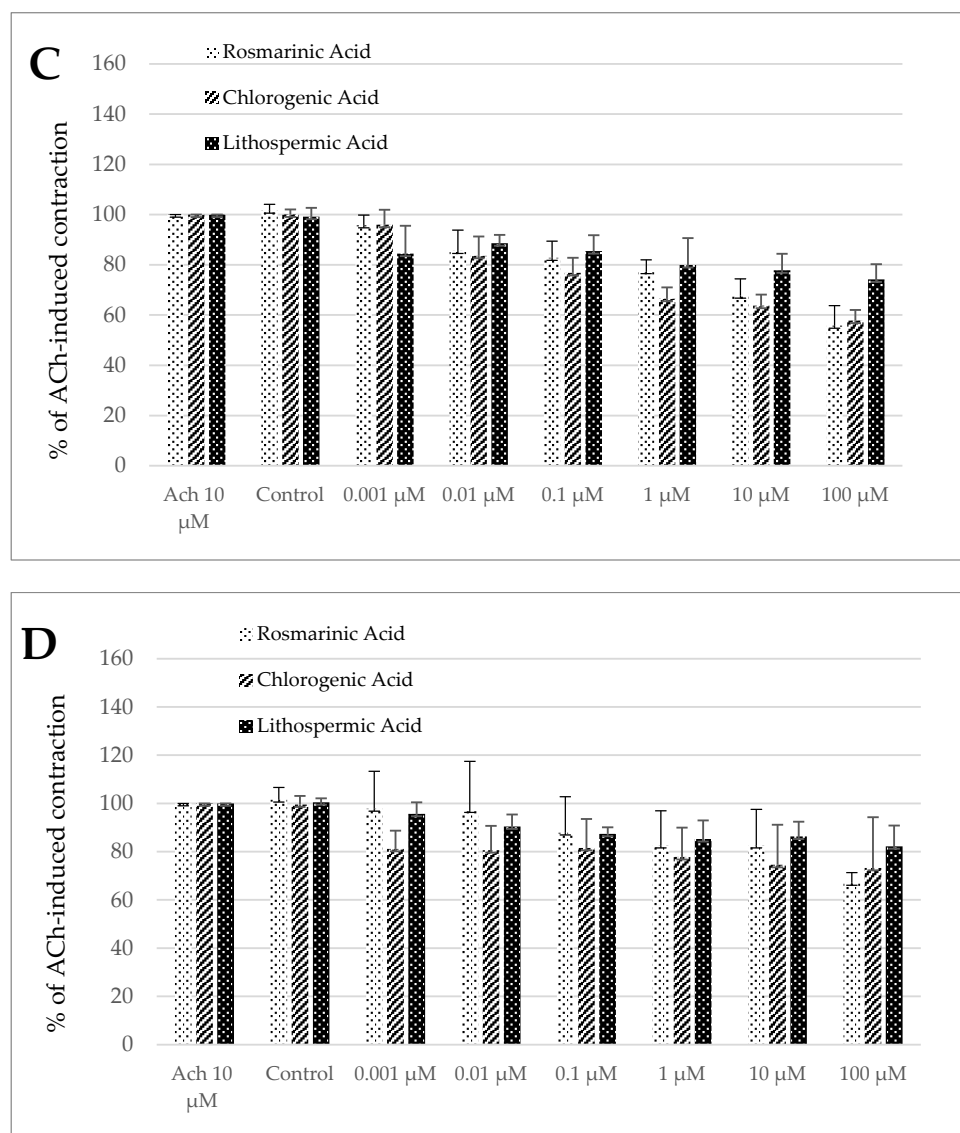


Figure 4. The effect of rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic acids on the spontaneous contractility of ovine jejunum (A,B) and colon (C,D)—circular (A,C) and longitudinal (B,D) smooth muscle. The data are expressed as a percentage of ACh-induced contraction, which is defined as 100%. The control reaction (Control) represents the response of the strips to ACh dissolved in DMSO. Data represent the mean $\pm$ standard deviation from five independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs. ACh.

Eventually, lithospermic acid provoked a similar change in contractility to chlorogenic acid, i.e., only the jejunum longitudinal strips did not respond to LA. By contrast, in all other types of muscle strips, LA provoked a remarkable decrease in ACh-induced contractions. For the jejunum circular smooth muscle preparations, a significant decrease of ACh-evoked contraction was measured in the presence of LA in the concentration range of 1–100 μ M and ranged respectively from $89.89 \pm 7.55\%$ to $81.21 \pm 6.04\%$ of the control reaction (Figure 4A). In the case of the colon preparation, in circular smooth muscle LA provoked a decreased reaction to ACh, which came to $84.41 \pm 11.15\%$ and $74.20 \pm 6.03\%$ of the control contraction for the acid utilized in the concentration of 0.001 and 100 μ M, respectively (Figure 4C). In the case of the colon longitudinal smooth muscle, a significant decrease in ACh-induced contraction was observed in the presence of LA in the concentration of 0.01 μ M and higher. The maximum inhibition of ACh-provoked reaction was detected for LA used in the highest dose (100 μ M) and amounted to $82.21 \pm 8.63\%$ of the control ACh treatment (Figure 4D).

4. Discussion

As a feed additive, *Melissa officinalis* offers various benefits for animal welfare. The experiment on Arabi sheep indicated that the high levels of added *melissa* leaves to feed significantly benefited productive traits (body weight, weight gain, feed consumption, and conversion factor) [15]. When selecting herbs to add to the feed, not only the plants' properties but the animals' preferences should be taken into account. It has been noticed that lemon balm is tasty for pigs, cows, and chickens [16]; it suggests that *Melissa officinalis* might also be palatable to sheep and, as a highly palatable herb, may increase feed and nutrient intake.

The safety of a commercially available dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves (Nor-Balm[®], Beaucouzé, France) was validated as a feed additive for all animal species. The maximum proposed use level is 100 mg/kg of complete feed. No safety concern arises for the consumer from animal feed [13]. Polish research has confirmed the positive effect of the moderate administration of mixtures of herbs, including lemon balm, on the flavor of meat lamb [17]. Since the extract is always applied orally, it has the chance to modulate the functioning of the digestive tract. Therefore, it is important to investigate and understand its potential to affect gut motility. Gastrointestinal disorders might seriously threaten the animal's welfare and cause financial losses for the farmer. Moreover, gastrointestinal disorders impacting motility play a critical role in digestion, nutrient absorption, and the maintenance of gut microbiome balance [18,19]. One of the most common diseases of the digestive tract in sheep is infection caused by *Clostridium perfringens*, which can occur mainly in the case of a weakened intestinal peristalsis. *Clostridium perfringens* is a regular component of the intestinal microbiota of sheep, which occurs in more significant quantities in the ileum [20,21]. In the case of a weakened peristalsis and an inappropriate diet, a pathological, excessive multiplication of this bacterium is likely to happen. Considering the results of our experiments (and assuming positive verification in in vivo trials), administering a feed additive with lemon balm to a healthy animal may reduce intestinal peristalsis, which increases the risk of infection with *Clostridium perfringens*. Therefore, lemon balm should not be a permanent feed additive, especially if added in large quantities. Still, in the case of illness, if one of the main symptoms is diarrhea, lemon balm should have a therapeutic effect, limiting intestinal hypercontractility. It can also improve the palatability of feed when appetite is reduced during illness.

The comprehensive understanding of the effects of lemon balm on critical tissues and their functionality in various animal species remains insufficiently explored. The trials' outcomes prove to undouble the significant and potent effect of lemon balm and its phenolic acids on modifying sheep GIT motility (Table 1). Regarding spontaneous contractions, the *Melissa officinalis* extract, rosmarinic acid, and lithospermic acid induced a significant decrease in spontaneous contractility in the sheep jejunum and colon. By contrast, chlorogenic acid exhibited myocontractile effects except for the colon circular smooth muscle preparations, where the effect was myorelaxant, as with the other acids. The results show a decrease in spontaneous activity after administration of the tested substances, so the *Melissa officinalis* extract should not be used for hypomotility or even atony of GIT in sheep. In the case of ACh-induced contractions, the *Melissa officinalis* extract and all tested phenolic acids decreased significantly acetylcholine-induced contractions in the sheep longitudinal and circular smooth muscle strips of the colon and jejunum (except for chlorogenic and lithospermic acid in the longitudinal strips of the jejunum, which did not cause significant impact). The observation of the antispasmodic effect could potentially benefit symptomatic therapy of sheep experiencing hypermotility disorders, demonstrated mainly as diarrhea, and it might help eliminate painful intestinal cramps and slow down peristalsis. Given the convergent effects of the whole lemon balm extract and

its phenolic acids, investigating their concurrent administration could provide insight into potential synergistic or hyperadditive interactions, enhancing their applicability in clinical settings. However, it is crucial to acknowledge that the findings presented were derived from ex vivo conditions. Alternative research methods help minimize the use of animals in in vivo studies, reducing research costs, duration, and supporting animal welfare. Due to the complexity and variability of rumen fermentation in vivo, these results should be interpreted cautiously. Furthermore, there is currently no experimental evidence on the metabolic fate of the lemon balm extract in the ruminant gastrointestinal tract, nor assurance that phenolic acids reach sufficient intestinal concentrations to elicit the observed effects. An additional factor influencing the bioavailability and activity of the phenolic acids is their potential interaction with other feed components, particularly proteins [22], and their impact on methanogenesis [23]. Given the interspecies variations in the anatomical structure of the digestive tract, dietary composition, housing conditions, and the intended use of animals, research should be very carefully extrapolated to other species. Nevertheless, there are examples of using sheep as a large animal model for investigating and treating human disorders [24], or as a representative for other ruminants [25,26]. Nevertheless, it is beneficial to conduct specific research across different animal species whenever possible to avoid misinterpretation [27,28]. The records of trials with *Melissa officinalis* and its ingredients demonstrate that the effects may indeed vary qualitatively and quantitatively between animal species. When comparing the results presented herein, it was found that *Melissa officinalis* also decreased the frequency of spontaneous contractions on the jejunum of the mice [29], the ileum of rats [30], and the jejunum of chicken [14]. However, in the case of swine, the effect is the opposite. Lemon balm extract caused a progressive increase in the spontaneous contractility of the jejunum and colon longitudinal smooth muscle, and rosmarinic and lithospermic acids provoked dose-dependently increased colon motility [31]. The contradictory results obtained in swine tissue might result from a more dominant role of phenolic acids other than active constituents, e.g., essential oil ingredients. On the other hand, the third of the phenolic acid tests, i.e., chlorogenic acid, was found to cause myorelaxation in the thoracic aorta smooth muscle of rats [32].

Interestingly, the effects are similar when comparing the research on the effects of *Melissa officinalis* to other plants of similar phytochemical profiles. For example, in an experiment involving a volatile oil of *Rosmarinus officinalis* leaves (rich in rosmarinic acid) on the vascular smooth muscle of a rabbit, the effect was also myorelaxant [33]. In an experiment involving sheep abomasal preparations [34], essential oil from *Artemisia dracuncululus* (rich in chlorogenic acid) provoked complete relaxation of the spontaneous activity and reduction of the force of ACh-induced contractions [35]. Moreover, *Crataegus gracilior*, a plant rich in chlorogenic acid, was also observed to relax the smooth muscle in rat-isolated aorta rings [36].

The influence of lemon balm and phenolic acids on the motor activity of the jejunum and colon may significantly impact the functioning of the sheep gut. A strong influence on intestinal motility could lead to alterations in digestion time, peristalsis, nutrients and antigens absorption, and microbiota homeostasis through the gastrointestinal tract. This study indicates that the effect of *Melissa officinalis* and some of its significant constituents may play an essential role in controlling the contractility of the sheep jejunum and colon. By offering an herbal-based approach to gut health and motility regulation, this research contributes to reducing antibiotic and synthetic drug use in sheep farming, aligning with global efforts to combat antimicrobial resistance. These findings provide a foundation for further research into the development of herbal supplements or medications targeting gut motility disorders in sheep.

Table 1. A summary of the effects of the *Melissa officinalis* extract and three phenolic acids on ovine intestine motoric activity: (A)—spontaneous contractility; (B)—ACh-induced contractility.

(A)				
Muscle Fiber	GIT Section			
	Jejunum		Colon	
	Circular	Longitudinal	Circular	Longitudinal
Lemon Balm extract	R	R	R	R
Rosmarinic Acid	R	R	R	R
Chlorogenic Acid	C	C	R	C
Lithospermic Acid	R	R	R	R
(B)				
Muscle Fiber	GIT Section			
	Jejunum		Colon	
	Circular	Longitudinal	Circular	Longitudinal
Lemon Balm extract	R	R	R	R
Rosmarinic Acid	R	R	R	R
Chlorogenic Acid	R	X	R	R
Lithospermic Acid	R	X	R	R

C—contraction of the smooth muscle, R—relaxation of the smooth muscle, X—no significant effect.

5. Conclusions

The results unequivocally demonstrate that both the *Melissa officinalis* extract and its primary phenolic constituents exert a myorelaxant effect on the smooth muscle of the sheep jejunum and colon under ex vivo conditions. This study underscores the significant potential of the *Melissa officinalis* extract as a feed additive to modulate intestinal motility in sheep, addressing various challenges in livestock production. Further in vivo investigations are necessary to validate these preliminary findings and elucidate the specific mechanisms through which *Melissa officinalis* influences these critical gastrointestinal functions.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.P., M.C.-S., S.S.C., S.C., M.e.A.B. and M.M.; Methodology, M.A.P., M.C.-S., S.C., M.e.A.B. and M.M.; Software, M.A.P.; Validation, M.M.; Formal analysis, M.A.P., M.C.-S., S.S.C., S.C. and M.M.; Investigation, M.A.P.; Data curation, S.C. and M.M.; Writing—original draft, M.A.P. and M.M.; Writing—review & editing, M.C.-S., S.S.C., S.C., M.e.A.B. and M.M.; Visualization, M.A.P.; Supervision, M.e.A.B. and M.M.; Project administration, S.C. and M.M.; Funding acquisition, M.e.A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Nor-feed® and the Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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 affiliated with the Warsaw University of Life Sciences declare no conflicts of interest. Sorphon Sour Cherer, Sekhou Cisse, and Mohamed el Amine Benrabia work within the R&D department of NOR-FEED. NOR-FEED commercializes NOR-BALM, a standardized *Melissa officinalis* extract.

Abbreviations

ACh	Acetylcholine chloride
ChA	Chlorogenic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
GI	Gastrointestinal
GIT	Gastrointestinal tract
Isop	Isoproterenol
LA	Lithospermic acid
MK-HS	Modified Krebs–Henseleit solution
RA	Rosmarinic acid

References

1. Pulina, G.; Milán, M.J.; Lavín, M.P.; Theodoridis, A.; Morin, E.; Capote, J.; Thomas, D.L.; Francesconi, A.H.D.; Caja, G. Invited Review: Current Production Trends, Farm Structures, and Economics of the Dairy Sheep and Goat Sectors. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 6715–6729. [\[CrossRef\]](#)
2. Tirado, R. *Defining Ecological Farming*; University of Exeter, School of Biosciences: Exeter, UK, 2009.
3. EFSA The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2018/2019. *EFSA J.* **2021**, *19*, e6490. [\[CrossRef\]](#)
4. Singer, R.S.; Porter, L.J.; Thomson, D.U.; Gage, M.; Beaudoin, A.; Wishnie, J.K. Raising Animals Without Antibiotics: U.S. Producer and Veterinarian Experiences and Opinions. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Gernat, A.A.; Santos, F.B.O.; Grimes, J.L. Alternative Approaches to Antimicrobial Use in the Turkey Industry: Challenges and Perspectives. *Ger. J. Vet. Res.* **2021**, *1*, 37–47. [\[CrossRef\]](#)
6. Kour, D.; Sharma, V.K.; Sharma, R.K.; Pathak, A.K.; Rastogi, A. Evaluation of Native Medicinal Plants as Feed Additives in the Sheep Ration. *Indian J. Anim. Sci.* **2023**, *93*, 129759. [\[CrossRef\]](#)
7. Saparova, E.; Zubova, T. The Effectiveness of Phytobiotic Additives in the Diet of Sheep. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2019**, *403*, 012034. [\[CrossRef\]](#)
8. Celi, P.; Raadsma, H.W. The effects of Yerba Mate (*Ilex paraguarensis*) supplementation on the productive performance of lambs. In *Ruminant Physiology*; Wageningen Academic: Wageningen, The Netherlands, 2009; pp. 804–805.
9. Amit, M.; Cohen, I.; Marcovics, A.; Muklada, H.; Glasser, T.A.; Ungar, E.D.; Landau, S.Y. Self-Medication with Tannin-Rich Browse in Goats Infected with Gastro-Intestinal Nematodes. *Vet. Parasitol.* **2013**, *198*, 305–311. [\[CrossRef\]](#)
10. Gradé, J.T.; Tabuti, J.R.S.; Van Damme, P. Four Footed Pharmacists: Indications of Self-Medicating Livestock in Karamoja, Uganda. *Econ. Bot.* **2008**, *63*, 29–42. [\[CrossRef\]](#)
11. Villalba, J.J.; Miller, J.; Ungar, E.D.; Landau, S.Y.; Glendinning, J. Ruminant Self-Medication against Gastrointestinal Nematodes: Evidence, Mechanism, and Origins. *Parasite* **2014**, *21*, 31. [\[CrossRef\]](#)
12. Singh, R.; Zogg, H.; Wei, L.; Bartlett, A.; Ghoshal, U.C.; Rajender, S.; Ro, S. Gut Microbial Dysbiosis in the Pathogenesis of Gastrointestinal Dysmotility and Metabolic Disorders. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2021**, *27*, 19–34. [\[CrossRef\]](#)
13. Posłuszny, M.A.; Chłopecka, M.; Suor-Cherer, S.; Cisse, S.; Benrabia, M.e.A.; Mendel, M. Modulation of Chicken Gut Contractility by *Melissa Officinalis*—Ex Vivo Study. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, 103045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Bampidis, V.; Azimonti, G.; Bastos, M.d.L.; Christensen, H.; Kouba, M.; Kos Durjava, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Marcon, F.; Mayo, B.; et al. Safety and Efficacy of a Dried Aqueous Ethanol Extract of *Melissa officinalis* L. Leaves When Used as a Sensory Additive for All Animal Species. *EFSA J.* **2020**, *18*, e06016. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Wedah, H.A.; Mohamed, A.S.; Al-Yassiri, A.J. Effect of Added Different Levels of Melissa Leaves Powder to Diet on Some Productive Traits of Arabi Sheep. *Plant Arch.* **2020**, *20*, 543–545.
16. Grela, E.; Klebaniuk, R.; Kwiecien, M.; Pietrzak, K. Fitobiotyki w produkcji zwierzęcej [Phytobiotics in animal production]. *Prz. Hod.* **2013**, *3*, 21–24.
17. Bodkowski, R.; Patkowska-Sokoła, B.; Szmato, T. Wpływ dodatku naturalnych biostymulatorów na użytkowość mięsna jagniąt oraz opłacalność tuczu. *Biul. Inf. Przem. Pasz.* **1992**, *4*, 35–45.
18. Lee, B.; Bello-Pérez, L.A.; Lin, A.H.; Kim, C.Y.; Hamaker, B.R. Importance of Location of Digestion and Colonic Fermentation of Starch Related to Its Quality. *Cereal Chem.* **2013**, *90*, 335–343. [\[CrossRef\]](#)

19. Sensoy, I. A Review on the Food Digestion in the Digestive Tract and the Used In Vitro Models. *Curr. Res. Food Sci.* **2021**, *4*, 308–319. [[CrossRef](#)]
20. Uzal, F.A.; Songer, J.G. Diagnosis of Clostridium Perfringens Intestinal Infections in Sheep and Goats. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2008**, *20*, 253–265. [[CrossRef](#)]
21. Mohammadabadi, M.R. Role of Clostridium Perfringens in Pathogenicity of Some Domestic Animals. *J. Adv. Agric.* **2017**, *7*, 1117–1121. [[CrossRef](#)]
22. Schefer, S.; Oest, M.; Rohn, S. Interactions between Phenolic Acids, Proteins, and Carbohydrates—Influence on Dough and Bread Properties. *Foods* **2021**, *10*, 2798. [[CrossRef](#)]
23. Liu, Y.; Li, X.; Diao, Q.; Ma, T.; Tu, Y. In Silico and in Vitro Studies Revealed That Rosmarinic Acid Inhibited Methanogenesis via Regulating Composition and Function of Rumen Microbiota. *J. Dairy Sci.* **2024**, *107*, 7904–7917. [[CrossRef](#)]
24. Banstola, A.; Reynolds, J.N.J. The Sheep as a Large Animal Model for the Investigation and Treatment of Human Disorders. *Biology* **2022**, *11*, 1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Delano, M.L.; Mischler, S.A.; Underwood, W.J. Biology and Diseases of Ruminants: Sheep, Goats, and Cattle. In *Laboratory Animal Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002; pp. 519–614.
26. Hackmann, T.J.; Spain, J.N. Invited Review: Ruminant Ecology and Evolution: Perspectives Useful to Ruminant Livestock Research and Production. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1320–1334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Karasov, W.H.; Douglas, A.E. Comparative Digestive Physiology. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 741–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mahayri, T.M.; Fliegerová, K.O.; Mattiello, S.; Celozzi, S.; Mrázek, J.; Mekadim, C.; Sechovcová, H.; Kvasnová, S.; Atallah, E.; Moniello, G. Host Species Affects Bacterial Evenness, but Not Diversity: Comparison of Fecal Bacteria of Cows and Goats Offered the Same Diet. *Animals* **2022**, *12*, 2011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Aubert, P.; Guinobert, I.; Guilbot, A.; Dubourdeaux, M.; Neunlist, M. Antispasmodic and Spasmolytic Activity of Melissa Officinalis EPS upon Mice Gastrointestinal Tract: An Ex Vivo Pilot Study. *Planta Med.* **2016**, *81*, S1–S381. [[CrossRef](#)]
30. Sadraei, H.; Ghannadi, A.; Malekshahi, K. Relaxant Effect of Essential Oil of Melissa Officinalis and Citral on Rat Ileum Contractions. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 445–452. [[CrossRef](#)]
31. Pośluszny, M.; Szadkowska, D.; Chłopecka, M.; Suor-Cherer, S.; Benarbia, M.e.A.; Mendel, M. Melissa Officinalis as Gut Contractility Modifier in Swine—Ex Vivo Study. *Planta Med.* **2021**, *87*, 1260–1261.
32. Tom, E.N.L.; Girard-Thernier, C.; Demougeot, C. The Janus Face of Chlorogenic Acid on Vascular Reactivity: A Study on Rat Isolated Vessels. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 1037–1042. [[CrossRef](#)]
33. Aqel, M.B. A Vascular Smooth Muscle Relaxant Effect of Rosmarinus Officinalis. *Int. J. Pharmacogn.* **1992**, *30*, 281–288. [[CrossRef](#)]
34. Jalilzadeh-Amin, G.; Maham, M.; Dalir-Naghadeh, B.; Kheiri, F. In Vitro Effects of Artemisia Dracunculus Essential Oil on Ruminal and Abomasal Smooth Muscle in Sheep. *Comp. Clin. Pathol.* **2011**, *21*, 673–680. [[CrossRef](#)]
35. Ekiert, H.; Świątkowska, J.; Knut, E.; Klin, P.; Rzepiela, A.; Tomczyk, M.; Szopa, A. Artemisia Dracunculus (Tarragon): A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 653993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hernández-Pérez, A.; Bah, M.; Ibarra-Alvarado, C.; Rivero-Cruz, J.; Rojas-Molina, A.; Rojas-Molina, J.; Cabrera-Luna, J. Aortic Relaxant Activity of Crataegus Gracilior Phipps and Identification of Some of Its Chemical Constituents. *Molecules* **2014**, *19*, 20962–20974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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.

NATURAL DRUGS

EXPLORING THE IMPACT OF STANDARDIZED MELISSA OFFICINALIS EXTRACT AND KEY PHENOLIC ACIDS ON THE CONTRACTILITY OF ISOLATED JEJUNUM AND COLON SEGMENTS IN PIGS

MARTYNA A. POSŁUSZNY¹, MAGDALENA CHŁOPECKA-SŁOMIŃSKA¹,
SORPHON SUOR CHERER², SEKHOU CISSE^{2,3},
MOHAMMED EL AMINE BENARBIA^{2,3}, and MARTA MENDEL^{1*}

¹Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences,
Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW,
ul. Ciszewskiego, 02-786 Warsaw, Poland

²Nor-Feed SAS, 3 rue Amédéo Avogadro, 49070 Beaucouzé, France

³Joint Lab ANR FeedInTech (FIT: SONAS/Nor-Feed), 49070 Beaucouzé, France

Abstract: The rising global demand for animal protein necessitates sustainable and efficient livestock production. This study explored the effects of *Melissa officinalis* extract and its main phenolic acids on the motility of the swine jejunum and colon, with the aim of verifying its usefulness as a health-promoting feed additive. The trials were performed on isolated jejunum and colon preparations and verified the effects of *Melissa officinalis* extract and three phenolic acids (rosmarinic, chlorogenic, and lithospermic) on spontaneous and acetylcholine (ACh)-induced smooth muscle activity under isometric conditions. The study revealed the antispasmodic effect of Melissa extract. The preparation reduced the control contraction by approximately 50% when used at the highest tested dose (0.1 mg/mL). These results suggest that rosmarinic acid contributes the most to the eventual effects on the plant. In contrast, chlorogenic acid was a potent myocontractile agent under all the studied conditions and models. The major outcome of this study was the confirmation of the utility of a standardized extract of lemon balm as an antispasmodic agent in jejunum and colon specimens challenged with ACh, which is the most important stimulatory neurotransmitter in the enteric nervous system. Owing to the lack of data revealing the effects of lemon balm extract and individual phenolic acids on spontaneous contractility, it is impossible to indisputably conclude their contributions to the final effects on the plant. Nevertheless, this study highlights the potential of *Melissa officinalis* to modulate intestinal motility in pigs with hypermotility disorders, mainly microbial infections.

Keywords: swine, *Melissa officinalis*, lemon balm, jejunum, colon, contractility.

Abbreviations: AAFCO: Association of American Feed Control Officials; Ach: acetylcholine chloride, APVMA: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority; ChA: chlorogenic acid; DMSO: dimethyl sulfoxide; EMA: European Medicines Agency; EU: European Union; GHG: greenhouse gas; GI: gastrointestinal; GIT: gastrointestinal tract; GRAS: Generally Recognized as Safe; Isop: isoproterenol; LA: lithospermic acid; M K-HS: Modified Krebs-Henseleit solution; RA: rosmarinic acid

Improvements in farming techniques and husbandry procedures are needed for several reasons: environmental sustainability, economic efficiency, animal welfare, and overall food security [1, 2]. There is public perception that intensive pig production systems raise concerns about animal welfare, naturalness, and the use of antimicrobials [3]. To meet the market's needs, pig farming must be efficient, relatively cheap, and cost-effective, but also

offer safe, ecologically friendly, and high-quality meat. With the European Union ban on antibiotic growth promoters, problems that were previously eliminated began to reappear.

According to the European Commission's Farm to Fork Strategy adopted in May 2020, the use of antibiotics in the EU is expected to be reduced by 50% by the year 2030 [4, 5]. However, an increase in infection rates may lead to an increase in the therapeutic use of

* Corresponding author: e-mail: marta_mendel@sggw.edu.pl

antibiotics, which contrasts with efforts to reduce the use of antimicrobials in animals. Numerous enteric pathogens have been identified as the primary targets of the swine gastrointestinal tract. Infections of the jejunum are commonly associated with agents such as enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), and Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) [6–8]. Notably, viral infections of the gastrointestinal tract are frequently followed by secondary bacterial infections, which may exacerbate the severity of clinical symptoms and complicate disease management. Conversely, infections of the colon are predominantly linked to pathogens such as *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella typhimurium* [9, 10].

There is an urgent need to find alternative ways to improve animal health and decrease the application of antimicrobials. This is reflected in the main focus of research, which has shifted from developing new therapeutic agents and management tools to working together to improve animal health, welfare, and sustainable food production. Despite the advances that have been made, there are still some problems that remain unresolved and new challenges, such as climate change, antibiotic resistance, antibiotic residues in food, and diseases, especially diarrhea at a young age [11]. The latter can be controlled using various approaches, including the introduction of feed additives to improve the gut and general health conditions. Herbal preparations, plant extracts, and isolated phytoconstituents offer the possibility of modifying numerous intestinal functions under physiological and pathological conditions [12]. In the case of gut dysmotility, which often accompanies infectious and invasive diseases, the control of contractility is an important element of symptomatic therapy [13].

Therefore, understanding the impact of herbal products, which are known to have beneficial effects on intestinal motility, is crucial. Accordingly, the objective of this study was to evaluate the effects of a standardized extract of *Melissa officinalis* and selected major constituents on both spontaneous and pharmacologically induced contractility of porcine jejunal and colonic tissues, which represent common sites of pathogen-induced gastrointestinal dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Modified Krebs–Henseleit solution (**M K-HS**) was used as an incubation medium. The solution contained 123.76 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂,

1.156 mM MgSO₄, 14.5 mM NaHCO₃, 2.75 mM KH₂PO₄, and 12.5 mM glucose, all of which were acquired from Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland. The pH of M K-HS was consistently maintained at 7.35–7.45 with the addition of carbogen (95% O₂/5% CO₂). The temperature was set to 38°C. Acetylcholine chloride (**ACh**) and isoproterenol hemisulfate salt (**Isop**) (both from Sigma–Aldrich, Germany) were used as myocontractile and myorelaxant reference agents, respectively.

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaf extract (Nor-balm®) was produced and standardized based on rosmarinic acid content [14] by the company Nor-Feed® as described previously [15]. The main phenolic acids in lemon balm are rosmarinic acid (RA) (Sigma–Aldrich), lithospermic acid (LA) (PhytoLab), and chlorogenic acid (ChA) (Sigma–Aldrich) [14]. The extract was tested at concentrations ranging from 0.1 µg/mL to 0.1 mg/mL, whereas the active ingredients were evaluated at concentrations ranging from 0.001 to 100 µM. The stock solutions and serial dilutions of the extract were prepared using incubation medium, whereas RA, ChA, and LA were first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich). Further dilutions were carried out in distilled water to maintain the final concentration of DMSO in the tissue incubation chambers at no more than 0.5%.

Isolation and Preparation of Isolated Intestine Segments

The intestine samples were harvested from pigs that were routinely slaughtered and inspected both before and after death by an official veterinarian. The specimens were collected from the jejunum (proximal part, behind duodenum, specimens had no connection with pancreas) and colon (proximal part, behind cecum) of five to six different animals (the weight and age of the animals were not standardized due to the diverse origins of the animals). Immediately following collection, the intestines were flushed to remove the gut contents and immersed in ice-cold M K-HS. The tissues were kept on ice until dissection, which was completed within one hour of slaughter to account for transportation time. In the laboratory, each intestinal section was opened, and segments approximately 5 × 20 mm in size were excised parallel to the orientation of the longitudinal and circular smooth muscle fibers, depending on the experimental requirements. Only intestine samples that displayed no visible pathological changes in the mucosa or serosa were used for the experiments.

Data Registration, Expression, and Statistical Analysis

Each intestinal strip was individually suspended in a Schuler Organ Bath (Hugo Sachs Elektronik, March, Germany). The slices were proximally connected to an isometric force transducer (F30, type 372, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) and distally attached to a hook on a tissue holder. Throughout the experiment, changes in tension were measured to assess the reactivity of the samples. These signals were converted using a bridge amplifier (DBA, type 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) and processed using an analog-digital converter (PowerLab, ADInstruments, Sydney, Australia). The motor activity of the samples was recorded and analyzed using the Chart v7.0 and Chart v8.1 programs (ADInstruments, Sydney, Australia), along with Microsoft Office Excel.

The impact of the tested substances and extract was determined by measuring changes in the tension of the smooth muscle strips five minutes before and after the application of any substance, which was quantified as the area under the curve (AUC). All results are presented as a percentage of the control reaction, defined by the intestinal response to M K-HS or DMSO (0.5%) in the case of spontaneous activity analysis and smooth muscle contraction induced by ACh (10 μ M) at the start of reactivity analysis. Reactions to M K-HS, DMSO (0.5%), and acetylcholine at reference doses were set at 100% (control). The results are expressed as the mean values from five to six independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA using TIBCO StatSoft, Inc. (13.3.143), STATISTICA (data analysis software system), version 13.3 www.StatSoft.com. Dunnett's test was used for pairwise comparisons, with the effects of M K-HS, DMSO (0.5%), and ACh (10 μ M) in DMSO (0.5%) serving as references. A *p* value of < 0.05 was considered statistically significant.

Course of Experiments

The strips were preincubated in M K-HS at 38°C for 45 minutes before each experiment. The chambers were flushed with fresh M K-HS every 10–15 min to provide nutrients to the tissues to allow them to adapt to *in vitro* conditions. The pH and oxygen supply were maintained by continuous gassing with carbogen. Maintenance of these parameters was intended to ensure laboratory conditions similar to those used for those retained in the

body. After preincubation, a slight load was added twice (0.01 N tension), 15 minutes apart. Strips that reacted properly to ACh (1 μ M) (two times) and exhibited clear spontaneous contractility were included in the experiment. The solvent of the test substance was administered before the actual experiment, that is, M K-HS for the lemon balm extract and DMSO (0.5%) for all three acids (negative control). After buffer exchange, the strips were challenged with ACh (10 μ M), and motor activity was recorded for 3–5 minutes. After the medium was flushed and the spontaneous work stabilized, either the extract or one of the active ingredients was added, the response was observed for five minutes, and the next ACh (10 μ M) was applied. Five minutes later, the buffer was exchanged and the mixture was treated with the test substance at a relatively high concentration. Consequently, the effects of the extract and three acids on spontaneous and ACh-induced contractility were assessed in a noncumulative manner. The experiment involved the administration of ACh and Isop to verify intestinal reactivity and viability.

RESULTS

Effects of Standardized *Melissa officinalis* Extract on Spontaneous Motor Activity of Swine Jejunum and Colon Specimens

The type and magnitude of the effects of the standardized *M. officinalis* extract were very complex (Fig. 1A, B, Table 1). In the case of the jejunum segments, the reaction provoked by lemon balm was variable and dependent on the orientation of the muscle fibers. A myocontractile response was observed in the longitudinal smooth muscle, where the reaction ranged from 113.20% $\pm$ 4.30% to 150.55% $\pm$ 8.85% of the control reaction for the application of the extract at concentrations of 0.0005 and 0.1 mg/mL, respectively. On the other hand, in the case of circular muscle, the use of the extract resulted in a reduction in the contraction force, which was significant if lemon balm was applied at a concentration of 0.0005 mg/mL or higher and reached 88.2% $\pm$ 4.74% (0.0005 mg/mL) to 58.01% $\pm$ 9.29% (0.1 mg/mL) in the control reaction (Figure 1A, Table 1). The situation was different for the different colon preparations. In the case of longitudinal smooth muscle, a significant change in spontaneous contractility was observed only when the extract was used at the two highest concentrations. The magnitude of increased motility was 134.14% $\pm$ 14.10% and 138.89% $\pm$ 21.25% greater than that of the control reaction for lemon

Table 1. Comparison of the effects of lemon balm extract and phenolic acids on spontaneous and induced motor activity of the jejunum and colon in pigs.

		Jejunum		Colon	
		Circular smooth muscle	Longitudinal smooth muscle	Circular smooth muscle	Longitudinal smooth muscle
Spontaneous contractility	Lemon balm extract	↓↓	↑↑↑	-	↑↑
	RA	↑↑	-	↑↑	↑↑↑
	ChA	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	LA	↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
ACh-induced contractility	Lemon balm extract	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	RA	↑↑*	↓↓	↓↓	↓↓
	ChA	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	LA	↓↓	↓↓	↑↑↑	↓↓↓

where:

- indicates no significant effect

* indicates biphasic activity

↑↑↑ indicates a result > 150% of the control reaction

↑↑ indicates a result of 126–150% of the control reaction

100% indicates the magnitude of the response to the administration of the control substance, i.e., solvent or ACh, for the results relating to spontaneous and induced motor activity, respectively.

↑ indicates a result of 101–125% of the control reaction

↓↓↓ indicates a result < 50% of the control reaction

↓↓ indicates a result of 50–74% of the control response

↓ indicates a result of 75–100% of the control response,

balm at doses of 0.05 and 0.1 mg/mL, respectively. Conversely, in the case of circular smooth muscle, there was only a tendency toward decreased spontaneous motor activity, but the observed changes were not statistically significant (Figure 1B).

Effects of Phenolic Acids on Spontaneous Motor Activity of Swine Jejunum and Colon Specimens

The control treatment with the solvent, DMSO (0.5%), did not significantly affect the spontaneous

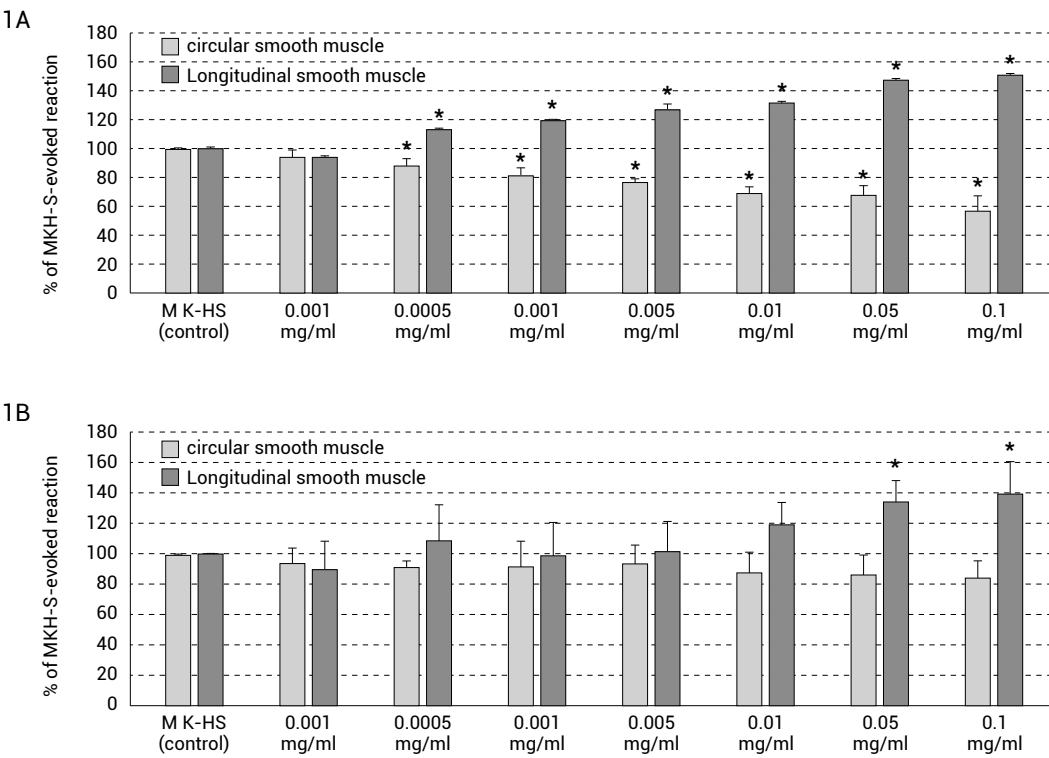


Figure 1. Effects of *Melissa officinalis* extract on the spontaneous contractility of swine jejunum (A) and colon (B) smooth muscle. The results are expressed as a percentage of spontaneous activity after the application of the control—solvent. The results shown are the means ± standard deviations of 5–6 experiments. *P ≤ 0.05 vs. M K-HS.

contractility of either the longitudinal or circular jejunum or colon segments of swine (Figure 2 A-D, Table 1). In the case of rosmarinic acid, a significant change in spontaneous contractility was observed in the jejunum circular smooth muscle and colon of both origins, when the substance was added at a concentration of 0.01 μ M or higher. The reaction was of contractile character at all times. The size of the induced contraction amounted to $115.84\% \pm 7.63\%$ and $147.33\% \pm 10.4\%$ of the control reaction for RA used at doses of 0.1 and 100 μ M, respectively. The increase in spontaneous contractility in the colon samples ranged from $122.15\% \pm 10.13\%$ (0.1 μ M) to $149.83\% \pm 9.37\%$ (100 μ M) and from $122.94\% \pm 9.73\%$ (0.01 μ M) to $185.13\% \pm 19.71\%$ (100 μ M) of the control for the circular and longitudinal smooth muscle preparations, respectively (Figure 2 C, D). Furthermore, analysis of the longitudinal smooth muscle strips isolated from the jejunum revealed no significant change in spontaneous contractility (Fig. 2B).

Chlorogenic acid induced a significant increase in the spontaneous motor activity of both the jejunum and colon strips. In the case of jejunal smooth muscle, marked changes were observed when the acid was administered at a concentration of 0.1 μ M or higher, whereas for colon preparation, significant myocontractile reactions were registered at lower doses. The size of the response induced by ChA ranged from $113.54\% \pm 1.91\%$ (0.1 μ M) to $138.27\% \pm 6.16\%$ (100 μ M) and from $116.39\% \pm 3.50\%$ (0.1 μ M) to $146.01\% \pm 8.52\%$ (100 μ M) for the longitudinal and circular jejunal smooth muscle strips, respectively (Fig. 2A, B). In the case of colon samples, the magnitude of changes in spontaneous contractility varied from $125.88\% \pm 8.99\%$ (0.01 μ M) to $163.89\% \pm 10.86\%$ (100 μ M) and from $116.02\% \pm 9.58\%$ (0.001 μ M) to $165.84\% \pm 3.59\%$ (100 μ M) of the control treatment with DMSO (0.5%) for the circular and longitudinal smooth muscle strips, respectively (Figure 2 C, D).

Lithospermic acid (LA) provokes significant disturbances in the spontaneous motor activity of both the jejunum and colon smooth muscles. LA caused a remarkable decrease in spontaneous activity in a dose-dependent manner only in the jejunum circular strips, starting at a dose of 0.01 μ M. The extent of inhibited contractility ranged from $84.31\% \pm 3.44\%$ to $55.86\% \pm 7.33\%$ of that of the control treatment for LA applied at doses of 0.01 and 100 μ M, respectively (Figure 2A). In the case of jejunum longitudinal smooth muscle, as well as circular and longitudinal colon

smooth muscle, the opposite effect was observed, that is, myocontractile. The reaction in jejunal longitudinal strips was significant when LA was used at a concentration of 0.01 μ M or higher and ranged between 112.89 ± 8.83 (0.01 μ M) and $153.18 \pm 7.50\%$ (100 μ M) of the control reaction (Figure 2B). In the case of the colon samples, the size of the reaction induced by LA applied at a concentration of 0.01 μ M reached 122.62 ± 4.31 (circular fibers) and $115.88 \pm 8.15\%$ (longitudinal fibers) of the control response, and for the LA used at the highest tested concentration, the contractions amounted to 150.85 ± 5.51 and $154.25 \pm 5.65\%$ of the reaction to the vehicle for the circular and longitudinal smooth muscle, respectively (Figure 2C, D).

Effects of Standardized *Melissa officinalis* Extract on Acetylcholine-Induced Contractility in Swine Jejunum and Colon Specimens

The standardized extract of *M. officinalis* had clear antispasmodic effects on the swine jejunum and colon segments (Figure 3 A, B, Table 1). In the jejunum, preparations consisting of circular smooth muscle fibers reacted sooner (at lower doses) to the lemon balm than did those in the jejunum, and preparations consisting of circular smooth muscle fibers reacted sooner (at lower doses) to the lemon balm than did the longitudinal smooth muscle. In the first case, a notable reduction in ACh-induced contraction was provoked by *Melissa* extract in the concentration range of 0.0005–0.1 mg/mL, with the maximum decrease in the level of $59.64\% \pm 5.92\%$ of the control reaction to ACh dissolved in M K-HS (Additional file 1). In the case of jejunum longitudinal smooth muscle, a significant change in ACh-induced contraction was observed at a concentration of 0.001 mg/mL or higher, amounting to $81.73\% \pm 4.54\%$ and $53.73\% \pm 9.29\%$ of the control reaction for the extracts used at concentrations of 0.001 mg/mL and 0.1 mg/mL, respectively (Figure 3A). In contrast, in the colon samples, circular smooth muscle was less susceptible to *Melissa* extract than longitudinally oriented fibers. The range of effective concentrations for the latter was between 0.0005 and 0.1 mg/mL, and the concentrations used in the myorelaxant reaction were $85.96\% \pm 5.19\%$ and $53.84\% \pm 16.45\%$ greater than those used in the control reaction, respectively. In the case of colon circular smooth muscle, notable relaxation was observed in the dose range of 0.01 ($71.75\% \pm 8.94\%$) to 0.1 mg/mL ($63.26\% \pm 13.82\%$ of the control ACh treatment) (Figure 3 B).

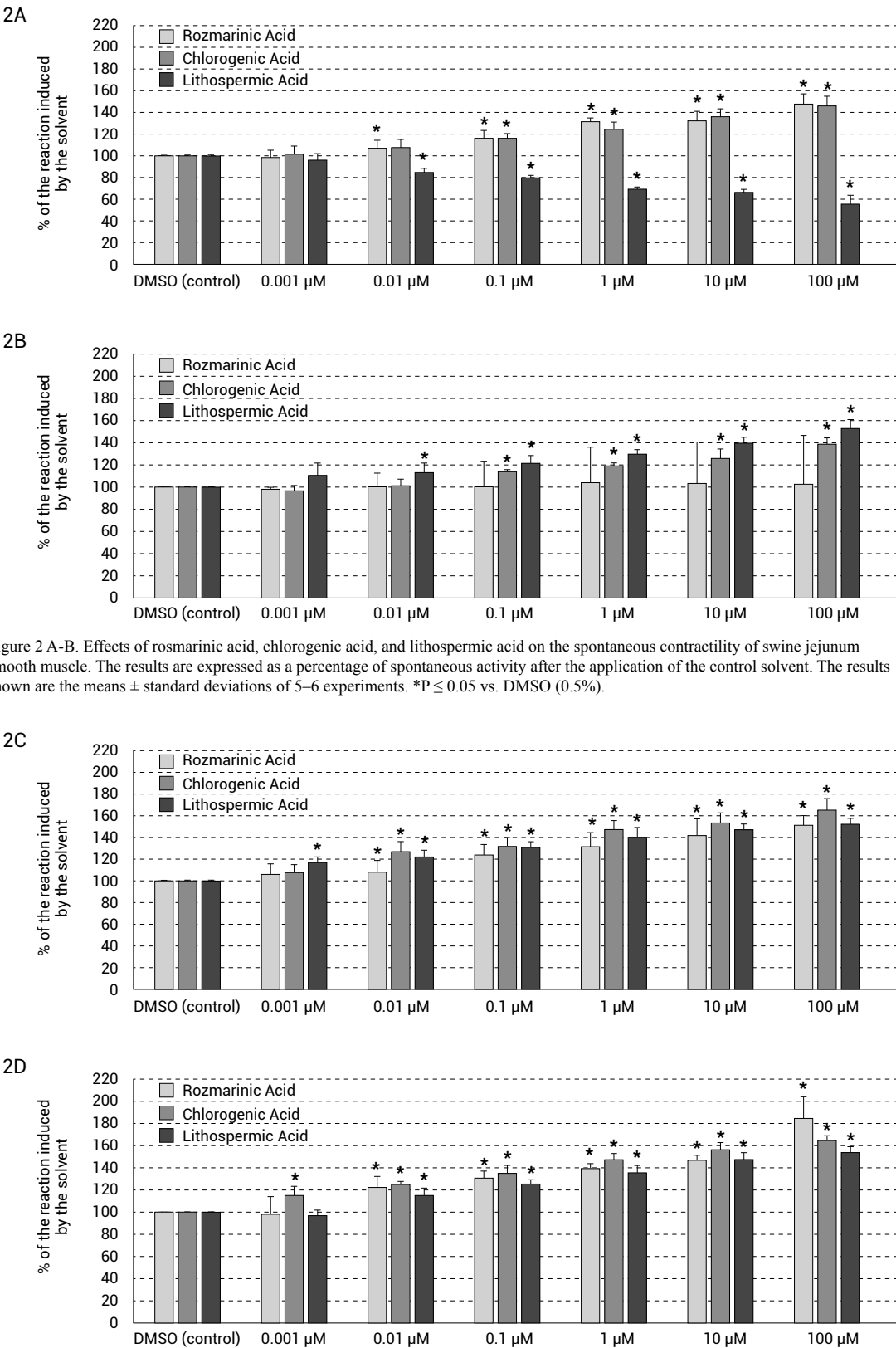


Figure 2 A-B. Effects of rosmarinic acid, chlorogenic acid, and lithospermic acid on the spontaneous contractility of swine jejunum smooth muscle. The results are expressed as a percentage of spontaneous activity after the application of the control solvent. The results shown are the means $\pm$ standard deviations of 5–6 experiments. * $P \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%).

Figure 2 C-D. Effects of rosmarinic acid, chlorogenic acid, and lithospermic acid on the spontaneous contractility of swine colon smooth muscle. The results are expressed as a percentage of spontaneous activity after the application of the control—solvent. The results shown are the means $\pm$ standard deviations of 5–6 experiments. * $P \leq 0.05$ vs. DMSO (0.5%).

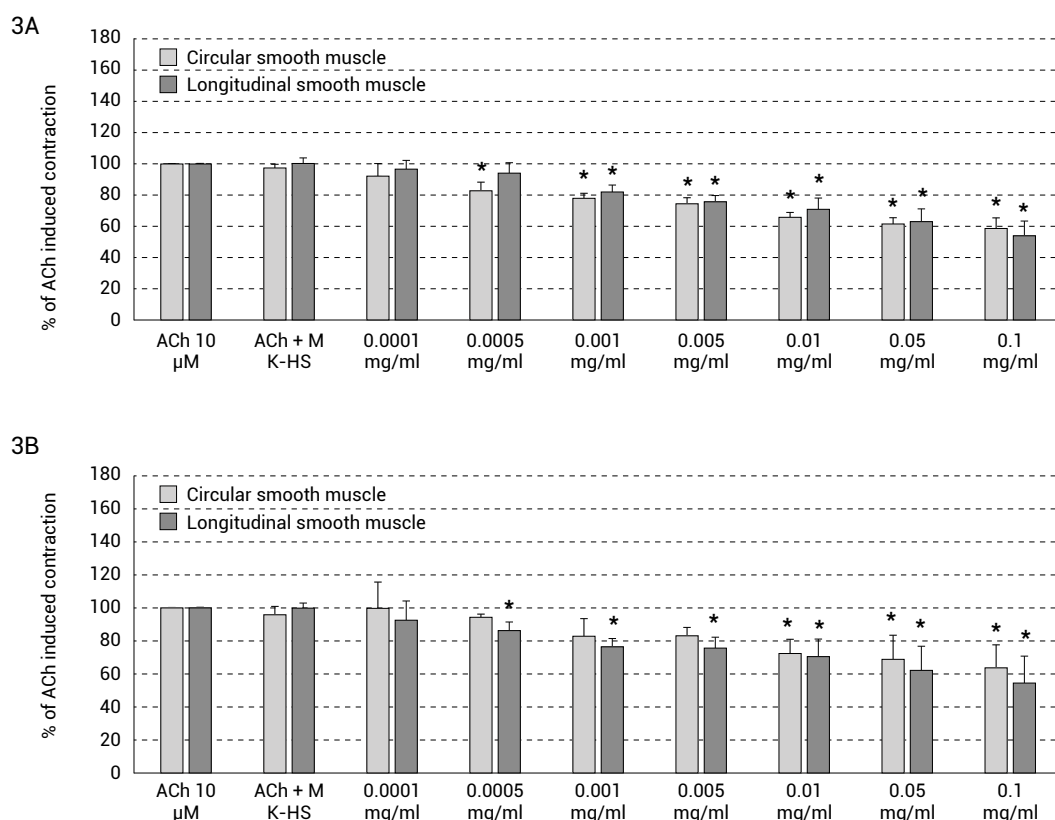


Figure 3. Effects of *Melissa officinalis* extract on the ACh-evoked reactions of swine jejunum (A) and colon (B) smooth muscle. The results are expressed as a percentage of ACh-induced contraction, which is considered a control reaction and is defined as 100%. The results shown are the means $\pm$ standard deviations of 5–6 experiments. * $P \leq 0.05$ vs. ACh.

Effects of Phenolic Acids on Acetylcholine-Induced Contractility in Swine Jejunum and Colon Specimens

Notably, the control treatment with the solvent (0.5% DMSO) produced no significant change in the size of ACh-induced contractility in the jejunum or colon preparation (Figure 4 A-D) of both longitudinal and circular segments. Rosmarinic acid significantly affected the ACh-induced contractility of both segments and muscle types (Figure 4A-D, Table 1). Regardless of the origin of the strips, the evoked reaction was antispasmodic and significant over a wide range of concentrations. In the longitudinal jejunum samples, the magnitude of decrease in contraction was $87.51\% \pm 3.97\%$ and $68.58\% \pm 5.89\%$ of the control for RA at concentrations of 0.1 and 100 μM , respectively (Figure 4B). Interestingly, RA induced a biphasic effect on jejunum circular smooth muscle. When RA was administered at concentrations ranging from 0.1 to 10 μM , it diminished the degree of ACh-induced contraction (up to $54.87\% \pm 9.27\%$ of the control reaction for RA at a dose of 10 μM). However, at the highest tested concentration (100 μM), RA increased contraction, which was $131.31\% \pm 18.26\%$

greater than that of the control (Figure 4A). In the case of the colon samples, the antispasmodic effect was notable at concentrations ranging from 1 to 100 μM in the circular smooth muscle (Additional file 2) and from 0.1 to 100 μM in the longitudinal smooth muscle. The maximum inhibition of the ACh-induced concentration was recorded when RA was applied at the highest dose and was $61.17\% \pm 13.86\%$ and $62.63\% \pm 8.27\%$ greater than that of the control ACh in the colon circular and longitudinal smooth muscle strips, respectively (Figure 4 C, D). Chlorogenic acid, the only acid studied, provoked a significant increase in ACh-induced contraction in all the jejunum and colon smooth muscle strips. In the jejunum, remarkable amplification of the reaction was observed when ChA was administered at concentrations of 0.01 μM or higher and 0.1 μM or higher in the case of longitudinal and circular smooth muscle, respectively. The size of the produced reaction ranged from $126.99\% \pm 10.34\%$ (0.01 μM) to $153.60\% \pm 9.82\%$ (100 μM) in the control treatment for the longitudinal strips and from $112.81\% \pm 7.29\%$ (0.1 μM) to $144.98\% \pm 6.01\%$ (100 μM) in the control treatment for the circular strips. In the longitudinal colon

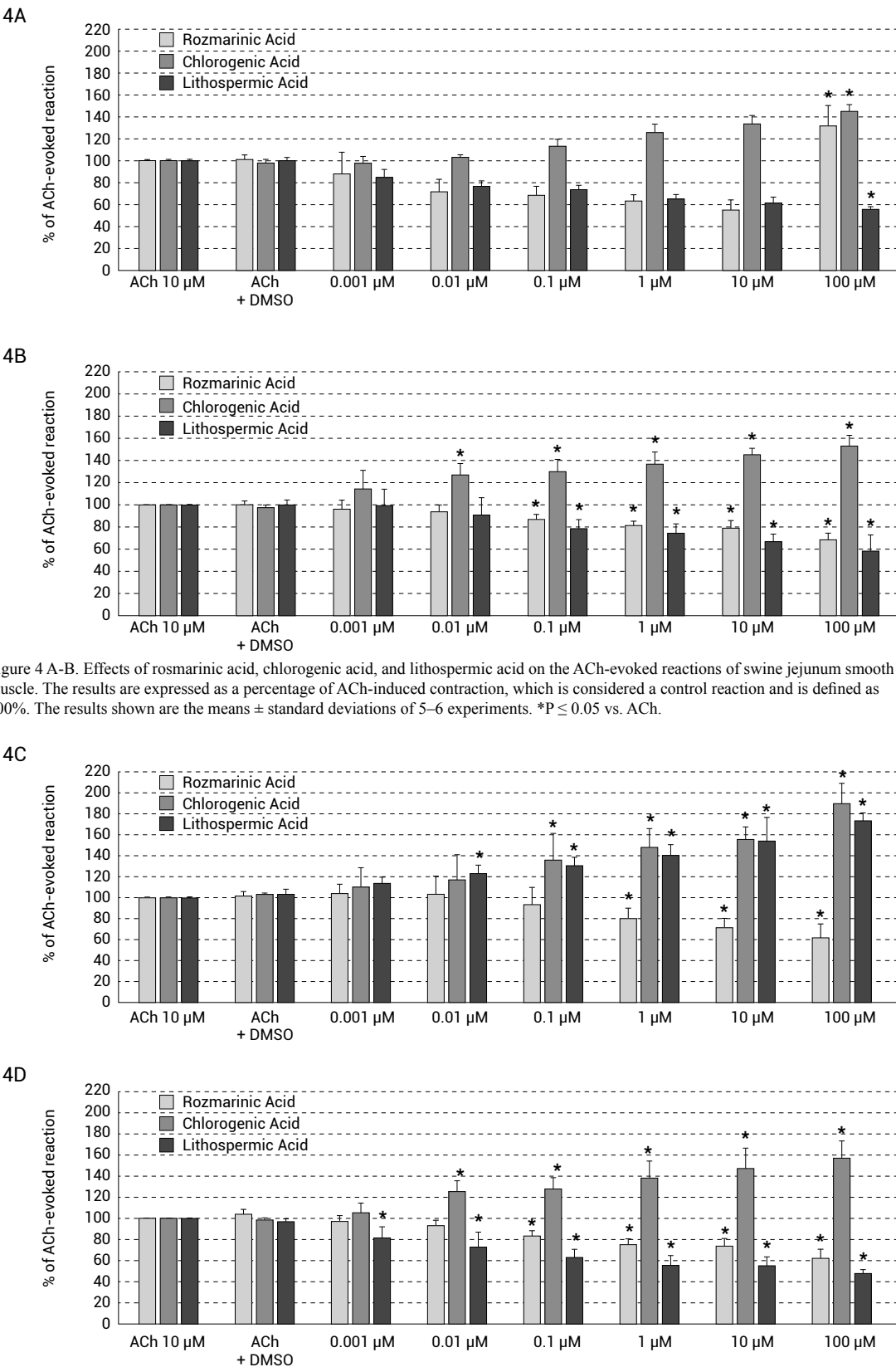


Figure 4 A-B. Effects of rosmarinic acid, chlorogenic acid, and lithospermic acid on the ACh-evoked reactions of swine jejunum smooth muscle. The results are expressed as a percentage of ACh-induced contraction, which is considered a control reaction and is defined as 100%. The results shown are the means $\pm$ standard deviations of 5–6 experiments. * $P \leq 0.05$ vs. ACh.

Figure 4 C-D. Effects of rosmarinic acid, chlorogenic acid, and lithospermic acid on the ACh-evoked reactions of swine colon smooth muscle. The results are expressed as a percentage of ACh-induced contraction, which is considered a control reaction and is defined as 100%. The results shown are the means $\pm$ standard deviations of 5–6 experiments. * $P \leq 0.05$ vs. ACh.

strips (Additional file 3), the effective dose started at 0.01 μ M, and the magnitude of ACh-induced contraction increased to $125.69\% \pm 10.37\%$ and even $157.56\% \pm 16.40\%$ of the control for ChA at concentrations of 0.01 and 100 μ M, respectively (Fig. 4D). Finally, in the case of colon circular smooth muscle, the reaction induced by ChA was significant at concentrations ranging from 0.1 to 100 μ M, and amounted to $136.14\% \pm 25.15\%$ and even $189.38\% \pm 19.80\%$ of the control reaction (Figure 4C).

Eventually, lithospermic acid provoked an antispasmodic effect in both the jejunum and colon strips, which consisted of longitudinal smooth muscle fibers. For the jejunum circular smooth muscle preparations, a significant decrease in ACh-evoked contraction was measured in the presence of LA in the concentration range of 0.001–100 μ M, ranging from $84.19\% \pm 8.00\%$ to $55.43\% \pm 2.62\%$ of the control reaction (Figure 4A). Furthermore, the antispasmodic effect of LA on jejunal longitudinal smooth muscle was remarkable when LA was used at a concentration of 0.1 μ M or higher. The size of the reduced contraction was $78.47\% \pm 8.40\%$ and $59.01\% \pm 14.00\%$ that of the control reaction for LA added at concentrations of 0.1 μ M and 100 μ M, respectively (Figure 4B). In the case of the colon preparation, the character and amplitude of the evoked reactions were dependent on the orientation of the smooth muscle fibers. Surprisingly, in circular smooth muscle, LA provoked an increased reaction to ACh, which reached $123.15\% \pm 7.93\%$ and $173.03\% \pm 7.99\%$ of the control contraction for the acids utilized at concentrations of 0.01 and 100 μ M, respectively (Figure 4C). Finally, LA is a potent antispasmodic agent for colon longitudinal smooth muscle. A significant decrease in ACh-induced contractions was observed in the presence of LA at concentrations of 0.001 μ M or higher. The maximum inhibition of the ACh-provoked reaction was detected for the LA used at the highest dose (100 μ M), which amounted to only $47.89\% \pm 3.64\%$ of the control ACh treatment (Figure 4D).

DISCUSSION

Alterations in the contractility of the gastrointestinal tract lead to diverse health outcomes. Enhanced motility or hypermotility of the smooth muscle in the jejunum and colon may precipitate nutrient leakage, fostering pathogenic growth and facilitating their translocation across the gut barrier. Nutrient absorption, a pivotal process within the digestive system, predominantly occurs in the small intestine and is significantly influenced by its

motility. The physiological benefits of alternating changes in the threshold conditions of the circular and longitudinal muscle layers are evident in the undulating movements of the intestinal contents. These coordinated muscle contractions enhance the contact of the intestinal contents with the mucosal surface, thereby optimizing nutrient absorption. Disruptions in intestinal motility can result in malabsorption, whereby animals fail to effectively assimilate nutrients from their diet, potentially leading to weight loss, stunted growth, and other health complications.

Conversely, hypomotility, which is characterized by reduced or insufficient gastrointestinal movement, adversely affects the normal transit of food and nutrients. Such conditions may prolong the retention of food within the digestive system, further impairing nutrient absorption. Diminished peristaltic movements are likely to cause stasis, creating conditions conducive to bacterial overgrowth and fermentation within the gastrointestinal tract [16]. The complex interplay between malabsorption and hypomotility highlights the critical need for comprehensive veterinary interventions. Accurate diagnosis and targeted management of the underlying etiologies, such as gastrointestinal disorders or infections, are imperative for devising effective treatment strategies. These may include dietary modifications, supportive care, and the potential use of medications to increase motility or correct specific nutrient deficiencies, thereby addressing the multifaceted challenges presented by malabsorption and hypomotility in animals [17, 18]

In the context of animal husbandry, the use of plant extracts for both prophylactic and therapeutic purposes in swine is gaining prominence [19, 20]. Although numerous phytochemicals derived from these extracts exhibit potential health-enhancing properties, their effects on gastrointestinal motility in animals have not been well documented. Lemon balm (*M. officinalis*) is a pertinent example of a botanical with promising attributes conducive to sustaining and enhancing the health status of animals. Further investigation into the pharmacological impacts of such plant-derived compounds on digestive motility is essential for expanding their application in veterinary medicine. The plant is recognized for its sedative, antipyretic, antispasmodic, and antihypertensive activities [21]. According to the European Medicines Agency (EMA), *M. officinalis* L. is classified as a traditional herbal medicinal product indicated for the relief of mild symptoms of mental stress, support in falling asleep, and symptomatic treatment of mild gastrointestinal complaints such as flatulence [22].

The safety of a commercial dried aqueous ethanol extract from *M. officinalis* leaves (Nor-Balm®) used in the present study has been confirmed by the European Food Safety Authority for use as a sensory feed additive across all animal species [14]. In the United States, lemon balm is classified as Generally Recognized as Safe (GRAS); however, it is not formally listed as an approved animal feed ingredient by the Association of American Feed Control Officials (AAFCO). In Australia, *M. officinalis* may be incorporated into animal feed or supplements, although any therapeutic claims or inclusion in veterinary pharmaceuticals is subject to regulation by the Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). For most animals, including pigs, as a highly palatable herb, *Melissa* may lead to increased feed and nutrient intake. The safety of a commercial dried aqueous ethanol extract of *M. officinalis* L. leaves (Nor-Balm®) as a feed additive was confirmed for all animal species [14]. However, the effects of lemon balm on critical tissues and their functionality in various animal species remain insufficiently explored. The study presented herein was designed to address this knowledge gap to a certain extent.

The outcomes of these trials prove the significant and potent effects of lemon balm and its phenolic acids in modifying pig intestine motility. The complexity and variability of these effects might be due to differences in jejunum and colon anatomy and physiology. The response we observed was always dose dependent. The extracts of *M. officinalis*, as well as RA and LA, were found to decrease contractility mostly in the case of acetylcholine-induced contractility. The effects of lemon balm and its ingredients on spontaneous motor activity are more complicated. The observation of an antispasmodic effect could benefit symptomatic therapy aimed at reducing painful contractions in patients with diarrhea.

The greater importance of the results obtained for ACh-induced contractility over spontaneous muscle activity is explained by the role of ACh as a major stimulatory neurotransmitter in the enteric nervous system [23]. The findings of our study and those of previous studies on the effects of *M. officinalis* on other species indicate similar outcomes. For example, in an experiment involving the jejunum of mice, lemon balm was found to decrease the frequency of spontaneous contractions starting at a concentration of 10 mg/mL [24]. A significant inhibitory effect on contractions was also observed in the ileum of rats [25]. In the case of the chicken jejunum, the effect was myorelaxant toward

spontaneous motor activity (in the range of concentrations: 0.001–0.1 mg/mL) and opposite, i.e., prokinetic toward ACh-induced activity (0.005–0.1 mg/mL) [15], but it might be explained by the different distributions of cholinergic receptors in avian and mammalian species [26].

Given that the primary secondary metabolites of *M. officinalis*, particularly volatile compounds (essential oils) and flavonoids, have frequently been the focus of prior experimental studies, we aimed to investigate whether the phenolic acids in the plant contribute to the overall efficacy of the extract. For this study, we used lemon balm (*M. officinalis* L.) leaf extract (Nor-balm®), which was produced and standardized for rosmarinic acid content [16] via Nor-Feed®. As previously reported [15], rosmarinic acid is the predominant compound in lemon balm leaf extract (54 mg/g), followed by lithospermic acid (2.1 mg/g) and chlorogenic acid (0.79 mg/g). Therefore, we explored these three phenolic acids to assess their contributions to the overall effect of *Melissa* extract on porcine intestinal contractility. In the case of rosmarinic acid, the range of the tested concentrations reflected Nor-balm® concentrations of 1 µg/mL or higher. The other acids were examined at concentrations higher than those found in the extract. However, all the active ingredients were evaluated at the same dose range to compare their effects.

With respect to acetylcholine-induced contractility, both rosmarinic acid (RA) and lithospermic acid (LA) clearly contributed to the antispasmodic effect of the extract (Figure 3 A-D). The application of RA resulted in a significant reduction in the response to acetylcholine (ACh), with an average decrease of 60%. While LA exhibited greater antispasmodic efficacy at approximately 50%, its low concentration in the extract limits the impact of this finding. Importantly, caution is necessary when the extract is used at high doses, as both RA and LA can exhibit myocontractile effects at their highest concentrations. This effect was observed in the circular smooth muscle of the jejunum for RA (Figure 4A) and generally in the circular smooth muscle of the colon for LA. (Fig. 4C). The only clear exception was ChA, which was the most potent myocontractile agent among all the tested preparations and in all the tested scenarios. Owing to the lack of data revealing the effects of lemon balm extract and individual phenolic acids on spontaneous contractility, it is impossible to indisputably conclude their contributions to the final effects on the plant.

To understand the diversity of results between longitudinal and circular muscles, it is also important

to consider the complexity of intestinal motor control. Intestinal motility is generally regulated by a combination of myogenic and hormonal factors. The myogenic factor is crucial because both localized and propagated contractions are similar to those recorded *in situ* [27]. In our study, only the influence of intestinal motility modified by the local nervous system was explored. Although the responses of longitudinal and circular smooth muscle strips documented in this study sometimes displayed inconsistencies (e.g., the impact of lemon balm or LA on the spontaneous contractility of the swine jejunum, as shown in Figures 1 and 2A and B), the data are inadequate for determining the greater susceptibility of either the longitudinal or circular smooth muscle of the jejunum. *in vitro* studies such as this one exclude the influence of the central nervous system and hormonal modulation. Consequently, the reactions of the smooth muscles of the jejunum within a living organism may differ, resulting in a more complex interaction profile. This discrepancy highlights the limitations of extrapolating *in vitro* findings to *in vivo* contexts without considering these physiological regulatory mechanisms.

Muscarinic and nicotinic receptors, both of which are stimulated by acetylcholine (ACh), are integral to gastrointestinal (GI) motility and play pivotal roles in a range of physiological processes within the body. These receptors are crucial for the regulation of the autonomic nervous system, which orchestrates a myriad of involuntary functions, including digestion, heart rate, and glandular secretion. Their involvement underscores the complexity of the neurochemical interactions that govern GI tract functionality and overall systemic health [28, 29]. In the gastrointestinal tract, muscarinic receptors are distributed throughout the gastrointestinal tract, influencing smooth muscle contraction and the secretion of digestive enzymes and fluids [30]. Based on the current findings, it can be hypothesized that lemon balm, along with some of its constituent phenolic acids, may interfere with cholinergic neurotransmission within the gastrointestinal tract (GIT). Future studies should focus on a more detailed analysis of these interactions to elucidate the mechanisms by which lemon balm influences gastrointestinal motility and cholinergic pathways. This research could provide valuable insights into the therapeutic potential of lemon balm for managing GIT disorders.

The influence of lemon balm on the motor activity of the jejunum and colon may have a significant effect on the function of the animal. A strong influence on intestinal motility could lead to alterations

in digestion time, peristalsis, and the movement of food through the gastrointestinal tract. Regulation of intestinal motility may affect the absorption of nutrients, and excessive movement of food may limit the time available for the absorption of essential nutrients [31]. This study indicates that the effects of *M. officinalis* and some of its major constituents may play important roles in controlling the contractility of swine intestines. The frequency of microbial infections affecting pigs and primarily targeting the gut is highly important. Porcine proliferative enteropathy, caused by *Lawsonia intracellularis*, *Clostridium perfringens* infections (severe necrotizing enteritis and milder enteric disease), and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) are only a few examples of pathogens and diseases that cause significant perturbation in gut motility, which is primarily demonstrated by severe or mild diarrhea, therapy of which might benefit from the supplemental use of lemon balm extract.

CONSLUSION

In conclusion, this study demonstrated that *M. officinalis* extract and its phenolic constituents exert notable modulatory effects on the contractility of porcine intestinal smooth muscle, particularly in response to acetylcholine stimulation. These findings underscore the potential of lemon balm as a supportive agent in managing gastrointestinal disorders associated with dysmotility in pigs, warranting further investigation into its mechanisms of action and therapeutic applicability in veterinary medicine.

Funding

This work was supported by Nor-feed® and the Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences.

Author's Contribution

Research concept and design: M.M., M.P., S.S.C., S.C., M.A.B.;

Collection and/or assembly of data: M.P.;

Data analysis and interpretation: M.M., M.P., M.C-S., S.S.C., S.C., M.A.B.;

Writing the article: M.M., M.P.;

Critical revision of the article: M.M., M.C-S., S.S.C., S.C., M.A.B.;

Final approval of the article: M.M., M.P., M.C-S., S.S.C., S.C., M.A.B.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Govoni C, Chiarelli DD, Luciano A, et al. Global assessment of land and water resource demand for pork supply. *Environ Res Lett.* 2022; 17: 074003. doi: 10.1088/1748-9326/ac74d7.
- De Paula Vieira A, Anthony R. Recalibrating veterinary medicine through animal welfare science and ethics for the 2020s. *Animals* 2020; 10(4): 654. doi: 10.3390/ani10040654.
- Clark B, Panzone LA, Stewart GB, et al. Consumer attitudes towards production diseases in intensive production systems. *PLoS One* 2019; 14(1): e0210432. doi:10.1371/journal.pone.0210432.
- Bampidis V, Azimonti G, Bastos M, et al. Efficacy of iron chelates of lysine and glutamic acid as feed additive for all animal species. *EFSA J.* 2020; 18(6): e06164. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6164.
- Krzyzanowski J. “Farm to fork” strategy and its implications for the development of the beef production sector in Poland. *Probl Agric Econ.* 2021; 369(4): 150–169. doi: 10.30858/zer/142846.
- Bergeland ME, Henry SC. Infectious diarrheas of young pigs. *Vet Clin North Am (Large Anim Pract)* 1982; 4(2): 389–399. doi: 10.1016/s0196-9846(17)30113-1.
- Xia L, Yang Y, Wang J, et al. Impact of TGEV infection on the pig small intestine. *Virol J.* 2018; 15(1): 102. doi: 10.1186/s12985-018-1012-9.
- Francis D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J Swine Health Prod.* 2002; 10(4): 171–175. doi: 10.54846/jshap/323.
- Costa MO, Harding JCS. Swine dysentery disease mechanism: brachyspira hampsonii impairs the colonic immune and epithelial repair responses to induce lesions. *Microb Pathog.* 2020; 148: 104470. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104470.
- Barbosa JA, Rodrigues LA, Columbus DA, et al. Experimental infectious challenge in pigs leads to elevated fecal calprotectin levels following colitis, but not enteritis. *Porcine Health Manag.* 2021, 7(1): 48. doi: 10.1186/s40813-021-00228-9.
- Luppi A, D’Annunzio G, Torreggiani C, Martelli P. Diagnostic approach to enteric disorders in pigs. *Animals* 2023; 13(3): 338. doi: 10.3390/ani13030338.
- Chang SY, Song MH, Lee JH, et al. Phytogetic feed additives alleviate pathogenic escherichia coli-induced intestinal damage through improving barrier integrity and inhibiting inflammation in weaned pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 2022; 13(1): 107. doi: 10.1186/s40104-022-00750-y.
- Singh R, Zogg H, Wei L, et al. Gut microbial dysbiosis in the pathogenesis of gastrointestinal dysmotility and metabolic disorders. *J Neurogastroenterol Motil.* 2021; 27(1): 19–34. doi: 10.5056/jnm20149.
- Bampidis V, Azimonti G, Bastos ML, et al. Safety and efficacy of a dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves when used as a sensory additive for all animal species. *EFSA J.* 2020; 18(2): e06016. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6016.
- Posłuszny MA, Chłopecka M, Suor-Cherer S, et al. Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study. *Poult Sci.* 2023, 102(11): 103045. doi: 10.1016/j.psj.2023.103045.
- Deane AM, Chapman MJ, Reintam Blaser A, et al. Pathophysiology and treatment of gastrointestinal motility disorders in the acutely ill. *Nutr Clin Pract.* 2018; 34(1): 23–36. doi: 10.1002/ncp.10199.
- Zoran D. Nutritional management of gastrointestinal disease. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003; 18(4), 211–217. doi: 10.1016/s1096-2867(03)00074-4.
- Guilford W, Matz M. The Nutritional Management of Gastrointestinal Tract Disorders in Companion Animals. *N Z Vet J.* 2003; 51(6): 284–291. doi: 10.1080/00480169.2003.36382.
- Bullitta S, Re GA, Manunta MDI, Piluzza G. Traditional knowledge about plant, animal, and mineral-based remedies to treat cattle, pigs, horses, and other animals in the Mediterranean island of Sardinia. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2018; 14(1): 50. doi: 10.1186/s13002-018-0250-7.
- Kuralkar P, Kuralkar SV. Role of herbal products in animal production – an updated review. *J Ethnopharmacol.* 2021; 278: 114246. doi: 10.1016/j.jep.2021.114246.
- Sharifi-Rad J, Quispe C, Herrera-Bravo J, et al. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the *Melissa officinalis*. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021: 6584693. doi: 10.1155/2021/6584693.
- European Medicines Agency, Community herbal monograph on *Melissa officinalis* L., folium. London, UK, 2013.
- Delvalle NM, Fried DE, Rivera-Lopez G, et al. Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018; 315(4): G473–G483. doi:10.1152/ajpgi.00155.2018.
- Aubert P, Guinobert I, Guilbot A, et al. Antispasmodic and spasmolytic activity of *Melissa officinalis* EPS upon mice gastrointestinal tract: an ex vivo pilot study. *Planta Med.* 2016; 82(S 01): S1–S381. doi: 10.1055/s-0036-1596945.

25. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* 2003; 74(5): 445–452. doi: 10.1016/s0367-326x(03)00109-6.
26. Darroch S, Irving HR, Mitchelson FJ. Characterisation of muscarinic receptor subtypes in avian smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2000; 402(1-2): 161–169. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00489-1.
27. Bortoff A. Myogenic control of intestinal motility. *Physiol Rev.* 1976; 56(2): 418–434. doi: 10.1152/physrev.1976.56.2.418.
28. Abraham G. The Importance of muscarinic receptors in domestic animal diseases and therapy: current and future perspectives. *Vet J.* 2016; 208: 13–21. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.10.025.
29. Mandl P, Kiss JP. Role of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of gastrointestinal motility. *Brain Res Bull.* 2007; 72(4-6): 194–200. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.02.005.
30. Tobias A, Sadiq N. Physiology, gastrointestinal nervous control. In: StatPearls [Internet]; 2019.
31. McQuilken SA. Gut motility and its control. *Anaesth Intensive Care Med.* 2021; 22(5): 339–342. doi: 10.1016/j.mpaic.2021.04.002.



Warszawa, 08/09/2025

Lek. wet. Martyna Pośluszny

Martyna_posluszny@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu i wykonaniu eksperymentów, gromadzeniu, analizie i opracowaniu danych, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Martyna Pośluszny
Podpis

Warszawa, 01/09/2025

Lek. wet. Martyna Pośluszny

Martyna_posluszny@sggw.edu.pl

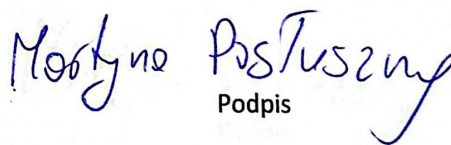
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pośluszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2/2025

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu i wykonaniu eksperymentów, gromadzeniu, analizie i opracowaniu danych, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.


Podpis

Warszawa, 08/09/2025

Lek. wet. Martyna Pośluszny

Martyna_posluszny@sggw.edu.pl

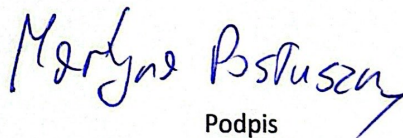
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pośluszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—*ex vivo* study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu i wykonaniu eksperymentów, gromadzeniu, analizie i opracowaniu danych, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.


Podpis

Warszawa, 08-09-2025

dr hab. Marta Mendel, prof. SGGW

marta_mendel@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2/2025

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na koordynowaniu projektu, przeprowadzeniu walidacji wyników oraz uczestniczeniu w pisaniu artykułu, redakcji i nadzorze.

M. Mendel

Podpis

Warszawa, 08-09-2025

dr hab. Marta Mendel, prof. SGGW

marta_mendel@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na koordynowaniu projektu, przeprowadzeniu walidacji wyników oraz uczestniczeniu w pisaniu artykułu, redakcji i nadzorze.

M. Mendel

Podpis

Warszawa, 08-08-2026

dr hab. Marta Mendel, prof. SGGW

marta_mendel@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Posłuszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—*ex vivo* study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na koordynowaniu projektu, przeprowadzeniu walidacji wyników oraz uczestniczeniu w pisaniu artykułu, redakcji i nadzorze.

M. Mendel
Podpis

Warszawa, 15.09.2025

dr hab. Magdalena Chłopecka-Słomińska, prof. SGGW

magdalena_chlopecka-slominska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Exploring the impact of standardized Melissa officinalis extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2/2025

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w projektowaniu badania, analizie danych oraz krytycznej ocenie manuskryptu.



Podpis

Warszawa, 15.08.2025

dr hab. Magdalena Chłopecka-Słomińska, prof. SGGW

magdalena_chlopecka-slominska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Posłuszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—*ex vivo* study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w projektowaniu badania, analizie danych oraz krytycznej ocenie manuskryptu.



Podpis

Warszawa, 15.09.2025

dr hab. Magdalena Chłopecka-Słomińska, prof. SGGW

magdalena_chlopecka-slominska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w projektowaniu badania, analizie danych oraz krytycznej ocenie manuskryptu.

M. Chłopecka-Słomińska

Podpis

[place], [date]

Sekhou Cisse, PhD

sekhoul.cisse@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine

Warsaw University of Life Sciences

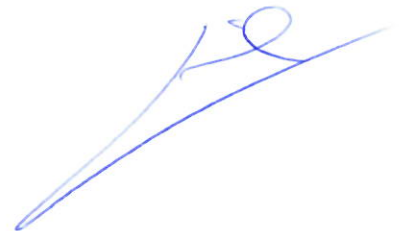
Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

My individual contribution to its creation consisted of contributed to methodology, data curation, and project administration.

Signature



NOR-FEED
SAS au capital de 520 200€
3 rue Amédéo Avogadro
49070 BEAUCOUZÉ - France
Tél : +33 (0)2 41 93 74 56
Siret : 449 090 919 00035

[place], [date]

Sekhou Cisse, PhD

sekhoulcisse@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine

Warsaw University of Life Sciences

Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Poshuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

My individual contribution to its creation consisted of contributed to methodology, data curation, and project administration.

Signature

NOR-FEED
SAS au capital de 520 200€
3 rue Amédéo Avogadro
49070 BEAUCOUZÉ - France
Tél : +33 (0)2 41 93 74 56
Siret : 449 090 919 00035

[place], [date]

Sekhou Cisse, PhD

sekhou.cisse@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine

Warsaw University of Life Sciences

Declaration of Co-Authorship

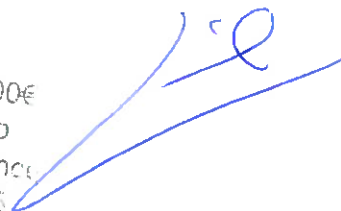
I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2/2025

My individual contribution to its creation consisted of contributed to methodology, data curation, and project administration.

Signature

NOR-FEED
SAS au capital de 520 200€
3 rue Amédéo Avogadro
49070 BEAUCOUZÉ - France
Tél : +33 (0)2 41 93 74 56
Siret : 449 090 919 00035



[Beaucouzé], [12/09/2025]

Mohammed el Amine Benarbia, PhD
amine.benarbia@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine
Warsaw University of Life Sciences

Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

My individual contribution to its creation consisted of supervised the study, secured funding, and revised the manuscript.

Signature



[Beaucouzé], [12/09/2025]

Mohammed el Amine Benarbia, PhD
amine.benarbia@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine
Warsaw University of Life Sciences

Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2/2025

My individual contribution to its creation consisted of supervised the study, secured funding, and revised the manuscript.

Signature

Amine
Benarbia

Signature
numérique de
Amine Benarbia
Date: 2025.09.12
17:24:28 +02'00'



[Beaucouzé], [12/09/2025]

Mohammed el Amine Benarbia, PhD

amine.benarbia@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine

Warsaw University of Life Sciences

Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chlopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

My individual contribution to its creation consisted of supervised the study, secured funding, and revised the manuscript.

Signature

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Amine', written over a horizontal line.

Soprane Suor-Cherer
sorphon.suor-cherer@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine
Warsaw University of Life Sciences

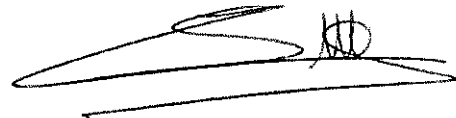
Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Verification of the Utility of the Standardized *Melissa officinalis* Extract to Control Gut Contractility in Sheep—*Ex Vivo* Study. *Animals*, 15(5), 626.

My individual contribution to its creation consisted of assisted with conceptualization, data analysis, and manuscript revision.

Signature

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by a circular mark and a horizontal line.

Soprane Suor-Cherer
sorphon.suor-cherer@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine
Warsaw University of Life Sciences

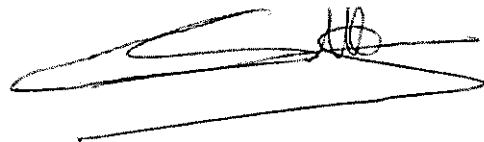
Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka, M., Suor-Cherer, S., Cisse, S., el Amine Benarbia, M., & Mendel, M.* (2023). Modulation of chicken gut contractility by *Melissa officinalis*—ex vivo study. *Poultry Science*, 102(11), 103045.

My individual contribution to its creation consisted of assisted with conceptualization, data analysis, and manuscript revision.

Signature

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke at the end.

Soprane Suor-Cherer
sorphon.suor-cherer@norfeed.net

Disciplinary Council of Veterinary Medicine
Warsaw University of Life Sciences

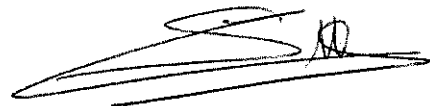
Declaration of Co-Authorship

I declare that in the work:

Posłuszny, M. A., Chłopecka-Słomińska, M., Cherer, S. S., Cisse, S., Benrabia, M. E. A., & Mendel, M. (2025). Exploring the impact of standardized *Melissa officinalis* extract and key phenolic acids in the contractility of the isolated jejunum and colon segments in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2/2025

My individual contribution to its creation consisted of assisted with conceptualization, data analysis, and manuscript revision.

Signature

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive script that appears to be 'S. S. Cherer'.