

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja ŠIKIĆ POGAČAR

**ADHEZIVNOST BAKTERIJE *Campylobacter jejuni*
K49/4 V CELIČNIH LINIJAH ČREVESNIH
EPITELNIH CELIC IN PROTIADHEZIJSKA
UČINKOVITOST IZBRANIH RASTLINSKIH
IZVLEČKOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja ŠIKIĆ POGAČAR

**ADHEZIVNOST BAKTERIJE *Campylobacter jejuni* K49/4 V CELIČNIH
LINIJAH ČREVESNIH EPITELNIH CELIC IN PROTIADHEZIJSKA
UČINKOVITOST IZBRANIH RASTLINSKIH IZVLEČKOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ADHESION OF *Campylobacter jejuni* K49/4 IN THE CELL MODEL OF
INTESTINE EPITHELIAL CELLS AND ANTI-ADHESION EFFICACY
OF SELECTED PLANT EXTRACTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Andrei

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Biotehniške fakultete in sklepu Senata Univerze z dne 25.09.2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij Bioznanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Dušanka Mičetić-Turk, za somentorico pa prof. dr. Sonja Smole Možina.

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija Bioznanosti, s področja živilstva. Raziskava je bila opravljena v laboratorijih Katedre za biologijo, mikrobiologijo, molekularno biologijo in biotehnologijo na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru; ter v Laboratorijskem centru za biokemijo, genetiko, biotehnologijo in molekularno biologijo Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru. Nekateri rastlinski izvlečki so bili pripravljani v Gradcu, Karl-Franzens University Graz, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy.

Mentorica: prof. dr. Dušanka MIČETIĆ-TURK

Somentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Maja ABRAM
Univerza v Reki, Medicinska fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in parazitologijo

Članica: asist. dr. Tjaša DANEVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod, identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka
Maja ŠIKIĆ POGAČAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD** Dd
- DK** UDK 579.2+579.61:547.9(043)=163.6
- KG** patogeni mikroorganizmi/*Campylobacter jejuni* K49/4/celična adhezija/translokacija/*in vitro*/citotoksičnost/rastlinski izvlečki/protimikrobne snovi/protiadhezijska učinkovitost/celice PSI/celice H4
- AV** ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, univ. dipl. inž. živ. tehnol.
- SA** MIČETIĆ-TURK, Dušanka (mentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (somentorica)
- KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje živilstvo
- LI** 2016
- IN** ADHEZIVNOST BAKTERIJE *Campylobacter jejuni* K49/4 V CELIČNIH LINIJAH ČREVESNIH EPITELNIH CELIC IN PROTIADHEZIJSKA UČINKOVITOST IZBRANIH RASTLINSKIH IZVLEČKOV
- TD** Doktorska disertacija
- OP** XII, 124 str., 7 pregl., 38 sl., 12 pril., 285 vir.
- IJ** sl
- Jl** sl/en
- AI** Na vprašanje ali je bakterija *C. jejuni* K49/4 sposobna translokacije skozi sloj črevesnih epitelnih celic, smo poskušali odgovoriti z uporabo polariziranega 3D modela prašičjih enterocitov PSI. V *in vitro* eksperimentalnem delu nismo ugotovili nobene povezave med transepitelno električno upornostjo (TEER) in sposobnostjo translokacije *C. jejuni* K49/4. Bakterije *C. jejuni* K49/4 smo zasledili v bazalnem delu vodnjaka že 3 h po okužbi polariziranega črevesnega epitela, brez znatnega zmanjšanja vrednosti TEER, kar nakazuje na transcelularni prenos *C. jejuni* K49/4 skozi funkcionalni celični monosloj. Protiadhezijska terapija predstavlja novo, alternativno metodo zdravljenja bakterijskih okužb, ki je zanimiva predvsem zato, ker preprečuje adhezijo bakterij, ključno, začetno stopnjo okužbe. Še bolj pomembno pri protiadhezijski terapiji je dejstvo, da ne izvaja selektivnega pritiska na bakterije, zaradi česar je manjše tveganje razvoja odpornosti. Da bi preverili inhibicijo adhezije *C. jejuni* K49/4, smo v nadaljnjih poskusih *in vitro* testirali različne rastlinske izvlečke na celičnem monosloju celic PSI, in sicer izvleček tropin sorte Modri pinot (GE), oljčnih listov (OE) ter timijana (TE) in njegov preostanek po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) ter izvleček iz semen rastline *Alpinia katsumadai* (SEE) in njegov preostanek po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R). Pred poskusom protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov smo preverili njihovo protimikrobno delovanje ter citotoksičnost na celičnih kulturah PSI in H4 in s tem določili koncentracijsko območje za testiranje protiadhezijske aktivnosti izvlečkov. Želeli smo preveriti uporabnost odpadnega materiala in stranskih proizvodov agro-živilstva ter primerjati njihovo učinkovitost z izvlečki iz izhodnega rastlinskega materiala. Z različnimi metodami predinkubacije celic PSI z izvlečki ali s *C. jejuni* K49/4 smo preverjali njihov vpliv na celične receptorje ali bakterijske adhezine. Najučinkovitejša izvlečka pri preprečevanju adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI sta bila SEE in hdSEE-R, sledila sta TE in TE-R. Zanimivo je, da so se odpadni materiali (TE-R in hdSEE-R) ter OE, izvleček iz stranskega proizvoda agro-živilske industrije, pokazali kot zelo uspešni pri preprečevanju adhezije *C. jejuni* K49/4 tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Rezultati so pokazali učinkovitost odpadnega materiala (TE-R in hdSEE-R) in stranskih proizvodov (OE) pri preprečevanju adhezije bakterij. Obetavni rezultati študije kažejo možnosti uporabe izvlečkov iz odpadnih rastlinskih materialov na različnih področjih, vključno z industrijo in skrbjo za zdravje ljudi in živali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN** Dd
- DC** UDC 579.2+579.61:547.9(043)=163.6
- CX** pathogens/*Campylobacter jejuni* K49/4/adhesion/translocation/*in vitro*/cytotoxicity/
plant extracts/antimicrobials/anti-adhesion/PSI cells/ H4 cells
- AU** ŠIKIĆ POGAČAR, Maja
- AA** MIČETIĆ-TURK, Dušanka (supervisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (co-advisor)
- PB** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PP** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme
in Biosciences, Field: Food Science and Technology
- PY** 2016
- TI** ADHESION OF *Campylobacter jejuni* K49/4 IN THE CELL MODEL OF
INTESTINE EPITHELIAL CELLS AND ANTI-ADHESION EFFICACY OF
SELECTED PLANT EXTRACTS
- DT** Doctoral dissertation
- NO** XII, 124 p., 7 tab., 38 fig., 12 ann., 285 ref.
- LA** sl
- AL** sl/en
- AI** By using polarized 3D model of pig small-intestinal epithelial cells PSI we tried to assess if *C. jejuni* K49/4 was capable of translocation through the intestinal epithelial cell layer. No correlation between TEER and the translocation capacity of *C. jejuni* was observed. Additionally, campylobacters were detected in the basal chamber of a functional small-intestinal epithelial cell model at 3 hours postinfection, without a significant reduction in the TEER value, suggesting transcellular transport of *C. jejuni* through cell monolayer. Anti-adhesion therapy is a new, alternative method of treating bacterial infections, which is particularly interesting as it prevents the adhesion of bacteria, a crucial step in any infection, without providing selection pressure for the emergence of resistant bacteria. The main objective of our study was to investigate on cell monolayer the *in vitro* antiadhesive properties of ethanolic extracts from dry cake leftover after pressing Pinot noir grapes (*Vitis vinifera*) (GE), extract from leaves of the olive tree (*Olea europea*) (OE), thyme (*Thymus vulgaris*) prior to (TE) and the residue after (TE-R) hydrodistillation of the essential oil, extract from the seeds of *Alpinia katsumadai* prior (SEE) and the residue after (hdSEE-R) hydrodistillation of the essential oil. Prior to the anti-adhesion testing, we determined the anti-*C. jejuni* and cytotoxic activities of these extracts against pig small-intestinal (PSI) and human fetal small-intestinal epithelial (H4) cell line, to avoid any influence in anti-adhesion testing and also to determine the concentration range of extracts in the assay. Through our experimental work we tried to compare the anti-adhesion efficacy and usefulness of extracts obtained from waste material or by-products of agro-food industry with the initial plant extracts. Also, for a better insight into interactions during *C. jejuni* infection, we screened different pre-incubation procedures with the addition of the extracts either 1 h before or 1 h after the *C. jejuni* infection and tried to determine whether extracts affect cellular receptors or bacterial adhesin. As the most effective extract in preventing the adhesion of *C. jejuni* K49/4 proved to be SEE and hdSEE-R, followed by the TE and TE-R. Interestingly, the waste material extracts (TE-R, hdSEE-R) and OE, as an agricultural residual material, proved to be very efficient in preventing *C. jejuni* adhesion, even at very low concentrations. Our results clearly show the potential use of bioactive waste material and agricultural by-products as a new antimicrobial and anti-adhesion agent. We suggest that not only plant extracts but also waste material and agro-food industry by-products can be used as promising novel therapeutic agents, with possible medical and industrial applications.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE RAZISKAVE	3
1.1.1 Cilji raziskave	3
1.1.2 Hipoteze	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 ZGODOVINA	5
2.2 KLASIFIKACIJA.....	5
2.3 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	8
2.4 BOLEZENSKA STANJA ZARADI KAMPILOBAKTERIOZ	10
2.5 EPIDEMIOLOGIJA BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	11
2.6 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI	14
2.6.1 Gibljivost in kemotaksa.....	16
2.6.2 Adhezija in invazija	19
2.6.2.1 Adhezija	19
2.6.2.2 Invazija	20
2.6.3 Translokacija	23
2.6.4 Toksini	23
2.6.5 Lipooligosaharid in kapsula	24
2.7 UPORABA RAZLIČNIH MODELOV ZA PROUČEVANJE VIRULENCE <i>C. jejuni</i>	25
2.7.1 Uporaba celičnih kultur	26
2.7.2 Splošne karakteristike celičnih kultur PSI in H4	27
2.8 RASTLINSKI IZVLEČKI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA ..28	
2.8.1 Definicija.....	28
2.8.2 Modri pinot	30
2.8.3 Oljčni listi	30
2.8.4 Timijan	31
2.8.5 <i>Alpinia katsumadai</i>	32
2.9 PREPREČEVANJE ADHEZIJE PATOGENIH BAKTERIJ	32
2.9.1 Preprečevanje bakterijske adhezije	33
2.9.1.1 Analogi receptorjev	33

2.9.1.2	Analogi adhezina.....	34
2.9.1.3	Spreminjanje površin	34
2.9.1.4	Preprečitev sinteze adhezinov	35
2.9.1.5	Interferenca s kovinami.....	35
2.9.1.6	Prehranski inhibitorji adhezije	36
3	MATERIAL IN METODE	39
3.1	POTEK DELA.....	39
3.2	MATERIALI	40
3.2.1	Bakterijski sev in kultivacija	40
3.2.2	Celični kulturi PSI in H4	40
3.2.3	Mikrobiološka gojišča	41
3.2.3.1	Trdno gojišče Karmali.....	41
3.2.3.2	Bujon BHI	42
3.2.3.3	Gojišče za rast in gojenje celičnih kultur DMEM advanced.....	42
3.2.4	Uporabljene raztopine, reagenti in laboratorijska oprema	43
3.2.4.1	Raztopine in reagenti.....	43
3.2.4.2	Laboratorijska oprema	44
3.2.5	Rastlinski izvlečki	44
3.2.5.1	Izvleček posušenih tropin po stiskanju grozdja sorte Modri pinot (GE)	44
3.2.5.2	Izvleček oljčnih listov (OE)	44
3.2.5.3	Izvleček timijana (TE in TE-R).....	45
3.2.5.4	Izvleček semen <i>Alpinia katsumadai</i> (SEE in hdSEE-R).....	45
3.2.5.5	Priprava izvlečkov za raziskavo	45
3.3	METODE.....	45
3.3.1	Revitalizacija bakterij <i>C. jejuni</i> K49/4	45
3.3.2	Mikroaerofilno gojenje <i>C. jejuni</i> K49/4 do eksponentne faze rasti	46
3.3.3	Priprava inokuluma	46
3.3.4	Priprava celičnih kultur za poskuse	47
3.3.5	Protimikrobno delovanje izvlečkov na <i>C. jejuni</i> K49/4	48
3.3.6	Citotoksičnost izbranih izvlečkov za celice PSI in H4	48
3.3.6.1	Določanje citotoksičnosti z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega	49
3.3.6.2	Določanje presnovne aktivnosti celic, izpostavljenih izvlečkom	50
3.4	ADHEZIJA, INVAZIJA IN TRANSLOKACIJA <i>C. jejuni</i> K49/4 NA/V PSI EPITELNE CELICE	51
3.5	INHIBICIJA VEZAVE <i>C. jejuni</i> K49/4 NA CELICE PSI IN H4 Z RASTLINSKIMI IZVLEČKI	53
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	54
4	REZULTATI	55
4.1	ADHEZIJA NA 3D CELIČNI MODEL PRAŠIČJIH ENTEROCITOV PSI TER ZNOTRAJCELIČNO PREŽIVETJE IN RAST <i>C. jejuni</i> K49/4	55
4.2	SPOSOBNOST TRANSLOKACIJE <i>C. jejuni</i> K49/4 SKOZI POLARIZIRANI CELIČNI MODEL PRAŠIČJIH ENTEROCITOV PSI	57

4.3	PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV	59
4.4	CITOTOKSIČNOST IZVLEČKOV	63
4.5	PROTIADHEZIJSKA UČINKOVITOST IZVLEČKOV	71
4.5.1	Protiadhezijska učinkovitost različnih koncentracij izvlečkov na celični kulturi PSI	71
4.5.1.1	Protiadhezijska učinkovitost izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE)	71
4.5.1.2	Protiadhezijska učinkovitost izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R)	72
4.5.1.3	Protiadhezijska učinkovitost izvlečka semen <i>Alpinia katsumadai</i> (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R)	73
4.5.2	Protiadhezijska učinkovitost različnih koncentracij izvlečkov na celični kulturi H4	74
4.6	VPLIV IZVLEČKOV NA INVAZIVNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> K49/4 V CELIČNI KULTURI PSI	75
4.6.1	Vpliv izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) na invazivnost <i>C. jejuni</i> K49/4 v celični kulturi PSI.....	75
4.6.2	Vpliv izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) na invazivnost <i>C. jejuni</i> K49/4 v celični kulturi PSI.....	76
4.6.3	Vpliv izvlečka semen <i>Alpinia katsumadai</i> (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) na invazivnost <i>C. jejuni</i> K49/4 v celični kulturi PSI	77
4.7	VPLIV IZVLEČKOV NA PREŽIVETJE IN RAST <i>C. jejuni</i> K49/4 V CELIČNI KULTURI PSI	78
4.7.1	Vpliv izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) na preživetje in rast <i>C. jejuni</i> K49/4 v celični kulturi PSI	78
4.7.2	Vpliv izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) na preživetje in rast <i>C. jejuni</i> K49/4 v celični kulturi PSI	79
4.7.3	Vpliv izvlečka semen <i>Alpinia katsumadai</i> (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) na preživetje in rast <i>C. jejuni</i> K49/4 v celični kulturi PSI	80
4.8	VPLIV RAZLIČNIH METOD INKUBACIJE CELIC PSI Z RASTLINSKIMI IZVLEČKI IN <i>C. jejuni</i> K49/4 NA ADHEZIVNOST <i>C. jejuni</i> K49/4	81
4.8.1	Protiadhezijska učinkovitost izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) po različnih metodah inkubacije s <i>C. jejuni</i> K49/4 in celicami PSI	81
4.8.2	Protiadhezijska učinkovitost izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) po različnih metodah inkubacije s <i>C. jejuni</i> K49/4 in celicami PSI.....	82
4.8.3	Protiadhezijska učinkovitost izvlečka semen <i>Alpinia katsumadai</i> (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) po različnih metodah inkubacije s <i>C. jejuni</i> K49/4 in celicami PSI.....	83
5	RAZPRAVA	84

5.1	PREHAJANJE BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> K49/4 SKOZI MONOSLOJ EPITELNIH CELIC PSI IN NJIHOVO PREŽIVETJE ZNOTRAJ CELIC	86
5.2	PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R	88
5.3	CITOTOKSIČNOST IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R	91
5.4	PROTIADHEZIJSKO DELOVANJE IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R PRI RAZLIČNIH METODAH INKUBACIJE VZORCEV	93
5.5	VPLIV IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R NA INVAZIVNOST IN ZNOTRAJCELIČNO PREŽIVETJE <i>C. jejuni</i> K49/4	96
6	SKLEPI.....	98
7	POVZETEK (SUMMARY)	99
7.1	POVZETEK.....	99
7.2	SUMMARY.....	101
7.3	SAŽETAK	103
8	VIRI	105
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam bakterijskih vrst rodu <i>Campylobacter</i> (Ming Man, 2011) .	6
Preglednica 2: Bakterijski dejavniki, ki so vključeni v patogenezo kampilobaktrov (Dasti in sod., 2010)	15
Preglednica 3: Glavne protimikrobne snovi rastlinskega porekla (Cowan, 1999)	29
Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za agar Karmali	41
Preglednica 5: Sestava bujona BHI	42
Preglednica 6: Sestava medija za gojenje celičnih kultur, DMEM advanced (Gibco)	43
Preglednica 7: Translokacija bakterij <i>C. jejuni</i> K49/4 (\log_{10} CFU/ml) skozi polarizirani 3D model celic PSI in meritve TEER (Ω/cm^2)	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Značilne kolonije bakterij <i>C. jejuni</i> na krvnem agarju (a) in Karmali agarju (b) po 48-urni inkubaciji v optimalnih pogojih rasti ter prikaz tipične morfologije <i>C. jejuni</i> pod elektronskim mikroskopom (c) (Gaynor in sod., 2004)	8
Slika 2: Viri in prenos okužbe z bakterijo <i>C. jejuni</i> (Young in sod., 2007)	12
Slika 3: Število prijavljenih primerov kampilobakterioz v letu 2012 (EFSA/ECDC, 2014)	14
Slika 4: Struktura flagela pri bakteriji <i>Campylobacter jejuni</i> (Young in sod., 2007).....	18
Slika 5: Različni dejavniki in faze kolonizacije bakterij <i>C. jejuni</i> v črevesju (van Vliet in Ketley, 2001)	22
Slika 6: Različne strategije preprečevanja bakterijske adhezije (Signoretto in sod., 2012) ..	38
Slika 7: Shema poskusa protiadhezijske učinkovitosti izbranih rastlinskih izvlečkov.....	39
Slika 8: Celice PSI (a) in H4 (b), posneto z invertnim mikroskopom (100x povečava)	41
Slika 9: Kolonije <i>C. jejuni</i> K49/4 na selektivnem agarju Karmali, po 48-urni inkubaciji	46
Slika 10: Shematski prikaz štetja celic s hemocitometrom (Doyle in Griffiths, 1999)	47
Slika 11: Mikrotitrna ploščica s 96 vodnjaki.....	48
Slika 12: Merjenje transepitelne električne upornosti (TEER) polariziranega 3D modela celic PSI.....	52
Slika 13: Shematski prikaz funkcionalnega 3D modela črevesja	53
Slika 14: Transepitelna električna upornost (TEER) polariziranega 3D modela celic PSI, ki so bile 7. dan od nasaditve okužene s <i>C. jejuni</i> K49/4 v koncentraciji 1×10^8 CFU/ml, ko je bila izmerjena najvišja upornost celic	56
Slika 15: Število adheriranih bakterij <i>C. jejuni</i> K49/4 na polarizirani 3D model celic PSI ter preživetje in rast znotrajceličnih bakterij	57
Slika 16: Protimikrobno delovanje različnih koncentracij izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) proti <i>C. jejuni</i> K49/4.....	60
Slika 17: Protimikrobno delovanje različnih koncentracij izvlečka timijana (TE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) proti <i>C. jejuni</i> K49/4.....	61
Slika 18: Protimikrobno delovanje različnih koncentracij izvlečka semen <i>A. katsumadai</i> (SEE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) proti <i>C. jejuni</i> K49/4	62
Slika 19: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) za celice PSI	64
Slika 20: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) za celice H4	65
Slika 21: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka timijana (TE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) za celice PSI.....	66
Slika 22: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka timijana (TE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) za celice H4	67

Slika 23: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka semen <i>A. katsumadai</i> (SEE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) za celice PSI.....	68
Slika 24: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka semen <i>A. katsumadai</i> (SEE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) za celice H4.....	69
Slika 25: Fotografija ene izmed mikrotiterskih ploščic pri določanju citotoksičnosti izvlečkov za celice PSI z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega	70
Slika 26: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice PSI po tretiranju celic z izvlečki GE in OE različnih koncentracij	71
Slika 27: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice PSI po tretiranju celic z izvlečki TE in TE-R različnih koncentracij.....	72
Slika 28: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice PSI po tretiranju celic z izvlečki SEE in hdSEE-R različnih koncentracij	73
Slika 29: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice H4 po tretiranju celic z izvlečki GE, OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R.....	74
Slika 30: Invazivnost <i>C. jejuni</i> K49/4 v celice PSI po tretiranju celic z izvlečki GE in OE različnih koncentracij.....	75
Slika 31: Invazivnost <i>C. jejuni</i> K49/4 v celice PSI po tretiranju celic z izvlečki TE in TE-R različnih koncentracij.....	76
Slika 32: Invazivnost <i>C. jejuni</i> K49/4 v celice PSI po tretiranju celic z izvlečki SEE in hdSEE-R različnih koncentracij	77
Slika 33: Preživetje in rast <i>C. jejuni</i> K49/4 znotraj celic PSI po inkubaciji z 200 µg/ml GE in OE.....	78
Slika 34: Preživetje in rast <i>C. jejuni</i> K49/4 znotraj celic PSI po inkubaciji z 200 µg/ml TE in TE-R.....	79
Slika 35: Preživetje in rast <i>C. jejuni</i> K49/4 znotraj celic PSI po inkubaciji s 50 µg/ml SEE in hdSEE-R	80
Slika 36: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice PSI po različnih metodah inkubacije celic z GE in OE	81
Slika 37: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice PSI po različnih metodah inkubacije celic s TE in TE-R.....	82
Slika 38: Inhibicija adhezije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celice PSI po različnih metodah inkubacije celic s SEE in hdSEE-R.....	83

KAZALO PRILOG

Priloga A: Transepitelna električna upornost (TEER) in potencial (TEP) polariziranega 3D modela celic PSI po izpostavitvi *C. jejuni* K49/4

Priloga B1: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka Modri pinot (GE) proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B2: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka oljčnih listov (OE) proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B3: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka timijana (TE) proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B4: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja preostanka po hidrodestilaciji TE (TE-R) proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B5: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B6: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja preostanka po hidrodestilaciji SEE (hdSEE-R) proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B7: Vrednosti absorbanca pri kontrolnem vzorcu s DMSO pri preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov proti *C. jejuni* K49/4

Priloga B8: Vrednosti absorbanca pri kontrolnem vzorcu pri preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov proti *C. jejuni* K49/4

Priloga C1: Citotoksičnost izbranih izvlečkov za celice PSI z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega

Priloga C2: Citotoksičnost izbranih izvlečkov za celice H4 z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega

Priloga D: Shema infekcije celic PSI s *C. jejuni* K49/4 ob uporabi različnih koncentracij izvlečkov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANOVA	analiza varianc
a_w	vodna aktivnost
BHI	bujon iz izvlečkov telečjih možganov in govejega srca (angl. Brain Heart Infusion)
<i>C. jejuni</i> K49/4	<i>Campylobacter jejuni</i> , izolat iz piščančjega mesa
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CadF	zunaj membranski protein, pomemben pri adheziji
CapA	Lipoprotein CapA (angl. <i>Campylobacter</i> adhesion protein A)
Cdc42	GTP-aza, ki je pomembna pri invaziji evkariontske celice
CDT	citotoksični toksin (angl. Cytolethal distending toxin)
CFU	število mikroorganizmov, ki lahko tvorijo kolonije (angl. Colony Forming Units)
CheY	odzivni regulator, ki ima glavno vlogo pri rotaciji bička
Cia	<i>Campylobacter</i> invazivni antigeni (angl. <i>Campylobacter</i> invasion proteins)
Cj1496c	transporterski glikoprotein, vključen v proces adhezije
CLT	enterotoksin (angl. Cholera-like toxin)
CPS	polisaharid kapsule
dH ₂ O	destilirana voda
DMEM	tekoče gojišče za gojenje celičnih kultur (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DnaJ	šaperon, ki uravnava zvijanje beljakovin pri toplotnem stresu
ECDC	Evropski center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. European Centre for Disease prevention and control)
EDTA	etilendiamin-tetraacetat
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
FBS	serum govejega zarodka
FlaA	protein bička, ki ima strukturno vlogo in ga kodira gen <i>flaA</i>
FlaB	protein bička, ki je pomemben pri premikanju bakterije in ga kodira gen <i>flaB</i>
<i>fliA</i>	sigma dejavnik, pomemben pri izražanju genov povezanih s delovanjem bička
FlpA	protein, ki je pomemben pri kolonizaciji kampilobaktrov (angl. <i>fibronectin-like protein A</i>)
FspA	protein, ki je vključen v proces apoptoze

GBS	Guillain-Barrèov sindrom
GE	izvleček grozdnih tropin sorte modri pinot (<i>Vitis vinifera</i>)
GRAS	na splošno znano kot varno (angl. generally Recognized As Safe)
GroESL	šaperon, ki uravnava zvijanje beljakovin pri toplotnem stresu
H4	celična linija fetalnih humanih črevesnih epitelnih celic
hdSEE-R	odpadni material po hidrodestilaciji eteričnega olja iz semen <i>A. katsumadai</i>
HIV	virus imunske pomanjkljivosti (angl. Human Immunodeficiency Virus)
Hsp90 α	šaperon, protein toplotnega stresa (angl. heat shock protein Hsp)
HtrA	serinska proteaza <i>C. jejuni</i>
Ig	imunoglobulin
IL	interlevkin
JlpA	lipoprotein, vključen v proces adhezije (ang. <i>jejuni</i> lipoprotein A)
LOS	lipidni oligosaharidni sloj v zunanji plasti celične stene <i>C. jejuni</i>
LPS	lipopolisaharidni sloj v zunanji plasti celične stene G- bakterij
MAP	kinaza, ki je vključena v vnetni odgovor
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NF- κ B	nuklearni faktor kapa B, ki je vključen v vnetni odgovor
MTT	(3-(4,-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolijev bromid)
OE	izvleček iz oljčnih listov (<i>Olea europea</i>)
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PEB1	zunaj membranski protein, pomemben pri adheziji
PSI	celična linija prašičjih črevesnih epitelnih celic
pVir	plazmid <i>C. jejuni</i> , ki ima vlogo v patogenezi tega patogena
<i>rpoN</i>	sigma dejavnik, pomemben pri izražanju genov povezanih s delovanjem bička
RpoS	dejavnik za večjo odpornost celic proti stresu v stacionarni fazi, imenovan sigma (σ) dejavnik
SEE	izvleček semen <i>A. katsumadai</i>
SOD	superoksid dismutaza
SoxRS	dejavnik prilagoditve na oksidativni stres
TE	izvleček timijana (<i>Thymus vulgaris</i>)
TE-R	odpadni material po hidrodestilaciji eteričnega olja iz timijana
TEER	transepitelna električna upornost
TLR	Tollu podobni receptorji (angl. Toll like receptors)
T _H	vrsta T limfocitnih celic - celice T pomagalk (angl. T helper cells))
VBNC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (Viable but Not Culturable)
VirK	protein, ki je vključen v proces kolonizacije <i>C. jejuni</i>
3D	tridimenzionalno

1 UVOD

Nesporogene, po Gramu negativne bakterije rodu *Campylobacter*, so v zadnjih 10 letih postale glavni povzročitelji črevesnih okužb ljudi, povezanih z uživanjem mikrobiološko kontaminirane hrane (EFSA, 2012; Smole Možina in sod., 2011a). Najpogostejši vzrok okužbe je predvsem uživanje nezadostno toplotno obdelanega perutninskega mesa, nepasteriziranega mleka in tudi vode ali navzkrižna kontaminacija druge hrane (Epps in sod., 2013; Haddad in sod., 2010; Humphrey in sod., 2007). Ocenjujejo, da je uživanje perutninskega mesa odgovorno za 50 – 70 % kampilobakterioz (Epps in sod., 2013; Humphrey in sod., 2007). Število prijavljenih primerov je višje kot pri drugih patogenih bakterijah, kot so *Salmonella*, *Shigella* in *Echerichia coli* O157: H7. Dejansko število okužb je zaradi številnih neprijavljenih primerov predvidoma še mnogo višje, tako v svetu kot tudi pri nas (Kovač, 2015; Parthasarathy in Mansfield., 2009). Bakterijske črevesne okužbe ljudi, vključno z najpogostejšim povzročiteljem, vrsto *C. jejuni*, predstavljajo veliko zdravstveno in ekonomsko breme. Niti 30 let intenzivnih študij niti dejstvo, da je zaporedje celotnega genoma poznano, še ni pojasnilo mehanizmov virulentnosti, oz. so ti še vedno slabo raziskani (Bell in Kyriakides, 2009).

Obvladovanje bakterijskih okužb postaja vedno težje zaradi naraščajočega števila bakterij, odpornih proti dostopnim antibiotikom, vključno z mnogokratno odpornostjo sevov proti večim antibiotikom hkrati. Ta se je pri bakterijah rodu *Campylobacter* znatno povečala v zadnjih letih (Zhang in Plummer, 2008), kar potrjujejo podatki evropskih držav (EFSA/ECDC, 2014) in tudi nedavna slovenska poročila (IVZ, 2012; Smole Možina in sod., 2011b). Konvencionalni antibiotiki uničijo mikroorganizme z oviranjem vitalnih celičnih funkcij. Tak pristop predstavlja selekcijski pritisk za razvoj odpornih bakterij. Zato so nujno potrebni novi načini preprečevanja infekcijskih bolezni (Klemm in sod., 2010).

Zanimiv pristop je t.i. protiadhezijska terapija. Glede na dejstvo, da sta pritrđitev patogenih bakterij na črevesne epitelne celice ter njihova nadaljnja kolonizacija predpogoj za razvoj bolezenskih znakov, bi intervencija v tej zgodnji fazi okužbe lahko pomagala pri preprečevanju bolezni. Pritrjene bakterije se namreč težje odstranijo iz organizma s pomočjo peristaltike, težje jih uničijo imunski sistem, bakteriolitični encimi ali antibiotiki (Lane in sod., 2010). Številne študije so že pokazale učinkovitost različnih spojin iz rastlin na patogene bakterije, ki so odporne proti antibiotikom (Friedman in sod., 2002). Vedno več je raziskav o učinkovitosti naravnih protimikrobnih snovi, pridobljenih iz rastlin, živali, bakterij, kot tudi organskih kislin, eteričnih olj itd. Nedavno so študije *in vitro* pokazale, da nekatere fenolne spojine, prisotne v vinu in v stranskih proizvodih proizvodnje vina, kot so grozdne tropine, znatno zmanjšajo sposobnost preživetja kampilobaktrov (Gaňan in sod., 2012). Za nekatere fenolne snovi pa so dokazali, da zmanjšujejo adhezijsko sposobnost nekaterih bakterijskih vrst, zato tak pristop v humani prehrani predstavlja zanimiv izziv in potencialno učinkovit način preprečevanja črevesnih okužb (Ofek in sod., 2003).

Uporaba celičnih kultur za raziskovanje invazivnosti je standardna metoda *in vitro*, tako kot je model kolonizacije piščancev standardna metoda *in vivo* za proučevanje virulentnosti kampilobaktrov. Z uporabo celičnih kultur se do določene mere izognemo poskusom na živalih, obenem, zaradi naprednih metod gojenja, predstavljajo relevantno primerljiv model s človeškim organizmom (Müller in sod., 2006). Epitelne celice PSI predstavljajo model, ki je najbližji humanemu modelu v smislu genoma, razvoja organov (Lunney, 2007), anatomije, fiziologije in metabolizma prebavnega trakta (Baltzell in sod., 1987; Brown in Timmermans, 2004) ter interakcij črevesje-mikrob (Pipenbahr in sod., 2009). Humane celice H4 so izolirane iz vzorca tankega črevesa 20- tednov starega zarodka. Oba celična modela sta ne-kancerogenega izvora in sta zato boljši *in vitro* model za proučevanje mehanizmov interakcij patogen-gostitelj od pogosto uporabljenih humanih celičnih linij kancerogenega izvora (npr. celice Caco-2).

Kampilobaktri, ki skupaj s hrano ali vodo preidejo v gostitelja in premagajo želodčno bariero, so sposobni preiti skozi mukozni sloj, ki prekriva epitelne celice črevesja. Nanje se pritrjujejo, kar omogoča bakterijam vstop v epitelne celice. Zaradi tega pride do poškodbe mukoznega sloja in do vnetja (van Vliet in Ketley, 2001). Pripenjanje na epitelne celice omogočajo t.i. adhezini na površini bakterije, ti vključujejo fimbrijske strukture, polisaharidne kapsule, LPS sloj, lektine, lipooligosaharide ter različne proteine. Flagel pospeši in olajša pritrditev na epitelne celice, medtem ko so adhezini, preko povezav z receptorji epitelnih celic, odgovorni za čvrsto povezanost obeh (McSweeney in Walker, 1986).

Bakterijska invazija povzroča poškodbe epitelnih celic *in vivo*, izgubo celičnih funkcij ter drisko (Snelling in sod., 2005). Mehanizem invazivnosti, ki ga sproži *C. jejuni*, vključuje povezano delovanje mikrofilamentov in mikrotubulov gostiteljske celice in inducira aktivacijo proteina G ali fosforilacijo tirozina (Crushell in sod., 2004; Friis in sod., 2005). Ko je *C. jejuni* znotraj gostiteljske celice, potuje do bazolateralne strani gostiteljske celice znotraj lizosoma, nato z eksocitozo preide iz gostiteljske celice (Snelling in sod., 2005). Znotrajcelično preživetje omogoča kampilobaktrom, da se izognejo imunskemu sistemu gostitelja, ter povzročajo ponavljajoče akutno vnetje in dolgotrajno infekcijo (Lastovica, 2006). Poleg tega kampilobaktri lahko preživijo v makrofagih, kar omogoči širjenje bakterij po organizmu in bakteriemijo (Šikić Pogačar in sod., 2009; Wassenaar in sod., 1997).

Translokacija je pomemben dejavnik virulence nekaterih črevesnih patogenov, saj jim omogoča dostop do notranjih tkiv ter diseminacijo po organizmu (Klingberg in sod., 2005; Rivera-Amill in sod., 2001). Način translokacije epitela za kampilobaktre še vedno ni pojasnjen, toda Bras in Ketley (1999) navajata dve možnosti, parcelularno in transcelularno.

Razumevanje teh mehanizmov je bistvenega pomena za razvoj strategij, ki bi preprečili hude zaplete bolezni. Z ozirom na to, da se je odpornost bakterij *Campylobacter* proti antibiotikom znatno povečala v zadnjem času, bi vključitev drugih protimikrobnih snovi

(predvsem naravno prisotnih v živilih ali iz stranskih produktov agro-živilske industrije) predstavljala novo strategijo v boju proti patogenim bakterijam.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE RAZISKAVE

1.1.1 Cilji raziskave

Namen eksperimentalnega dela je bil proučevanje sposobnosti adhezije, invazije ter znotrajceličnega preživetja bakterij *C. jejuni* K49/4 v eksponentni fazi rasti v tridimenzionalnem celičnem modelu prašičjih črevesnih epitelnih celic PSI. Želeli smo oceniti tudi sposobnost translokacije bakterij *C. jejuni* K49/4 skozi polarizirani 3D model celic PSI.

Ugotavljali smo tudi v kolikšni meri je adhezija bakterij *C. jejuni* K49/4 preprečena, če inkubiramo bakterije in celice, ob istočasni prisotnosti rastlinskih izvlečkov. Hkrati nas je zanimalo, če lahko s sočasno inkubacijo teh izvlečkov preprečimo ali zmanjšamo invazijo ter znotrajcelično razmnoževanje kampilobaktrov. Predpostavili smo, da je protiadhezijska učinkovitost odvisna tudi od načina inkubacije celic s izvlečki (npr. istočasno, pred ali po izpostavitvi epitelnih celic bakterijam).

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje izvlečke: izvleček grozdnih tropin sorte Modri pinot (*Vitis vinifera*, GE), kot stranski proizvod vinarstva, izvleček listov oljke (*Olea europaea*, OE), kot stranski proizvod oljkarstva, izvleček timijana (*Thymus vulgaris*, TE) in semen rastline *Alpinia katsumadai* (SEE). Pri slednjih dveh rastlinah smo preverili učinkovitost različnih materialov, npr. navadnega izvlečka in odpadnega materiala po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R in hdSEE-R).

Cilji naloge:

- Ugotoviti v kakšni meri je bakterija *C. jejuni* K49/4 sposobna adhezije/invazije/translokacije v polariziranem 3D modelu prašičjih epitelnih celic PSI.
- Ugotoviti, če sočasna inkubacija bakterij *C. jejuni* K49/4 in različnih rastlinskih izvlečkov, zmanjša njihovo adhezijo/invazijo na/v prašičje epitelne celice PSI.
- Ugotoviti, če predhodna inkubacija celic PSI z rastlinskimi izvlečki dodatno zmanjša adhezijo bakterij *C. jejuni* K49/4 na prašičje epitelne celice PSI.

1.1.2 Hipoteze

- Bakterijski sev *C. jejuni* K49/4, izoliran iz piščančjega mesa, je sposoben pritrditve, invazije in tudi translokacije skozi črevesni epitel v tridimenzionalnem, funkcionalnem celičnem modelu.
- Izvlečki različnih rastlinskih materialov zmanjšajo sposobnost adhezije bakterij *C. jejuni* K49/4 na prašičje črevesne epitelne celice (PSI) in humane črevesne epitelne celice (H4).

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

Bakterije rodu *Campylobacter* so edinstveni povzročitelji bolezni, glede na to, da je preteklo skoraj celo stoletje od prve omembe tega mikroorganizma do razvoja rutinskih tehnik gojenja, ki bi omogočale uspešno izolacijo kampilobaktrov iz blata bolnikov. Prvi, ki je opisal kampilobaktrom podobne bakterije, je bil Escherich, ki jih je leta 1886 izoliral iz blata bolnikov, ki so trpeli za drisko. Sprva so kampilobaktrre uvrščali med bakterije rodu *Vibrio*. Leta 1938 je Levy izoliral vibrijem podobne mikroorganizme iz krvi bolnikov, ki so zaužili kontaminirano mleko (Crushell in sod., 2004). E. King je leta 1957 opisala te spiralne bakterije kot povzročitelje enteritsov pri dojenčkih, jih na podlagi seroloških in biokemijskih testov ločila od ostalih vrst rodu *Vibrio* ter jih poimenovala vibrijem – podobni (Butzler, 2004; Silva in sod., 2011). Kasneje so dokazali, da se te bakterije razlikujejo od vibrijev tudi po vsebnosti gvanina in citozina v njihovi DNA. Sebald in Veron sta leta 1963 predlagala nov rod, imenovan *Campylobacter*. *Vibrio fetus* subsp. *jejuni* je bil tako preimenovan v *Campylobacter jejuni*. V naslednjih treh desetletjih so ta organizem opisovali kot redek, oportunističen in invaziven patogen, ki povzroča bolezen predvsem pri oslabeledih osebah (Solomon in Hoover, 1999). Trajalo je vse do leta 1972, ko sta Dekeyser in Butzler izolirala vrsto *Campylobacter jejuni* iz krvi in iz blata bolnika z akutnim enterokolitisom z uporabo filtracijske tehnike na krvnem agarju (Snelling in sod., 2005). Skirrow je leta 1977 prvič nakazal, da je bolezen lahko povezana z zaužitjem kontaminiranih živil. Prvič je opisal selektivni dodatek k osnovnem mediju za gojenje ter s tem poenostavil izolacijo kampilobaktrov iz fekalij. To je omogočilo vpeljavo metode v širšem krogu mikrobioloških laboratorijev (Skirrow, 1977).

Skoraj deset let kasneje so *C. jejuni* prepoznali kot najpogostejši vzrok črevesnih enterokolitisov pri ljudeh (Butzler, 2004; Silva in sod., 2011). Danes so bakterije rodu *Campylobacter* spp. najpogostejši gastrointestinalni patogeni v Evropski Uniji (EFSA, 2012). Najpomembnejša patogena tega rodu sta *C. jejuni* in *C. coli*, saj skupaj povzročata več kot 95 % vseh kampilobakterioz pri ljudeh (Park, 2002). Ostali predstavniki rodu *Campylobacter* lahko okužijo človeka, vendar je potek infekcije z njimi še slabo raziskan (Ketley, 1997; Ming Man, 2011).

2.2 KLASIFIKACIJA

Rod *Campylobacter* je bil prvič taksonomsko opredeljen leta 1984 v prvi izdaji Bergeyevga priročnika za sistematizacijo bakterij (Solomon in Hoover, 1999). Rod *Campylobacter* spada skupaj z rodovoma *Sulfurospirillum* in *Arcobacter* v družino *Campylobacteraceae*. Višje taksonomske skupine Bacteria; Proteobacteria; poddeblo Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae (Lastovica in sod., 2014).

Danes v rod *Campylobacter* spada 26 bakterijskih vrst (*C. avium*, *C. canadensis*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. hyoilei*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. peloridis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*, *C. subantarcticus*, *C. troglodytis*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. volucris*) in 8 podvrst (Ming Man, 2011). Prikazane so v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam bakterijskih vrst rodu *Campylobacter* (Ming Man, 2011).
Table 1: List of members of the genus *Campylobacter* (Ming Man, 2011).

VRSTA BAKTERIJE	POZNANI IZVOR	SIMPTOMATIKA OBOLENJA	
		PRI ČLOVEKU	PRI ŽIVALIH
<i>C. avium</i>	Perutnina	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. canadensis</i>	Ptiči	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. coli</i>	Prašiči, perutnina, govedo, ovca, ptiči, opica, pes	Gastroenteritis, akutni holecistitis, bakteriemija, sepsa, meningitis	Gastroenteritis
<i>C. concisus</i>	Človek, pes, mačka	Periodontalna obolenja, Gastroenteritis, reaktivni artritis, reumatoidni artritis	Trenutno ni znano
<i>C. cuniculorum</i>	Zajec	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. curvus</i>	Človek, pes	Periodontalna obolenja, Gastroenteritis, ulcerozni kolitis, bakteriemija	Trenutno ni znano
<i>C. fetus</i> subs. <i>fetus</i>	Govedo, ovca, konj	Gastroenteritis, septikemija	Spontani splav (pri govedu in ovcah)
<i>C. fetus</i> subs. <i>venerealis</i>	Govedo	Gastroenteritis, splav, meningitis	Infekcijska neplodnost pri govedu
<i>C. gracilis</i>	Človek, pes	Septikemija, Crohnova bolezen (otroci), ulcerozni kolitis (odrasli), periodontitis	Trenutno ni znano
<i>C. helveticus</i>	Mačka, pes	Periodontalna obolenja, empijem, absces	Gastroenteritis (pri psih in mačkah)
<i>C. hominis</i>	Človek	Gastroenteritis pri imunokompromitiranih, Crohnova bolezen (otroci), ulcerozni kolitis (odrasli)	Trenutno ni znano
<i>C. hyointestinalis</i> subs. <i>hyointestinalis</i>	Prašiči, govedo, hrček, srnjad	Gastroenteritis	Enteritis (pri govedu in svinjah)
<i>C. hyointestinalis</i> subs. <i>lawsonii</i>	Prašiči, pes, ovca	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. hyoilei</i>	Prašiči	Trenutno ni znano	Proliferativni enteritis (pri svinjah)
<i>C. insulaenigrae</i>	Tjulni, delfini	Gastroenteritis, septikemija	Trenutno ni znano
<i>C. jejuni</i> subs. <i>doylei</i>	Človek	Gastroenteritis, gastritis, septikemija	Trenutno ni znano

se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 1: Seznam bakterijskih vrst rodu *Campylobacter* (Ming Man, 2011).

VRSTA BAKTERIJE	POZNANI IZVOR	SIMPTOMATIKA OBOLENJA	
		PRI ČLOVEKU	PRI ŽIVALIH
<i>C. jejuni</i> subs. <i>jejuni</i>	Perutnina, prašiči, govedo, ovce, pes, mačka, ptiči, kuna, zajec, insekti	Gastroenteritis, septikemija, meningitis, splav, proktitis, GBS	Gastroenteritis, hepatitis (pri ptičih)
<i>C. lanienae</i>	Govedo, prašiči, ovca	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. lari</i>	Ptiči (tudi perutnina), voda, mačke, opice, konji, tjulni	Gastroenteritis, septikemija	Gastroenteritis (pri ptičih)
<i>C. mucosalis</i>	Prašiči, pes	Gastroenteritis	Nekrotizantni enterokolitis in ileitis (pri svinjah)
<i>C. perloridis</i>	Školjke	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. rectus</i>	Človek, pes	Periodontalna obolenja, gastroenteritis, Crohnova bolezen (otroci), ulcerozni kolitis (odrasli)	Trenutno ni znano
<i>C. showae</i>	Človek, pes	Periodontalna obolenja, Crohnova bolezen (otroci), ulcerozni kolitis (odrasli)	Trenutno ni znano
<i>C. sputorum</i> bv. <i>sputorum</i>	Človek, govedo, prašiči	Absces, gastroenteritis	Trenutno ni znano
<i>C. sputorum</i> bv. <i>faecalis</i>	Ovce, bik	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. subantarcticus</i>	Albatros, pingvin	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. troglodytis</i>	Opice	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. upsaliensis</i>	Pes, mačka	Gastroenteritis, septikemija, absces, splav	Gastroenteritis (pri psih in mačkah)
<i>C. ureolyticus</i>	Konj	Periodontalna obolenja, gastroenteritis, Crohnova bolezen (otroci), ulcerozni kolitis (odrasli)	Trenutno ni znano
<i>C. volucris</i>	Črnoglav galeb	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano

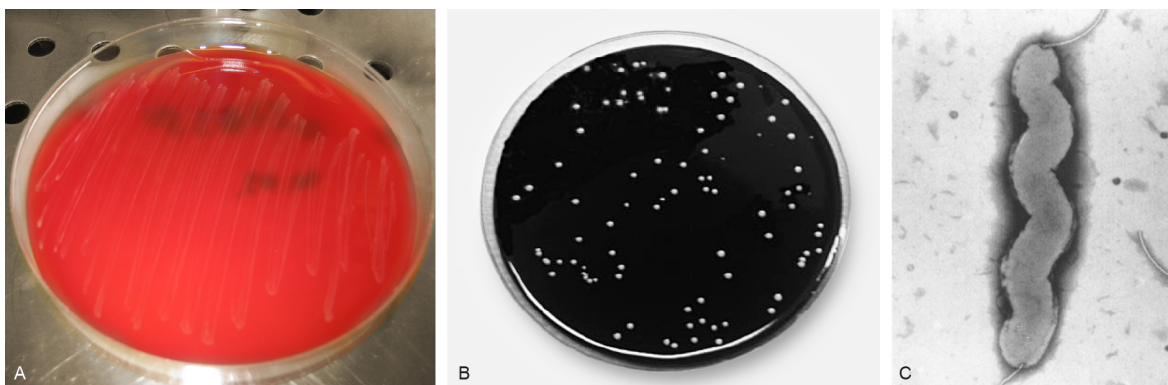
* Trenutno ni povezave med boleznijo pri človeku in naslednjimi vrstami rodu *Campylobacter*: *C. avium*, *C. canadensis*, *C. cuniculorum*, *C. lanienae*, *C. perioridis*, *C. subantarcticus*, *C. troglodytis* in *C. volucris*.

Največkrat so povzročitelji okužb pri človeku *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter fetus* (Brenner in sod., 2005). V več kot 95 % primerih sta povzročitelja kampilobakterioz pri človeku *C. jejuni* ter *C. coli* (Snelling in sod., 2005), od teh dveh povzročiteljev je v več kot 90 % primerov izoliran *C. jejuni* (Bolton, 2015).

2.3 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Campylobacter jejuni je po Gramu negativna, nesporogena in mikroaerofilna bakterija. Ime rodu *Campylobacter* prihaja iz grške besede "kampylos", kar v grščini pomeni ukrivljen (Keener in sod., 2004). Celice imajo značilno spiralno obliko, podobno črki S in so široke med 0,2 μm in 0,9 μm in dolge od 0,5 μm do 5 μm (Humphrey in sod., 2007). Gibljivost in možnost preboja skozi mukozni sloj, ki prekriva črevesne celice, celicam omogoča mono-ali bipolarni biček (Ketley, 1997). Ne tvorijo spor in so nesaharolitične (Silva in sod., 2011).

Tvorijo termolabilni enterotoksin in citotoksin. Rastejo na različnih obogatenih gojiščih, vendar zelo počasi. V primerjavi z drugimi mikroorganizmi kampilobaktri zahtevajo za svojo rast zelo specifične pogoje in se lahko razmnožujejo v zelo ozkem spektru gojišč. V mikroaerofilnih pogojih, v atmosferi s 5 % O_2 , 10 % CO_2 in 85 % N_2 , dosežejo optimalno rast znotraj temperaturnega območja med 37 °C in 42 °C (Altekruse in sod., 1999). Za bakterije *C. jejuni* sta značilna dva tipa kolonij: ravne, sivkaste, ploščate z neravnim robom in okrogle, izbočene in lesketajoče se kolonije. Pogosto imajo kolonije majhen, temnejši center.



Slika 1: Značilne kolonije bakterij *C. jejuni* na krvnem agarju (a) in Karmali agarju (b) po 48-urni inkubaciji v optimalnih pogojih rasti ter prikaz tipične morfologije *C. jejuni* pod elektronskim mikroskopom (c) (Gaynor in sod., 2004).

Figure 1: Typical colonies of *C. jejuni* on blood agar (a) and Karmali agar (b) after 48h of incubation under optimal growth conditions and a picture of typical morphology of *C. jejuni* cells under electron microscope (c) (Gaynor et al., 2004).

Bakterije vrste *C. jejuni* so termotolerantne, saj rastejo v temperaturnem območju med 30 - 45 °C, optimalno pri 42 - 43 °C. Visoka optimalna temperatura je posledica prilagoditve temperaturi njihovega naravnega okolja (črevesju toplokrvnih živali in ptic) (Ketley, 1997). Pri temperaturi pod 30 °C ne rastejo (Park, 2002). Organizmi so zelo občutljivi za zmrzovanje in sušenje ter učinke visokih temperatur, njihova rast je ustavljena pri temperaturi nad 45 °C (Solomon in Hoover, 1999). Ker so bakterije občutljive za visoko temperaturo, jih s pravilnimi postopki pasterizacije ali drugo primerno toplotno obdelavo

živila, uničimo. Bolje preživijo v ohlajenih živilih pri temperaturi v hladilniku kot na sobni temperaturi ali v zamrzovalniku (Park, 2002).

Kot mikroaerofilni organizmi najbolje rastejo pri nizkih koncentracijah kisika oz. v atmosferi, ki vsebuje 5 % O₂, 10 % CO₂ in 85 % N₂ (McSweegan in sod., 1986; Walker in sod., 1986). Pri izpostavljenosti atmosferski koncentraciji kisika bakterije prehajajo v kokoidno obliko (Snelling in sod., 2005). Zaradi mikroaerofilne narave in potrebe po temperaturah, višjih od 30 °C, je možnost razmnoževanja tega patogena izven živalskega gostitelja zelo omejena (Park, 2002).

Bakterije rodu *Campylobacter* imajo encima oksidaza in katalaza, ter ne metabolizirajo sladkorjev (so nesaharolitične). Ker ne fermentirajo ogljikovih hidratov, pretvarjajo energijo iz aminokislin in iz intermediatov cikla trikarboksilnih kislin (Snelling in sod., 2005; Silva in sod., 2011). Na temelju O antigena so kampilobaktri razdeljeni na več kot 90 serotipov in na temelju kapsularnega in flagelarnega antigena na 50 različnih serotipov (Radšel-Medvešek, 2002).

Genomsko zaporedje *Campylobacter jejuni* so določili leta 2000. Rezultati raziskav so pokazali, da ima *C. jejuni* relativno majhen genom (približno 1,6 – 1,7 Mbp) z visokim deležem adenina in timina. Vsebnost gvanina in citozina je okoli 30 % (Ketley, 1997). Genom vsebuje celo 94,3 % kodirajočih genov, zato *C. jejuni* predstavlja eno od najbolj gensko zgoščenih bakterij, za katero so do takrat sekvencirali genom (Parkhill in sod., 2000). Majhen genom kampilobaktrov je verjetno vzrok za njihove velike potrebe po rastnih dejavnikih oz. kompleksnih medijih, ki jim omogočajo rast, ter njihove nezmožnosti fermentacije sladkorjev, lipidov in nezmožnosti rasti pri vrednosti pH, nižji od 4,9 (Snelling in sod., 2005). Ena izmed posebnih značilnosti genoma je prisotnost hipervariabilnih nukleotidnih zaporedij, predvsem v genih, ki kodirajo biosintezne poti in spremembe površinskih struktur ter v genih, katerih funkcija zaenkrat še ni poznana. Nekateri menijo, da je mogoče prav ta hipervariabilnost genoma pomembna za preživetje tega organizma v okolju (Murphy in sod., 2006; Solomon in Hoover, 1999; Young in sod., 2007).

Kampilobaktri ne rastejo pri vrednosti a_w , manjši od 0,987. So bolj občutljivi na osmotski stres kot druge patogene bakterije, saj ne rastejo v okoljih, ki vsebujejo nad 2 % natrijevega klorida. Prav tako kampilobaktri ne kažejo dobre preživelosti na suhih površinah (Altekruse in sod., 1999; Nguyen in sod., 2006).

Za razliko od mnogih drugih mikroorganizmov so kampilobaktri bolj občutljivi na okoljske pogoje, saj nimajo nekaterih mehanizmov prilagoditve na stresne pogoje, potrebnih za preživetje v neugodnih pogojih (Nguyen in sod., 2006). Prav tako nimajo "klasične" stacionarne faze, zaradi pomanjkanja RpoS oz. dejavnika σ^s , ki omogoča izražanje genov za večjo odpornost celice v stacionarni fazi, in SoxRS, ki vpliva na celično odpornost proti oksidativnemu stresu (Gaynor in sod., 2005). Prilagoditveni odgovori na stresne razmere, ki jih poznamo pri drugih patogenih mikroorganizmih in se prenašajo z živili, so pri

kampilobaktrih drugačni in so še slabo raziskani (Park, 2002). Zaradi teh značilnosti se kampilobaktri težko razmnožujejo izven prebavnega trakta živali (Park, 2002).

Za sposobnost preživetja kampilobaktrov v suboptimalnih pogojih za rast je pomembno njihovo dinamično prilagajanje na stresne okoliščine. Kadar so bakterije *Campylobacter* izpostavljene stresu (npr. stradanje, nizke temperature, atmosferska koncentracija kisika) prehajajo iz spiralne v kokoidno obliko, ki ponavadi spremlja transformacijo celic v živo, vendar ne kultivabilno stanje, t.i. VBNC stanje (angl. Viable But Not Cultivable) (Cappelier in Federighi, 2000; Klančnik in sod., 2008).

Kljub nesposobnosti razmnoževanja v živilih in izjemni občutljivosti tega patogena mnoge države poročajo o visoki incidenci kampilobakterioz. To neskladje med občutljivostjo teh bakterij in prevalenco bolezni so nekateri raziskovalci poimenovali "*Campylobacter paradox*" (Smole Možina in Uzunović, 2005; Solomon in Hoover, 1999).

2.4 BOLEZENSKA STANJA ZARADI KAMPILOBAKTERIOZ

Akutni enteritis, povzročen z bakterijami iz rodu *Campylobacter* spp., imenujemo kampilobakterioza. Klinična slika bolezni je podobna klinični sliki bolezni, povzročenih z drugimi črevesnimi patogeni, kot so na primer šigeloza in salmoneloza. Samo na osnovi klinične slike ne moremo sklepati o povzročitelju enteritisa, čeprav potek bolezni z visoko vročino, odsotnostjo driske ob prisotnosti hudih bolečin v abdomnu, kažejo na kampilobakteriozo. Iz tega razloga mora biti diagnoza kampilobakterioze postavljena na osnovi bakteriološke analize in osamitve patogena iz blata ali krvi bolnika. Prisotnost bakterije lahko dokažemo tudi z DNA hibridizacijskimi metodami ali s serološko diagnostiko, pri kateri ugotavljamo pojav specifičnih protiteles razredov IgG in IgM (Blaser in Engberg, 2008).

Glavni vir okužb pri ljudeh je kontaminirano in nezadostno obdelano piščančje meso, nepasterizirano mleko in kontaminirana voda. Omenjena živila lahko predstavljajo tudi vir navzkrižne okužbe drugih živil (Friedman in sod., 2004). Kot možen vzrok okužb navajajo še uživanje drugih vrst živil, kot je mleto meso, solate, ustekleničena mineralna voda, grozdje in nekatere druge vrste sadja (Evans in sod., 2003; Friedman in sod., 2004; Humphrey in sod., 2007).

Infekcijska doza kampilobaktrov je nizka in je odvisna od seva. Za človeka lahko znaša le 500 do 800 bakterij (Solomon in Hoover, 1999; Walker in sod., 1986). Pri nekaterih bolnikih se bolezen lahko razvije brez značilnih simptomov, medtem ko pri drugih pride do težjih oblik bolezni, katere simptomi se začnejo kazati 1.-7. dan po okužbi. Običajno od okužbe do pojava bolezni poteče okoli tri dni. Klinični znaki akutnega enteritisa z drisko, splošno oslabeledostjo, bruhanjem in krči ter vročino in glavobolom trajajo ponavadi dva do pet dni. Pri bolnikih z zmanjšano odpornostjo organizma lahko bolezen traja tudi do tri tedne. Pri teh bolnikih je

lahko bolezen kronična in ponavljajoča, možne so tudi črevesne in izvenčrevesne težave (Solomon in Hoover, 1999; Walker in sod., 1986).

Pri bolnikih se pojavljata dva tipa driske. Pri vnetni, pogosto sluzasti in krvavi driski, ki vsebuje levkocite in jo spremlja tudi vročina, lahko pomembno virulentno vlogo igrajo citotoksini, ki jih izloča kar 70 % kampilobaktrov. Pri drugem tipu gre za nevnetno, vodeno drisko brez vročine, krvi in levkocitov v blatu (Wassenaar in Blaser, 1999). Povzročale naj bi jo bakterije, ki se pritrldijo na mukozni sloj tankega črevesja, kjer proizvajajo enterotoksin. Bolezen se običajno pri zdravih ljudeh konča sama od sebe po 2–7 dneh, brez potrebnega zdravljenja, vendar lahko telo obolelega izloča bakterije še nekaj tednov (Ketley, 1997). Potek bolezni je odvisen tako od gostitelja kot od bakterije. Zdravstveno stanje, starost gostitelja ter specifična imunost organizma proti tem bakterijam, zaradi prejšnje izpostavljenosti, vplivajo na potek bolezni po okužbi (Altekruse in sod., 1999; Ming Man, 2011).

Zdravljenje običajno temelji le na blažitvi simptomov, tako pri večini bolnikov zadošča zdravljenje z nadomeščanjem tekočine in elektrolitov (Altekruse in sod., 1999). Izjemo predstavljajo težje klinične slike kampilobakterioz, ki se pogosto javljajo pri majhnih otrocih, starejših in še zlasti pri imunokompromitiranih osebah. V takih primerih je poleg podporne simptomatske terapije potrebna še antibiotična terapija (Crushell in sod., 2004).

Zapleti, ki lahko sledijo okužbi s kampilobaktri, so bakteremija, Reiterjev sindrom, ki je revmatološko obolenje in Guillain-Barré-jev sindrom (GBS) (Walker in sod., 1986; Yan in sod., 2005). GBS, ki je pogosto posledica okužbe s *C. jejuni*, je resna avtoimunska okvara perifernega živčnega sistema ter eden izmed najpogostejših vzrokov za akutno paralizo (Ketley, 1997). Zanj je značilna hitro napredujoča oslabeledost okončin in dihalnih mišic. Na vsakih 1000 primerov kampilobakterioze se pojavi približno en primer GBS, 40 % bolnikov s sindromom je bilo predhodno okuženih s kampilobaktri (Butzler, 2004). V ZDA ocenjujejo, da je *Campylobacter* vzrok za 1 do 7 milijonov enteritisov letno, od katerih se jih 100 do 500 konča s smrtnim izidom (Solomon in Hoover, 1999).

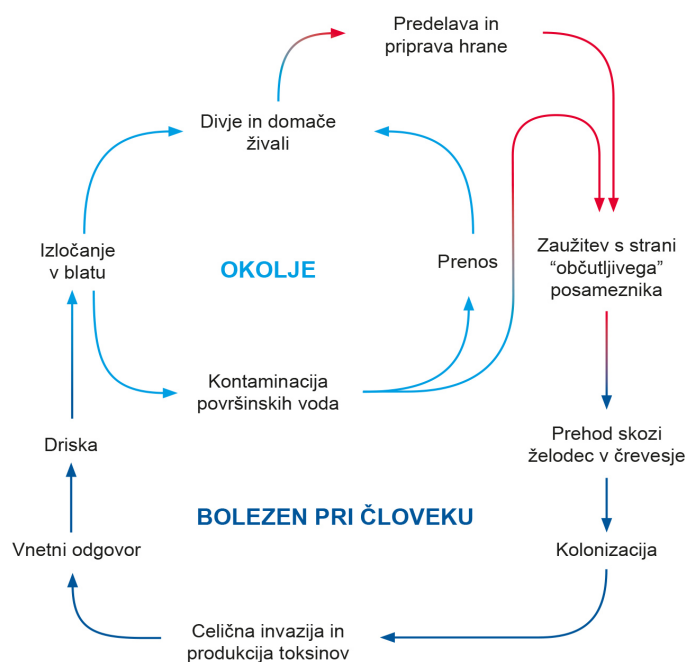
2.5 EPIDEMIOLOGIJA BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Kampilobakterioza je zoonoza, infekcijska bolezen, ki jo povzročajo bakterije rodu *Campylobacter*, za katero je znanih več načinov prenosa. Potencialni vir bakterij predstavljajo: domača perutnina in divje ptice, govedo, prašiči, konji, ovce, zajci, glodalci ter hišni ljubljenci, kjer so kampilobaktri naravni del črevesne mikrobne združbe (Solomon in Hoover, 1999). V 80 % okužb je vir prenosa kontaminirana hrana, predvsem nezadostno toplotno obdelano piščančje meso ali navzkrižna kontaminacija toplotno obdelane hrane s surovo (Solomon in Hoover, 1999). Poleg uživanja toplotno premalo obdelane perutnine je možen vzrok okužbe s kampilobaktri tudi uživanje svežega mleka in kontaminirana voda (Crushell in sod., 2004; Silva in sod., 2011).

Prenos z živali na ljudi prevladuje pri ljudeh, ki imajo neposredni stik z živalmi ali živalskimi izdelki, ter pri otrocih s hišnimi ljubljenci. Mačke in psi lahko prenašajo

kampilobakte brez opaznih simptomov bolezni (Crushell in sod. 2004). Možna načina prenosa *C. jejuni* med perutnino sta preko kontaminirane vode ali krme, lahko pa tudi preko insektov, glodalcev, divjih ptic in iztrebkov kokoši ter iztrebkov ostalih živali na kmetiji (Pearson in sod., 1996). Če se kampilobaktri pojavijo v jati, se zelo hitro prenesejo na vse živali in se naselijo v prebavnem traktu kot nepatogeni komenzali (Hendrixson in DiRita, 2004; Pearson in sod., 1993).

Meso se večinoma kontaminira med zakolom s črevesno vsebino ali pa preko kontaminirane klavniške opreme (Altekruse in sod., 1999). Čeprav je bakterija *C. jejuni* zelo občutljiv organizem, je sposobna preživeti na piščančjem mesu. Preprečevanje okužb s kampilobaktri se mora začeti že pri vzreji piščancev in se končati z osveščanjem potrošnikov, t.i. pristopom "od vil do vilic" (angl. "from farm to fork ") (Solomon in Hoover, 1999). Pogostost okužb se naglo viša, kar je verjetno posledica sprememb prehranjevalnih navad in vse večje popularnosti perutninskega mesa (Tauxe, 2002). Ocenjuje se, da je med 68 – 98 % piščančjega mesa kontaminiranega z bakterijami *C. jejuni* (Hendrixson in DiRita, 2004). Več kot 90 % primerov kampilobakterioz je sporadičnih in sezonsko odvisnih, saj večina pojavov bolezni doseže vrh v pomladnih oz. zgodnjih poletnih mesecih (Snelling in sod., 2005).



Slika 2: Viri in prenos okužbe z bakterijo *C. jejuni* (Konkel in sod., 2001).

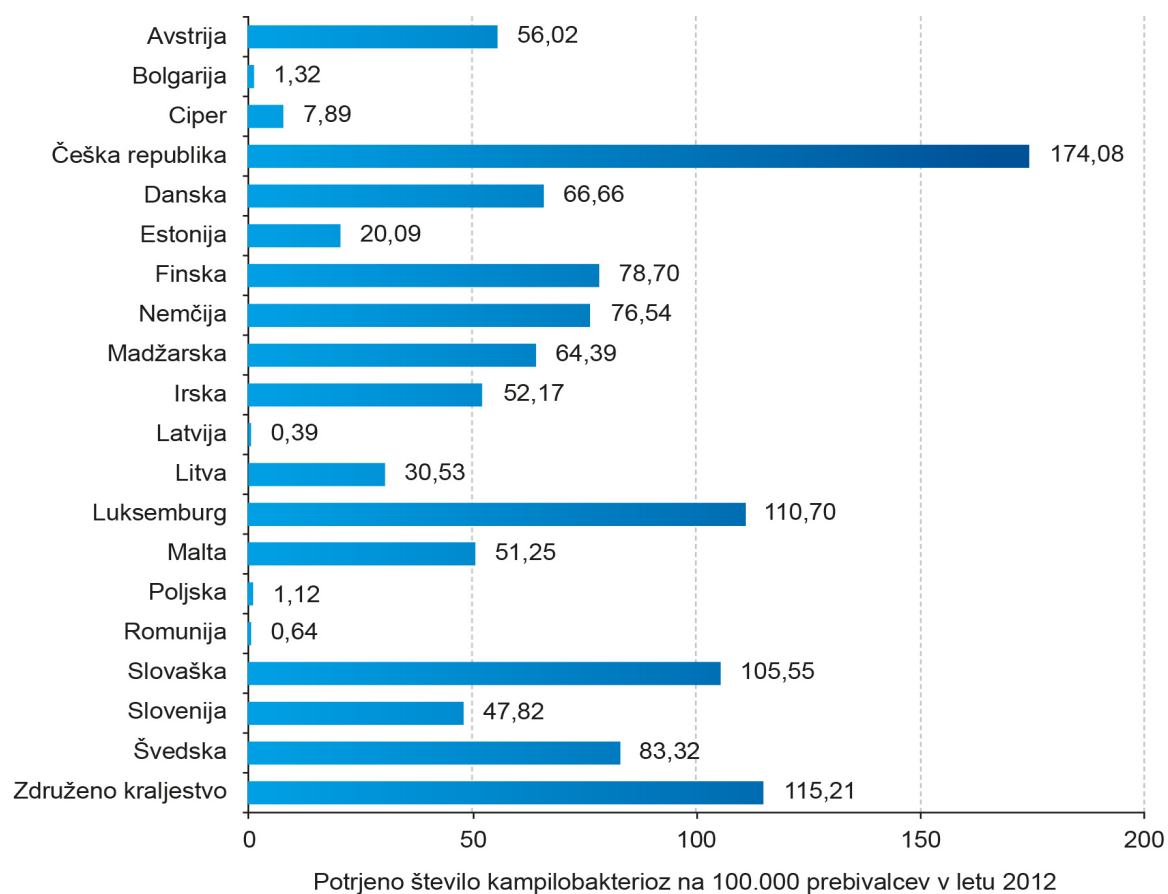
Figure 2: The sources and transmission of *C. jejuni* (Konkel et al., 2001).

Moški obolevajo 1,2 do 1,5 krat pogosteje kot ženske in to je zlasti opazno v skupini mladih. Najpogosteje so prizadeti otroci starostne skupine do pet let (Ming Man, 2011; Tauxe, 2000). Za infekcije so veliko bolj dovzetne osebe z zmanjšano imunsko odpornostjo (Solomon in Hoover, 1999; Tauxe, 2000). Težji potek bolezni je pri otrocih, starejših ljudeh in imunokompromitiranih (Crushell in sod., 2004).

Naraščajoče število kampilobakterioz v številnih Evropskih državah v zadnjih dvajsetih letih lahko deloma pripišemo povečanemu spremljanju bolezni in izboljšanim tehnikam izolacije. Razlogi so različni, od spremenjenega načina prehranjevanja, večjih migracij ljudi in vse večjega deleža ljudi, ki so bolj dovzetni za bolezen (van Vliet in Ketley, 2001).

V razvitih državah so najpogostejši bakterijski povzročitelji gastroenteritisov pri ljudeh termotolerantne vrste kampilobaktrov. Mednje sodijo *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* in *Campylobacter upsaliensis*. Kot povzročitelj je med njimi najpogosteje identificiran *Campylobacter jejuni* (Gormley in sod., 2008). Pojav kampilobakterioz v državah v razvoju je posledica slabega higienskega stanja in tesnejšega stika ljudi z domačimi živalmi. Bolezen v teh državah je omejena na otroke in se ne pojavlja sezonsko. Driske se pojavljajo le pri mlajših otrocih, veliko okuženih starejših ne kaže znakov bolezni (Ketley, 1997; van Vliet in Ketley, 2001). Tako velike razlike v epidemiologiji lahko pripišemo večji izpostavljenosti otrok v zgodnjem obdobju in razvoju odpornosti (Ketley, 1997; van Vliet in Ketley, 2001). Najpogostejši vzrok za okužbe je zaužitje kontaminirane hrane ali vode (Crushell, 2004). Medtem ko bolezen v državah v razvoju spremljajo blage in vodene driske, vključujejo simptomi bolezni v razvitih državah akutne bolečine v trebuhu, drisko, vročino, splošno oslabeledost in včasih tudi bruhanje.

Kampilobaktri so tudi eden izmed vodilnih vzrokov t.i. potovalne driske, predvsem pri potovanjih oseb iz razvitih držav v dežele v razvoju, Latinsko Ameriko, Azijo, Afriko in Bližnji vzhod (Crushell in sod., 2004). Simptomi bolezni so običajno podobni simptomom bolezni v državi, iz katere oseba prihaja, ne pa obiskuje (van Vliet in Ketley, 2001). Klinični simptomi, ki spremljajo bolezen, so poleg povečanega izločanja blata še slabost, trebušni krči, vročina in drugi. Najpogosteje obolevajo mlajši otroci, mladostniki med 20. in 29. letom in ljudje z zmanjšano odpornostjo organizma, kot so bolniki, okuženi z virusom HIV, bolniki s kroničnimi gastrointestinalnimi obolenji itd. (Crushell in sod., 2004).



Slika 3: Število prijavljenih primerov kampilobakterioz v letu 2012 (EFSA/ECDC, 2014).

Figure 3: The number of known cases of campylobacteriosis in the year 2012 (EFSA/ECDC, 2014).

2.6 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI

Poznavanje mehanizmov, s pomočjo katerih patogeni vstopijo v gostiteljski organizem, so sposobni preživeti, se razmnožiti in povzročiti bolezen, predstavlja osnovo za vzpostavitev preventivnih ukrepov in s tem posledično zmanjšanje pogostosti nalezljivih obolenj (Wassenaar in sod., 1997). Čeprav je *C. jejuni* zelo pomemben patogen, so mehanizmi povzročanja bolezni pri človeku še nepojasnjeni (Müller in sod., 2006). Patogenost je sposobnost mikroorganizmov, da povzročijo bolezen in je odvisna od stopnje virulence patogena ter od gostiteljevega imunskega sistema. Ko kampilobaktiri, skupaj s hrano ali vodo, pridejo v gostitelja in premagajo želodčno bariero, kolonizirajo mukozni sloj, ki prekriva črevesne epitelne celice med ileumom in kolonom (Ketley, 1997). V črevesju pride v celici bakterije do izražanja številnih virulentnih dejavnikov (preglednica 2), ki vključujejo gibljivost in kemotakso, pritrditev na epitelne celice, invazivnost in epitelno translokacijo, produkcijo toksinov ter znotrajcelično preživetje bakterijskih celic. Ti virulentni dejavniki

omogočajo naseljevanje (kolonizacijo) telesnih površin, vdiranje (invazijo) v globlje ležeča tkiva ali organe, okužbo (razmnoževanje mikroorganizmov ter izogibanje gostiteljevi obrambi) in bolezen, ki je večinoma posledica izločenih toksinov in toksičnih presnovkov bakterij. Na simptome in znake bolezni močno vplivajo tudi gostiteljevi obrambni odzivi, zlasti vnetje (Ketley, 1997).

Med virulentnimi dejavniki je potrebno posebej izpostaviti lipidni oligosaharidni sloj (LOS), ki je pri kampilobaktirih zelo podoben humanim nevronskim gangliozidom. Ta lastnost kampilobaktrov je najverjetneje vzrok za avtoimune zaplete pri bolnikih s kampilobakteriozami, vključno s sindromoma Guillain-Barré in Miller-Fisher, kjer je prizadet periferni živčni sistem. Sindrom Guillain-Barré se pojavlja s frekvenco en primer na tisoč registriranih primerov kampilobakterioz (Humphrey in sod., 2007).

Preglednica 2: Bakterijski dejavniki, ki so vključeni v patogenezo kampilobaktrov (Dasti in sod., 2010).

Table 2: Bacterial factors involved in the pathogenesis of campylobacteriosis (Dasti et al., 2010).

	Virulentni dejavnik	Komentar	Referenca
Odgovor na stres	GroESL	Odgovor na toplotni stres	Thies in sod., 1999
	DnaJ	Odgovor na toplotni stres	Konkel in sod., 1998
	Lon proteaza	Odgovor na toplotni stres	Thies in sod., 1999
	RacR-RacS	Regulator temperaturno odvisne signalizacije	Bras in sod., 1999
	γ -glutamyltranspeptidaza	Izkoriščanje glutamina in glutationa	Hofreuter in sod., 2008
Giblјivost in kemotaksa	Flagel	O-glikozilacija	Guerry in sod., 1992
	Flagelni FlgR-FlgS	Regulator biosinteze proteina flagela	Hendrixson, 2006
	Flagelni <i>fli A</i> (σ^{28})	Transkripcija gena flagela	Carrillo in sod., 2004
	Flagelni <i>rpoN</i> (σ^{54})	Transkripcija gena flagela	Hendrixson in DiRita, 2004
	FlgP, FlgQ	Giblјivost flagela	Sommerlad in Hendrixson, 2007
	CheY	Regulator, potreben za rotacijo flagela	Yao in sod., 1997
Adhezija	Flagel	Ne-giblјivi mutanti so v manjši meri sposobni adhezije	Yao in sod., 1994

se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 2: Bakterijski dejavniki, ki so vključeni v patogenezo kampilobaktrov (Dasti in sod., 2010).

	Virulentni dejavnik	Komentar	Referenca
	LOS	Podobnost z GM1 in GD1a gangliozidi – Guillain-Barré sindrom	Young in sod., 2007
	CadF	Zunajmembranski protein, ki se veže na fibronektin	Konkel in sod., 1997
	PEB1	Periplazmatski protein	Pei in Blaser, 1993
	JlpA	Površinski lipoprotein	Jin in sod., 2001
Invazija	Flagel	Aflagelirani mutanti so manj invazivni	Wassenaar in Blaser, 1999
	LOS	Lipooligosaharid	Louwen in sod., 2008
	Cia	<i>Campylobacter</i> invazivni antigeni	Rivera-Amill in sod., 2001
	CadF	Aktivacija Rac 1 in Cdc42	Krause-Gruscynska in sod., 2007
	CPS	Kapsularni polisaharid	Karlyshew in Wren, 2001
Toksini	CdtA, B, C	Toksin CdtB povzroča: prekinitev celičnega cikla in apoptozo ter izločanje IL-8	Pickett in Whitehouse, 1999 Hickey in sod., 1999
Preboj skozi polarizirani epitel	Trenutno ni znano	Razdor tesnih medceličnih stikov Translokacija črevesnih komenzalov	MacCallum in sod., 2005 Kalischuk in sod., 2009

2.6.1 Gibljivost in kemotaksa

Kolonizacijo črevesa omogočata kampilobaktrom gibljivost in sposobnost preboja skozi mukozni sloj, ki prekriva črevesne celice. To dosežejo s pomočjo flagela in svoje spiralno-vijačne oblike (Ketley, 1997). *Campylobacter*, zlasti v viskoznih medijih, kaže neobičajno gibljivost, predvsem zaradi prisotnosti enega ali dveh polarnih bičkov ter spiralno-vijačne oblike. Prvi omogoča propulzivno rotacijsko gibanje celic, vijačna oblika pa spiralno rotacijo (Bolton, 2015). Gibljivost *C. jejuni* je pomembna pri iskanju pritrdilnega mesta, prispeva k sposobnosti kolonizacije prebavnega trakta *in vivo* in prav tako k invazivnosti celičnega monosloja *in vitro* ter je najboljše opisani virulenčni dejavnik kampilobaktrov (Grant in sod., 1993; Yan in sod., 2005).

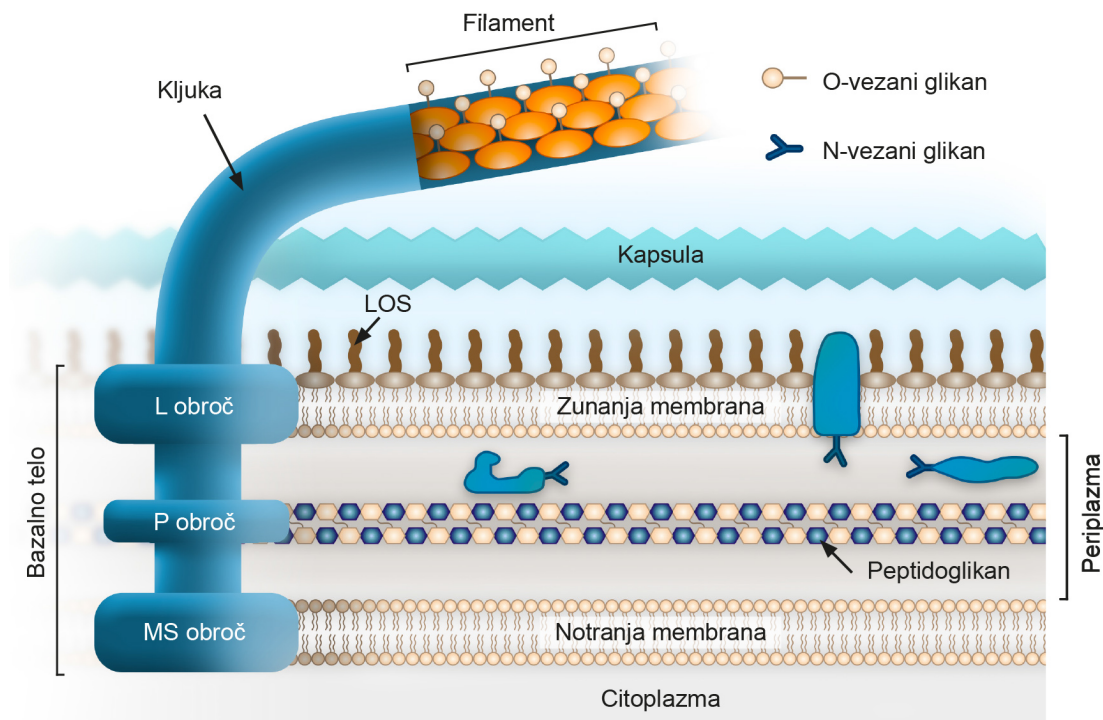
Flagel *C. jejuni* je sestavljen iz bazalnega telesa, kljuge ter O- glikoziliranega filamenta, ki ga sestavljata dva proteina, FlaA in FlaB. Kodirata ju gena *flaA* in *flaB*. Gena nimata skupnega promotorja, saj izražanje gena *flaA* regulira σ^{28} , ki jo kodira *fliA*, izražanje gena *flaB* pa σ^{54} , ki jo kodira *rpoN* (Konkel in sod., 2004; Young in sod., 2007). Gen *flaA* se izraža v večji meri

kot *flaB*. Dokazano je, da ima protein FlaA strukturno vlogo, protein FlaB je pomemben pri premikanju bakterije (Ketley, 1997). Mutacija gena *flaA* povzroči sintezo okrnjenega filameta bička, posledično je gibljivost bakterije zelo zmanjšana. Če pride do mutacije gena *flaB*, je filament bička strukturno normalen in ne pride do značilnega upada gibljivosti. Pri kampilobaktirih torej gibljivost korelira s sintezo proteina FlaA (Konkel in sod., 2001). Kakršnekoli napake pri O-glikozilaciji filameta vodijo v izgubo gibljivosti in s tem zmanjšane adhezivnosti in invazivnosti evkariontskih celic (Dasti in sod., 2010). Vloga proteina FlgK, ki se nahaja na koncu kljuge, je pod nadzorom gena *flgK*, a njena vloga še ni poznana. Vendar so ugotovili, da so mutante *flgK* slabo gibljive (Fernando in sod., 2007).

Novejše študije so pokazale, da je za regulacijo bička odgovoren dvokomponentni sistem FlgRS, ki je fazno-variabilen in ga sestavljata senzor, kinaza FlgS in odzivni regulator FlgR (Guerry, 2007). Pri izražanju genov, ki sodelujejo pri gibljivosti, izločanju proteinov (Cia) in invaziji, imajo pomembno vlogo regulatorji *fliA* (σ^{28}), *rpoN* (σ^{54}) in vzdrževalni gen *rpoD* (σ^{70}) (Hendrixson, 2006). Geni *fliA*, *rpoN* in *flgK* so potencialno dobre tarče pri proizvodnji cepiv in terapevtikov (Fernando in sod., 2007).

Na podlagi poznavanja celotnega nukleotidnega zaporedja genoma *C. jejuni* NTC11168 so odkrili več kot 40 različnih genov, ki naj bi bili povezani s funkcijo bička. Poleg biosinteze teh 40 strukturnih in regulatornih proteinov je pomemben sekrecijski sistem tipa III. *C. jejuni* uporablja flagel kot aparat za izločanje, tako beljakovin flagela, kot ostalih beljakovin, med katerimi so tudi proteini potrebni za adhezijo in invazijo tega patogena (Zilbauer in sod., 2008). Gibljivost *C. jejuni* narašča v zelo viskoznih okoljih in v takih pogojih lahko doseže hitrost 75 mm/sec. Ta sposobnost premikanja v zelo viskoznih pogojih omogoča kampilobaktrom preboj skozi gosti mukozni sloj, ki prekriva epitelne celice v črevesju (Guerry in sod., 2007).

Vsi bakterijski flagelini imajo visoko ohranjene amino in karboksi konce, ki so prepoznavna mesta za njihovo izločanje iz celice in tudi za povezovanje podenot pri sintezi filameta. Ta ohranjena področja flagelinov predstavljajo tudi enega od značilnih vzorcev posameznega patogena (angl. MAMP – microbe-associated molecular patterns), ki jih prepozna prirojeni imunski sistem gostitelja. Tollu-podobni receptorji (angl. Toll-like receptors; TLR), kot so TLR5, specifično prepoznajo te strukturne determinante na bakterijskih flagelinih. Pri vrstah *Campylobacter* niso odkrili TLR5–prepoznavnih mest, kar najverjetneje prispeva k izogibanju kampilobaktrov imunskemu sistemu (Guerry in sod., 2007).



Slika 4: Struktura flagela pri bakteriji *Campylobacter jejuni* (Young in sod., 2007).

Figure 4: The structure of flagellum in *Campylobacter jejuni* (Young et al., 2007).

Kemotaksa je sposobnost odkrivanja kemijskih gradientov in premikanja vzdolž njih, bodisi proti atraktantom ali proč od repelentov. Pomembna je prav tako pri življenjskem stilu komezala in pri patogenezi *C. jejuni* in je skupaj z gibljivostjo bistvena za uspešno kolonizacijo *C. jejuni* v črevesju. Med znane kemoatraktante, ki privlačijo celice *C. jejuni*, sodijo L- serin, L- fukoza (oba pomembna glikopeptida mucina), L-cistein, piruvat, sukcinat, fumarat, citrat in malat, med kemorepelente pa spadajo žolčne kisline (Hermans in sod., 2011; Lertsethtakarn in sod., 2011; McSweegan in Walker, 1986). Molekularne osnove kemotakse so pri kampilobaktrih še vedno slabo raziskane (Li in sod., 2014). Najpomembnejši med številnimi geni, ki so vključeni v kemotaktični sistem, je regulatorni gen *cheY*. Mutante tega gena niso sposobne invazije. Predvidevajo, da je ta gen pomemben za celotno regulacijo virulencnih genov (van Vliet in Ketley, 2001).

Vloga bička v patogenezi kampilobaktrov je zapletena in več-funkcionalna. Flagel ni vključen le v gibljivost in kemotakso, temveč tudi v izločanje proteinov, autoaglutinacijo, formiranje mikrokolonij (predstopnja nastanka biofilmov) ter v izogibanje imunskemu sistemu gostitelja (Guerry in sod., 2007; Silva in sod., 2011).

2.6.2 Adhezija in invazija

2.6.2.1 Adhezija

Sposobnost bakterije *C. jejuni*, da se veže na gostiteljske celice, predstavlja pomemben začetni korak pri kolonizaciji in razvoju bolezni (Awad in sod., 2015). Po okužbi *C. jejuni* preide skozi mukozni sloj, ki prekriva epitelne celice in se pritrdi na njih, kar omogoča bakterijam vstop v epitelne celice. Zaradi tega pride do poškodbe mukoznega sloja in vnetja (Awad in sod., 2015; van Vliet in Ketley, 2001; Walker in sod., 1986). Pripenjanje na epitelne celice omogočajo številni adhezini na površini bakterijske celice, ti vključujejo različne fimbrijske strukture, flagel, polisaharidne kapsule, sloj LPS, lektine, lipooligosaharide ter različne proteine. Sintezo fimbrijskih struktur spodbuja prisotnost žolčnih kislin (McSweegan in Walker, 1986; Snelling in sod., 2005). Flagel pospešuje in olajša pritrditev na epitelne celice, medtem ko povezava različnih bakterijskih adhezinov z receptorji epitelnih celic očvrsti povezanost obeh (McSweegan in Walker, 1986).

Nedavno so odkrili, da k sposobnosti adhezije *C. jejuni* na evkariontske celice prispeva več beljakovin. Najbolj raziskan adhezin pri vrsti *C. jejuni* je zunajmembranski protein CadF (ang. a fibronectin binding protein), ki se specifično veže na fibronektin, glikoprotein epitelnih celic gastrointestinalnega trakta. Vezava na fibronektin sproži signalni proces, ki vodi do aktivacije GTP-az Rac1 in Cdc42, ki omogočajo internalizacijo *C. jejuni*. Monteville s sod. je leta 2003 ugotovil značilno zmanjšanje vezave in internalizacije *C. jejuni* v humane črevesne epitelne celice INT-407 pri *cadF* mutantih. Zaporedje aminokislin v domeni CadF beljakovine predstavlja nov fibronektin-vezajoči se motiv. CadF je potreben za maksimalno adhezijo in invazijo *C. jejuni* *in vitro*. Gen *cadF*, ki kodira ta protein, je dobro ohranjen med različnimi vrstami rodu *Campylobacter*, razlike v nukleotidnem zaporedju so majhne. Mutante *cadF* so v značilno manjši meri sposobne kolonizirati črevesje piščancev v primerjavi z divjim tipom (Dasti in sod., 2010; Young in sod., 2007). Za protein FlpA so prvotno mislili, da je pomemben pri vezavi na črevesne epitelne celice piščancev (Flanagan in sod., 2009), vendar so nadaljnje študije odkrile, da je FlpA sposoben vezave na fibronektin (Konkel in sod., 2010). Zato so predlagali, da CadF in FlpA skupaj sodelujeta pri adheziji *C. jejuni* in nadaljnji invaziji (Eucker in Konkel, 2012).

Drugi dobro opisan adhezin je lipoprotein JlpA (ang. *jejuni* lipoprotein A), ki se nahaja na zunanji strani bakterijske celice *C. jejuni* in je ključnega pomena za njegovo pripenjanje na HEp - 2 celice *in vitro*. JlpA se veže na šaperon Hsp90 α evkariontskih celic in s tem sproži aktivacijo NF- κ B in MAP kinaze, kar prispeva k vnetnemu odgovoru gostitelja. To pomeni, da je del vnetja, ki se kaže pri kampilobakteriozi, posledica JlpA-odvisne adhezije (Dasti in sod., 2010; Young in sod., 2007). Lipoprotein CapA (*Campylobacter* adhesion protein A) je autotransporter in je tudi vpleten v adhezijo *C. jejuni*. Mutacija v genu *capA* se kaže v zmanjšani sposobnosti *C. jejuni*, da se veže in invadira na/v humane epitelne celice *in vitro* (Dasti in sod., 2010; Young in sod., 2007). Študije kolonizacije piščancev so si nasprotujoče. Ashgar in sod. so leta 2007 ugotovili popolno nesposobnost mutantov *capA* kolonizacije

piščancev, dočim slednja mutacija pri študiji Flanagan in sod. leta 2009 ni imela nobenega učinka na kolonizacijo piščancev (Ashgar in sod., 2007; Flanagan in sod., 2009).

Določeni adhezini *C. jejuni* se nahajajo celo v periplazmatskem prostoru. Eden takšnih adhezinov je PEB1, ki je nujen za vezavo *C. jejuni* na HeLa celice *in vitro*. PEB1 se veže z visoko afiniteto na aspartat in glutamat. Mutante *Peb1* ne morejo preživeti v okolju, kjer sta ti dve aminokislini glavni vir ogljika. Drugi periplazmatski protein, ki je potreben za adhezijo *C. jejuni*, je transporterski glikoprotein Cj1496c. Kako proteina PEB1 in Cj1496c prispevata k adheziji *C. jejuni* na gostiteljsko celico, ni še pojasnjeno (Flanagan in sod., 2009; Young in sod., 2007). Za *Peb4* so prvotno mislili, da je še en adhezin *C. jejuni* (Asakura in sod., 2007a; Kervella in sod., 1993), vendar so novejšje študije to ovrgle in ugotovile, da je to bakterijski šaperon, ki ima glavno vlogo pri transportu CadF na zunanjo membrano (Kale in sod., 2011).

Nespecifično vezanje bakterije na lipide na membrani epitelnih celic lahko tudi prispeva k adhezivnosti (Jin in sod., 2003). Posebnost mnogih proteinov *C. jejuni*, vključno s flagelom, je v njihovi glikoziliranosti. Biološka pomembnost glikozilacije proteinov ni znana, vendar domnevajo, da določeni bakterijski glikoproteini vplivajo na receptorje evkariontskih celic ter omogočajo pripenjanje bakterijskih celic (Karlyshev in sod., 2004).

In vitro testi so pokazali, da so žive, a nekultivabilne celice kampilobaktrov sposobne vezave na gostiteljsko celico, kar nakazuje, da "de novo" sinteza proteinov ni potrebna za vezavo na evkariontsko celico, medtem ko je invazija *C. jejuni* odvisna od teh proteinov in signalno transdukcijskega sistema gostiteljskih celic. *C. jejuni* preide čez črevesni epitel skozi M celice v Peyerjevih ploščah z mikrotubuli odvisnim invazivnim mehanizmom in se širi v sosednje celice bazolateralno preko interakcije z receptorji na gostiteljskih celicah. Proteini, ki sodelujejo pri invaziji bakterij *C. jejuni* v gostiteljsko celico, so različni od tistih, ki omogočajo adhezijo. Dokaz za to je mutant *C. jejuni*, z mutacijo na genu *peb1* za adhezin, ki značilno zmanjša adhezijo bakterij na celično kulturo celo za 50-100 %, invazijo le za 15 % (Pei in sod., 1998). Flagelirani, gibljivi sevi so bolj invazivni kot neflagelirani, negibljivi sevi. Mutanti *flaA*, *flaB*, *flgB* in *flgE* imajo manjšo sposobnost invazije (Konkel in sod., 2004). Biček, kot najbolj raziskan virulentni dejavnik, ima vlogo pri gibanju in adheziji (Konkel in sod., 2000), pri internalizaciji (Grant in sod., 1993) ter penetraciji skozi epitelne celice in nadaljnji širitvi po organizmu (van Vliet in Ketley, 2001; Wassenaar in sod., 1997).

2.6.2.2 Invazija

Bakterijska invazija povzroča poškodbe epitelnih celic *in vivo*, izgubo celičnih funkcij ter drisko (Snelling in sod., 2005). Biopsija črevesnega tkiva in vzporedni eksperimentalni modeli živalskih celičnih kultur so pokazali podobne posledice invazije bakterij *C. jejuni*, kot sta nekroza epitelnega tkiva ter infiltracija nevtrofilcev in monocitov (Babakhani in sod., 1993; Friis in sod., 2005). *C. jejuni* je eden izmed peščice invazivnih patogenih bakterij, sposobnih s pomočjo reorganizacije citoskeleta vstopiti v gostiteljsko celico in se premikati znotraj nje. Mehanizem invazivnosti v celice, ki ga sproži *C. jejuni*, vključuje povezano delovanje

mikrofilamentov in mikrotubulov gostiteljske celice in inducira aktivacijo proteina G ali fosforilacijo tirozina (Crushell in sod., 2004; Friis in sod., 2005; Hu in Kopecko, 1999; Ketley, 1997; Snelling in sod., 2005). Za maksimalno invazijo je pri vseh sevih *C. jejuni* potrebna polimerizacija mikrotubulov, določeni sevi pa potrebujejo tudi polimerizacijo mikrofilamentov (Young in sod., 2007). Avtorja van Vliet in Ketley (2001) navajata tudi možnost prodiranja *C. jejuni* v gostiteljsko celico s pomočjo endocitoze (Snelling in sod., 2005; van Vliet in Ketley, 2001).

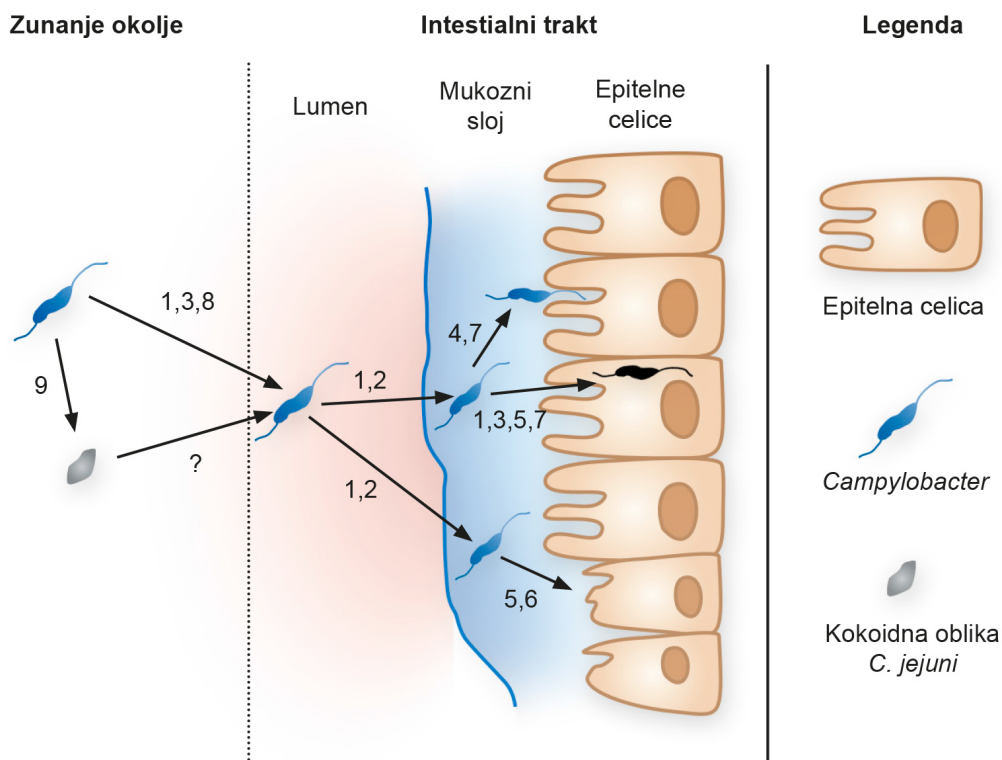
V prisotnosti evkariontskih celic *C. jejuni* sintetizira in izloča proteine Cia (ang. *Campylobacter* invasion antigens), ki naj bi pomagali pri invaziji v gostiteljsko celico (Konkel in sod., 2001). Njihovo sintezo stimulira prisotnost žolčnih soli. Mehanizem izločanja Cia proteinov in njihova vloga v invaziji je še nejasna (Dasti in sod., 2010). CiaB je 73-kDa protein, mutanti *ciaB* imajo zmanjšano sposobnost adhezije in invazije (Konkel in sod., 1999). CiaC je potreben za invazijo humanih embrionalnih črevesnih epitelnih celic INT-407 (Eucker in Konkel, 2012), medtem ko ima CiaI vlogo pri znotrajceličnem preživetju *C. jejuni* (Buelow in sod., 2011).

Ostali proteini, ki vplivajo na sposobnost adhezije in invazije *C. jejuni*, so HtrA, VirK in FspA. HtrA naj bi delovala kot šaperon, ki usmerja pravilno upogibanje adhezinov (Baek in sod., 2011). Mutanti *virK* so bolj občutljivi na protimikrobne peptide (Novik in sod., 2009), medtem ko se protein FspA izloča skozi biček in ima vlogo pri apoptozi (Poly in Guerry, 2008).

Ko je *C. jejuni* znotraj gostiteljske celice, ne more uiti iz lizosoma. Pri tem mu je za preživetje in obrambo pred oksidativnim stresom zelo pomembna prisotnost katalaze. Znotraj lizosoma *C. jejuni* potuje do bazolateralne površine gostiteljske celice, kjer z eksocitozo preide iz celice, pri čemer lahko bakterijske celice preidejo v živo, a nekultivabilno stanje (VBNC) (Snelling in sod., 2005). Zaradi svoje sposobnosti preživetja znotraj fagocitov in črevesnih epitelnih celic je *C. jejuni* fakultativni znotrajcelični parazit (Day in sod., 2000; Konkel in Cieplak, 1992; Wassenaar in sod., 1997). Znotrajcelično preživetje omogoča celicam *C. jejuni*, da uidejo imunskemu sistemu gostitelja, ter povzročijo ponavljajoče akutno vnetje in dolgotrajno infekcijo (Lastovica, 2006). Kampilobaktiri lahko preživijo v makrofagih, kar omogoča širjenje bakterij v organizmu (Wassenaar in sod., 1997). Znotraj gostiteljske celice so izpostavljeni stresnim pogojem (npr. stradanju) ter različnim uničujočim mehanizmom. Pri tem sta pomembna gena *kata* in *sodB*, ki kodirata encima katalazo in superoksid dismutazo (Day in sod., 2000; Müller in sod., 2006). Geni ali fenotipski dejavniki, ki pomagajo kampilobaktrom preživeti znotraj gostiteljske celice, še vedno niso dobro raziskani.

Sposobnost invazije in stopnja invazije kampilobaktrov v celice je sevno specifična. Klinični izolati *C. jejuni* so se pokazali kot bolj invazivni od živalskih, pri čemer s kontinuiranim precepljanjem izgubljajo to lastnost (van Vliet in Ketley, 2001). Adhezija in invazija bakterij *C. jejuni* na/v humane črevesne epitelne celice spodbudi izločanje citokina interleukina 8 (IL-8), ki je ključni mediator imunskega odgovora na infekcijo. Citokini so polipeptidi, ki jih producirajo različni tipi celic in imajo pomembno vlogo pri vnetnem odgovoru gostitelja.

Delujejo kot atraktanti specifičnih fagocitov, saj se izločajo na mestih, kjer pride do vnetja. IL-8 se izloča na bazolateralni strani celic, kjer spodbudi dendritične celice, sproži migracijo nevtrofilcev in monocitov, ki fagocitirajo bakterije in nadaljnjo izločanje pro-vnetnih citokinov, aktivacijo celic T_H ter aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B (NF- κ B) (Hickey in sod., 2005; Konkel in sod., 2001; Rathinam in sod., 2008; Wassenaar in Blaser, 1999).



Slika 5: Različni dejavniki in faze kolonizacije bakterij *C. jejuni* v črevesju (van Vliet in Ketley, 2001). (1) gibljivost; (2) kemotaksa; (3) oksidativni obrambni mehanizem; (4) adhezija; (5) invazija; (6) sinteza toksina; (7) pridobivanje železa; (8) stresni odziv na spremembe temperature; (9) kokoidna oblika.

Figure 5: Different factors and phases of *C. jejuni* colonization of the intestine (van Vliet and Ketley, 2001). (1) motility; (2) chemotaxis; (3) oxidative stress defence; (4) adhesion; (5) invasion; (6) toxin production; (7) iron acquisition; (8) temperature stress response; (9) cocoid dormant stage.

2.6.3 Translokacija

Translokacija je pomemben dejavnik virulence nekaterih patogenih bakterij, saj jim omogoča dostop do tkiv pod epitelom ter diseminacijo v organizmu. Črevesni epitel je primarna ovira pred invazivnimi patogenimi bakterijami, ki so sposobne translokacije skozi celice (Monteville in Konkel, 2002). Za študij učinka bakterij na membransko permeabilnost, mehanizme transcitoze in celične invazije se uporabljajo polarizirane celične kulture (Friis in sod., 2005).

Bakterije se prebijajo iz apikalne na bazolateralno stran enterocitov po dveh poteh. Način translokacije kampilobaktrov preko epitela še vedno ni pojasnjen, toda Bras in Ketley (1999) navajata dve možnosti, paracelularno (med celicami) in transcelularno (skozi citoplazmo gostiteljske celice). Transcelularni način potrjuje konstantna transepitelna električna upornost (TEER) med translokacijo kampilobaktrov (Bras in Ketley, 1999). Paracelularni način ne zahteva invazije, povzroči pa razdor tesnih medceličnih stikov in padec TEER, ki je merilo za propustnost tesnih stikov celic in integriteto monosloja. Monteville in Konkel sta leta 2001 pokazala, da je *C. jejuni* sposoben translokacije tudi paracelularno brez spremembe transepitelne električne upornosti (Monteville in Konkel, 2002). Translocirane bakterije so opazili pod monoslojem celic v manj kot 1 uri po inokulaciji celic (Konkel in sod., 1992).

2.6.4 Toksini

Poskusi *in vitro* so pokazali, da le okoli 1 % bakterij, ki pridejo v črevesje, napade in uspešno invadira črevesne epitelne celice, kjer jih večino uničijo znotrajcelični dejavniki. Iz tega sledi, da so za citopatološke učinke okužbe z bakterijami rodu *Campylobacter* poleg invazije epitelnih celic potrebni še drugi dejavniki, med katerimi pomembno vlogo igrajo toksini (Wassenaar in sod., 1997). Kampilobaktri tvorijo enterotoksine, ki jih je slovenska raziskovalka prof. Gubina odkrila leta 1982 (Gubina in sod., 1982) in citotoksine (Wassenaar in sod., 1997; Wooldridge in Ketley, 1997). *C. jejuni* enterotoksin (CLT) je imunološko podoben enterotoksinu bakterije *Vibrio cholerae*, t.i. kolera toksinu (CT) in termolabilnemu toksinu, ki ga izloča *Escherichia coli* (LT). Enterotoksini se vežejo na celične receptorje in po vstopu v celico dvignejo koncentracijo znotrajceličnega cikličnega AMP (cAMP), kar pospeši aktivni transport elektrolitov in vode v črevesje. S svojim lokalnim delovanjem na črevesno sluznico so enterotoksini vzrok vodene driske (Wassenaar in sod., 1997).

Drugi tip toksinov, ki jih izločajo kampilobaktri, so citotoksini (proteini), ki uničujejo tarčno celico. Njihovo sintezo sta prvič opisala Johnson in Lior leta 1988 (Konkel in sod., 2001). Kampilobaktri proizvajajo različne vrste citotoksinov: citotoksin 70 kDa, toksin CDT, Shiga toksinu podoben toksin, hemolitične citotoksine in hepatotoksin, vendar mehanizmi delovanja za večino od teh še niso poznani (Louwen in sod., 2012). Toksin CDT je edini citotoksin, ki je

dobro poznan in ga sestavlja Cdt ABC kompleks. Vse tri podenote so potrebne za funkcionalno aktivnost toksina (Asakura in sod., 2007b; Silva in sod., 2011). CdtA in CdtC sta pomembna pri vezavi toksina na membrano gostiteljske celice, CdtB pa je encimsko aktivna molekula kompleksa. CdtA in CdtC skupaj s CdtB sestavljata CDT holotoksin, velikost teh proteinov je 30, 29 in 21 kDa. Za citotoksično aktivnost je pomembna translokacija CdtB v citoplazmo gostiteljske celice, kjer se s pomočjo Golgijevega aparata prenese do endoplazmatskega retikuluma in do jedra gostiteljske celice po t.i. retrogradnem transportnem mehanizmu. CdtB deluje podobno kot encim deoksiribonukleaza in povzroči blokado celičnega cikla v G-2 fazi, s preprečevanjem defosforilacije CDC-2 kinaze, ki je povezana z začetkom mitoze (Konkel in sod., 2001; Silva in sod., 2011). Toksin na ta način povzroči nepravilen razvoj epitelne celice, ki se postopoma raztegne in kot taka nima sposobnosti absorpcije, kar vodi v smrt celice (Ming Man, 2011; Pickett in sod., 1996). Kdaj pride do izločanja toksina CDT, ali pred kontaktom bakterije z gostiteljsko celico, ob pripenjanju ali po invaziji, še ni poznano (Crushell in sod., 2004; Ming Man, 2011). Lokalni vnetni odgovor s sproščanjem IL-8 in infiltracijo polimorfonuklearnih levkocitov ter celične poškodbe, povzročene s CDT toksinom, imajo za posledico krvavo vnetno drisko (Navaneethan in Giannella, 2008).

2.6.5 Lipooligosaharid in kapsula

Vse do nedavnega je veljalo, da *C. jejuni* sintetizira lipooligosaharide (LOS) in lipopolisaharid visoke molekulske mase (LPS). Danes vemo, da je LPS pravzaprav visoko variabilni polisaharid kapsule, ki ima pomembno vlogo za preživetje in obstoj *C. jejuni* v okolju ter prispeva k njegovi sposobnosti, da adherira in invadira na/v epitelne celice ter kolonizira črevesje piščancev. Kapsularni polisaharidi in lipooligosaharidi vplivajo na hidrofobnost kampilobaktrov, autoaglutinacijo ter adhezijo številnih sevov na različne celične kulture (Nguyen in sod., 2013; Young in sod., 2005).

Lipopolisaharid, ki ga ponavadi imajo po Gramu negativne bakterije, je sestavljen iz lipida A ter osrednjega oligosaharidnega dela, na katerega je kovalentno vezana veriga ponavljajočih se oligosaharidov (O-antigen) (van Vliet in Ketley, 2001; Oh in Jeon, 2015). Lipooligosaharid (LOS), ki ga ima *C. jejuni*, ne vsebuje polisaharidne verige O – antigena in je sestavljen iz osrednjega oligosaharidnega dela, na katerega je vezan lipid A, ki je zasidran v membrano bakterijske celice (Nguyen in sod., 2013; Oh in Jeon, 2015). LOS ima več funkcij, med katerimi so tudi adhezija in invazija ter izogibanje imunskemu sistemu gostitelja. Sialilacija LOS še dodatno poviša invazivni potencial *C. jejuni* in zmanjša njegovo imunogenost (Guerry in Szymanski, 2008; Louwen in sod., 2008). Pri bakteriji *C. jejuni* je struktura lipooligosaharida (LOS) podobna humanim nevronskim gangliozidom, kar lahko vodi do avtoimunskih zapletov bolezni (Szymanski in Gaynor, 2012; Young in sod., 2005; Zilbauer in sod., 2008). Zaradi lipooligosaharida je *C. jejuni* bolj odporen na hidrofobna zdravila (npr. eritromicin) in tudi na žolčne soli, kar vpliva na njegovo sposobnost kolonizacije črevesja piščancev (Oh in Jeon, 2015).

Površino celic *C. jejuni* prekriva polisaharidna kapsula, ki omogoča bakterijam preživetje, adhezijo in izogibanje imunskemu sistemu gostitelja. Kapsula *C. jejuni* je strukturno visoko variabilna, kar omogoča temu patogenu, da oponaša antigene gostitelja in se na ta način izogne fagocitozi ter komplementarnem ubijanju s strani imunskega sistema gostitelja (Karlyshev in sod., 2004). Nekapsulirani mutanti, npr. mutacija v genu *kspM* (ki kodira transportni protein za polisaharide kapsule), kažejo zmanjšano sposobnost invazije v celice INT-407 ter tudi zmanjšano kolonizacijo perutnine (Bachtiar in sod., 2007). Gen *kspE* ter ostali geni za biosintezo polisaharidov kapsule se nahajajo na hipervariabilni regiji genoma *C. jejuni* (Poly in sod., 2011). Njihovo izražanje je inducibilno, kar pomeni, da se lahko vključijo ali izključijo v različnih fazah celičnega cikla (fazna variabilnost) (Guerry in sod., 2002; Parkhill in sod., 2000). Znana je struktura kapsule nekaterih sevov *C. jejuni* - na osnovi flagelarnega in kapsularnega antigena ločimo 50 različnih serotipov (Young in sod., 2007).

C. jejuni ima N-vezavni glikozilacijski sistem, ki ga kodira večgenski lokus *pgl* in je odgovoren za post-translacijsko modificiranje več kot 60 periplazmatskih proteinov (vključno s proteini bička in beljakovinami, vezanimi na membrano). N- glikozilacija omogoča izogibanje kampilobaktrov imunskemu sistemu gostitelja in naj bi jih tudi ščitila pred proteazami gastrointestinalnega trakta gostitelja (Alemka in sod., 2013).

2.7 UPORABA RAZLIČNIH MODELOV ZA PROUČEVANJE VIRULENCE *C. jejuni*

Razvitih je več modelov za proučevanje mehanizma patogeneze bakterij rodu *Campylobacter*, mednje uvrščamo polarizirane in nepolarizirane epitelne celične kulture ter živalske modele. Celični modeli služijo predvsem za proučevanje sposobnosti adhezije, invazije in translokacije bakterij skozi polarizirani črevesni epitelni monosloj (Šikić Pogačar in sod., 2012). Večji, živalski modeli so omogočili prve raziskave mehanizmov patogeneze *C. jejuni*, prenosa bakterije in razvoja cepiv. Različne načine inokulacije so uporabili pri kokoših, dihurjih, psih, zajcih, miših, opicah in prašičih, z namenom razvoja okužbe, podobne humani (Mansfield in sod., 2008). Celu ličinke molja *Galleria mellonella* so se pokazale občutljive za infekcijo s *C. jejuni* in so jih uporabili kot model infekcije (Senior in sod., 2011; Šikić Pogačar in sod., 2012). Kot najboljši živalski model za proučevanje infekcij so se pokazale opice, a so žal predrage in niso dostopne večini inštitucij.

Idealni živalski model naj bi zagotavljal: simptome, podobne kot pri ljudeh po oralnem vnosu inokuluma bakterij, dostopnost živali, enostavno uporabo, ponovljivost, poceni vzdrževanje živali ter znan imunski status živali (Mansfield in sod., 2008). Pomanjkljivost uporabe živalskih modelov je v tem, da so živali pogosto tihi prenašalci bolezni in zato ker pogosto nimajo očitnih simptomov bolezni. Poleg tega mora biti življenjska doba živali dovolj dolga, da omogoči zaključek celotne študije (Haddad in sod., 2010). "Popolne" modele, ki izrazijo kampilobakteriozo (predvsem drisko), moramo ločiti od "delnih" modelov, pri katerih ne pride do ene ali več lastnosti virulence *C. jejuni* (npr. kolonizacije, adhezije, internalizacije ali produkcije toksina) (Haddad in sod., 2010).

2.7.1 Uporaba celičnih kultur

Študij mehanizma patogeneze bakterij rodu *Campylobacter* je zapleten predvsem zaradi pomanjkanja preprostega živalskega modela, s katerim bi lahko prikazali potek razvoja bolezni pri ljudeh. Dobra in uporabna alternativa, s katero lahko proučujemo interakcije patogen-gostitelj in se obenem izognemo poskusom na živalih, so celične kulture (Friis in sod., 2005). Uporaba celičnih kultur za raziskovanje invazivnosti je standardna metoda *in vitro*, tako kot je model kolonizacije piščancev standardna metoda *in vivo* za proučevanje virulentnosti kampilobaktrov (Hu in Kopecko, 2008; Müller in sod., 2006).

Adhezivnost in invazivnost *C. jejuni* se *in vitro* proučujeta na različnih črevesnih celičnih kulturah, ki naj bi oponašale pogoje *in vivo*. Največkrat uporabljene humane celične kulture so: diferencirane celice Hep-2 (celice humanega karcinoma jeter), T84 (celice iz karcinoma debelega črevesa človeka), INT-407 (humane embrionalne črevesne epitelne celice), HeLa (celice humanega karcinoma cerviksa) ter Caco-2 (celice humanega adenokarcinoma debelega črevesa) (Friis in sod., 2005; van Vliet in Ketley, 2001). Humane celice črevesnega epitela so se izkazale kot najboljši *in vitro* model proučevanja interakcij gostitelj–patogen pri kampilobaktarih (Friis in sod., 2005; van Vliet in Ketley, 2001).

Celice po nasaditvi sprva rastejo kot monosloj. Konfluentnost monosloja je pomemben dejavnik, ki vpliva na invazijo in adhezijo bakterij. Po dosegu konfluentnosti se začnejo diferencirati v celice, podobne absorpcijskim enterocitom, ki izražajo lastnosti epitelnih celic tankega črevesa. Tesni stiki med celicami ovirajo prehajanje tekočine in ločijo apikalni del od bazolateralnega. Apikalni in bazolateralni del sta si biokemijsko različna, glede na funkcije transporta in lokacije receptorjev na celični membrani. Ker postane monosloj električno aktiven šele po vzpostavitvi tesnih stikov, lahko z merjenjem transepitelne električne upornosti (TEER) preverjamo stopnjo diferenciacije (Fantini, 1992). TEER je obenem pokazatelj integritete celičnega monosloja ter translokacije *C. jejuni* skozi monosloj polariziranih črevesnih epitelnih celic (Langerholc in sod., 2011; Šikić Pogačar in sod., 2010; Šikić Pogačar in sod., 2012).

Dober celični model mora *in vitro* izpolnjevati osnovne zahteve: ohraniti mora značilnosti izhodiščnega tkiva, da so dobljeni rezultati lahko primerljivi z razmerami *in vivo*, biti mora razpoložljiv in enostaven za uporabo (Langerholc in sod., 2011). Pri določanju števila invadiranih celic *C. jejuni* v celično kulturo se uporablja antibiotik gentamicin, saj ne penetrira v evkariontske celice, torej so invadirane bakterijske celice zaščitene (Elsinghorst, 1994).

Poskus, ki je bil povzet po metodi Elsinghorsta (1994), je sestavljen iz več faz:

- Inkubacija namnoženih evkariontskih celic z bakterijsko suspenzijo *in vitro*;
- Izpiranje neadheriranih bakterijskih celic;
- Inkubacija z raztopino gentamicina;
- Liziranje evkariontskih celic v določenih intervalih ter štetje invadiranih bakterijskih celic.

Število adheriranih bakterij lahko izračunamo iz vzporednega poskusa, pri katerem je faza inkubacije z gentamicinom izpuščena. To metodo lahko uporabljamo ne samo za proučevanje invazivnosti *C. jejuni*, ampak tudi za proučevanje znotrajceličnega preživetja in replikacije bakterijskih celic (Biswas in sod., 2000; Elsinghorst, 1994; Friis in sod., 2005).

2.7.2 Splošne karakteristike celičnih kultur PSI in H4

Celice PSI (celična linija prašičjih črevesnih epitelnih celic) so bile izolirane iz vzorca tankega črevesa prašiča v Laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru. Humane celice H4 so izolirane iz vzorca tankega črevesa 20- tednov starega zarodka. Celično linijo so razvili Walker in sod. leta 2000 v razvojnem gastroenterološkem laboratoriju, Splošne bolnišnice Massachusetts (Cencič in Langerholc, 2010). Celice H4 imajo v pogojih *in vitro* lastnosti nezrelih človeških enterocitov (Nanthakumas in sod., 2000; Sanderson in sod., 1996). Oba celična modela sta adherentna, kar pomeni, da se pritrdita na podlago in rasteta kot monosloj.

Z merjenjem transepitelne električne upornosti (TEER) so dokazali, da so celice PSI visoko diferencirane in polarizirane, saj pri gojenju celic na poroznih insertih tvorijo tesne stike med celicami. Polariziranost pomeni, da imajo dva različna pola: apikalni in bazolateralni pol. Diferenciranost prepoznamo po prisotnosti mikrovilov na apikalni strani celic (Cencič in Langerholc, 2010). Celice PSI so kriптиčni in nepopolnoma diferencirani enterociti.

Celični liniji PSI in H4 sta nekarcinogenega izvora, zato predstavljajo boljši model za študij interakcij gostitelj-patogen kot celične linije karcinogenega izvora, ki so zaradi sprememb na celični membrani manj podobne zdravim črevesnim celicam *in vivo* (Šikić Pogačar in sod., 2010; Šikić Pogačar in sod., 2012).

2.8 RASTLINSKI IZVLEČKI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA

2.8.1 Definicija

Uporaba zdravilnih rastlin je stara toliko kot človeštvo. Ljudje so rastline uporabljali ne samo v zdravstvene namene, ampak tudi kot začimbe in za konzerviranje hrane. Protimikrobni učinki rastlinskih izvlečkov so znani že več stoletij. Čeprav se uporabljajo za inhibicijo rasti patogenih mikroorganizmov in mikrobnih povzročiteljev kvarjenja hrane, je njihova uporaba v hrani zaradi intenzivnih arom omejena (Del Campo in sod., 2000). Večina eteričnih olj in izvlečkov ima status GRAS (angl. generally recognized as safe) oz. je "na splošno spoznana kot varna".

V zadnjih letih je prišlo do vse večjega zanimanja za alternativno terapijo in terapevtsko uporabo naravnih izdelkov, zlasti tistih, ki so pridobljeni iz rastlin. Razlogov je več. Konvencionalna medicina se je velikokrat pokazala kot neučinkovita, pojavljajo se stranski učinki zaradi preobčutljivosti posameznikov, nepravilne uporabe, oziroma zlorabe sintetičnih zdravil. Poleg tega pa velik del populacije sploh nima dostopa do običajnega zdravljenja (Palombo, 2011). Tudi tradicionalna medicina je vedno bolj dovzetna za uporabo protimikrobnih učinkovin, izoliranih iz rastlin, kajti do sedaj uporabljeni antibiotiki postajajo vse bolj neučinkoviti zaradi vse večjega števila patogenih bakterij, ki so odporne na antibiotično terapijo (Cowan, 1999). Istočasno se razvija trend zelenega potrošništva. Ljudje želijo varno hrano z manj sintetičnih aditivov oz. jih želijo nadomestiti z naravnimi z manjšim vplivom na zdravje ljudi in okolje (Burt, 2004).

Rastline so bogat vir protimikrobnih snovi in imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih sestavin (Burt, 2004; Cowan, 1999). Med temi so najbolj zastopane in tudi najpomembnejše fenolne spojine ter njihovi oksigenirani derivati. Večinoma so to sekundarni metaboliti. Do sedaj so jih izolirali vsaj 12 000, ta številka predstavlja manj kot 10 % vseh rastlinskih snovi. Rastlino ščitijo pred napadi virusov, bakterij, plesni, insektov in herbivorov ter povečujejo odpornost pred škodljivimi UV-žarki, ki sprožajo nastanek prostih radikalov. Nekatere spojine so odgovorne za vonj rastline, druge za barvo ali okus (Gibbons, 2008). Protimikrobne snovi se akumulirajo predvsem v epidermalnem tkivu rastlin, kjer pod stresnimi pogoji nastane nešteto kombinacij majhnih molekul (molekulska masa < 500) (Hemaiswarya in sod., 2008). Najbolj poznane začimbe in zelišča s protimikrobnim delovanjem so: čebula, česen, origano, rožmarin, cimet, koriander, žajbelj, nageljnova žbica in timijan (Burt, 2004). Količina sintetiziranih fenolnih spojin v rastlinah je genotipsko pogojena (sorta), lahko pa se razlikuje tudi glede na geografsko lego (svetloba, temperatura), stopnjo zrelosti, vsebnost ogljikovih hidratov, mineralov ter količino vode v celici. Rastlinski izvlečki se pridobivajo iz skorje, listov, cvetov, plodov in semen (Araujo in sod., 2003). Njihova protimikrobna učinkovitost ter spekter delovanja sta odvisna od vrste in strukture prisotnih spojin, od njihovega deleža v rastlini ter morebitnega sinergističnega delovanja, če je prisotnih več aktivnih komponent (Araujo in sod., 2003).

V preglednici 3 so zbrane glavne protimikrobne snovi rastlinskega porekla ter njihovi znani primeri in načini delovanja na bakterijsko celico. Na učinkovitost rastlinskih izvlečkov vplivajo številni dejavniki, od bioloških (zrelost, sorta, rastni pogoji in geografsko poreklo rastlin) do postopkov priprave vzorcev (od ekstrakcijskih metod, vrste topila, načina koncentriranja in same koncentracije končnega produkta ter načina uporabe) (Klančnik in sod., 2009). Številne študije *in vitro* so pokazale visoko učinkovitost eteričnih olj proti patogenim bakterijam v živilih in tudi kvarljivcem. Vendar je za doseganje iste učinkovitosti v samem živilu potrebna višja koncentracija kot v testiranjih *in vitro* (Burt, 2004). Pri nižjem pH se protimikrobna učinkovitost povečuje, saj se z nižanjem vrednosti pH hidrofobnost eteričnega olja povečuje, to pa jim omogoča lažje vrivanje v membrano tarčne celice (Juven in sod., 1994).

Izredna kemijska raznolikost rastlin predstavlja obetaven vir novih biološko aktivnih učinkovin s terapevtskim potencialom. Številne učinkovine predstavljajo osnovo za razvoj novih farmacevtskih učinkovin ter poceni surovino za sintezo novih zdravil s profilaktičnim delovanjem. Širom sveta obstaja okoli 500 000 različnih rastlinskih vrst, od katerih je le 1 % fitokemijsko analiziran, kar pomeni, da je to področje dokaj slabo poznano in predstavlja velik potencial za odkritje novih biološko aktivnih učinkovin (Palombo, 2011).

Preglednica 3: Glavne protimikrobne snovi rastlinskega porekla (Cowan, 1999).

Table 3: Major classes of antimicrobial compounds from plants (Cowan, 1999).

Razred	Polrazred	Primer	Mehanizem delovanja
Fenolne spojine	Enostavni fenoli	Katehol	Pomanjkanje substrata
		Epikatehin	Razbitje membrane
	Fenolne kisline	Cimetna kislina	Ni znan
	Kinoni	Hipericin	Vezava na adhezine, kompleks s celično steno, inaktivacija encimov
	Flavonoidi	Krizin	Vezava na adhezine
	Flavoni	Abisinon	Kompleks s celično steno, inaktivacija encimov, inhibicija reverzne transkriptaze HIV
	Flavonoli	Totarol	Ni znan
	Tanini	Elagitanin	Vezava na proteine, vezava na adhezine, inhibicija encimov, pomanjkanje substrata, tvorba kompleksa s celično steno, razbitje membrane, kelacija ionov.
	Kumarini	Varfarin	Interakcija z evkarionsko DNA, protivirusno delovanje
	Terpeni, eterična olja		Kapsaicin
Alkaloidi		Berberin, piperin	Interkalacija v celično steno in/ali DNA
Lektini in polipeptidi		Manoza-specifični aglutinin	Preprečevanje fuzije ali adsorpcije virusov
		Fabatin	Tvorba disulfidnih mostičkov

2.8.2 Modri pinot

V svetovni proizvodnji sadja je daleč na prvem mestu pridelava grozdja s 60 milijoni ton/leto, večina pa se uporablja (> 80 %) v pridelavi vina. Rdeče vino je priljubljena pijača s številnimi pozitivnimi učinki na zdravje ljudi. To je kompleksna raztopina različnih spojin z izrazitim protimikrobnim delovanjem, predvsem zaradi nizke vrednosti pH (3 – 4), relativno visoke koncentracije etanola (10 – 15 %) in številnih protimikrobnih spojin, ki so prisotne v vinu (Gaňan in sod., 2009). Vsebnost fenolnih spojin in sestava grozdja sta odvisni od kultivarja, okoljskih dejavnikov, leta ter pogojev v katerih poteka fermentacija. Na splošno imajo rdeče sorte večjo vsebnost fenolnih spojin (predvsem antocianov) kot bele sorte (Timothe in sod., 2007). Grozdne pečke in kožice so dober vir taninov. Pečke so pravzaprav kompleksni matriks, ki ga sestavlja približno 40 % vlaknin, 16 % olja, 11 % beljakovin in 7 % kompleksnih fenolnih spojin (vključno s tanini). Poleg tega vsebujejo še sladkorje in mineralne soli (Murga in sod., 2000). Galna kislina in monomeri katehina in epikatehina so glavne fenolne spojine grozdnih pečk (Yilmaz in Toledo, 2004). V grozdnih kožicah so glavni tanini: katehin, epikatehin in epikatehin galat, v manjši meri tudi galokatehin in epigalokatehin (Timothe in sod., 2007).

Pri pridelavi vina nastaja večja količina trdnih, predvsem organskih odpadkov, kot so grozdne pečke, tropine po predelavi rdečih vinskih sort in pecljevina z listi. Ti odpadki predstavljajo pomemben vir polifenolov z antioksidativno in protimikrobno učinkovitostjo. Bioaktivne fenolne spojine lahko uporabimo kot antioksidante v živilih in za pripravo preventivnih prehranskih dopolnil za preprečevanje različnih obolenj. Visokovredne antioksidante iz pecljevine in listov, kot npr. resveratrol že uporabljajo v kozmetični in farmacevtski industriji. Tropine predstavljajo bogat vir drugih antioksidantov (procianidinov) in barvil (antocianov). So tudi surovina za proizvodnjo olja iz grozdnih pečk, ki imajo visoko vsebnost nenasičenih maščobnih kislin (Jayaprakasha in sod., 2003; Palma in Taylor, 1999; Rauha in sod., 2000). Stranski produkti, ki se akumulirajo v ogromnih količinah pri pridelavi vina, predstavljajo poceni vir novih farmakološko aktivnih snovi za uporabo v prehranskih dopolnilih ali za proizvodnjo fitofarmaceutskih sredstev (Timothe in sod., 2007).

2.8.3 Oljčni listi

Oljka (*Olea europaea* L., družina *Oleaceae*) je eno od najpomembnejših sadnih dreves v Sredozemlju, kjer pokriva 8 milijonov hektarov, kar predstavlja skoraj 98 % svetovnega pridelka. To kaže na njen ekonomsko pomemben status in potencialne možnosti uporabe njenih stranskih produktov. Oljčno olje in plodovi oljke predstavljajo pomembna živila v prehrani velikega deleža svetovne populacije. Plodovi in listi oljke predstavljajo bogat vir naravnih antioksidantov, kot so karotenoidi, tokoferoli, flavonoidi in druge fenolne spojine, med katerimi sta najbolj zastopana olevropein in dimetilolevropein. V zgodovini so se listi oljke uporabljali kot ljudsko zdravilo za preprečevanje povišane temperature, mrzlice in drugih bolezni, kot je malarija. Nekatere študije poročajo, da listi oljke znižujejo krvni

pritisk, povečujejo arterijski krvni pretok, pomagajo pri aritmijah ter preprečujejo spazme črevesnih mišic (El in Karakaya, 2009; Pereira in sod., 2007).

Grenka spojina olevropein, ki je glavna komponenta oljk in njenih listov, kaže potencialno protivnetno sposobnost in je učinkovita proti nekaterim virusom, bakterijam, kvasovkam, plesnim in drugim parazitom. Zaradi zaščitnega delovanja fenolnih spojin lahko uporaba listov oljke znižuje tveganje okužb, še posebej črevesnega in respiratornega trakta. Najbolj pomembne spojine, ki so jih identificirali v izvlečkih listov oljke so: hidroksitirozol, kavna kislina, verbaskozid, oleuropein, luteolin 7-*O*-glukozid, rutin, apigenin 7-*O*-glukozid in luteolin 4'-*O*-glukozid (Ok-Hwan in Boo-Yong, 2010). Rezultati študij so pokazali, da sta predvsem hidroksitirozol in oleuropein sposobna inhibirati ali upočasniti rast nekaterih črevesnih in respiratornih patogenov pri ljudeh (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Helicobacter pylori* in *Campylobacter jejuni*) (Ok-Hwan in Boo-Yong, 2010; Pereira in sod., 2007).

2.8.4 Timijan

Slovensko ime za rod *Thymus* je materina dušica ali timijan. Timijan (*Thymus vulgaris*), je del družine ustnatic (Labiatae), ki ima okoli 5500 različnih vrst, razširjenih po vsem svetu. Rod *Thymus* L. obsega okoli 300 vrst trajnih in polgrmovnih zelišč, ki jih najdemo po večini v Sredozemlju, severnem predelu afriške celine ter južnem delu Grenlandije. Timijan izvira iz Sredozemlja in je aromatična zdravilna rastlina z vse večjim pomenom v hortikulturi (Bhaskara Reddy in sod., 1998). Listi timijana se lahko uporabljajo sveži ali posušeni kot začimba. Posušeni nadzemni del timijana vsebuje poleg čreslovin, flavonoidov in triterpenskimi spojin tudi do 2,5 % eteričnega olja. Eterično olje se ekstrahira iz svežih listov in cvetov ter se lahko uporablja kot aromatični dodatek v pripravi jedi, farmacevtikov in kozmetični industriji. Posušene rastline ali rastlinske dele uporabljajo v zdravilstvu.

Najpogosteje se v fitoterapiji uporabljajo posušeni nadzemni deli timijana kot sredstvo proti kašlju, bronhitisu, bronhialnem katarju, astmi, pri driski itd. Tradicionalno se timijan uporablja zaradi svojih blagodejnih učinkov kot so protimikrobno, antispazmotično ter antioksidativno delovanje (Seung-Joo in sod., 2005). Številne študije so potrdile, da ima eterično olje timijana izrazito protimikrobno delovanje, predvsem zaradi visoke vsebnosti fenolnih spojin kot sta timol (30 – 70 %) in karvakol (3 – 15 %), ter metoksi-timol, p-cimen, cineol, linalol itd. (Cosentino in sod., 1999). Med biološko aktivnimi sestavinami timijana so še kavna kislina in njeni oligomeri (rožmarinska kislina), flavoni, flavanoli, monoterpenski glikozidi, diterpeni, triterpeni, steroli itd. Timol je znan tudi pod imenom 2-izopropil-5-metilfenol in spada med monoterpenske alkohole, hkrati pa prispeva karakterističen vonj "po timijanu". Zanj so prav tako dokazali vpliv na rast in produkcijo toksinov mikotoksigenih plesni (Bhaskara Reddy in sod., 1998; Jeršek in sod., 2014).

2.8.5 *Alpinia katsumadai*

Alpinia katsumadai je rastlina iz velike družine *Zingiberaceae* in izvira iz otoka Hainan na vzhodu Kitajske. Rod *Alpinia* sestavlja kar 250 različnih rastlinskih vrst, katerih predstavnike najdemo predvsem na področju Kitajske, Indije in Polinezije. Rastline iz rodu *Alpinia* imajo debelo korenino, podobno kot ingver. Številne vrste *Alpinia* so cenjene zaradi njihovih zdravilnih lastnosti in se že stoletja uporabljajo v tradicionalni kitajski medicini za zdravljenje različnih stanj, kot so bruhanje in želodčne težave (Lee in sod., 2003).

Glavne bioaktivne učinkovine v izvlečku semen *A. katsumadai* so flavonoidi (kardamonin, alpinetin, pinocembrin in diarilheptanoidi), monoterpeni, stilbeni in labdani. Te spojine imajo številne zdravilne koristi in tudi protimikrobno delovanje (Xiao in sod., 2011). Omejene sestavine imajo tudi antioksidativno aktivnost, vendar je bilo narejenih le malo raziskav, ki bi pokazale antioksidativno ali biološko aktivnost izvlečka semen *A. katsumadai* *in vivo* (Lee in sod., 2003). Študije so pokazale, da etanolni izvleček *A. katsumadai* zmanjšuje oksidativni stres in je zato potencialni kandidat za zdravljenje alergijske astme (Lee in sod., 2010). Pri miškah s sepso so pokazali, da izvleček zmanjša nivo pro-inflamatornih citokinov v serumu teh živali, kljub temu pa niso dokazali nobenega direktnega bakteriostatičnega ali baktericidnega učinka (Yang in sod., 2009).

Bistro in rumeno eterično olje *A. katsumadai*, pripravljeno s parno destilacijo cvetov in listov rastline, vsebuje 49 različnih sestavin. Štiri spojine eteričnega olja *A. katsumadai*, β - pinen, 1,8-cineol, p-ment-1-en-ol in ocimen so pokazale močno protimikrobno delovanje. Za sestavino 1,8-cineol pa je bilo med drugim dokazano tudi na srčno žilni sistem. Razlike v učinkih eteričnega olja različnih vrst *Alpinia* so posledica razlik v sestavi olja oz. v vsebnosti različnih snovi (Klančnik in sod., 2012b; Nan in sod., 2004).

2.9 PREPREČEVANJE ADHEZIJE PATOGENIH BAKTERIJ

Zanimiv pristop preprečevanja infekcij je t.i. protiadhezijska terapija. Ker sta vezava in kolonizacija patogenih bakterij predpogoj za razvoj okužbe, bi intervencija v tej zgodnji fazi okužbe lahko pomagala pri preprečevanju bolezni, saj so vezane bakterije dosti bolj odporne proti odstranitvi iz organizma s pomočjo peristaltike ali proti uničenju s strani imunskega sistema, bakteriolitičnih encimov ali antibiotikov (Lane in sod., 2010). Za številne bakterijske patogene, ki napadajo mukozna tkiva, so specifični adhezini njihovi virulenčni dejavniki. Včasih imajo izražen le en adhezin, ki je kritičen za povzročanje bolezni. Večina bakterijskih patogenov ima sposobnost izražanja številnih adhezinov, ki so ponavadi izraženi v različnih stopnjah infekcije (Niemann in sod., 2004).

Adhezija bakterij ni le predpogoj za razvoj bolezni, temveč tudi kritičen korak pri formiranju biofilmov. Slednje poteka v fazah, od ireverzibilne pritrditve do začetne namnožitve bakterij in formiranja mikrokolonij in kasneje biofilma, ki je kompleksna tridimenzionalna struktura. Na področju medicine so biofilmi zelo pomembni, saj so kronične in trdovratne bakterijske

okužbe tesno povezane z biofilmi. Ti so tudi vzrok ponavljajočih se infekcij. Težavni so predvsem zato, ker so bakterije v biofilmih zelo odporne proti delovanju gostiteljskega imunskega sistema, antibiotikom, biocidom in hidrodinamskim silam (Costerton in sod., 1999). V industriji so biofilmi velik problem zaradi kontaminacije delovnih površin, zamašitve cevovodnih sistemov in aparatov (Kumar in Anand, 1998).

Tudi ljudje se danes vse bolj zavedajo slabosti uporabe antibiotikov in se vse več obračajo komplementarni medicini pri iskanju rastlinskih "zdravil" oz. dopolnil za vzdrževanje zdravja, za preprečevanje ali zdravljenje manjših težav in bolezni, kot so na primer različne gastrointestinalne težave. Pogosto uporabljajo rastlinska prehranska dopolnila skupaj s "konvencionalno" terapijo. Proučevanje rastlinskih zdravil, izvlečkov ali delov rastlin z namenom iskanja spojin s protiadhezijskimi lastnostmi bi lahko vodilo v razvoj novih zdravil, ki bi bila pomembna zaščita v boju proti bakterijskim okužbam.

2.9.1 Preprečevanje bakterijske adhezije

2.9.1.1 Analogi receptorjev

Bakterijski adhezini se najpogosteje vežejo na sladkorne komponente glikoproteinov ali glikolipidov na tarčni celici. Zato bi bili analogi receptorjev v protiadhezijski terapiji uporabni predvsem proti patogenom, ki se povežejo s tarčno celico gostitelja preko adhezinov, specifičnih za določene ogljikove hidrate (npr. lektini). V tem primeru so analogi receptorjev različni sladkorji, strukturno podobni glikoproteinskim ali glikolipidnim receptorjem in delujejo na principu kompetitivne inhibicije (Klemm in sod., 2010; Ofek in sod., 2003). Posledično se patogen, namesto na gostiteljsko celico, veže na specifični topni oligosaharid, po strukturi podoben celičnemu receptorju in se s peristaltiko odstrani iz telesa (Wang in sod., 2015).

Že pred tremi desetletji so odkrili, da je manoza sladkor na receptorjih, na katere se vežejo enterobakterije (Ofek in sod., 1977). Od takrat so za številne bakterije določili, na katere sladkorne komponente receptorjev se vežejo, kar je prispevalo k razvoju receptorjem podobnih ogljikovih hidratov, ki preprečijo adhezijo patogenih bakterij na celice in tkiva gostitelja (Ofek in sod., 2003; Wang in sod., 2015). Ponavadi so koncentracije ogljikovih hidratov, ki so potrebne za uspešno preprečitev adhezije *in vitro*, visoke zaradi nizke afinitete sladkorjev za bakterijske lektine. Ta afiniteta se lahko močno poveča s kovalentno vezavo hidrofobnega preostanka, kot je fenil- ali metilumbeliferil na sladkorno komponento ali z vezavo številnih kopij sladkorjev na ustrezni nosilec (multivalentni inhibitor adhezinov), kar se je pokazalo za uspešno pri bakterijah *Helicobacter pylori* in *Escherichia coli* (ki imajo fimbrije tipa 1) (Ofek in sod., 2003).

V nekaterih primerih je znana tudi molekulska struktura segmenta receptorja, na katerega se veže bakterijski adhezin. Najbolj znan primer sta tarči dveh adhezinov, fimbrijev tipa 1 in P, ki sta pomembna pri infekcijah urinarnega trakta in sta vključena v kolonizacijo mehurja in

ledvic. Primarna fiziološka receptorja za adhezijo s fimbriji tipa 1 (FimH) v urinarnem traktu sta uroplakin Ia in Ib, dva velika glikoproteina, bogata z manozo, ki se nahajata na urotelialnih celicah na luminalni strani mehurja (Connell in sod., 1996; Min in sod., 2002; Zhou in Sebbel, 2001). Blokiranje interakcije FimH-receptor se lahko doseže s številnimi sladkorji naravnega ali umetnega izvora (Bouckaert in sod., 2005). Takšni inhibitorji onemogočijo ali vsaj zmanjšajo formiranje biofilmov (Pratt in Kolter 1998). S pomočjo sestavin oz. zdravil, ki preprečijo bakterijsko vezavo v urinarnem traktu, bi se lahko letno preprečilo približno 150 milijonov infekcij urinarnega trakta.

2.9.1.2 Analogi adhezina

Strategija uporabe adhezinskih analogov za preprečevanje okužb temelji na predpostavki, da se posamezna molekula adhezina oz. aktivni sintetični oz. rekombinantni fragment veže na receptor in kompetitivno blokira adhezijo bakterij (Ofek in sod., 2003). Uporaba adhezinskih analogov predstavlja dokaj nepraktično metodo zato, ker so adhezini makromolekule, ki niso splošno dosegljive ter tudi zaradi potrebnih visokih koncentracij, da bi bila metoda sploh učinkovita. Poleg tega je potrebno paziti tudi na njihovo toksičnost in imunogenost. Proteomika in rekombinantna biotehnologija sta omogočila razvoj edinstvenih, relativno majhnih peptidov za protiadhezijsko terapijo (Kelly in sod., 1999). V teh študijah je uporabljeni inhibitor sintetični peptid iz 20 aminokislin, ki oponaša zaporedje površinskega adhezina *Streptococcus mutans*, kar omogoča vezavo te bakterije na zobno površino. *In vitro* je ta peptid uspešno blokiral vezavo streptokokov na imobiliziran receptor iz sline na umetnemu zobu. Dodatek peptida na zob, predhodno obdelanega s klorheksidin glukonatom z namenom zmanjševanja normalne mikrobiote in odstranjevanja *S. mutans*, je značilno upočasnil ponovno kolonizacijo zoba z istimi bakterijami. Čeprav je ta metoda obetavna, je potrebno zgoraj opisane rezultate vseeno interpretirati s previdnostjo, z ozirom na to, da adhezijo *S. mutans* omogočajo tudi drugi adhezini, ki niso povezani z zaporedjem umetno sintetiziranega peptida (Signoretto in sod., 2012).

2.9.1.3 Spreminjanje površin

Adhezija bakterij na inertne abiotske površine predstavlja velik problem v industriji, medicini ter okolju. Zelo zanimiv pristop k temu problemu predstavlja možnost nanosa oz. prekrivanja površin s snovmi, ki preprečujejo adhezijo bakterij in njihovo kolonizacijo. Eden izmed načinov je prekrivanje površin z ribjim mišičnim proteinom α -tropomiozinom. Znanstveniki so namreč odkrili, da prekrivanje površin iz nerjavečega jekla z izvlečkom ribjih mišic, značilno zmanjša bakterijsko adhezijo (Bernbom in sod., 2006). V isti raziskavi so kasneje odkrili, da je za preprečevanje adhezije odgovorna komponenta α -tropomiozin. Možnost njegove uporabe je široka in zajema materiale od stekla, polistirena in plastike vse do nerjavečega jekla (Vejborg in Klemm, 2008). α -tropomiozin je hidrofilni protein z izrazitim negativnim nabojem. Z ozirom, da je površina večine bakterij negativno nabita in

hidrofilna, so skleпали, da površine, prekrte z α -tropomiozinom preprečujejo adhezijo na osnovi fizikalno-kemijskih lastnosti in ne zaradi specifičnosti za bakterijske adhezine.

Študije so pokazale tudi, da so površine, prekrte z α -tropomiozinom, odporne proti formiranju biofilmov. Premaz iz α -tropomiozina je zaradi njegove ne-toksičnosti, nizke cene, dostopnosti ter sposobnosti, da značilno inhibira bakterijsko adhezijo in prepreči nastanek biofilma, zelo privlačen protiadhezijski pristop za abiotske površine. Slednji premaz je lahko zelo uporaben na urinarnih katetrih v medicini ali v industriji na površinah iz nerjavečega jekla, kjer lahko preprečijo bakterijsko adhezijo in kolonizacijo (Klemm in sod., 2010).

2.9.1.4 Preprečitev sinteze adhezinov

Biosinteza fimbrijev je kompleksen proces, ki vključuje združevanje velikih heteropolimernih organelov na zunanji membrani bakterijske celice (Klemm in sod., 2010). Zanimiv način preprečevanja adhezije je prekinitev biosinteze fimbrijev. Motena sinteza P in fimbrijev tipa 1 se lahko doseže po kemijski poti na nivoju združevanja strukturnih podenot, ki sestavljajo organel (Pinkner in sod., 2006). *In vitro* poskusi na urotelialnih celicah mehurja so pokazali, da družina bicikličnih 2-piridonov (znanih pod imenom pilicidi) kar za 90 % zmanjša vezavo različnih sevov *E. coli* in posledično tvorbo biofilma prav z zaviranjem biosinteze fimbrijev P in tip 1 nujno potrebnih za vezavo na površino gostiteljskih celic (Larsson in sod., 2005; Pinkner in sod., 2006).

2.9.1.5 Interferenca s kovinami

Kationi kovin so izjemno pomembni za rast bakterij, adhezijo in formiranje biofilmov (Hancock in sod., 2008). Zato ne preseneča, da so za preprečevanje bakterijske adhezije in formiranje biofilmov zanimivi kelatorji kovin, kot so na primer EDTA in citrat. Primer je trinatrijev citrat, kelator z visoko afiniteto za kovine, ki so ga uporabili v katetrih za hemodializo in s tem učinkovito preprečili adhezijo mikroorganizmov (Bosma in sod., 2010). Celo razpad biofilma *Pseudomonas aeruginosa* se lahko inducira s kelatorji železovih ionov (Banin in sod., 2006).

Natančen mehanizem preprečevanja adhezije in kasnejšega formiranja biofilmov s pomočjo kelatorjev kovinskih ionov ni znan. Pri *E. coli* je znano, da so železovi ioni nujni za učinkovito formiranje biofilmov *in vitro* (Hancock in sod., 2008). Železovi ioni pri *E. coli* regulirajo izražanje fimbrij tipa 1 (Wu in Outten, 2009). Premazi s snovmi, ki vsebujejo cink in v kombinaciji s še drugimi inhibitorji adhezije, bi lahko bili uporabni za preprečitev bakterijske adhezije na urinarnih katetrih, s tem bi lahko posledično zmanjšali tudi pogostost infekcij urinarnega trakta (Klemm in sod., 2010).

2.9.1.6 Prehranski inhibitorji adhezije

Zanimivo je, da so najbolj učinkovite dosedaj znane protiadhezijske snovi prisotne v hrani. Živila vsebujejo mešanico inhibitorjev ali le enega inhibitorja s širokim spektrom delovanja. Čeprav je možno najti ustrezen inhibitor za določen patogen, najverjetneje ne bo mogoče oblikovati prehrane, ki bi vsebovala komplementarne inhibitorje adhezinov posameznih patogenov ali celo cele skupine patogenov. V zadnjih letih so številne študije pokazale, da imajo določene sestavine živil pozitiven vpliv na preprečevanje bakterijskih okužb. Slednje predstavljajo dobre kandidate za protiadhezijske študije. Pri tem pa je potrebna previdnost, saj imajo določene sestavine živil baktericidno/bakteriostatično delovanje. Poleg tega določene snovi, kot so npr. lektini, adhezijo celo pospešijo (Lane in sod., 2010).

Humano mleko in snovi rastlinskega izvora so primeri spreminjanja aktivnosti adhezinov s snovmi, ki so naravno prisotne v hrani. Kako pomembno je materino mleko pri preprečevanju bakterijskih okužb novorojenčkov in dojenčkov v prvem letu življenja, je že dolgo znano. Ta bioaktivna tekočina je bogata z oligosaharidi in podobnimi snovmi, na katere se bakterije vežejo. Sestava oligosaharidov v humanem mleku je zelo kompleksna, njihova velikost varira od treh do osmih enot sladkorja, čeprav so visoko kompleksni oligosaharidi lahko sestavljeni iz celo 32 sladkorjev (Stahl in sod., 1994). Znanstveniki so ocenili, da je v humanem mleku prisotno tudi do 900 različnih struktur, glede na vse možne kombinacije monosaharidov ter možnih vezav med njimi. Monomeri oligosaharidov v mleku so D-glukoza, D-galaktoza, N-acetilglukozamin, L-fukoza in sialična kislina. Številne kohortne klinične raziskave so potrdile povezavo med relativno količino oligosaharidov v materinem mleku in zaščito dojenih otrok pred drisko, vse do dveh let po porodu (Lane in sod., 2010).

Za *C. jejuni* je znano, da je *in vitro* sposoben vezave s številnimi strukturami ogljikovih hidratov, kot so na primer manoza, fukoza, galaktoza in glikani z N-acetilneuraminično kislino (Day in sod., 2009). Z ozirom, da ni sposoben fermentirati ogljikovih hidratov, so najverjetneje interakcije z ogljikovimi hidrati povezane z njegovo adhezijo in invazijo, kar je privedlo do velikega entuziazma pri iskanju različnih struktur ogljikovih hidratov z namenom preprečevanja okužb s *C. jejuni*. Leta 2009 so Day in sod. predlagali možen model pripenjanja *C. jejuni* na gostiteljsko celico, kjer se *C. jejuni* v fazi prilagajanja na okolje gostitelja najprej veže na proteine, ki vsebujejo manozo ali sialično kislino. Temu sledi izražanje adhezinov, ki se komplementarno vežejo na fukoza in galaktozo, kar privede do porasta virulence tega patogena (Lane in sod., 2010). V eni od študij so dokazali, da fukozilirani oligosaharidi v mleku uspešno preprečijo okužbo s *C. jejuni* pri miškah (Ruiz-Palacios in sod., 2003).

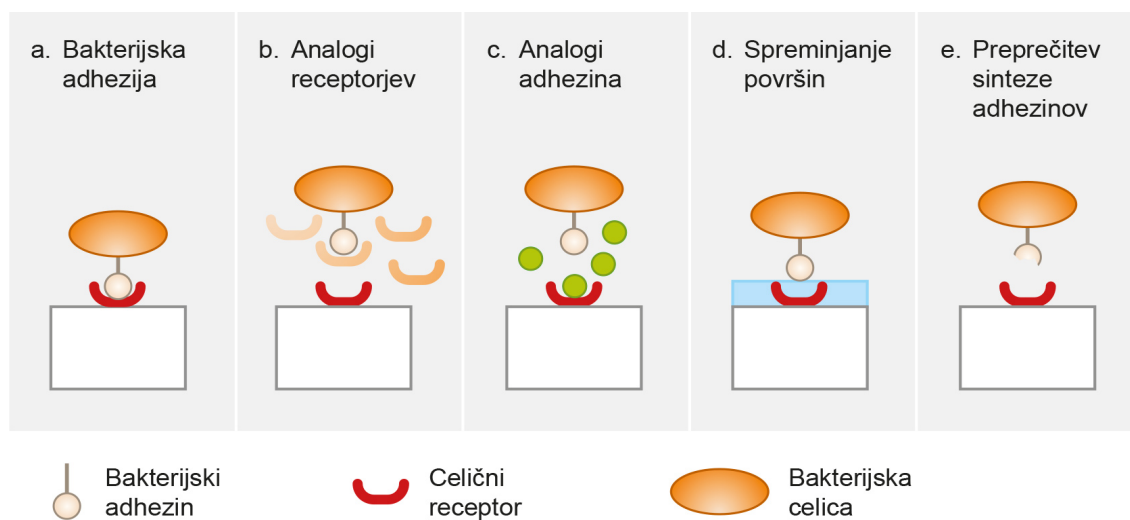
Ne samo oligosaharidi, tudi številne druge snovi, prisotne v humanem mleku, se vežejo na patogene bakterije in na ta način preprečijo njihovo adhezijo. Glikoprotein in laktoferin so snovi, ki so prisotne v mleku, inhibirajo adhezijo bakterij *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* in *P. nigriscens* na monosloj fibroblastov *in vitro* (Alugupalli in Kalfas, 1997). V drugi študiji so pokazali, da laktoferin prepreči vezavo *E. coli* na eritrocite in celice HeLa (Giugliano in sod., 1995).

Membrana maščobnih kapljic v mleku vsebuje različne glikokonjugate, ki so specifični za bakterijske adhezine. Lipidi kolostruma inhibirajo adhezijo *Helicobacter pylori* in *H. mustelae* na imobilizirane glikolipide. β -laktoglobulin se veže na *L. monocytogenes* (al-Makhlac in sod., 1994). Poleg omenjenih snovi humano mleko vsebuje tudi protimikrobne snovi, kot so lizocim, laktoperoksidazo in imunoglobuline (Newman, 1995).

Zaradi svoje dostopnosti predstavljajo rastline s protiadhezijskimi lastnostmi idealne kandidate za protimikrobne snovi. Čeprav so rastlinski lektini zelo zastopani v človeški prehrani in so številni med njimi opisani, je njihova uporaba v protiadhezijski terapiji zaenkrat še omejena (Cowan, 1999). Lektini naj bi vzajemno delovali s sladkorji na površini živalske celice in na ta način preprečili adhezijo bakterij ter pospešili izločanje bakterij iz gostitelja (Slifkin in Doyle, 1990). Po drugi strani imajo lektini, prisotni v hrani, tudi številne škodljive učinke. Lahko namreč delujejo kot receptorji za bakterijske glikane, kar celo izboljša adhezijo bakterij na tkiva.

Med rastlinskimi izvlečki so bili v smislu protiadhezijske aktivnosti najbolj proučevani izvlečki pridobljeni iz brusnic. Dve komponenti iz brusnic delujeta protiadhezijsko, in sicer, visokomolekularna komponenta (>15 kDa) ter protoantocianin. Visokomolekularna komponenta ne vsebuje proteinov ali ogljikovih hidratov in se obnaša podobno kot tanin (Ofek in sod., 1991; Ofek in sod., 1996). Pokazalo se je, da inhibira adhezijo uropatogene *E. coli* na evkariontsko celico, vendar ne deluje na adhezine enterotoksigene *E. coli* (Ofek in sod., 1991). Med živila, ki so najbolj proučevana zaradi svojih protiadhezijskih lastnosti, sodijo še: čaj (zeleni, črni in oolong), kava, ječmenova kava, vino in grozdje, gobe shiitake, med itd. (Signoretto in sod., 2012).

Vedno več znanstvenih raziskav *in vitro* potrjuje protimikrobno delovanje različnih snovi, ki so naravno prisotne v vsakdanji prehrani človeka. Terapevtska in profilaktična vrednost teh snovi je pogosto povezana s preprečevanjem bakterijske adhezije na celičnem nivoju.

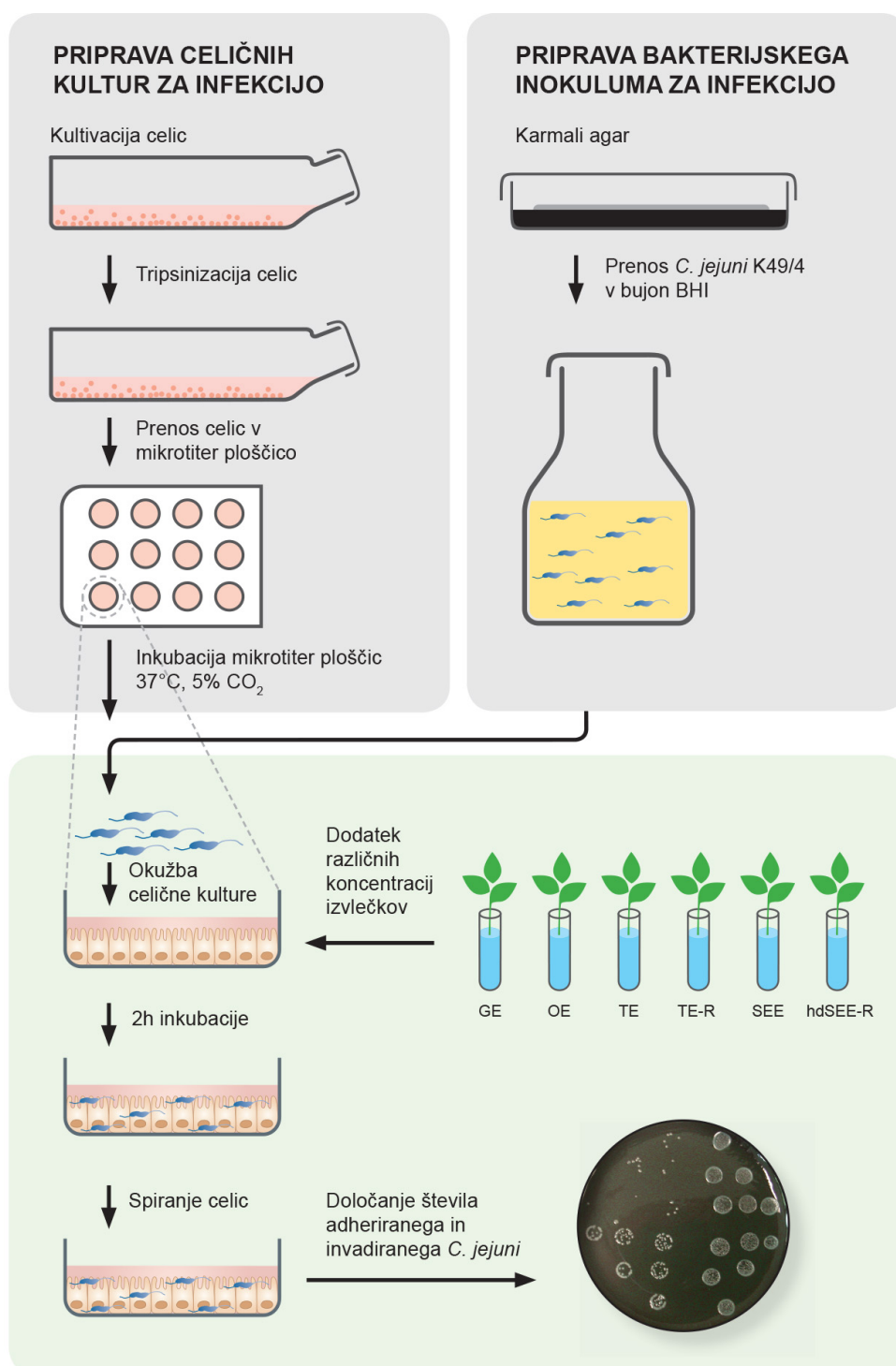


Slika 6: Različne strategije preprečevanja bakterijske adhezije. Bakterijska adhezija (a). Uporaba analogov receptorjev (b). Uporaba analogov adhezina (c). Spreminjanje oz. "maskiranje" površine (d). Preprečitev sinteze adhezinov (e) (Signoretto in sod., 2012).

Figure 6: Different strategies to inhibit bacterial adhesion. Bacterial adhesion (a). Use of receptor analogues that bind bacterial adhesins (b). Use of adhesin analogues that bind the receptor of the targeted substrate (c). Coating of the targeted substrate or surface (d). Inhibition of adhesin biosynthesis (e) (Signoretto et al., 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 7: Shema poskusa protiadhezijske učinkovitosti izbranih rastlinskih izvlečkov.

Figure 7: Sheme of anti-adhesion ability of selected plant extracts.

3.2 MATERIALI

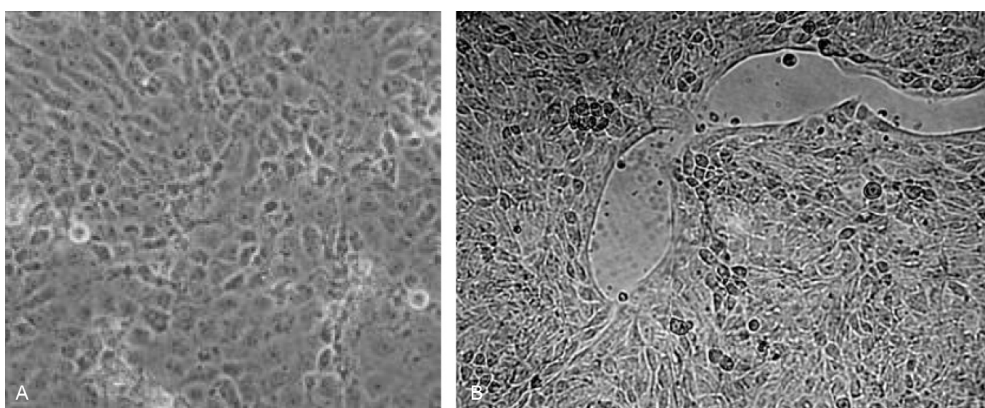
3.2.1 Bakterijski sev in kultivacija

Glavni delovni mikroorganizem, ki smo ga uporabili pri poskusih, je bil bakterijski izolat iz piščančjega mesa *C. jejuni* K49/4. Identificiran je s klasičnimi in molekularnimi metodami ter trajno shranjen v zbirki Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniške fakultete, Ljubljana (Zorman in Smole Možina, 2002). Bakterije smo gojili 48 ur v mikroaerofilni atmosferi na selektivnem Karmali agarju (Oxoid). Namnožena kultura je bila trajno shranjena v tekočem gojišču BHI z dodatkom 10 % glicerola (v/v) pri temperaturi -80 °C. Pred vsakim poskusom smo bakterije 48 ur inkubirali na krvnem agarju v anaerobnih loncih s "Campy Pak" vrečko (BD BBL™) za pripravo modificirane atmosfere, pri temperaturi 42 °C. Po 48-urni inkubaciji kulture na krvnem agarju, smo kolonije resuspendirali v plastične lončke z 20 ml bujona BHI in inkubirali v inkubatorju pri temperaturi 42 °C v mikroaerofilnih pogojih (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) 9 h do eksponentne faze rasti.

3.2.2 Celični kulturi PSI in H4

Celice za pripravo uporabljenih celičnih modelov PSI in H4 so bile izolirane v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru. Celični model PSI je bil pridobljen iz epitelih celic tankega črevesa prašičev, H4 iz epitelih celic tankega črevesa 20 tednov starega zarodka.

Celice smo gojili v gojitvenih posodicah volumna 25 cm² (Corning Incorporated, Corning, New York), v definiranem mediju za gojenje celičnih kultur DMEM advanced (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco), ki smo mu dodali sterilno pripravljen serum govejega zarodka (FBS) (Life technologies, Carlsbad, California), v končni koncentraciji 5 % (v/v), 2 mM L-glutamina (Life technologies, Carlsbad, California) ter 0,1 mg/ml streptomicina (Fluka, Buchs, Switzerland) in 10000 µg/ml penicilina (Sigma, Steinheim, Germany). Celice smo gojili v gojitvenih posodicah v inkubatorju za celične kulture pri temperaturi 37 °C v aerobnih razmerah s 5 % CO₂ in zračno vlago. Celični kulturi PSI in H4 se pritrdita na površino in se po njej razmnožujeta, dokler ni dno posodice popolnoma zapolnjeno. Gojišče smo menjali vsake tri dni. Celice smo presajali enkrat tedensko in jih odlepili od podlage z uporabo 0,25 % Trypsina (Sigma) in dodatkom 0,5 mM EDTA.



Slika 8: Celice PSI (a) in H4 (b), posneto z invertnim mikroskopom (100x povečava).

Figure 8: PSI (a) and H4 cells (b) under inverted light microscope (100x magnification).

3.2.3 Mikrobiološka gojišča

3.2.3.1 Trdno gojišče Karmali

- Osnovni medij: *Campylobacter* blood free medium base (CM739, Oxoid)

Sestavine:

- 23,35 g osnovnega medija *Campylobacter* blood free medium base (CM739, Oxoid)
- 500 ml destilirane vode
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (SR0167E, Oxoid)

Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za agar Karmali

Table 4: The composition of *Campylobacter* Agar Base (Karmali)

Sestavine	Količina (g/l)
Hranljivi agar	25,0
Bakteriološki agar	4,0
Kazein hidrolizat	3,0
Natrijev dezoksiholat	1,0
Natrijev piruvat	0,25
Železov sulfat	0,25
Agar	12,0

Priprava:

23,35 g osnovnega medija za trdno gojišče Karmali smo raztopili v 500 ml destilirane vode ter sterilizirali v avtoklavu pri 115 °C, 15 minut. Medij smo ohladili na 47 °C ter mu dodali 1 stekleničko dodatka za selektivnost (SR0167E, Oxoid) raztopljeno v 5 ml sterilne destilirane vode. Gojišče smo dobro premešali in ga razlili v sterilne petrijevke. Ohlajenega smo hranili do uporabe pri temperaturi 4 °C.

3.2.3.2 Bujon BHI

Osnovni medij: Bujon iz izvlečkov telečjih možganov in govejega srca (angl. Brain Heart Infusion) (Oxoid, CM225)

Preglednica 5: Sestava bujona BHI

Table 5: The composition of BHI (Brain-heart infusion) broth

Sestavine	Količina (g/l)
Izvleček telečjih možganov	200
Izvleček govejega srca	250
Pepton kompleks	10
Bacto dekstroza	2
Natrijev klorid	5
Natrijev fosfat	2,5

Zatehtali smo 39 g osnovnega medija za BHI bujon in ga raztopili v 1000 ml destilirane vode ter sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri temperaturi 121 °C.

3.2.3.3 Gojišče za rast in gojenje celičnih kultur DMEM advanced

Gojišče DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium advanced, Gibco) je predpripravljen, definiran medij za gojenje celičnih kultur. Gojišče vsebuje vitamine, aminokisljine, anorganske soli in pH indikator, je brez antibiotikov, seruma in L-glutamina, zato smo ga pred prvo uporabo dopolnili.

Preglednica 6: Sestava medija za gojenje celičnih kultur, DMEM advanced (Gibco)

Table 6: The composition of Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) basal medium for growth of mammalian cell culture (Gibco)

Sestavine	Količina (g/l)
D-glukoza	4,50
Natrijev piruvat	0,11
Neesencialne aminokisljine	+
L-glutamin	-

Za pripravo ustreznega gojitvenega medija (DMEM Advanced) smo gojišču DMEM dodali 100 UI/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomcina, 2 mM L-glutamina in 5 % (v/v) seruma FBS.

3.2.4 Uporabljene raztopine, reagenti in laboratorijska oprema

3.2.4.1 Raztopine in reagenti

- FBS, serum govejega zarodka - (Life technologies, Carlsbad, California)
- Glicerol ($C_3H_8O_3$) –(Kemika) redestiliran, pro analysi
- 0,25 % tripsin-EDTA (Sigma T - 4049)
- Raztopina gentamicina – (Garmycin KRKA – raztopina za injiciranje 80 mg / 2 ml)
- DMSO – Dimetil sulfoksid (Sigma), C_2H_6SO
- Dulbecco's minimalni esencialni medij (DMEM) (Gibco, London, UK)
- L-glutamin (Life technologies, Carlsbad, California)
- Raztopina streptomcina (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Raztopina penicilina (Sigma, Steinheim, Germany)
- 70 % (v/v) etanol (Fluka, Buchs, Switzerland)
- 0,1 % (w/v) kristal vijolično barvilo v 20 % (v/v) etanolu (Fluka, Buchs, Switzerland)
- 10 % očetna kislina
- 0,1 % Tripansko modro barvilo (Merck, ZDA)
- MTT (3-(4,-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolijev bromid) (Sigma, Steinheim, Germany)
- Fiziološka raztopina

3.2.4.2 Laboratorijska oprema

- splošni mikrobiološki material: petrijeve plošče, cepilne zanke, avtomatske pipete, 1000 µl in 100 µl nastavki za pipete, 1 l merilni valji, erlenmajerice, Demetrijeve steklenice, epruvete, centrifugirke, centrifugirke za centrifugo (322A, Centric), plastični lončki, filtri, steklene pipete (10 ml, 20 ml in 50 ml), multikanalna pipeta (Thermo), steklena palčka za razmazovanje,...
- zaščitna mikrobiološka komora SMBC 122AV (Iskra PIO, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Slovenija)
- tehtnica Exacta 1200EB (Tehtnica, Slovenija)
- avtomatske pipete (Finnpipete, Thermo scientific)
- inkubator (Kambič SP190, Slovenija)
- CO₂ inkubator (type 70 000, Integra Biosciences)
- čitalec mikrotitrne ploščice (Labsystems Multiscan MS)
- zmrzovalna omara (- 80 °C, Heto Ultra Freeze)
- hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- vodna kopel (Inko, Zagreb)
- digitalni fotoaparati (Coolpix, 995, Nikon)
- spektrofotometer (Cecil, CE 2021)
- anaerobni lonci (Anaerobar 2,5 l, Oxoid Ago 25A)
- centrifuga CENTRIC 3000 R (Tehtnica)
- injekcijske brizgalke (BD DiscarditTM, 10 ml, 5 ml)
- mikroskop za opazovanje celičnih kultur (Olympus CH-BI45-2, Japan)
- mikroaerofilne vrečke GENbox microaer (BIOMERIEUX)

3.2.5 Rastlinski izvlečki

3.2.5.1 Izvleček posušenih tropin po stiskanju grozdja sorte Modri pinot (GE)

V raziskavi smo uporabili izvleček posušenih tropin po stiskanju grozdja sorte Modri pinot, ki so ga pripravili v okviru bilateralnega projekta med Slovenijo in Hrvaško (Katalinić in sod., 2013). Izvleček so pripravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Splitu z uporabo ekstrakcije (tekoče-tekoče) z 80 % alkoholom (etanolom).

3.2.5.2 Izvleček oljčnih listov (OE)

Posušene oljčne liste smo zmleli in zmešali s 70 % alkoholom (etanolom) ter pustili 24 h, da je potekla ekstrakcija pri sobni temperaturi (25 °C). Nato smo dodatno ekstrahirali s heksanom, da smo odstranili voske, ki so naravno prisotni v listih ter vzorec filtrirali in evaporirali preostalo ekstrakcijsko topilo z N₂ pri temperaturi 40 °C in znižanem pritisku. Izkoristek za izvleček oljčnih listov je znašal 14,6 %.

3.2.5.3 Izvleček timijana (TE in TE-R)

Posušeni in zmleti timijan smo zmešali s 96 % alkoholom (etanolom). Ekstrakcija je potekala ob konstantnem mešanju pri sobni temperaturi 24 ur. Po ekstrakciji smo zmes filtrirali in pustili, da je ekstrakcijsko topilo evaporiralo pod znižanim pritiskom pri temperaturi 40 °C. Preostalo topilo smo odstranili z N₂. Na ta način smo pridobili etanolni izvleček timijana. Izkoristek je znašal 8,92 %. Etanolni izvleček (10 g) smo nato 2 h hidrodestilirali v aparaturi po Clevengeru in pridobili eterično olje. Odpadni material od hidrodestilacije smo filtrirali in nato liofilizirali. Slednjega smo uporabili v študiji skupaj z etanolnim izvlečkom timijana.

3.2.5.4 Izvleček semen *Alpinia katsumadai* (SEE in hdSEE-R)

400 g posušenih semen *A. katsumadai* (Plantasia; Cat. No. 680381, Oberndorf, Austria) smo zmleli in zmešali s 96 % alkoholom (etanolom). Ekstrakcija je potekala pri sobni temperaturi 24 ur. Po ekstrakciji smo zmes filtrirali in pustili, da je ekstrakcijsko topilo evaporiralo pod znižanim pritiskom pri temperaturi 40 °C. Izkoristek je znašal 7,5 %. Etanolni izvleček (9 g) smo nato hidrodestilirali v aparaturi po Clevengeru in na ta način dobili eterično olje. Odpadni material od hidrodestilacije smo filtrirali in nato liofilizirali. Slednjega smo uporabili v študiji skupaj s etanolnim izvlečkom semen *Alpinia katsumadai*.

3.2.5.5 Priprava izvlečkov za raziskavo

Ker so bili vsi izvlečki in preostanki po hidrodestilaciji slabše topni v mediju za gojenje celičnih kultur in etanolu, smo pripravili založno raztopino posamezne učinkovine v dimetil sulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Vse vzorce smo raztopili v enakem volumnu DMSO, tako da so bile njihove koncentracije oz. razmerja med rastlinskim materialom in topilom enake (1g/10ml). Na vrtničnem mešalu smo vzorce mešali tako dolgo, da so se popolnoma raztopili. Iz te osnovne raztopine smo pred vsakim poizkusom pripravili ustrezne razredčitve v gojišču DMEM oz. BHI.

3.3 METODE

3.3.1 Revitalizacija bakterij *C. jejuni* K49/4

Bakterije *C. jejuni* K49/4, shranjene pri temperaturi -80 °C v bujonu BHI (Brain Heart Infusion) z dodatkom 10 % (v/v) glicerola, smo s cepilno zanko aseptično razmazali na petrijevke s selektivnim Karmali agarjem. Plošče smo mikroaerofilno (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) inkubirali v anaerobnih loncih 48 h pri temperaturi 42 °C.

3.3.2 Mikroaerofilno gojenje *C. jejuni* K49/4 do eksponentne faze rasti

Po 48-urni inkubaciji kulture na selektivnem krvnem agarju smo kolonije resuspendirali v plastične lončke s 50 ml bujona BHI. Vsebino lončkov smo premešali na vrtinčniku in jih 9 h mikroaerofilno (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) inkubirali v inkubatorju pri temperaturi 42 °C do eksponentne faze rasti.

3.3.3 Priprava inokuluma

Po inkubaciji v bujonu BHI smo pred vsakim poskusom določali gostoto celic spektrofotometrično, z merjenjem absorbance pri valovni dolžini $\lambda = 660$ nm. Na ta način smo pridobili standardizirano osnovno kulturo. Nato smo kulturo centrifugirali 10 minut (3000 x g, 20 °C) in usedlino resuspendirali v gojišču DMEM brez dodanih antibiotikov. V tem času je bila koncentracija bakterij približno $2-3 \times 10^8$ CFU/ml. To založno suspenzijo smo uporabljali za izračun volumnov, ki so bili potrebni za pripravo ustrezne koncentracije bakterij za poskus.

Za potrditev gostote celic v osnovni kulturi smo vzporedno z merjenjem absorbance pripravili decimalne razredčitve kulture in nacepili po 10 μ l dobro premešanega vzorca na plošče s selektivnim agarjem Karmali. Plošče smo inkubirali 48 h pri temperaturi 42 °C v mikroaerofilnih pogojih. Po končani inkubaciji smo s štetjem kolonij, zraslih na agarskih ploščah, določili koncentracijo bakterij v osnovni kulturi. Inokulum za okužbo celic PSI in H4 je vseboval približno 10^8 CFU/ml.



Slika 9: Kolonije *C. jejuni* K49/4 na selektivnem agarju Karmali, po 48-urni inkubaciji.

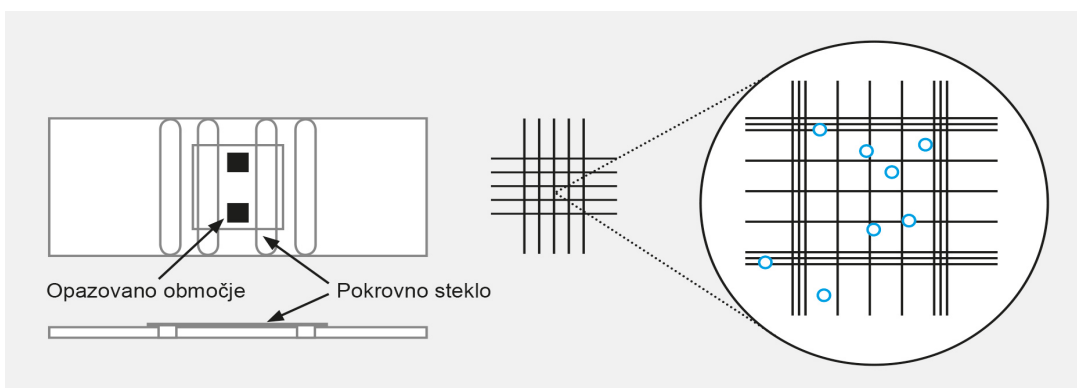
Figure 9: *C. jejuni* K49/4 colonies on Karmali agar after 48h of incubation.

3.3.4 Priprava celičnih kultur za poskuse

Celice smo presajali 1-krat tedensko. Iz petrijevk smo odlili staro gojišče in sprali celice z 1 ml Tripsin-EDTA (0,25 %). Ponovno smo celice prekrili z raztopino Tripsin-EDTA in petrijevke postavili nazaj v inkubator (na temperaturo 37 °C) za 10 minut. Celice smo nato resuspendirali v gojišču DMEM, kvantitativno prenesli vsebino petrijevke v centrifugo in centrifugirali 5 minut pri 800 obratih. Supernatant smo zavrgli, da bi sedimentu dodali 10 ml osnovnega gojišča DMEM, v katerem smo dobro resuspendirali celice. V pripravljeno suspenzijo celic smo določali njihovo število: 25 µl suspenzije smo dobro premešali z 200 µl barvila Türk. 100 µl mešanice smo prenesli na hemocitometer po Bürker-Türku ter pod mikroskopom prešteli celice.

Število celic/ml suspenzije smo izračunali po formuli:

$$\text{Število prešteti celic} \times 90 \cdot 10^3 \quad \dots (1)$$



Slika 10: Shematski prikaz štetja celic s hemocitometrom (Doyle in Griffiths, 1999).

Figure 10: Schematic presentation for counting the cells with hemocytometer (Doyle and Griffiths, 1999).

V vsakem poskusu je bilo končno število celic v posameznem vodnjaku na mikrotitrski ploščici (s 96 vodnjaki) približno 5×10^5 celic v ml suspenzije. V vsak vodnjak mikrotitrške ploščice smo odpipetirali po 100 µl suspenzije celične kulture v DMEM brez antibiotikov (ki bi lahko ovirali poskus z bakterijami). Ploščice smo inkubirali 24 h v inkubatorju pri temperaturi 37 °C ter 5 % CO₂. Po 24 urah smo pred poskusom pod mikroskopom preverili, če so celice ustvarile lep monosloj ter odstranili medij pred nanosom inokuluma *C. jejuni* K49/4 in rastlinskih izvlečkov.

3.3.5 Protimikrobno delovanje izvlečkov na *C. jejuni* K49/4

Pri poskusih moramo vedno paziti, da uporabimo takšne koncentracije izbranih izvlečkov, ki niso ne citotoksične in ne baktericidne. Protimikrobno delovanje izvlečkov smo preverili spektrofotometrično, z merjenjem absorbance pri 595 nm. V mikrotitrskih ploščicah s 96 vodnjaki smo istočasno inkubirali bakterijsko suspenzijo *C. jejuni* K49/4 in izvlečke, ki smo jih predhodno pripravili v bujonu BHI. Koncentracija bakterij pri preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov je bila približno 5×10^5 CFU/ml. Uporabljena koncentracija izvlečkov je bila enaka kot pri določanju citotoksičnosti le-teh (v razponu od 0,02 mg/ml do 10 mg/ml). Mikrotitrskе ploščice smo nato inkubirali v mikroaerofilnih pogojih 24 h pri temperaturi 42 °C. Kontrolni vzorec je predstavljala bakterijska suspenzija *C. jejuni* K49/4 v bujonu BHI brez dodatka izvlečkov. Dodatno kontrolo z DMSO je predstavljala bakterijska suspenzija *C. jejuni* K49/4 v bujonu BHI brez dodatka izvlečkov v koncentracijskem razponu DMSO od 0,02 mg/ml do 10 mg/ml. Protimikrobno aktivnost izvlečkov smo določili z merjenjem absorbance pri 595 nm v določenih časovnih presledkih, z nacepljanjem razredčenih alikvotov bakterijskih suspenzij na selektivni agar Karmali (Oxoid) ter s štetjem zraslih kolonij po 48 urni inkubaciji v mikroaerofilnih pogojih pri temperaturi 42 °C. Poskus smo ponovili najmanj 4 – krat.



Slika 11: Mikrotitrskа ploščica s 96 vodnjaki

Figure 11: Microtiter plate with 96 wells

3.3.6 Citotoksičnost izbranih izvlečkov za celice PSI in H4

Razvitih je veliko testov oz. metod za določanje citotoksičnosti in ker so poceni, se jih da enostavno ovrednotiti in so dobro ponovljivi. Izraz citotoksičnost ali celično preživetje se uporablja za kvantifikacijo in karakterizacijo celične viabilnosti oz. živosti. S določanjem citotoksičnosti proučujemo direkten toksični učinek različnih substanc (zdravil, dodatkov hrani, pesticidov itd.) na celico v kulturi. Določanje citotoksičnosti pred preverjanjem protiadhezijske učinkovitosti izbranih izvlečkov je bilo nujno, saj bi morebitna

citotoksičnost izvlečkov dala lažno pozitivne rezultate. Citotoksičnost po izpostavitvi celic različnim koncentracijam izvlečkov smo testirali na celicah PSI in H4 z dvema metodama, in sicer z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega in s testom MTT, kjer smo merili metabolno aktivnost živih celic.

3.3.6.1 Določanje citotoksičnosti z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega

Kristal vijolično (KV) je triarilmetansko barvilo, ki je osnovno barvilo za barvanje bakterijskih celic po Gramu. Gillies in sod. (1986) so uporabljali KV za določanje števila celic v monoslojnih celičnih kulturah kot funkcijo absorbance barvila, ki so ga celice prevzele (Gillies in sod., 1986). Barvanje s kristal vijoličnim je hitra in preprosta, občutljiva, dobro ponovljiva in zanesljiva kvantitativna metoda preverjanja citotoksičnosti (Castro-Garza in sod., 2007; Saotome in sod., 1989). Ta metoda je ob modifikacijah zelo uporabna za številne namene, večinoma za citotoksičnost ali določanje celične smrti zaradi uporabe različnih spojin, zdravil ali bakterijskih toksinov ter za določanje celične viabilnosti ali celične proliferacije pod različnimi pogoji (Castro-Garza in sod., 2007). Slabost te metode je, da se v nekaterih primerih, zaradi nespecifičnega barvanja, vse celice štejejo kot žive, vključno z mrtvimi (Saotome in sod., 1989).

Citotoksičnost izbranih izvlečkov smo preverili z uporabo 0,1 % kristal vijoličnega v 20 % etanolu (Saotome in sod., 1989). Celični liniji PSI in H4 smo vzgajali v mikrotitrski ploščici s 96 vodnjaki (2×10^5 CFU/ml) v osnovnem gojišču DMEM z dodatkom 100 IU/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomocina, 2 mmol/l L-glutamina in 5 % fetalnega govejega seruma (FBS). Celice smo gojili v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Ko so se celice razrasle v konfluentni monosloj, smo zavrgli gojitveni medij, celice dvakrat sprali s pufrom PBS, da smo odstranili sledi gojitvenega medija z antibiotiki, ter dodali 100 µl rastlinskih izvlečkov pripravljenih v gojišču DMEM z maksimalno želeno koncentracijo. Nato smo naredili serijo razredčitev, od najvišje koncentracije vsakega izvlečka do najnižje, od zgoraj navzdol po mikrotitrski ploščici. Negativno kontrolo so predstavljali vodnjaki s celicami brez dodanih izvlečkov, pozitivno kontrolo pa DMSO v mediju za celice (10 % končna koncentracija). Naredili smo tudi dodatno kontrolo DMSO v najvišji koncentraciji 2,5 % ter s tem dokazali, da DMSO ni toksičen za celice. Celice smo nato 24 h inkubirali v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Po končani 24-urni inkubaciji smo medij zavrgli in dodali 100 µl 0,1 % kristal vijoličnega v 2 % etanolu na vodnjak. Kristal vijolično barvilo služi obarvanju preživelih celic po končanem poskusu preverjanja citotoksičnosti izvlečkov. Po 5-minutni inkubaciji smo izprali kristal vijolično in čez noč posušili mikrotitrsko ploščico na sobni temperaturi. Po sušenju smo dodali 100 µl 10 % očetne kisline (Sigma) na vodnjak, ploščice postavili na horizontalni stresalnik za 60 min, ter s spektrofotometrom Varioskan Flash (Thermo Scientific) izmerili absorbance pri 595 nm. Izmerjene absorbance smo primerjali z absorbance celic, ki jih nismo inkubirali z rastlinskimi izvlečki in so nam služile kot kontrola. Poskus smo ponovili 10 – krat. Višja izmerjena absorbance pomeni, da je več celic preživelu saj je preživelost premosorazmerna z intenziteto barve. Manjša vrednost absorbance pomeni večji razpad celičnega monosloja in govorimo

lahko o večji toksičnosti izvlečka. Glede na kontrolo (100% preživelost) smo nato preračunali preživelost celic po dodatku posameznega izvlečka.

3.3.6.2 Določanje presnovne aktivnosti celic, izpostavljenih izvlečkom

Viabilnost celične kulture lahko določamo z merjenjem metabolnih komponent, ki so potrebne za rast. Osnova temelji na dejstvu, da se po poškodbi celice prekinejo poti, potrebne za metabolizem in rast. Z meritvami lahko ugotovljamo aktivnost encimov, ki so vključeni v tvorbo ATP. Med njimi so tudi mitohondrijske dehidrogenaze. Mitohondrijsko aktivnost celic, inkubiranih z izvlečki, smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) in temelji na uporabi raztopine MTT (5 mg/ml v pufri PBS) [MTT= (3-(4,-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolijev bromid)]. Pri MTT-testu metil tetrazolijev bromid služi kot akceptor vodika in dehidrogenaze v živih celicah ga pretvorijo v netopen formazan. Količino tega merimo spektrofotometrično pri 565 nm. Prednost testa je, da merimo aktivnost delečih se celic, poleg tega pa omogoča analizo velikega števila vzorcev, saj uporabljamo večkanalni spektrofotometer za plošče s 96 vodnjaki. Količina nastalega netopnega formazana je direktno proporcionalna številu živih celic pri mnogih celičnih linijah (Batista, 2005).

Celični liniji PSI in H4 (2×10^5 CFU/ml) smo vzgojili v mikrotitrski ploščici s 96 vodnjaki v gojišču DMEM z dodatkom 100 IU/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomcina, 2 mmol/l L-glutamina in 5 % fetalnega govejega seruma (FBS). Celice smo gojili v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Ko so se celice razrasle v konfluentni monosloj, smo zavrgli gojitveni medij, celice dvakrat sprali s pufrom PBS in jim dodali 100 µl rastlinskih izvlečkov pripravljenih v gojišču DMEM do zelene maksimalne koncentracije. Nato smo naredili serijo razredčitev, od najvišje koncentracije vsakega izvlečka do najnižje, od zgoraj navzdol po mikrotitrski ploščici. Negativno kontrolo so predstavljali vodnjaki s celicami brez dodanih izvlečkov, pozitivno pa DMSO v mediju za celice (10 % končna koncentracija). Naredili smo tudi dodatno kontrolo z DMSO v DMEM v najvišji koncentraciji 2,5 % ter s tem dokazali, da DMSO ni toksičen za celice. Celice smo nato inkubirali 24 h v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Po končani 24-urni inkubaciji smo medij zavrgli, celice sprali s pufrom PBS ter dodali 200 µl gojišča DMEM brez fenol rdečega, brez antibiotikov in brez FBS-a. Nato smo dodali še 20µl raztopine MTT v vsak vodnjak, ploščico postavili na horizontalni stresalnik za 5 min in jo nato inkubirali 5 ur v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Med inkubacijo aktivni encimi tetrazolno barvilo reducirajo v formazansko, ki da vijolično barvo.

Po končani inkubaciji smo zavrgli medij in mikrotitrsko ploščico posušili na zraku čez noč. Po sušenju smo dodali 100 µl 0,04 M HCl v izopropanolu v vsak vodnjak in ploščico prestavili na horizontalni stresalnik za 5 min ter nato še za 20 min na mirno podlago. Po končani inkubaciji smo s spektrofotometrom Varioskan Flash (Thermo Scientific) izmerili absorbanco pri 565 nm. Izmerjene absorbance smo primerjali z absorbanco celic, ki jih nismo inkubirali z izvlečki in so nam služile kot kontrole. Poskus smo vsaj 5 - krat ponovili.

Citotoksičnost smo računali po naslednji enačbi:

$$\text{Citotoksičnost (\%)} = (C - T)/C * 100 \quad \dots(2)$$

kjer je C- absorbanca kontrolnega vzorca in T- absorbanca testnega vzorca oz. vzorca, ki mu je bil dodan izvleček.

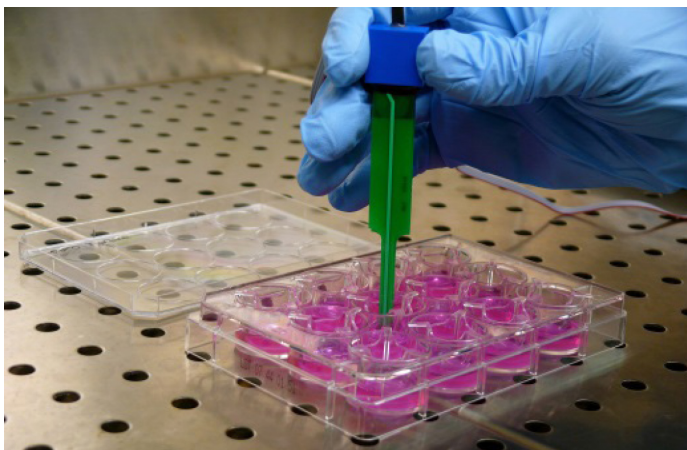
3.4 ADHEZIJA, INVAZIJA IN TRANSLOKACIJA *C. jejuni* K49/4 NA/V PSI EPITELNE CELICE

Za študijo adhezije, invazije in translokacije *C. jejuni* K49/4 skozi epitel smo uporabili tridimenzionalni funkcionalni celični model s celično linijo PSI. Celično linijo PSI smo vzgajali v Transwell ploščici z 12 vodnjaki (Corning Incorporated, Corning, New York) v gojišču DMEM z dodatkom 100 IU/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomocina, 2 mmol/l L-glutamina in 5 % fetalnega govejega seruma (FBS). V zgornjem delu vodnjaka, ki predstavlja apikalni del membrane, je bila v 500 μ l končna koncentracija celic 2×10^5 celic/ml. Spodnji del vodnjaka predstavlja bazolateralni del membrane. Celicam smo zamenjali medij vsak drugi dan. Transwell tehnologija omogoča celicam, ki rastejo na posebni porozni membrani, da vzpostavijo funkcionalne karakteristike epitela, ki jih v monosloju ne morejo vzpostaviti. Celice smo gojili v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂.

Integriteto oz. transepitelno upornost (TEER) celic, ki so rasle na porozni membrani, smo merili s pomočjo aparata Millicell-ERS Volt/Ohm metrom (Millipore, Bedford, MA) in pripadajočim parom elektrod pred dodatkom bakterij ter nato vsak naslednji dan vse do 12 dni po infekciji, ko smo zaključili s poskusom (slika 14). TEER vrednosti celic, ki jim nismo dodali bakterij, so predstavljale kontrolne vrednosti. 30 minut pred vsakim merjenjem smo plošče postavili iz CO₂ inkubatorja (37 °C), da se je temperatura ustalila na sobno temperaturo. Eno elektrodo smo pomočili v gojišče nad membrano s plastjo celic, drugo pa v gojišče pod membrano, ter merili upornost celične plasti oz. razliko v napetosti med apikalno (zgornjo) in bazolateralno (spodnjo) površino celic (slika 12). TEER prazne membrane smo odšteli od TEER plasti celic kot prikazuje enačba (3):

$$R [\Omega/\text{cm}^2] = (R_v - R_f) [\Omega]/P[\text{cm}^2] \quad \dots(3)$$

R je upornost plasti celic, R_v je upornost plasti celic in membrane, R_f je upornost prazne membrane in P je površina membrane.

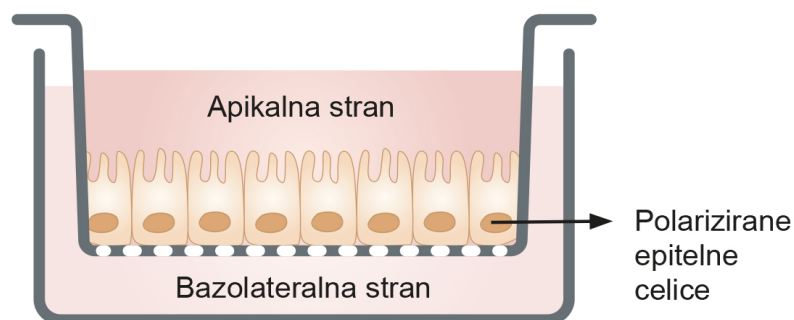


Slika 12: Merjenje transepitelne električne upornosti (TEER) polariziranega 3D modela celic PSI.

Figure 12: Measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) of polarized PSI cell monolayer.

Ko so celice na približno 7. dan razvile funkcionalno polarnost oz. primerno transepitelno električno upornost ($\sim 1600 \Omega$), smo zavrgli gojitveni medij, celice dvakrat sprali s pufrom PBS, da smo odstranili sledi gojitvenega medija z antibiotiki in serumom, ki bi lahko ovirali poskus ter dodali 500 μl suspenzije *C. jejuni* s koncentracijo 10^8 CFU/ml na en vodnjak nad membrano. Celično kulturo smo nato inkubirali 2 h v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Po končani inkubaciji smo trikrat sprali vse vodnjake s pufrom PBS, da smo odstranili neadherirane bakterije. Na mikrotitrne ploščice za določanje števila invadiranih bakterij smo dodali osnovni gojitveni medij DMEM z dodatkom gentamicina (100 $\mu\text{g/ml}$). Na mikrotitrne ploščice za določanje števila adheriranih bakterij smo dodali le osnovni gojitveni medij DMEM brez antibiotika in brez seruma. Ploščice smo še naprej inkubirali do liziranja pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂. V določenih časovnih presledkih smo celice lizirali z 200 μl 0,1 % TRITON-X v pufu PBS. Ta povzroča lizo celic PSI, ne pa lize bakterij. Po končani lizi celic smo nanесли serijske redčitve na selektivni agar Karmali ter smo agarske plošče inkubirali za 48 ur v mikroaerofilnih pogojih pri temperaturi 42 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle bakterijske kolonije.

Da smo lahko določili translokacijo bakterij čez epitelni monosloj, smo medij iz bazalnega dela vodnjaka v časovnih presledkih nacepili na agar Karmali in nato inkubirali 48 ur pod mikroaerofilnimi pogoji in pri temperaturi 42 °C. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah.



Slika 13: Shematski prikaz funkcionalnega (3D) modela črevesja. Celice, ki rastejo na mikroporozni membrani, razvijejo transepitelno upornost (TEER) in potencial (TEP), ki se meri med apikalno in bazolateralno površino celic.

Figure 13: Schematic presentation of the functional (3D) model. Cells growing on a microporous membrane develop transepithelial resistance (TER) and potential (TEP), measured between apical and basolateral compartments.

3.5 INHIBICIJA VEZAVE *C. jejuni* K49/4 NA CELICE PSI IN H4 Z RASTLINSKIMI IZVLEČKI

Za proučevanje inhibicije vezave *C. jejuni* K49/4 na epitel, z rastlinskimi izvlečki, smo uporabili dvodimenzionalni funkcionalni celični model s celično linijo PSI in H4. Obe celični liniji smo vzgojili v mikrotitrski ploščici s 96 vodnjaki (Corning Incorporated, Corning, New York) v osnovnem gojišču DMEM z dodatkom 100 IU/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomocina, 2 mmol/l L-glutamina in 5 % fetalnega govejega seruma (FBS). Celice smo gojili v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Ko so celice dosegle konfluentno rast, smo celice dvakrat sprali s pufrom PBS, da smo odstranili sledi gojitvenega medija z antibiotiki in jim dodali 100 µl suspenzije *C. jejuni* s koncentracijo 2 x 10⁸ CFU/ml ter 100 µl rastlinskih izvlečkov, pripravljenih v ustreznih koncentracijah v DMEM brez dodanega antibiotika. Celice smo nato inkubirali 2 h v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Po končani inkubaciji smo vodnjake trikrat sprali s pufrom PBS, da smo odstranili nevezane bakterije, nato smo v mikrotitrsko ploščico za določanje invadiranih bakterij dodali 100 µl gentamicina v DMEM (100 µg/ml). Inkubirali smo še 1 h v vlažni atmosferi pri temperaturi 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Po končani inkubaciji smo sprali vse vodnjake s pufrom PBS in celice lizirali z 200 µl 0,10 % TRITON-X v pufru PBS. Po končani lizi celic smo nanесли serijske redčitve na selektivni agar Karmali (Oxoid) ter agarne plošče inkubirali za 48 ur pri temperaturi 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Po končani inkubaciji smo prešteli izrasle kolonije in izrazili odstotek vezave glede na kontrolni vzorec. Kot kontrolo smo prav tako uporabili vodnjake s celicami, ki smo jih inkubirali samo z dodatkom 200 µl suspenzije bakterij ter vodnjake z dodatkom bakterij in DMSO v najvišji uporabljeni koncentraciji (2,5 %).

Pri najvišji koncentraciji izvlečkov smo spremljali število adheriranih in invadiranih bakterij v časovnih presledkih do vključno 24 h po dodatku bakterij na celice PSI. V nadaljevanju smo določili tudi minimalne koncentracije, ki še imajo vpliv na preprečevanje adhezije bakterij *C. jejuni* K49/4 na celični monosloj. Preverili smo tudi, kako na adhezijo vpliva predhodna inkubacija epitelnih celic z rastlinskimi izvlečki ter kako vpliva na adhezijo dodatek izvlečkov po predhodni inkubaciji celic z bakterijami.

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično analizo podatkov smo uporabili programski paket Predictive Analytics software (PASW) statistics 202 software, verzija 18,0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Podatke smo primerjali z enosmernim testom za analizo varianc (ANOVA), ki mu je sledil Dunnett-ov test multiplih primerjav. Meja statistične značilnosti je bila pri $p \leq 0,001$.

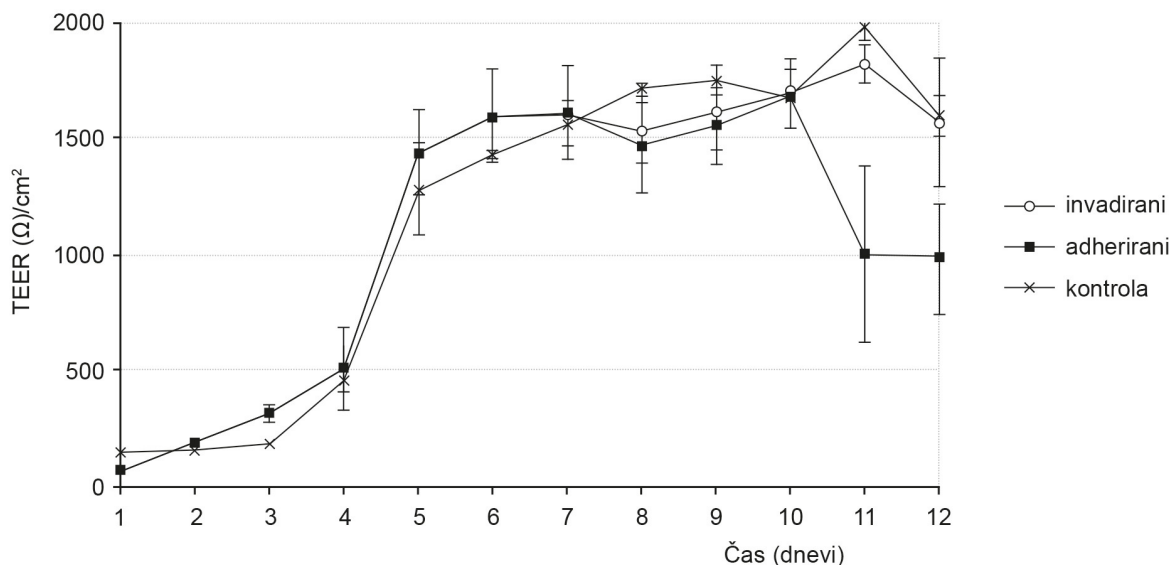
4 REZULTATI

4.1 ADHEZIJA NA 3D CELIČNI MODEL PRAŠIČJIH ENTEROCITOV PSI TER ZNOTRAJCELIČNO PREŽIVETJE IN RAST *C. jejuni* K49/4

Transepitelno električno upornost (TEER) celic, ki so rasle na porozni membrani, smo merili s pomočjo aparata Millicell-ERS Volt/Ohm metrom (Millipore, Bedford, MA). Dobljeno vrednost TEER (Ω/cm^2) smo korigirali za upornost ozadja na ta način, da smo od skupne vrednosti odšteli upornost same mikroporozne prazne membrane z medijem, v katerem smo gojili celice ($10^8 \Omega/\text{cm}^2$). TEER smo merili pred dodatkom bakterij *C. jejuni* K49/4 ter po okužbi celic PSI vse do 12. dne po okužbi, ko smo ploščice zavrgli. Celice so na poroznih filterih rasle počasneje kot v stekleničkah.

Ko smo približno na 7. dan izmerili največjo vrednost TEER kar pomeni, da so celice razvile funkcionalno polarnost ($\sim 1600 \Omega$) smo celicam dodali bakterije *C. jejuni* K49/4. Celično kulturo smo nato inkubirali 2 h ter po končani inkubaciji sprali vodnjake s pufrom PBS, da smo odstranili neadherirane bakterije. Na mikrotitrne ploščice za določanje števila invadiranih bakterij smo dodali osnovni gojitveni medij DMEM z dodatkom gentamicina. Na mikrotitrne ploščice za določanje števila adheriranih bakterij smo dodali le osnovni gojitveni medij DMEM brez antibiotika in brez seruma. Ploščice smo še naprej inkubirali do liziranja celic (3 h, 5 h, 10 h, 15 h in 24 h od dodatka bakterijskega inokuluma na apikalno stran polariziranega celičnega modela PSI) pri temperaturi 37°C in 5 % CO_2 kot je opisano pod točko 3.4.

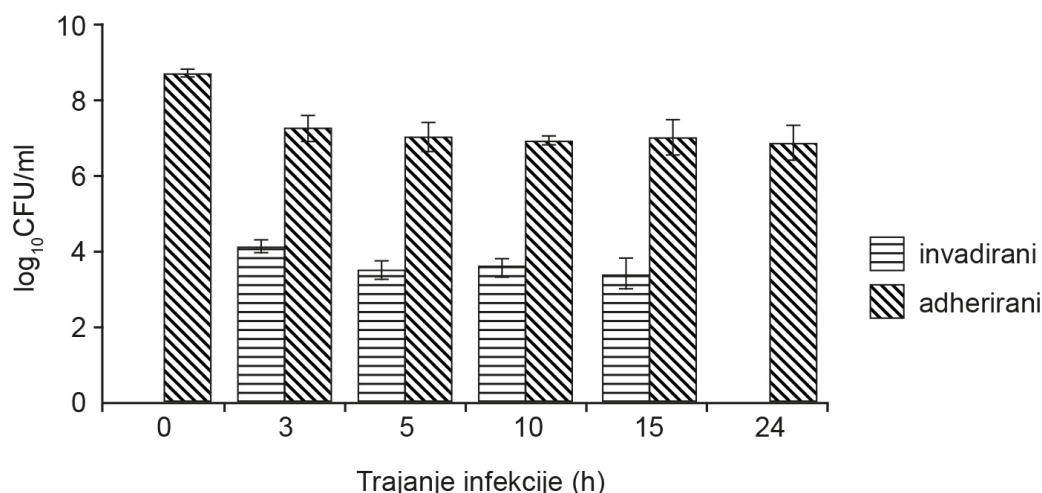
Da so celice primerne za poskus, smo preverili še z opazovanjem celic pod svetlobnim mikroskopom. Na sliki 14 je prikazan razvoj TEER celic PSI na poroznih filterih s premerom $0,4 \mu\text{m}$. Po 12-ih dneh gojenja so celice začele propadati, kar se je odražalo tudi v padcu upornosti. Da smo lahko sklepali o možnem načinu, kako *C. jejuni* K49/4 preide skozi polarizirani celični monosloj, smo merili TEER pred okužbo celic (7. dan) ter takoj naslednji dan in dnevno do 12. dneva od nasaditve celic na porozne filtre, ko smo s poskusom zaključili (slika 14).



Slika 14: Transepitelna električna upornost (TEER) polariziranega 3D modela celic PSI, ki so bile 7. dan od nasaditve okužene s *C. jejuni* K49/4 v koncentraciji 1×10^8 CFU/ml, ko je bila izmerjena najvišja upornost celic. Kontrolni vzorec predstavljajo celice brez dodanih bakterij. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost \pm standardni odklon.

Figure 14: Transepithelial electrical resistance (TEER) of polarized PSI cell monolayers, exposed to 1×10^8 CFU/ml of *C. jejuni* K49/4 on day 7, when the maximum TEER was measured. Control represents TEER of non-infected cells. Each point represents the mean \pm SD of the TEER in Ω/cm^2 .

Po vezavi *C. jejuni* K49/4 na polarizirane celice PSI smo ugotovili, da vrednost TEER rahlo pada v prvih 24 h po infekciji ter nato ponovno 72 h po infekciji. Na zadnji dan infekcije je upornost padla za več kot $600 \Omega/\text{cm}^2$. Na sliki 14 se vidi, da so večji vpliv na integriteto celičnega monosloja imele adherirane kot invadirane bakterije *C. jejuni* K49/4, kar je lahko posledica replikacije *C. jejuni* K49/4 na površini celic PSI in bakterijske translokacije skozi polarizirane PSI celice. Sklepamo, da povečanje števila bakterij na površini celic povzroči porušitev metabolične aktivnosti v črevesnem mikro-okolju, kar ima za posledico porušitev medceličnih stikov oz. integritete polariziranega črevesnega epitela. Naši rezultati so v skladu s rezultati Bras in Ketleya (1999), ki sta zaključila, da je znižanje TEER v prvih 24 h po vstopu *C. jejuni* v črevesje gostitelja, rezultat transceličnega mehanizma prehajanja skozi polarizirane epitelne celice z ozirom, da so spremembe TEER majhne. Istočasno vidimo, da so nastale le rahle spremembe upornosti pri invaziji celic PSI (slika 14). Ti rezultati kažejo, da *C. jejuni*, enkrat, ko je znotraj gostiteljske celice, nima več učinka na medcelično integriteto monosloja in se lahko diseminira po gostitelju s transcelularnim mehanizmom prehajanja skozi črevesno pregrado.



Slika 15: Število adheriranih bakterij *C. jejuni* K49/4 na polarizirani 3D model celic PSI ter preživetje in rast znotrajceličnih bakterij. Rezultati so predstavljeni kot log₁₀ povprečne vrednosti treh paralelk ± standardni odklon.

Figure 15: The number of adhered *C. jejuni* K49/4 to 3D model of intestinal epithelial cells PSI, their survival and intracellular growth. All experiments were repeated three times and the data presented as means (±standard deviation) of the adherent and invaded *C. jejuni* K49/4.

Število adheriranih bakterij se v času trajanja okužbe ni bistveno spreminjalo in je bilo ves čas infekcije (24 h) okrog 7 logaritmskih enot. Tudi število invadiranih kampilobaktrov je bilo dokaj stabilno in je njihovo število variiralo od začetnega števila invadiranih bakterij (3 h po infekciji) do 15 h po infekciji od 4,12 do 3,40 logaritmskih enot. Po 15 urah od začetka okužbe je število znotrajceličnih kampilobaktrov začelo upadati in po 24 h jih ni bilo več mogoče zaslediti znotraj celic PSI.

4.2 SPOSOBNOST TRANSLOKACIJE *C. jejuni* K49/4 SKOZI POLARIZIRANI CELIČNI MODEL PRAŠIČJIH ENTEROCITOV PSI

Ko smo polarizirane epitelne celice PSI okužili, smo še naprej merili TEER, ki nam je služil kot pokazatelj integritete celičnega monosloja in translokacije *C. jejuni* K49/4 skozi polarizirani monosloj celic (Slika 14). Število translociranih bakterij *C. jejuni* K49/4 smo določali v časovnih presledkih, z nacepljanjem vzorcev medija odvzetega pod mikroporozno membrano vodnjakov, na agarске plošče Karmali v paralelnih poskusih z gentamicinom (za določanje invadiranih/translociranih bakterij *C. jejuni* K49/4) oz. brez gentamicina (za določanje adheriranih bakterij *C. jejuni* K49/4) (Preglednica 7).

Preglednica 7: Translokacija bakterij *C. jejuni* K49/4 (\log_{10} CFU/ml) skozi polarizirani 3D model celic PSI in meritve TEER (Ω/cm^2)

Table 7: Translocated *C. jejuni* K49/4 (\log_{10} CFU/ml), from the basal chamber of a PSI cell model, and TEER (Ω/cm^2).

Čas po infekciji (h)	Poskus z gentamicinom		Poskus brez gentamicina	
	Translocirane bakterije (\log_{10} CFU/ml)	TEER (Ω/cm^2)	Translocirane bakterije (\log_{10} CFU/ml)	TEER (Ω/cm^2)
0	0,00	1610,0 ± 201,3	0,00	1610,0 ± 201,3
3	3,97 ± 0,11	NM	5,35 ± 0,34	NM
5	3,97 ± 0,12	NM	5,18 ± 0,21	NM
10	3,45 ± 1,00	NM	4,94 ± 0,54	NM
15	0,00	NM	4,19 ± 0,22	NM
24	0,00	1525.3 ± 133.1	2,31 ± 0,12	1470,6 ± 207,8
48	0,00	1604.8 ± 155.8	0,00	1553,0 ± 166,7
72	0,00	1692.1 ± 151.3	0,00	1678,1 ± 120,9
96	0,00	1820.8 ± 83.1	0,00	1000,4 ± 381,1
120	0,00	1565.9 ± 276.0	0,00	980,6 ± 235,1

* TEER polariziranih celic PSI (kontrolni vzorec), ki jim nismo dodali bakterijski inokulum, je bil $1612 \pm 207 \Omega/\text{cm}^2$ in je ostal skoraj nespremenjen tekom celotnega trajanja eksperimenta (120 h).

**CFU, colony-forming units; NM, upornost ni merjena

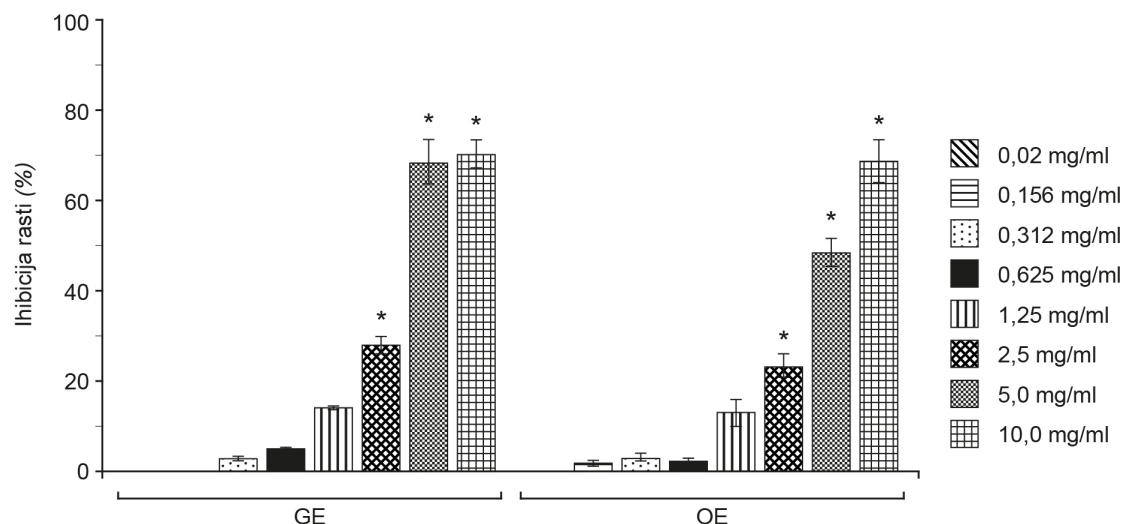
Že 3 h po infekciji polariziranih celic PSI smo zaznali bakterije *C. jejuni* K49/4 v delu vodnjaka pod membrano (na bazolateralni strani celic) (Preglednica 7). Podobno so opazili tudi Konkel in sod. (1992), ki so v svoji študiji ugotovil najvišje število *C. jejuni* že 4 h po okužbi polariziranih celic Caco-2.

V poskusu, kjer smo določali invadirane bakterije in uporabili gentamicin, 15 h po infekciji nismo več zaznali bakterij na bazolateralni strani. V vzporednem poskusu brez gentamicina smo določili bakterije *C. jejuni* K49/4 na bazolateralni strani monosloja tudi 24 h po infekciji, sicer v značilno manjši koncentraciji, kot na začetku infekcije, kasneje jih nismo več zaznali.

4.3 PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV

Določanje protimikrobnega delovanja izbranih izvlečkov pred preverjanjem njihove protiadhezijske učinkovitosti, je bilo nujno, saj bi morebitno protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov vplivalo na rezultate poskusa protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču smo v sterilni mikrotitrski ploščici pripravili serijske razredčitve izvlečkov v gojišču BHI in nato dodali kulturo *C. jejuni* K49/4 iz eksponentne faze rasti. Inkubacija je trajala 24 h pri temperaturi 42 °C, kot je opisano v poglavju 3.3.5.

Protimikrobno delovanje uporabljenih izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE), oljčnih listov (OE), timijana (TE) in njegovega hidrodestilacijskega ostanka (TE-R) ter semen *A. katsumadai* (SEE) in hidrodestilacijskega ostanka (hdSEE-R), je prikazano na slikah 16 - 18. Izraženo je kot odstotek (%) inhibicije rasti. Koncentracijski razpon, ki smo ga uporabili pri testu določanja protimikrobnega delovanja izvlečkov, je bil od 0,02 mg/ml do 10 mg/ml za GE, OE, TE in TE-R, oz. od 0,02 mg/ml do 5 mg/ml pri SEE in hdSEE-R.



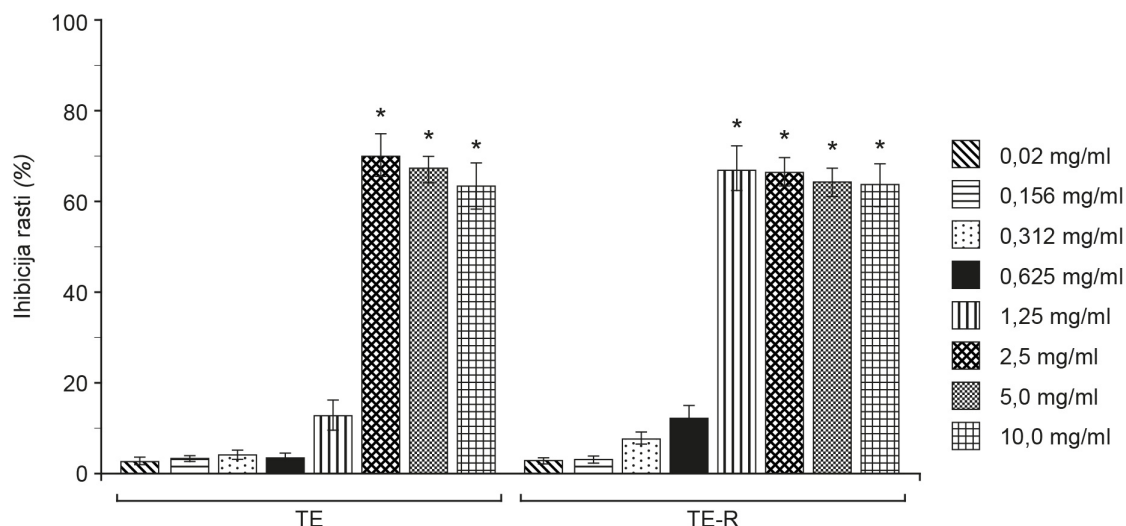
Slika 16: Protimikrobno delovanje različnih koncentracij izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) proti *C. jejuni* K49/4. Metoda mikrodilucije smo uporabili za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Suspenzija *C. jejuni* K49/4 v bujonu BHI je služila kot kontrola. Protimikrobna učinkovitost je izračunana kot odstotek inhibicije rasti. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardna deviacija. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolo.

Figure 16: Inhibitory effect of extract from waste Pinot noir grape skins and seeds (GE) and olive leaf extract (OE) at different concentrations against *C. jejuni* K49/4. The microdilution method was used to measure the minimal inhibitory concentrations (MICs). A suspension of *C. jejuni* K49/4 in BHI broth served as the growth control. The antimicrobial effectiveness was calculated as the percentage of growth inhibition after 24 h of incubation. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Z metodo mikrodilucije smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) za GE pri koncentraciji izvlečka 1,25 mg/ml. Pri slednji koncentraciji je dosežena 23 % inhibicija rasti *C. jejuni* K49/4 po 24 urni inkubaciji z izvlečkom. Zanimivo je, da je izvleček GE s koncentracijo 2,5 mg/ml povzročil le delno povečanje inhibicije rasti, višje uporabljene koncentracije pa že več kot 70 % inhibicijo rasti.

MIK izvlečka OE, prav tako določena z mikrodilucijo je kot pri GE, pri koncentraciji 1,25 mg/ml. Pri tej koncentraciji je po 24 urni inkubaciji z izvlečkom prišlo do 13 % inhibicije rasti. Iz slike 16 pa je razviden podoben vpliv izvlečka OE v primerjavi z izvlečkom GE in sicer največji preskok v povečanju inhibicije rasti, na 50 %, pri koncentraciji 5 mg/ml ter nato še za dodatnih 20 % pri koncentraciji 10 mg/ml.

Glede na sliko 16 lahko sklepamo, da sta oba izvlečka v koncentraciji 5 mg/ml tudi baktericidna, saj je inhibicija rasti več kot 50 %.

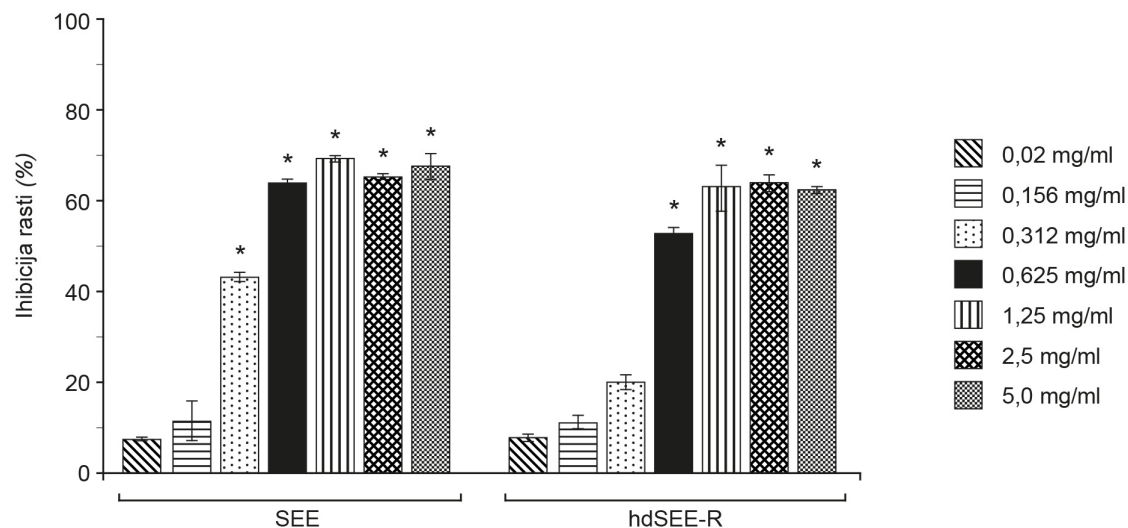


Slika 17: Protimikrobno delovanje različnih koncentracij izvlečka timijana (TE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) proti *C. jejuni* K49/4. Metodo mikrodilucije smo uporabili za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Suspenzija *C. jejuni* K49/4 v bujonu BHI je služila kot kontrola. Protimikrobna učinkovitost je izračunana kot odstotek inhibicije rasti. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardna deviacija. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolo.

Figure 17: Inhibitory effect of thyme extract (TE) and its post-distillation residue (TE-R) at different concentrations against *C. jejuni* K49/4. The microdilution method was used to measure the minimal inhibitory concentrations (MICs). A suspension of *C. jejuni* K49/4 in BHI broth served as the growth control. The antimicrobial effectiveness was calculated as the percentage of growth inhibition after 24 h of incubation. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Rezultati so pokazali, da je do minimalne inhibicije rasti pri izvlečku TE prišlo pri koncentraciji 1,25 mg/ml. Pri TE-R je določena minimalna inhibitorna koncentracija še nižja kot pri TE in sicer 0,625 mg/ml. Pri slednjih koncentracijah je bila *in vitro* inhibicija rasti *C. jejuni* K49/4 < 20 %. Ti rezultati kažejo, da se protimikrobno delovanje izvlečka, tudi po procesu hidrodestilacije, ne zmanjšuje, oz. da je protimikrobni učinek hidrodestilacijskega ostanka TE-R še izrazitejši kot pri osnovnem izvlečku TE kljub temu, da je njihova kemijska sestava različna. Najbolj izrazita razlika v inhibiciji rasti *C. jejuni* K49/4 ob dodatku TE in TE-R je bila pri koncentraciji 1,25 mg/ml. Pri slednji koncentraciji je inhibicija rasti *C. jejuni* K49/4 pri inkubaciji s TE le 17 %, pri TE-R pa visokih 70 %, medtem ko pri višjih koncentracijah dodanih izvlečkov (2,5 – 10 mg/ml) dosežemo 70 % inhibicijo rasti *C. jejuni* K49/4 *in vitro*.

Glede na sliko 17 lahko sklepamo, da je koncentracija 2,5 mg/ml pri izvlečku TE baktericidna saj je inhibicija rasti več kot 50 %. Pri TE-R se to zgodi že pri nižji uporabljeni koncentraciji, in sicer 1,25 mg/ml.



Slika 18: Protimikrobno delovanje različnih koncentracij izvlečka semen *A. katsumadai* (SEE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) proti *C. jejuni* K49/4. Metodo mikrodilucije smo uporabili za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Suspenzija *C. jejuni* K49/4 v bujonu BHI je služila kot kontrola. Protimikrobna učinkovitost je izračunana kot odstotek inhibicije rasti. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardna deviacija. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolo.

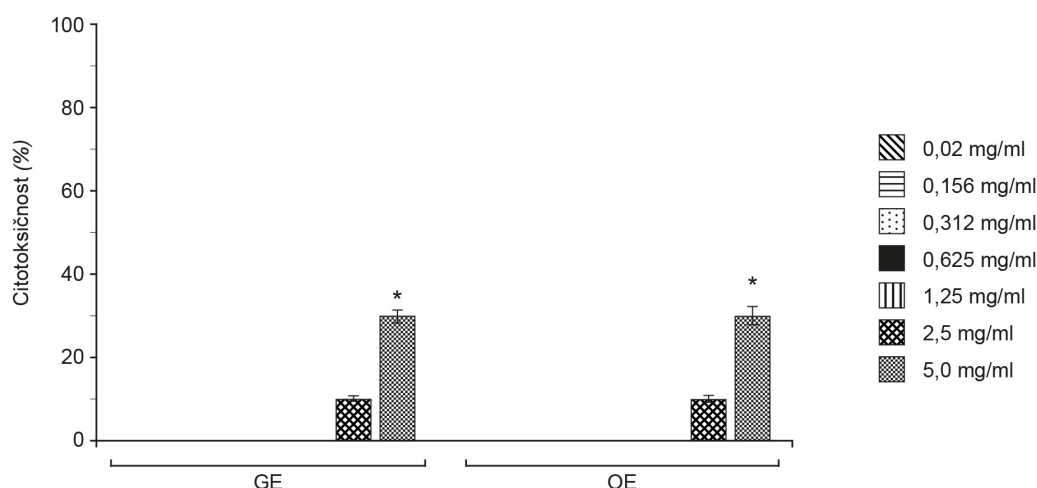
Figure 18: Inhibitory effects of different concentrations of *A. katsumadai* seed extract (SEE) and its post-distillation residue (hdSEE-R) against *C. jejuni* K49/4. The microdilution method was used to measure the minimal inhibitory concentrations (MICs). A suspension of *C. jejuni* K49/4 in BHI broth served as the growth control. The antimicrobial effectiveness was calculated as the percentage of growth inhibition after 24 h of incubation. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Izveček SEE je imel izrazitejšo inhibitorno aktivnost, ki se po procesu hidrodestilacije ni bistveno spremenila, kar je razvidno iz določenih MIK vrednosti: 0,25 mg/ml za SEE in 0,5 mg/ml za hdSEE-R (Slika 18). Po 24 urni inkubaciji smo preverili kakšna je inhibicija rasti *C. jejuni* K49/4 z določanjem števila kultivabilnih celic. Pri obeh izvlečkih, SEE in hdSEE-R, je pri koncentracijah višjih od 0,625 mg/ml izražena močna inhibicija rasti za več kot 50 %. Zaradi slednjega sklepamo, da sta oba izvlečka, v koncentracijah višjih od 0,625 mg/ml, tudi baktericidna. Po prvem poskusu s SEE in hdSEE-R smo, zaradi izrazite inhibicije rasti *C. jejuni* K49/4, pri nadaljnjih poskusih citotoksičnosti in protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov uporabili maksimalno koncentracijo 5 mg/ml, za razliko od ostalih izvlečkov, kjer je bila najvišja uporabljena koncentracija izvlečkov 10 mg/ml.

Če primerjamo protimikrobno delovanje GE, OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R, oz. inhibicijo rasti *C. jejuni* K49/4 po 24 urni inkubaciji z izvlečki, vidimo, da je pri koncentracijah MIK preživetje *C. jejuni* K49/4 okrog 80 %. Izvlečka SEE in hdSEE-R sta imela med vsemi izvlečki najbolj izrazito protimikrobno delovanje, tudi pri nižjih koncentracijah sta povzročila občutno inhibicijo rasti *C. jejuni* K49/4. Zelo zanimivo je, da je pri izvlečkih, ki so odpadni material po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R in hdSEE-R), inhibicija rasti podobna, kot pri izhodišnem izvlečku, čeprav njihova kemijska sestava ni enaka (rezultati niso prikazani). Pri TE-R je inhibicija rasti celo izrazitejša kot pri TE. Iz tega lahko sklepamo, da hlapne spojine, ki so prisotne v TE in SEE, ne vplivajo bistveno na inhibicijo rasti izvlečkov, oz. da so še druge spojine, ki so prisotne tako v izvlečku kot odpadnem materialu, odgovorne za protimikrobno aktivnost izvlečkov.

4.4 CITOTOKSIČNOST IZVLEČKOV

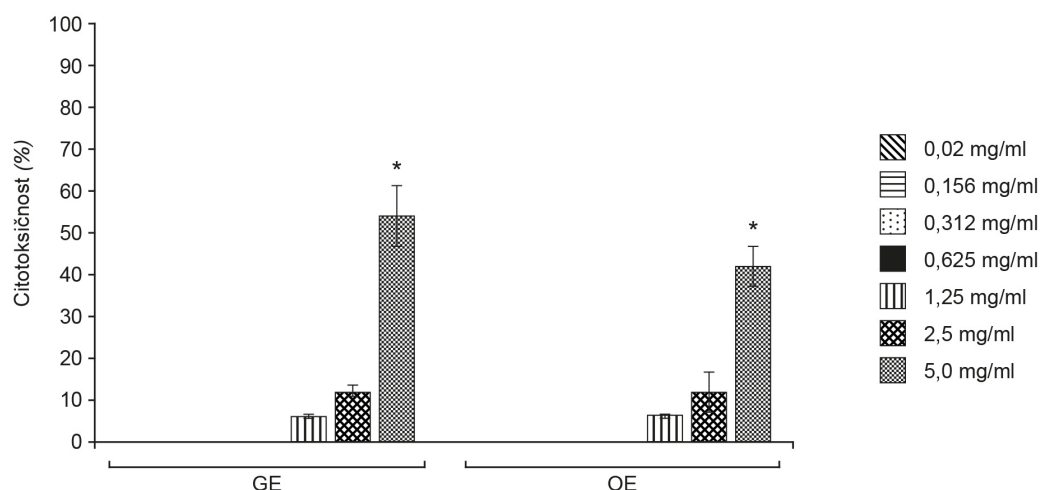
Določanje citotoksičnosti je pomembno za določanje škodljivost snovi za posamezno celično linijo. Citotoksična aktivnost uporabljenih izvlečkov, in sicer grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE), oljčnih listov (OE), timijana (TE) in hidrodestilacijskega preostanka (TE-R) ter semen *A. katsumadai* (SEE) in hidrodestilacijskega preostanka (hdSEE-R), je prikazana na slikah 19 - 24 in je izražena kot odstotek (%) citotoksičnosti izvlečkov za celične linije. Večja citotoksičnost izvlečka pomeni večji upad celične živosti ter večji razpad celičnega monosloja. Koncentracijski razpon, ki smo ga uporabili pri testu citotoksičnosti, je bil podoben koncentracijskem razponu pri testu protimikrobnega delovanja izvlečkov, od koncentracije 0,02 mg/ml do 5 mg/ml. Grafično so prikazani najprej rezultati citotoksičnosti za prašičje črevesne epitelne celice PSI, njim sledijo grafični prikazi citotoksičnosti izvlečkov za humane črevesne epitelne celice H4.



Slika 19: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) za celice PSI. Citotoksično delovanje izvlečkov smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) z uporabo raztopine MTT. Povprečna absorbanca kontrolnih vodnjakov je bila 100 %, citotoksičnost smo nato računali za vsak izvleček posebej. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardni odklon. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Figure 19: Cytotoxic activity of different concentrations of extract from waste Pinot noir grape skins and seeds (GE) and extract of olive leaves (OE) on pig small-intestine (PSI) epithelial cell line was determined by using MTT colorimetric assay, as described by Mossmann (1983). The average absorbance of the control wells was regarded as 100% and thereafter cytotoxicity was calculated for each test extract. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Tako s metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega, kot s testom MTT, smo ugotovili da se začne citotoksičen vpliv izvlečkov GE in OE pri višjih koncentracijah (2,5 mg/ml in 5 mg/ml). Iz slike 19 je razvidno, da koncentracije nižje od 2,5 mg/ml, niso imele nobenega vpliva na celice PSI. Oba izvlečka, tako GE kot OE, sta pokazala enako citotoksičnost in sta pri koncentraciji 2,5 mg/ml izzvala 10 % citotoksičnosti v primerjavi s kontrolo, pri koncentraciji 5 mg/ml sta izvlečka pokazala 30 % citotoksičnosti za celice PSI.

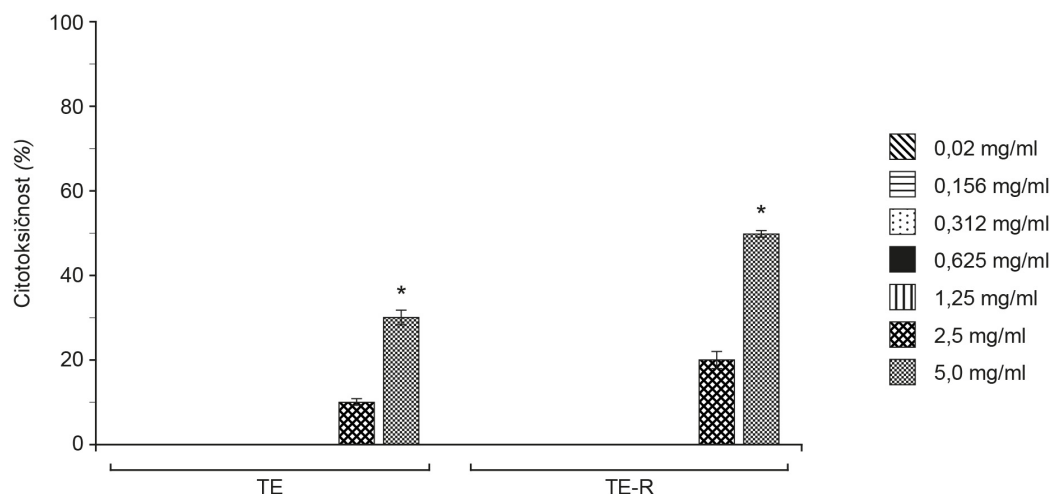


Slika 20: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) za celice H4. Citotoksično delovanje izvlečkov smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) z uporabo raztopine MTT. Povprečna absorbanca kontrolnih vodnjakov je bila 100 %, citotoksičnost smo nato računali za vsak izvleček posebej. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardni odklon. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Figure 20: Cytotoxic activity of different concentrations of extract from waste Pinot noir grape skins and seeds (GE) and olive leaves extract (OE) on human foetal small-intestine H4 epithelial cell line was determined by using MTT colorimetric assay, as described by Mossmann (1983). The average absorbance of the control wells was regarded as 100% and thereafter cytotoxicity was calculated for each test extract. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Koncentracije GE in OE, ki so bile nižje kot 1,25 mg/ml, niso imele nobenega učinka na celice H4 (slika 20). Pri slednji koncentraciji ni bilo vpliva na PSI celice in le 5 % citotoksičnosti na celice H4 kar pomeni upad celične živosti za približno 5 %. Ko je bila koncentracija GE in OE v celičnem mediju 2,5 mg/ml, so izvlečki pokazali skoraj 13 % citotoksičnost za celice H4, kar je malo več kot pri celicah PSI. Najvišja koncentracija, 5 mg/ml, je pokazala 55 % citotoksičnost, ko je uporabljen GE in 40 % citotoksičnost za celice H4, ko je uporabljen izvleček OE.

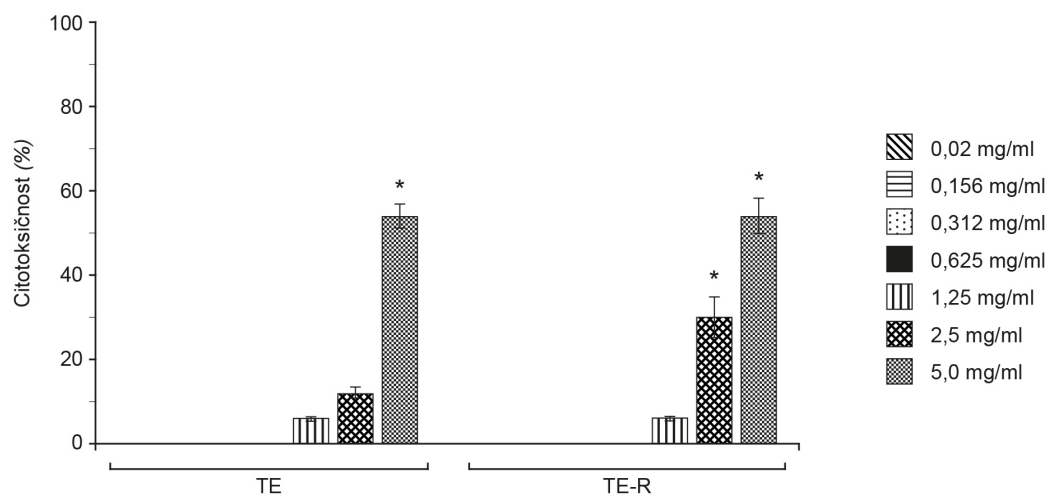
Rezultati so pokazali, da so višje koncentracije bolj citotoksične, kar se je pokazalo z večjim razpadom monosloja celic PSI in H4 po 24 urni inkubaciji z izvlečki. Celice H4 so se pokazale kot bolj občutljive na uporabljene izvlečke, kar je najverjetneje posledica večje celične občutljivosti na aktivne snovi v izvlečkih in razlike v zgradbi membrane celic.



Slika 21: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka timijana (TE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) za celice PSI. Citotoksično delovanje izvlečkov smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) z uporabo raztopine MTT. Povprečna absorbanca kontrolnih vodnjakov je bila 100 %, citotoksičnost smo nato računali za vsak izvleček posebej. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardni odklon. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Figure 21: Cytotoxic activity of different concentrations of thyme ethanol extract (TE) and its post-hydrodistillation residue (TE-R) on pig small-intestine (PSI) epithelial cell line was determined by using MTT colorimetric assay, as described by Mossmann (1983). The average absorbance of the control wells was regarded as 100% and thereafter cytotoxicity was calculated for each test extract. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Iz slike 21 je razvidno, da koncentracije TE in TE-R nižje od 2,5 mg/ml, niso imele nobenega vpliva na celice PSI. Pri koncentraciji 2,5 mg/ml je TE povzročil 10 % citotoksičnost, medtem ko je TE-R povzročil 20 % citotoksičnost v primerjavi s kontrolo. Pri koncentraciji 5 mg/ml je izvleček TE-R ponovno pokazal višjo citotoksičnost za celice PSI in sicer, 50 % citotoksičnost, medtem ko je TE pokazal 30 % citotoksičnost in manjši razpad celičnega monosloja.

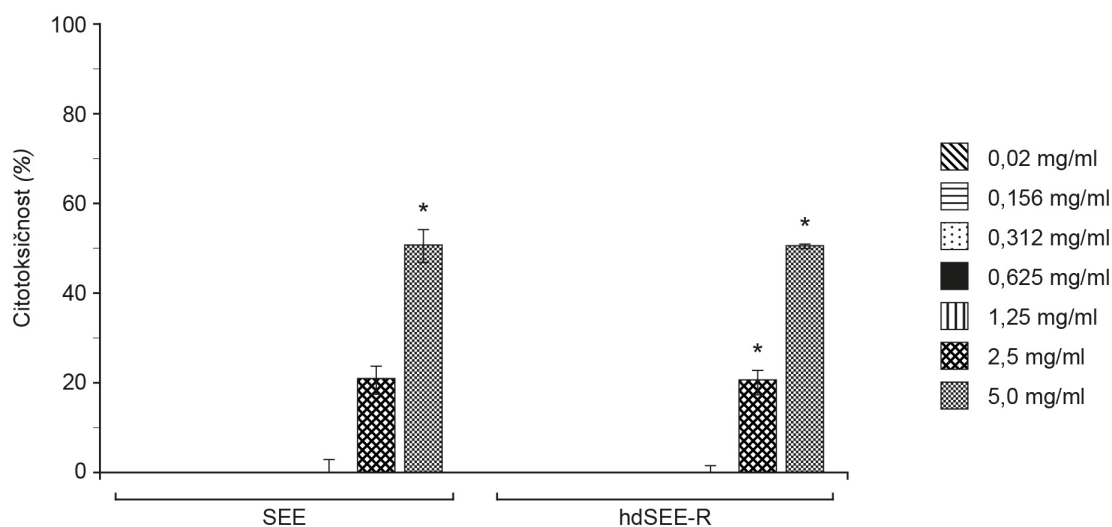


Slika 22: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka timijana (TE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) za celice H4. Citotoksično delovanje izvlečkov smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) z uporabo raztopine MTT. Povprečna absorbanca kontrolnih vodnjakov je bila 100 %, citotoksičnost smo nato računali za vsak izvleček posebej. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardni odklon. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Figure 22: Cytotoxic activity of different concentrations of thyme ethanol extract (TE) and its post- hydrodistillation residue (TE-R) on human foetal small-intestine H4 epithelial cell line was determined by using MTT colorimetric assay, as described by Mossmann (1983). The average absorbance of the control wells was regarded as 100% and thereafter cytotoxicity was calculated for each test extract. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, *versus* control.

Nižje koncentracije TE in TE-R od 1,25 mg/ml niso imele nobenega citotoksičnega učinka za celice H4 (slika 22). Pri obeh izvlečkih je slednja koncentracija povzročila le 5 % citotoksičnost za celice H4. Pri koncentraciji 2,5 mg/ml je izvleček TE povzročil le 10 % citotoksičnost za celice H4 po 24 urni inkubaciji z izvlečkom. Podobno kot pri PSI celicah, se je ista koncentracija TE-R pokazala kot bolj citotoksična za celice H4 in je povzročila 30 % citotoksičnost. Oba izvlečka, TE in TE-R, sta povzročila 50 % citotoksičnost (IC_{50}) za celice H4 pri najvišji uporabljeni koncentraciji 5 mg/ml.

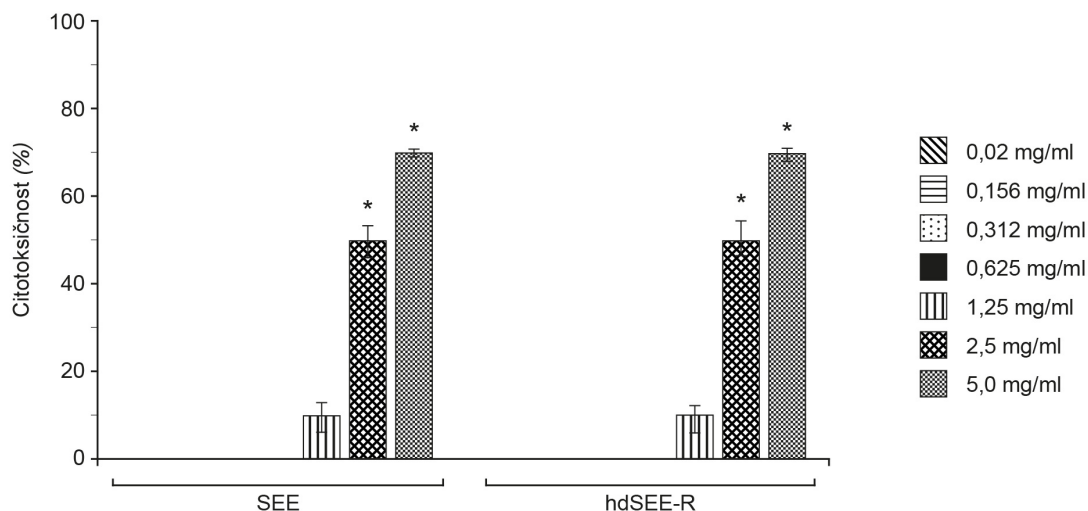
Rezultati citotoksičnosti izvlečkov TE in TE-R so pokazali, da so višje koncentracije bolj citotoksične, saj so povzročile večji razpad monosloja celic PSI in H4. Pri koncentraciji 5 mg/ml sta oba izvlečka povzročila 50 % citotoksičnost (IC_{50}) na celicah H4, pri celicah PSI pa je tako izrazito citotoksičnost pokazal le TE-R. Celice H4 so se ponovno pokazale kot bolj občutljive na uporabljene izvlečke.



Slika 23: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka semen *A. katsumadai* (SEE) in preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) za celice PSI. Citotoksično delovanje izvlečkov smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) z uporabo raztopine MTT. Povprečna absorbanca kontrolnih vodnjakov je bila 100 %, citotoksičnost smo nato računali za vsak izvleček posebej. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardni odklon. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Figure 23: Cytotoxic activity of different concentrations of *A. katsumadai* seed extract (SEE) and its post-distillation residue (hdSEE-R) on pig small-intestine (PSI) epithelial cell lines was determined by using MTT colorimetric assay, as described by Mossmann (1983). The average absorbance of the control wells was regarded as 100% and thereafter cytotoxicity was calculated for each test extract. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Ko je bila koncentracija SEE in hdSEE-R v mediju za celice nižja od 2,5 mg/ml, izvlečka nista imela nobenega citotoksičnega učinka na celice PSI (slika 23). Pri slednji koncentraciji sta oba izvlečka izražala 20 % citotoksičnost. Po 24 h inkubacije celic s SEE in hdSEE-R v koncentraciji 5 mg/ml sta oba izvlečka povzročila 50 % citotoksičnost za celice PSI.



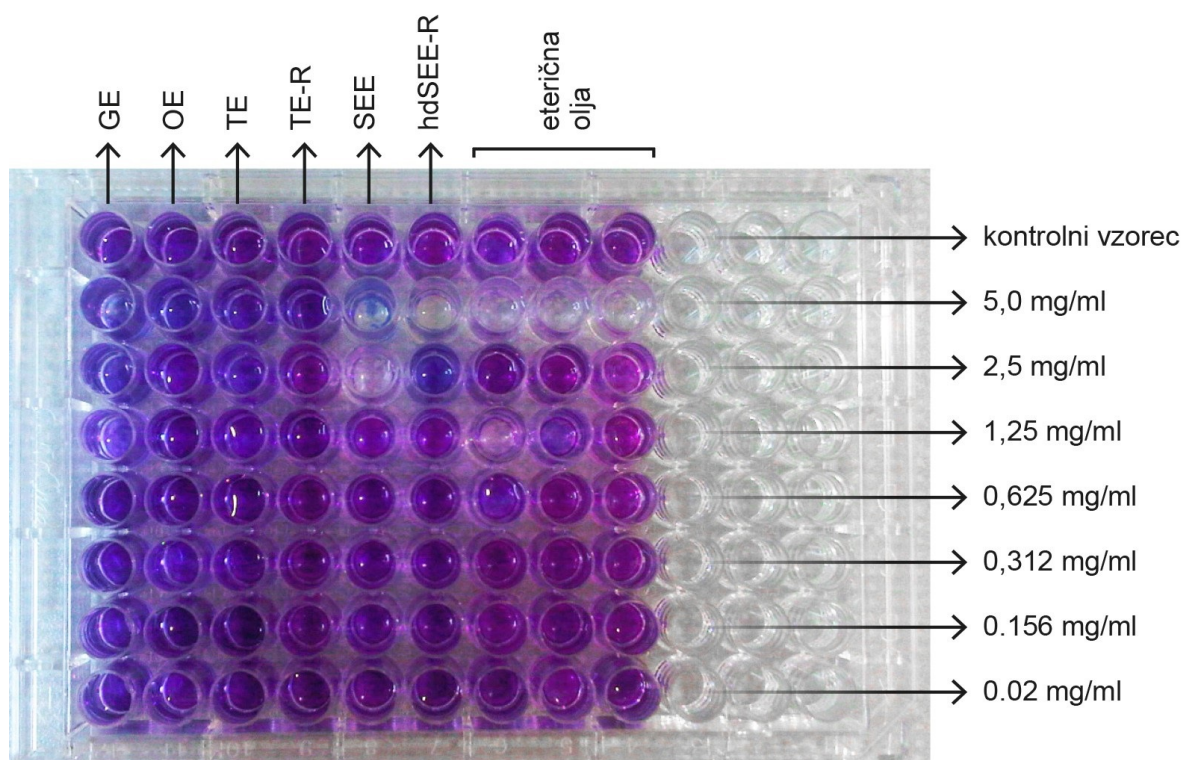
Slika 24: Citotoksičnost različnih koncentracij izvlečka semen *A. katsumadai* (SEE) in preostanka po hidroddestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) za celice H4. Citotoksično delovanje izvlečkov smo preverili z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) z uporabo raztopine MTT. Povprečna absorbanca kontrolnih vodnjakov je bila 100 %, citotoksičnost smo nato računali za vsak izvleček posebej. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti \pm standardni odklon. *, $p \leq 0,001$, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Figure 24: Cytotoxic activity of different concentrations of *A. katsumadai* seed extract (SEE) and its post-distillation residue (hdSEE-R) on human foetal small-intestine H4 epithelial cell lines was determined by using MTT colorimetric assay, as described by Mossmann (1983). The average absorbance of the control wells was regarded as 100% and thereafter cytotoxicity was calculated for each test extract. Data are means \pm standard deviation. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Pri celicah H4 koncentracije SEE in hdSEE-R nižje od 1,25 mg/ml niso imele citotoksičnega učinka (slika 24). Pri slednji koncentraciji sta oba izvlečka povzročila le 10 % citotoksičnost za celice H4. Oba izvlečka, tako SEE kot hdSEE-R, sta povzročila 50 % citotoksičnost (IC_{50}) pri koncentraciji 2,5 mg/ml na celicah H4. Najvišja uporabljena koncentracija obeh izvlečkov (5 mg/ml) je pri celicah H4 povzročila izrazit razpad celičnega monosloja. Tako kot pri ostalih uporabljenih izvlečkih (GE, OE, TE in TE-R) sta izvlečka SEE in hdSEE-R imela bolj izrazito citotoksično delovanje na celice H4. Že pri koncentraciji 2,5 mg/ml sta SEE in hdSEE-R dosegla vrednosti (IC_{50}) pri celicah H4, oz. pri koncentraciji 5 mg/ml pri celicah PSI.

Pri določanju citotoksičnosti za celice PSI so bili izvlečki GE, OE in TE najmanj citotoksični med uporabljenimi izvlečki. Bolj citotoksičen je bil TE-R, najbolj citotoksična sta bila SEE in hdSEE-R. SEE in hdSEE-R sta povzročila bolj izrazito citotoksičnost že pri nižjih koncentracijah in večjo citotoksičnost kot GE, OE, TE pri istih uporabljenih koncentracijah. Na splošno so se H4 celice pokazale kot bolj občutljive na uporabljene izvlečke. Na celicah

H4 je podoben trend citotoksičnosti kot pri PSI celicah in sicer, najmanj citotoksični so bili GE, OE, TE, katerim so sledili TE-R, SEE in hdSEE-R. Pri testih protiadhezijske aktivnosti izvlečkov smo uporabili izvlečke v bistveno nižjih koncentracijah kot so bile koncentracije, ki so v preskusu citotoksičnosti dale pozitivne rezultate.



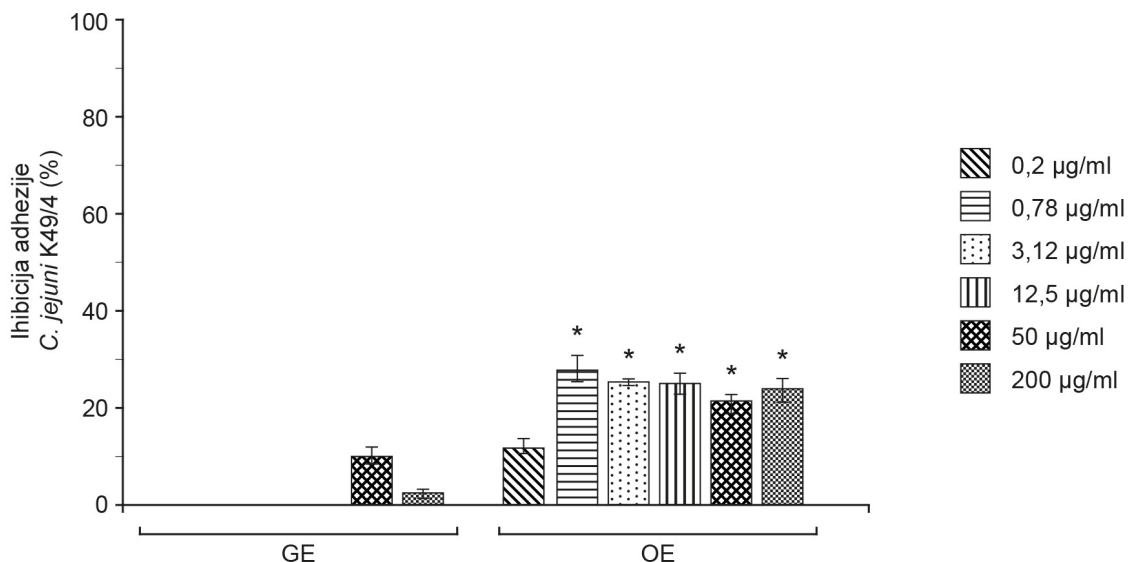
Slika 25: Fotografija ene izmed mikrotiterskih ploščic pri določanju citotoksičnosti izvlečkov za celice PSI z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega.

Figure 25: One of the microtiter plates used in cytotoxicity assay on PSI cells using crystal violet staining method.

4.5 PROTIADHEZIJSKA UČINKOVITOST IZVLEČKOV

4.5.1 Protiadhezijska učinkovitost različnih koncentracij izvlečkov na celični kulturi PSI

4.5.1.1 Protiadhezijska učinkovitost izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE)

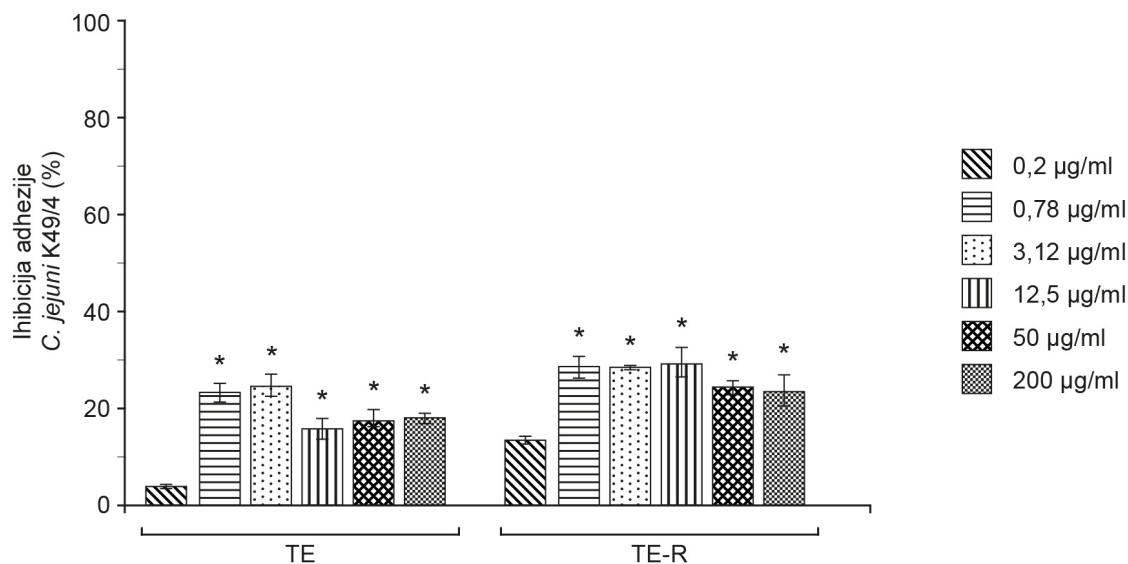


Slika 26: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI po tretiranju celic z izvlečki GE in OE različnih koncentracij. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 26: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to PSI epithelial cells by different concentrations of GE and OE. The data are % of inhibition of bacterial adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Sposobnost adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, ob dodatku izvlečkov GE in OE, smo testirali v koncentracijskem območju od 0,2 µg/ml do 200 µg/ml. Če je bila koncentracija GE 50 µg/ml ali 100 µg/ml (ni prikazano na sliki), se je na celice PSI vezalo 10 % manj celic kot pri kontrolnem vzorcu, kar ni doseglo statistične značilnosti. Zanimivo je, da je najvišja uporabljena koncentracija izvlečka GE (200 µg/ml) povzročila le 5 % manjšo adhezijo *C. jejuni* K49/4 na celice PSI (slika 26). Koncentracije GE, nižje od 50 µg/ml, niso vplivale na sposobnost adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, oz. adhezivnost je bila podobna kot v kontrolnem vzorcu. Za razliko od GE je sočasna inkubacija z OE zmanjšala adhezivnost *C. jejuni* K49/4 na celice PSI znotraj večjega koncentracijskega razpona izvlečka, in sicer med 0,78 µg/ml in 200 µg/ml. V primerjavi s kontrolo je OE inhibiral adhezijo *C. jejuni* K49/4 za 30 %, kar je bilo tudi statistično značilno. Trend inhibicije adhezije na celice PSI v odvisnosti od koncentracije je pokazal, da le ta ni odvisna od koncentracije, saj je adhezivnost pri koncentracijah OE, višjih od 0,78 µg/ml zelo podobna. Že tako nizka koncentracija kot je 0,78 µg/ml je zmanjšala adhezijo *C. jejuni* K49/4 za > 10 % v primerjavi s kontrolo.

4.5.1.2 Protiadhezijska učinkovitost izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R)

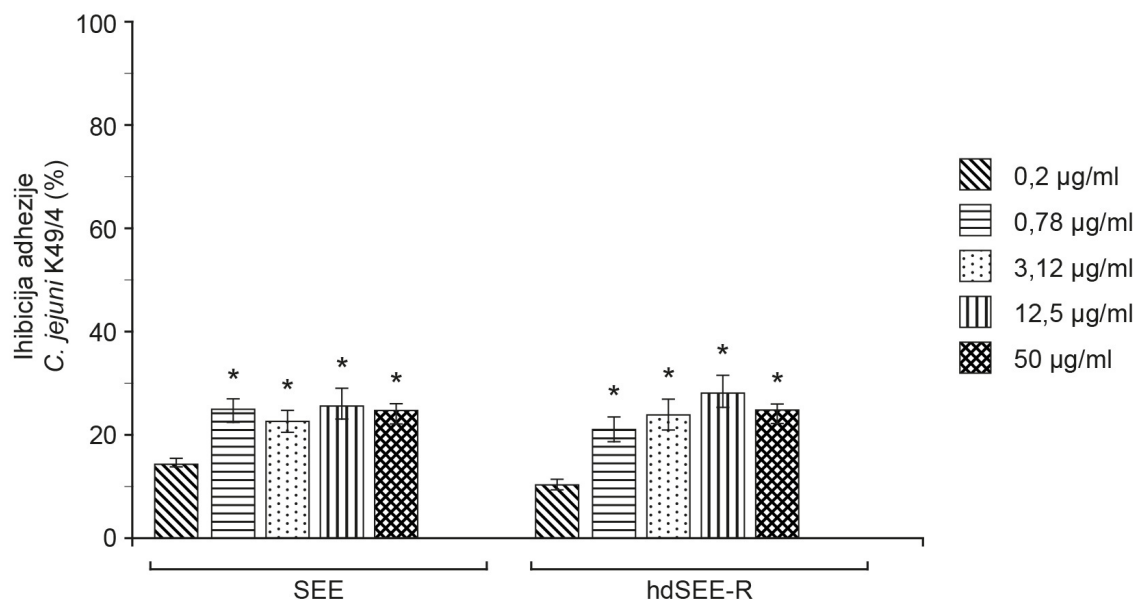


Slika 27: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI po tretiranju celic z izvlečki TE in TE-R različnih koncentracij. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 27: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to PSI epithelial cells by different concentrations of TE and TE-R. The data are % of inhibition of bacterial adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Izvlečka TE in TE-R sta statistično značilno zmanjšala adhezivnost *C. jejuni* K49/4 na celično kulturo PSI znotraj koncentracijskega območja 0,78 µg/ml - 200 µg/ml. Adhezija je bila inhibirana za 30 %, kar je bilo še bolj izrazito pri nižjih koncentracijah TE in TE-R. TE-R se je pokazal kot bolj učinkovit pri nižjih koncentracijah kot TE, kar je najbolj očitno pri koncentraciji 12,5 µg/ml, kjer je inhibicija adhezije s TE malo nižja od 20 %, pri TE-R pa je skoraj 30 % (slika 27). Že najnižja uporabljena koncentracija TE ali TE-R (0,2 µg/ml) je delovala protiadhezijsko za *C. jejuni* K49/4, a je bila pri TE le 4 %, pri TE-R pa 14 %, in ni bila statistično značilna. Podobno kot pri OE je bila protiadhezijska učinkovitost izvlečkov TE in TE-R dokaj stabilna znotraj testiranega koncentracijskega območja.

4.5.1.3 Protiadhezijska učinkovitost izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R)



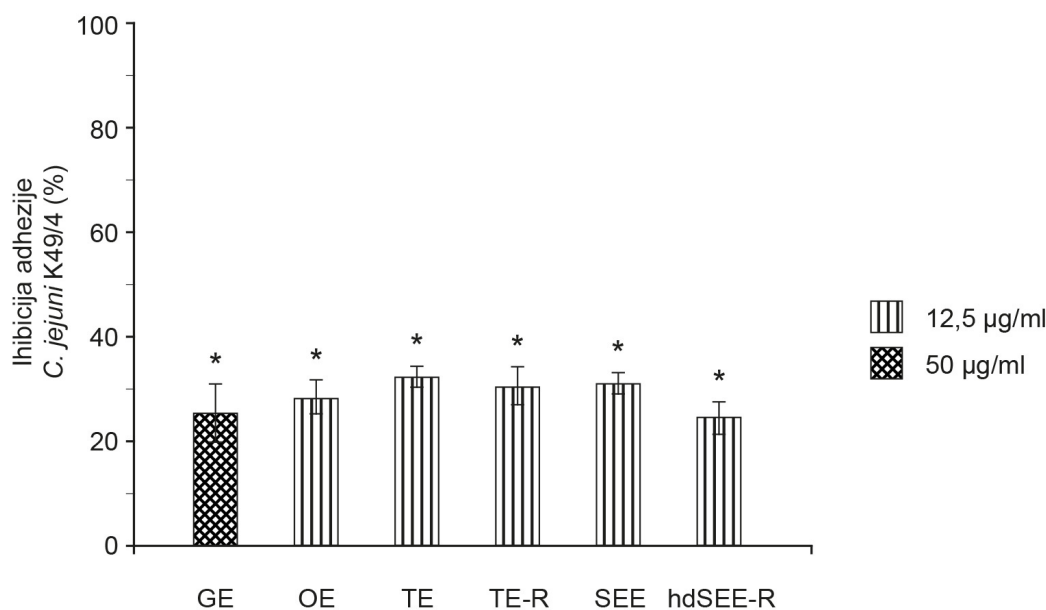
Slika 28: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI po tretiranju celic z izvlečki SEE in hdSEE-R različnih koncentracij. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 28: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to PSI epithelial cells by different concentrations of SEE and hdSEE-R. The data are % of inhibition of bacterial adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Izvečka SEE in hdSEE-R sta pokazala protiadhezijsko aktivnost v velikem koncentracijskem razponu, in sicer med 0,2 µg/ml in 50 µg/ml (slika 28). V primerjavi s kontrolo, je bilo zmanjšanje adhezivnosti *C. jejuni* K49/4 na celično kulturo PSI znotraj koncentracijskega območja izvlečkov SEE in hdSEE-R med 0,78 µg/ml in 50 µg/ml najmanj 20 %. Najnižja koncentracija 0,2 µg/ml je povzročila < 20 % zmanjšanje adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, kar pa ni doseglo statistične značilnosti. Tako kot pri OE, TE in TE-R protiadhezijska aktivnost izvlečkov SEE in hdSEE-R ni odvisna od koncentracije, razen pri najnižji uporabljeni koncentraciji (0,2 µg/ml), ki ni pokazala statistično značilnega zmanjšanja adhezije *C. jejuni* K49/4. Pri obeh izvlečkih, SEE in hdSEE-R, je koncentracija 12,5 µg/ml imela najizrazitejše protiadhezijsko delovanje in je za 30 % zmanjšala adhezivnost *C. jejuni* K49/4 na celice PSI.

4.5.2 Protiadhezijska učinkovitost različnih koncentracij izvlečkov na celični kulturi H4

Z ozirom da protiadhezijska aktivnost izvlečkov GE, OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R ni bila odvisna od koncentracije smo se odločili za testiranje le ene koncentracije pri poskusu protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov na celicah H4. Izbrali smo koncentracijo 50 µg/ml izvlečka GE in 12,5 µg/ml pri izvlečkih OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R.



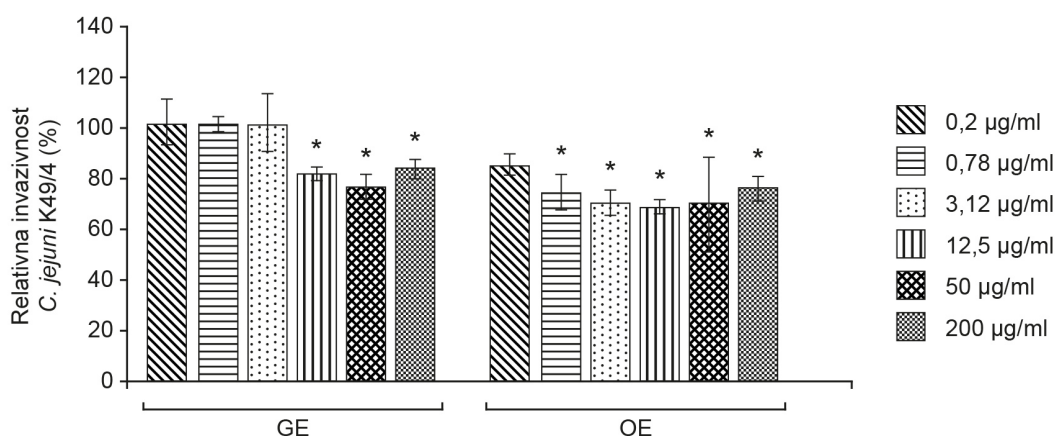
Slika 29: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice H4 po tretiranju celic z izvlečki GE, OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 29: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to H4 epithelial cells with GE, OE, TE, TE-R, SEE and hdSEE-R. The data are % of inhibition of bacterial adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Izvleček GE je pri koncentraciji 50 µg/ml imel bolj izrazito protiadhezijsko delovanje na celice H4 kot na celice PSI, z zmanjšanjem adhezije *C. jejuni* K49/4 za > 20 % (slika 29). Čeprav je bila koncentracija izvlečkov TE, TE-R in SEE nizka (12,5 µg/ml), je bila, z > 30 % inhibicijo adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice H4, zelo učinkovita.

4.6 VPLIV IZVLEČKOV NA INVAZIVNOST BAKTERIJ *C. jejuni* K49/4 V CELIČNI KULTURI PSI

4.6.1 Vpliv izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) na invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celični kulturi PSI

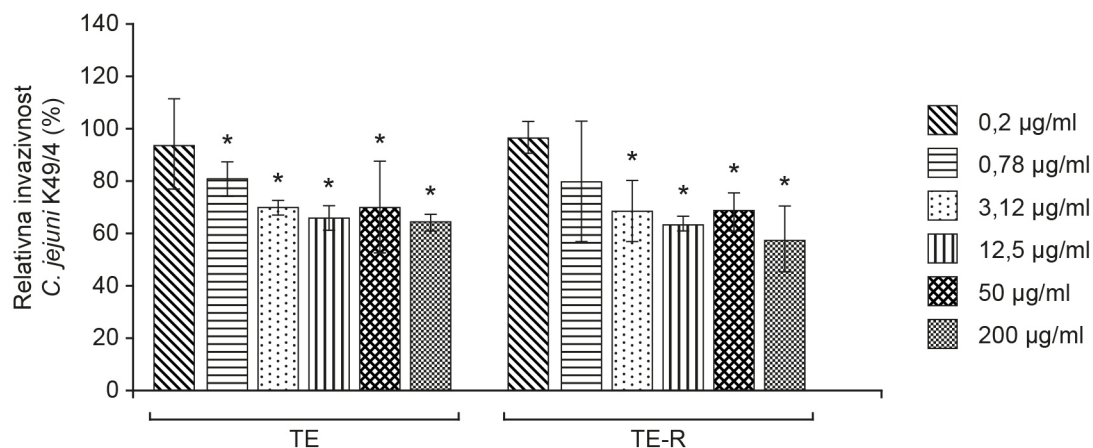


Slika 30: Invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celice PSI po tretiranju celic z izvlečki GE in OE različnih koncentracij. Rezultati so predstavljeni kot relativna invazivnost glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 30: Invasiveness of *C. jejuni* K49/4 in PSI epithelial cells by different concentrations of GE and OE. The data are presented as relative invasion of *C. jejuni* K49/4. *, $p \leq 0,001$, versus control.

Poskus vpliva izvlečkov na invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celice PSI smo izvedli v vsaj treh ponovitvah. Pri nižjih uporabljenih koncentracijah GE (0,2 µg/ml – 3,12 µg/ml) je bilo po treh urah ko-inkubacije *C. jejuni* K49/4 in izvlečka GE s celicami PSI število znotrajceličnih bakterij podobno kot v kontrolnem vzorcu (slika 30). Pri višjih koncentracijah GE (od 12,5 µg/ml do 200 µg/ml) je bila invazivnost zmanjšana do 20 %. V primerjavi z GE je bil OE bolj učinkovit. Tudi nižje koncentracije, ki pri GE niso imele nobenega vpliva na invazivnost bakterij *C. jejuni* K49/4 (0,78 µg/ml in 3,12 µg/ml), so pri OE zmanjšale invazijo do 30 %. Vpliv izvlečka OE na invazivnost *C. jejuni* K49/4 v koncentracijskem območju od 0,78 µg/ml do 50 µg/ml, ni bil odvisen od koncentracije izvlečka.

4.6.2 Vpliv izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) na invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celični kulturi PSI

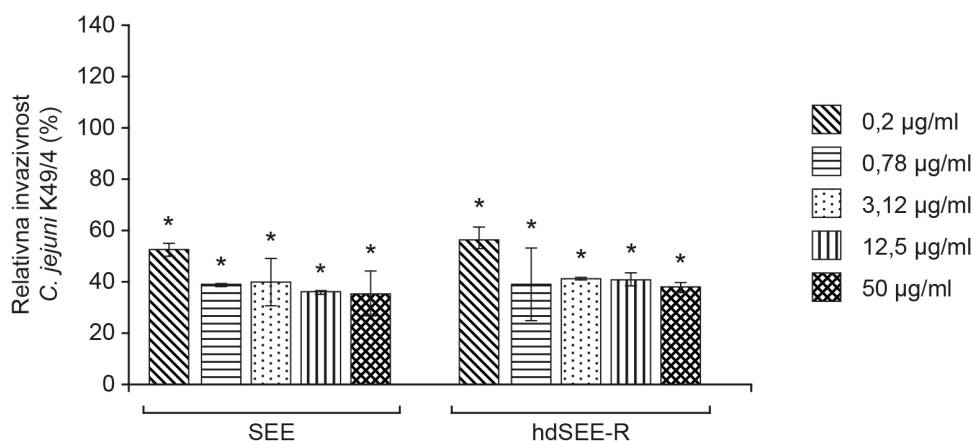


Slika 31: Invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celice PSI po tretiranju celic z izvlečki TE in TE-R različnih koncentracij. Rezultati so predstavljeni kot relativna invazivnost glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 31: Invasiveness of *C. jejuni* K49/4 in PSI epithelial cells by different concentrations of TE and TE-R. The data are presented as relative invasion of *C. jejuni* K49/4. *, $p \leq 0,001$, versus control.

Dodatki izvlečkov TE in TE-R so povzročili manjšo invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celice PSI v koncentracijskem razponu od 0,78 µg/ml do 200 µg/ml (slika 31). Le najnižja uporabljena koncentracija, 0,2 µg/ml, ni imela nobenega učinka na invazijo *C. jejuni* K49/4 v celice PSI, saj je bila le ta podobna kot v kontrolnem vzorcu. Za najbolj učinkovito se je izkazala najvišja uporabljena koncentracija, 200 µg/ml. Pri tej koncentraciji je TE zmanjšal invazivnost *C. jejuni* v celice PSI za > 30 %, TE-R pa celo za 40 %. Učinkovitost obeh izvlečkov je bila primerljiva, razen pri najvišji koncentraciji, kjer se je TE-R izkazal kot bolj učinkovit.

4.6.3 Vpliv izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) na invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celični kulturi PSI



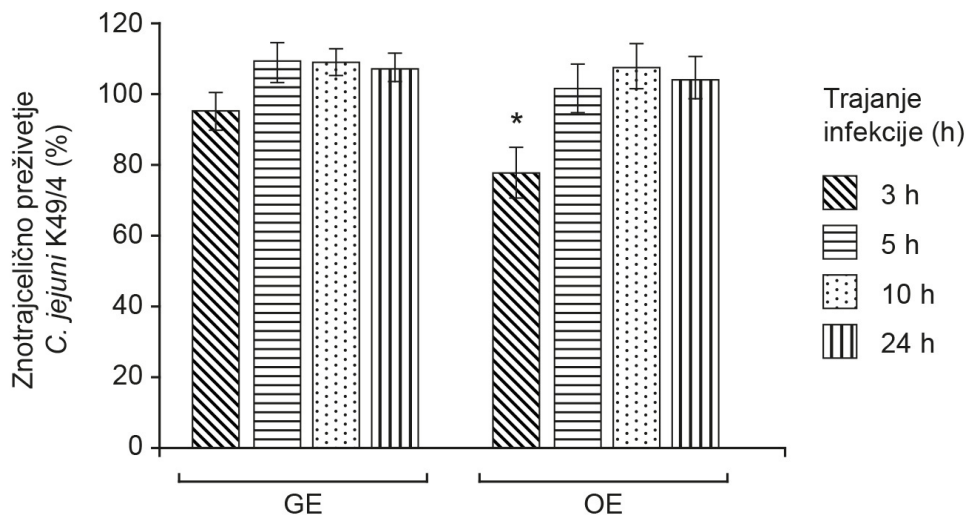
Slika 32: Invazivnost *C. jejuni* K49/4 v celice PSI po tretiranju celic z izvlečki SEE in hdSEE-R različnih koncentracij. Rezultati so predstavljeni kot relativna invazivnost glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 32: Invasiveness of *C. jejuni* K49/4 in PSI epithelial cells by different concentrations of SEE and hdSEE-R. The data are presented as relative invasion of *C. jejuni* K49/4. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Invazivnost *C. jejuni* K49/4 se je značilno zmanjšala zaradi 2 h inkubacije izvlečkov SEE in hdSEE-R s celicami PSI in bakterijskim inokulumom. Dodatek izvlečkov SEE in hdSEE-R znotraj enakega koncentracijskega območja kot pri ostalih izvlečkih, 0,2 µg/ml – 50 µg/ml, je v primerjavi s kontrolo zmanjšal invazivnost za 45 % do 65 % (slika 32). Bolj učinkovite so bile koncentracije SEE in hdSEE-R višje od 0,78 µg/ml. Invazivnost pa je bila pri vseh uporabljenih koncentracijah statistično značilno nižja kot v kontrolnem vzorcu.

4.7 VPLIV IZVLEČKOV NA PREŽIVETJE IN RAST *C. jejuni* K49/4 V CELIČNI KULTURI PSI

4.7.1 Vpliv izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) na preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 v celični kulturi PSI

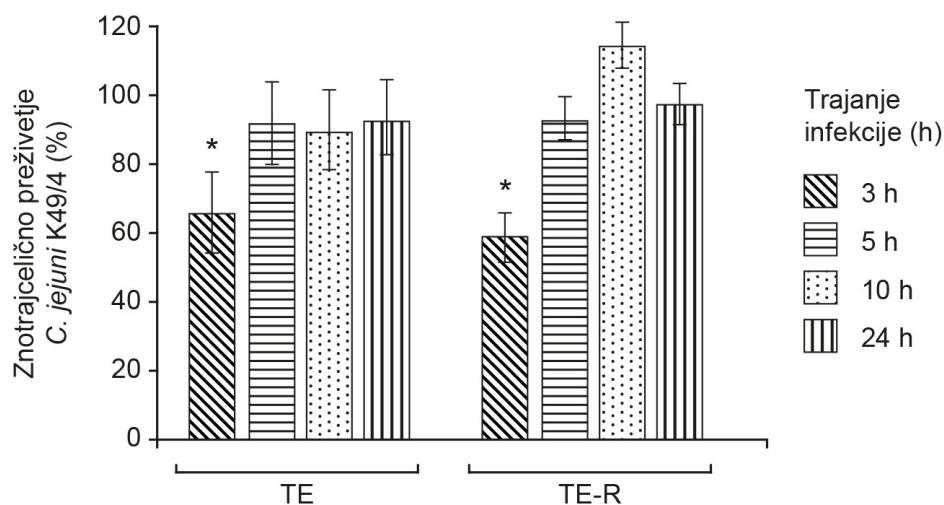


Slika 33: Preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 znotraj celic PSI po inkubaciji z 200 µg/ml GE in OE. Rezultati so predstavljeni kot relativno število živih celic *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI glede na kontrolo, izraženo v %. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 33: Intracellular survival and growth of *C. jejuni* K49/4 in PSI cells exposed to 200 µg/ml GE and OE. The data are presented as the relative number of viable *C. jejuni* K49/4 within the PSI cells. *, $p \leq 0,001$, versus control.

Z nadaljnjimi poskusi smo želeli ugotoviti vpliv sočasne inkubacije izvlečkov in bakterij na znotrajcelično preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI. Testirali smo najvišjo uporabljeno koncentracijo GE in OE (200 µg/ml). V primerjavi s kontrolo je bilo 3 h po infekciji število *C. jejuni* K49/4 znotraj PSI, ob uporabi OE, za skoraj 20 % manjše kot pri kontroli, medtem ko je dodatek GE le malo zmanjšal število znotrajceličnih kampilobaktrov. Nižje število znotrajceličnih kampilobaktrov je bilo najverjetneje posledica protiadhezijske aktivnosti izvlečkov oz. slabše adhezije *C. jejuni* K49/4 na celično kulturo PSI. Že 5 h po infekciji je pričelo število znotrajceličnih kampilobaktrov naraščati in je doseglo število v kontrolnem vzorcu. Kljub dodatku izvlečkov GE in OE je *C. jejuni* K49/4 preživel znotraj celic PSI vseh 24 h, koliko je trajal poskus. Tudi po zaključku poskusa, 24 h po infekciji, je število *C. jejuni* K49/4 ostalo visoko, primerljivo s kontrolnim vzorcem (slika 33).

4.7.2 Vpliv izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) na preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 v celični kulturi PSI

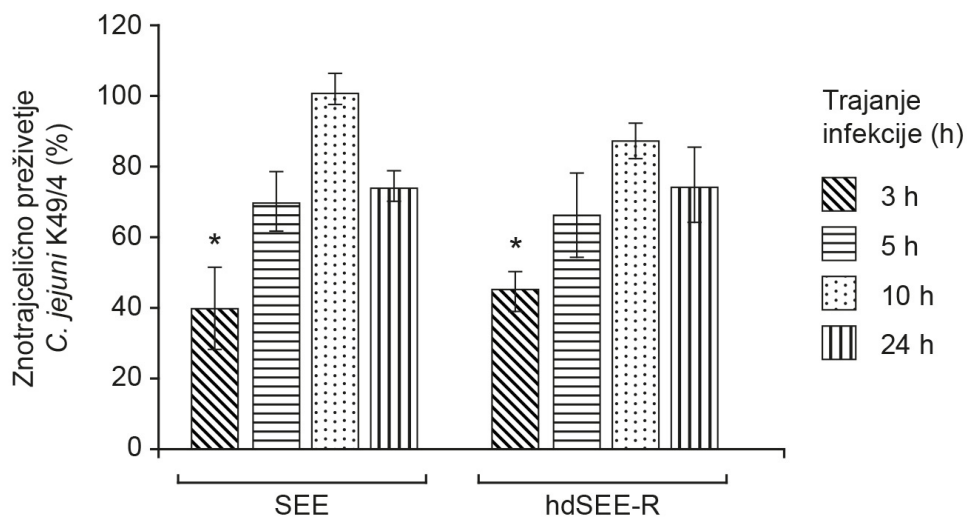


Slika 34: Preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 znotraj celic PSI po inkubaciji z 200 µg/ml TE in TE-R. Rezultati so predstavljeni kot relativno število živih celic *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI glede na kontrolo, izraženo v %. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 34: Intracellular survival and growth of *C. jejuni* K49/4 in PSI cells exposed to 200 µg/ml TE and TE-R. The data are presented as the relative number of viable *C. jejuni* K49/4 within the PSI cells. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Vpliv izvlečkov TE in TE-R na znotrajcelično preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI smo testirali pri koncentraciji 200 µg/ml (slika 34). Kljub dodatku izvlečkov so bakterije preživele v celicah PSI celoten čas opazovanja (24 h). Največji vpliv izvlečkov je viden po 3 h inkubacije, ko je bilo pri dodatku TE in TE-R, število znotrajceličnih kampilobaktrov za skoraj 40 % nižje kot v kontrolnem vzorcu, kar je posledica slabše adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, zaradi dodatka izvlečkov. 5 h po infekciji se je število *C. jejuni* K49/4 znotraj PSI že zvišalo in ostalo visoko do konca opazovanja. Ko smo uporabili TE, je ostalo število znotrajceličnih kampilobaktrov okrog 10 % nižje kot pri kontroli. Pri TE-R izstopa visoko število kampilobaktrov 10 h po infekciji (doseglo je koncentracijo kot pri kontrolnem vzorcu). 24 h po infekciji je bilo število znotrajceličnih kampilobaktrov nekoliko nižje kot v kontrolnem vzorcu pri obeh uporabljenih izvlečkih.

4.7.3 Vpliv izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) na preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 v celični kulturi PSI



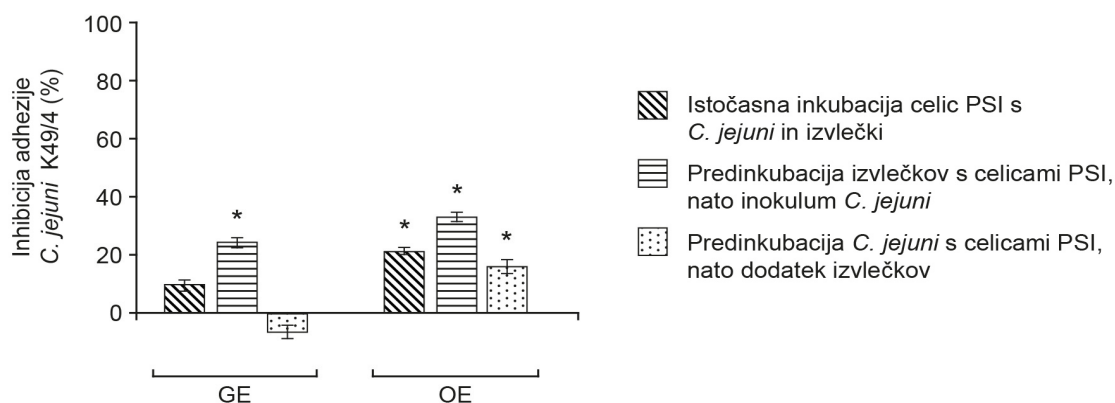
Slika 35: Preživetje in rast *C. jejuni* K49/4 znotraj celic PSI po inkubaciji s 50 µg/ml SEE in hdSEE-R. Rezultati so predstavljeni kot relativno število živih celic *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI glede na kontrolo, izraženo v %.*, statistično značilna razlika ($p \leq 0.001$).

Figure 35: Intracellular survival and growth of *C. jejuni* K49/4 in PSI cells exposed to 50 µg/ml SEE and hdSEE-R. The data are presented as the relative number of viable *C. jejuni* K49/4 within the PSI cells. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Znotrajcelično rast in preživetje *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI smo preverili tudi ob dodatku SEE in hdSEE-R v najvišji koncentraciji, uporabljeni pri poskusih protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov, in sicer 50 µg/ml (slika 35). Po začetnih 2 h inkubacije celic PSI s SEE ali hdSEE-R in *C. jejuni* K49/4, je *C. jejuni* K49/4 preživel znotraj celic PSI vseh 24 h opazovanja. SEE in hdSEE-R sta statistično značilno zmanjšala preživetje in rast znotrajceličnega *C. jejuni* K49/4 za približno 40 % 3 h po infekciji, kar je tako kot pri ostalih izvlečkih, posledica slabše adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI. Število znotrajceličnih kampilobaktrov narašča s trajanjem inkubacije, vendar ostane nižje kot pri kontroli. Najvišje število znotrajceličnih kampilobaktrov smo zaznali 10 h po okužbi celic PSI ob dodatku izvlečkov SEE in hdSEE-R.

4.8 VPLIV RAZLIČNIH METOD INKUBACIJE CELIC PSI Z RASTLINSKIMI IZVLEČKI IN *C. jejuni* K49/4 NA ADHEZIVNOST *C. jejuni* K49/4

4.8.1 Protiadhezijska učinkovitost izvlečkov grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE) in oljčnih listov (OE) po različnih metodah inkubacije s *C. jejuni* K49/4 in celicami PSI



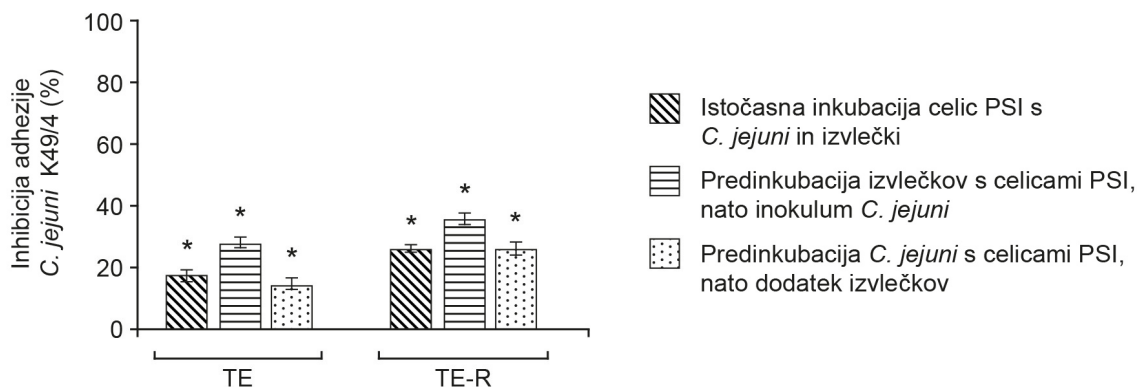
Slika 36: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI po različnih metodah inkubacije celic z GE in OE. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 36: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to PSI cells following different incubation treatment with GE and OE. The data are presented as percentage of inhibition of *C. jejuni* adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Da bi sklepali o možnem mehanizmu preprečevanja adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, smo v naslednjem poskusu uporabili različne metode predinkubacije celic PSI z izvlečki ali s *C. jejuni* K49/4. Pri GE smo uporabili koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$, pri ostalih izvlečkih pa 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (slika 36). Rezultati so potrdili približno 10 % inhibicijo adhezije ob sočasni inkubaciji celic *C. jejuni* K49/4 in GE, ki je še višja (> 20 %), ko smo GE 1h inkubirali s celicami PSI in nato dodali bakterijski inokulum. Po drugi strani, ko smo inkubirali *C. jejuni* K49/4 s celicami PSI pred dodatkom izvlečka GE, je bila bakterijska adhezija višja kot v kontrolnem vzorcu brez izvlečkov in višja kot v paralelnem poskusu, kjer so GE in *C. jejuni* bili istočasno inkubirani s celicami PSI.

Istočasna inkubacija celic PSI z OE in *C. jejuni* K49/4 je zmanjšala adhezivnost *C. jejuni* K49/4 za 20 %. Predinkubacija PSI z OE je rezultirala s 30 % zmanjšanjem adhezije *C. jejuni* K49/4, po predinkubaciji PSI s *C. jejuni* K49/4 je bila adhezija *C. jejuni* K49/4 na PSI boljše, kar je vidno iz slike 36, kot inhibicija adhezije z manj kot 20 %. Tako kot pri GE, je bila inhibicija adhezije največja v primeru, ko so celice PSI predinkubirane z izvlečki, najmanjša pa v primeru, ko so celice PSI predinkubirane s *C. jejuni* K49/4. Iz tega lahko sklepamo, da se GE in OE vežeta na receptorje na evkariontski celici, ter na ta način onemogočita vezavo bakterij na njihovo površino. Ne glede na metodo inkubacije je OE učinkoviteje inhibiral adhezijo *C. jejuni* K49/4 na celice PSI.

4.8.2 Protiadhezijska učinkovitost izvlečka timijana (TE) in njegovega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (TE-R) po različnih metodah inkubacije s *C. jejuni* K49/4 in celicami PSI

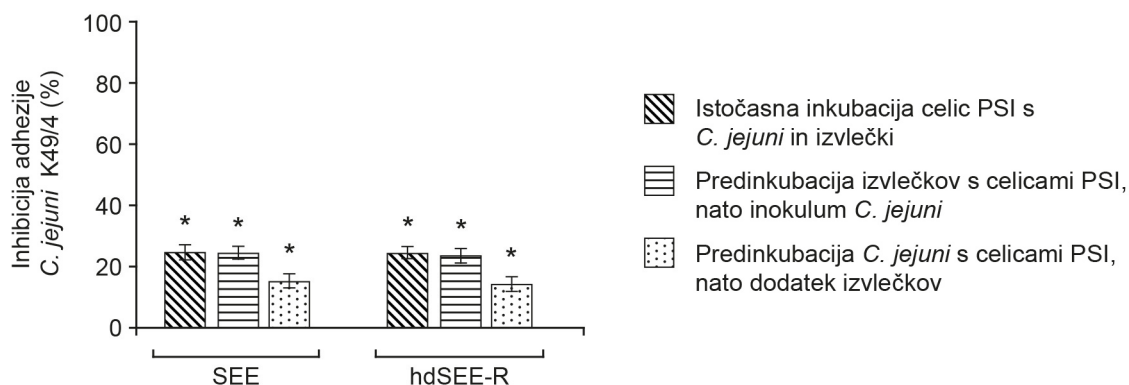


Slika 37: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI po različnih metodah inkubacije celic s TE in TE-R. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 37: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to PSI cells following different incubation treatment with TE and TE-R. The data are presented as percentage of inhibition of *C. jejuni* adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

Ko smo uporabili TE in TE-R, smo potrdili inhibicijo adhezije za več kot 20 %, zaradi istočasne inkubacije celic PSI s *C. jejuni* K49/4 in izvlečki. V primeru predinkubacije celic PSI s TE-R, je bila adhezija zmanjšana za celo 30 % in nekoliko manj pri uporabi TE (slika 37). Le malo boljša adhezija je dosežena zaradi predinkubacije celic PSI s *C. jejuni* K49/4 in nato z dodatkom TE. Po drugi strani je število adheriranih *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, po predinkubaciji celic PSI s *C. jejuni* K49/4 in nato z dodatkom TE-R, skoraj enako kot v paralelnem poskusu, kjer sta tako bakterijski inokulum kot TE-R dodana istočasno. Inhibicija adhezije je bila, ne glede na metodo predinkubacije, vedno večja pri TE-R. Z ozirom, da je bakterijska adhezija najbolj inhibirana v primeru, ko so bile celice PSI predinkubirane z izvlečki, sklepamo, da slednji najverjetneje vplivajo na celične receptorje.

4.8.3 Protiadhezijska učinkovitost izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) in njenega preostanka po hidrodestilaciji eteričnega olja (hdSEE-R) po različnih metodah inkubacije s *C. jejuni* K49/4 in celicami PSI



Slika 38: Inhibicija adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI po različnih metodah inkubacije celic s SEE in hdSEE-R. Rezultati so predstavljeni kot odstotek inhibicije adhezije glede na kontrolo. *, statistično značilna razlika ($p \leq 0,001$).

Figure 38: Inhibition of adhesion of *C. jejuni* K49/4 to PSI cells following different incubation treatment with SE and hdSEE-R. The data are presented as percentage of inhibition of *C. jejuni* adhesion. *, $p \leq 0.001$, versus control.

V poskusu z različnimi metodami predinkubacije smo najprej potrdili več kot 20 % inhibicijo adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI ob istočasnem dodatku bakterijskega inokuluma in izvlečkov SEE in hdSEE-R. Znižanje adhezije po predinkubaciji celic PSI s SEE ali hdSEE-R, je bilo pri obeh izvlečkih podobno in primerljivo z istočasnim dodatkom izvlečkov in bakterijskega inokuluma na celice PSI (slika 38). Po drugi strani je predinkubacija celic PSI z bakterijskim inokulumom rezultirala z boljšo bakterijsko adhezijo na evkarionsko celico v primerjavi s paralelnim poskusom, v katerem so bili tako bakterijski inokulum kot izvlečka dodani istočasno. Iz tega lahko sklepamo, da izvlečka SEE in hdSEE-R vplivata na celične receptorje in tudi na bakterijske adhezine.

5 RAZPRAVA

Kampilobakterioza je najpogostejša zoonoza po vsem svetu. Znanstveniki ocenjujejo, da je *Campylobacter* odgovoren za 80 - 90 % bakterijskih črevesnih nalezljivih obolenj (Epps in sod., 2013; EFSA (European Food Safety Authority) in ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014; Humphrey in sod., 2007). Bakterije *Campylobacter* vstopijo v telo s kontaminirano hrano oz. pijačo. Ko uspešno preidejo želodčno bariero, kolonizirajo distalni del tankega črevesa in debelo črevo (Guerry, 2007). *Campylobacter jejuni* najpogosteje kolonizira črevesje perutnine in kljub temu, da je njihov gastrointestinalni trakt neprijazno okolje, visoka stopnja okužb kaže, da so te bakterije sposobne prilagoditve na različne okoljske strese (Silva in sod., 2011). Kljub dejstvu, da so vrste rodu *Campylobacter* zelo pogosti bakterijski patogeni, je naše razumevanje mehanizmov njihove patogeneze in preživetja, za razliko od drugih patogenih bakterij, kot so vrste *Salmonella* in *Escherichia coli*, omejeno in še vedno slabo poznano (Bolton, 2015). Po eni strani je za to slabo razumevanje patogeneze odgovorno dejstvo, da je *C. jejuni* specifična bakterija, saj na primer ne vsebuje številnih toksinov in virulenčnih faktorjev, ki jih najdemo pri drugih patogenih bakterijah (Stahl in sod., 2014). Poleg tega je vloga številnih virulenčnih faktorjev, kot so polisaharidi kapsule (Day in sod., 2012; Guerry in Szymanski, 2008), lipooligosaharidi in proteini CadF (Konkel in sod., 1997), PEB1 (Pei in Blaser, 1993; Leon-Kempis in sod., 2006), JlpA (Jin in sod., 2001) in invazivni antigeni *Campylobacter* (Cia) (Dasti in sod., 2010; Neal-McKinney in Konkel, 2012; Rivera-Amil in sod., 2001; Samuelson in sod., 2013) raziskani *in vitro*, njihova vloga v patogenezi *in vivo* pa je večinoma neznana (Stahl in sod., 2014).

Medsebojni vpliv bakterij, črevesnega epitela in obrambnega odziva gostitelja so kritični dejavniki, ki določajo usodo bakterijskih okužb in izid bolezni (Kim in sod., 2010). Črevesne epitelne celice in mukozna plast imajo pomembno vlogo v obrambi in pred vdorom patogenih mikroorganizmov, saj delujeta kot fizična in biološka bariera, kjer se sproži lokalni imunski odziv. Konstantno sta izpostavljena prehranskim in okoljskim antigenom, komenzalnim bakterijam, ki ga naseljujejo in patogenim bakterijam. Integriteto epitelnega monosloja vzdržuje tvorba tesnih stikov, ki preprečuje spontano prehajanje bakterij skozi epitel in mukozno plast, ki vsebuje različne encime in protimikrobne snovi, kot so β - defenzini, kemokini itd. (Awad in sod., 2015; Mason in Huffnagle, 2009). Da bi se patogene bakterije izognile obrambnim mehanizmom gostitelja, vzpostavile infekcijo in razširile v globlja tkiva, so razvile različne strategije za premagovanje ovir.

Adhezija na črevesne epitelne celice je prvi pomembni korak za vzpostavitev katerekoli okužbe in predpogoj za invazijo patogenih bakterij v celice. Po vezavi *C. jejuni* na epitelne celice pride do povečane sinteze vnetnih citokinov, predvsem interleukina-8 (IL-8), kar povzroči infiltracijo neutrofilcev, aktivacijo makrofagov in proliferacijo T in B limfocitov (Masanta in sod., 2013). Histopatološke analize črevesnih biotipov ljudi (Chang in Miller, 2006), raziskave *in vivo* v živalskih modelih infekcije (Bereswill in sod., 2011; Vučković in sod., 1998) ter študije *in vitro* na črevesnih epitelnih celicah (Friis in sod., 2005; Gaňan in sod., 2010; Rubeša - Mihaljević in sod., 2007; Šikić Pogačar in sod., 2010) so jasno pokazale,

da je *C. jejuni* sposoben invadirati v črevesne epitelne celice. Znotraj epitelnih celic je *C. jejuni* sposoben preživeti in se množiti (Konkel in Cieplak, 1992; Rubeša - Mihaljević in sod., 2007; Watson in Galán, 2008). Ko je enkrat znotraj epitelnih celic, ima *C. jejuni* dostop do globljih tkiv in fagocitnih celic, znotraj katerih lahko preživi in se razširi po gostitelju, ter lahko privede do bakteriemije.

V živinoreji se že desetletja uporabljajo antibiotiki z namenom kontrole, preprečevanja in zdravljenja okužb ter za hitrejšo rast živali. Zaradi te intenzivne uporabe antibiotikov so, tako v živinoreji kot v okolju, bakterije rodu *Campylobacter* spp. postale odporne proti številnim antibiotikom (Epps in sod., 2013). Konstantno naraščanje pojavnosti okužb, povzročenih z odpornimi sevi *C. jejuni*, predstavlja resno zaskrbljenost na področju javnega zdravja. Okužbe, povzročene z odpornimi sevi *C. jejuni*, imajo ponavadi težji klinični potek bolezni (Zeitouni in sod., 2013). Zaradi vse težjega obvladovanja bolezni je postalo zmanjševanje kolonizacije perutnine s kampilobaktri primarni cilj (Aguiar in sod., 2013). Znanstveniki intenzivno raziskujejo nove spojine in metode, ki bi lahko preprečile kolonizacijo perutnine in posledično razvoj okužb pri človeku. Z različno stopnjo uspeha so tako do sedaj raziskovali uporabnost encimov ksilanaz (Fernandez in sod., 2000), bakteriofagov (Wagenaar in sod., 2005), bakteriocinov (Cole in sod., 2006; Stern in sod., 2006), fruktooligosaharidov in organskih kislin (Byrd in sod., 2001; Solis de los Santos in sod., 2010), antibiotikov (Farnell in sod., 2005) ter probiotikov (Callaway in sod., 2008). Ker se kampilobaktri z veliko afiniteto vežejo na epitel gastrointestinalnega trakta (Campbell in sod., 1987), se intenzivno iščejo snovi, ki bi preprečile njihovo vezavo, t.i. snovi s protiadhezijsko aktivnostjo (Klemm in sod., 2010). Na ta način bi se infekcija preprečila v samem začetku s preprečevanjem bakterijske vezave. Velika prednost oz. korist pri uporabi protiadhezijskih snovi je v tem, da ta pristop ni baktericiden in je zaradi tega manjša verjetnost širjenja odpornih bakterijskih vrst (Klemm in sod., 2010).

Po drugi strani so tudi potrošniki vse bolj ozaveščeni, zavedajo se slabosti konstantne uporabe zdravil, antibiotikov in se vse pogosteje obračajo k "alternativni" medicini pri iskanju rešitev za svoje težave. Želijo varno hrano brez ali z minimalno vsebnostjo kemijskih konzervansov, po možnosti naravnega izvora. Rastline so eden izmed možnih virov protiadhezijskih snovi. Slednje so kompleksna mešanica organskih biološko aktivnih snovi in zato predstavljajo velik potencial za odkrivanje doslej neznanih snovi (Petrovska, 2012; Roby in sod., 2013). Rastlinska eterična olja in izvlečki se že dolgo uporabljajo v aromaterapiji, kozmetiki, v proizvodnji hrane in pijač, vedno bolj pa tudi v medicinske namene in za konzerviranje hrane. Zaradi svojih bioloških aktivnosti so zelo aktualna tema številnih bioloških študij, ki iščejo alternativne načine za obvladovanje patogenih mikroorganizmov, saj so se izkazale kot dober vir protimikrobnih spojin. Po drugi strani predstavlja boljše poznavanje bakterijskih adhezinov, mehanizmov adhezije posameznih patogenov, odkrivanje in razvoj protiadhezijskih snovi, prihodnost protiadhezijske terapije. Snovi s protiadhezijsko aktivnostjo so bodisi specifične, kar pomeni, da ciljajo na točno določene bakterijske adhezine, bodisi široko spektralne protiadhezijske snovi, ki ciljajo na več adhezinov. V mnogih primerih poteka vezava mikroorganizmov na receptorje in ligande gostiteljske celice oz. tkiva preko ogljikovih hidratov oz. vezi protein-ogljikov hidrat (Sharon, 2006; Wang in sod., 2015). Iz tega razloga

predstavljajo ogljikovi hidrati in visoko glikozilirane spojine možne antiadhezivne snovi v boju proti patogenim mikroorganizmom in so potencialna funkcionalna hrana oz. aditivi h krmi v živinoreji.

Glavni namen doktorskega dela je bil najprej proučiti sposobnost translokacije *C. jejuni* K49/4 skozi 3D model črevesnega epitela tankega črevesa z uporabo celične linije PSI ter vpliv izvlečkov na adhezijo in invazijo le tega v celičnih linijah PSI in H4. Da bi sklepali o možnem mehanizmu delovanja izvlečkov, smo uporabili različne metode inkubacije celične linije s *C. jejuni* K49/4 in izvlečki, in sicer: (i) celice PSI smo izpostavili istočasno okužbi s *C. jejuni* K49/4 in izvlečkom v različnih koncentracijah, (ii) celice PSI smo predinkubirali z izvlečki in nato okužili s *C. jejuni* K49/4, (iii) celice PSI smo najprej okužili s *C. jejuni* K49/4 in nato izpostavili izvlečkom. Z različnimi metodami inkubacije smo želeli ugotoviti ali izvlečki delujejo na bakterijske adhezine, celične receptorje oz., če sploh vplivajo na adhezijo in invazijo *C. jejuni* K49/4 v celični monosloj.

5.1 PREHAJANJE BAKTERIJ *C. jejuni* K49/4 SKOZI MONOSLOJ EPITELNIH CELIC PSI IN NJIHOVO PREŽIVETJE ZNOTRAJ CELIC

3D modeli črevesnega epitela se vse pogosteje uporabljajo pri proučevanju vpliva bakterij na črevesje in imunski sistem, saj je celična polarnost zelo pomembna funkcionalna in zaščitna lastnost gastrointestinalnega sistema *in vivo* (Backert in Hofreuter, 2013). Polarizirane črevesne epitelne celice imajo apikalno in bazolateralno površino, ki sta ločeni s tesnimi in presledkovnimi stiki. Oblikujejo ščetkasto membrano oz. mikrovile na apikalni strani in izražajo več specifičnih markerskih proteinov. Številni pomembni črevesni patogeni kot so *Salmonella* spp., *Shigella* spp. in *Listeria* spp., so razvili mehanizme za prehajanje skozi epitelno pregrado in za dostop do submukoznih tkiv, sprožanje poškodb tkiva in povzročanje bolezni pri človeku. Translokacija skozi ne-fagocitne celice v črevesnem epitelu je ključni mehanizem, ki ga uporabljajo patogeni, da bi prišli do lamina proprije, kar je predpogoj za vzpostavitev sistemske okužbe (Ribet in Cossart, 2015). Na splošno, obstajata dva različna mehanizma prehajanja in sicer paracelularna in transcelularna transmigracija oz. pot (Tegtmeyer in sod., 2011). Patogeni, ki uporabljajo paracelularni mehanizem prehajanja, prehajajo v spodnja tkiva skozi prostor med sosednjimi celicami, torej, so sposobni premagati tesne in presledkovne stike. Po drugi strani, patogeni, ki prehajajo z uporabo transcelularnega mehanizma, invadirajo v gostiteljske celice na apikalni strani in pridejo skozi celico na bazolateralni strani (Balkovetz in Katz, 2003). Paracelularno prehajanje *C. jejuni* bi porušilo kompleksne medcelične povezave, s tem bi se povečala prepustnost celičnega monosloja, kar bi se tudi odražalo na izrazitem padcu TEER.

Na modelu črevesnega epitela, sestavljenega iz celic PSI, smo želeli ugotoviti ali so bakterije *C. jejuni* K49/4 sposobne preiti skozi epitelni sloj in kako hitro. Pogost način spremljanja vpliva invazivnih bakterij na epitelne celice v pogojih *in vitro* je merjenje TEER celične kulture. Zato smo v poskusu merili TEER polariziranih črevesnih epitelnih celic, ki nam je služil kot indikator integritete celičnega monosloja in translokacije *C. jejuni* K49/4 skozi

polarizirane celice PSI. Najprej smo preverili, kako se pri celicah PSI vzpostavlja TEER. TEER smo merili od nasaditve celic vse do 12-ega dne starosti celic. Slika 14 prikazuje kako TEER celic PSI s časom narašča. Celice PSI so imele podobno kinetiko rasti na poroznih filtrih, kot so jo opazili pri celicah Caco-2 (Brás in Ketley, 1999; Konkel in Cieplak, 1992; Murphy in sod., 2011), le da so dosegle višje vrednosti TEER in hitreje kot celice Caco-2. Naši rezultati so pokazali, da se po začetni vezavi *C. jejuni* K49/4 na polarizirani monosloj celic PSI, 24 h po infekciji, vrednosti TEER rahlo znižajo. Do ponovnega, bolj izrazitega padca TEER je prišlo 72 h po infekciji in sicer za več kot $500 \Omega/\text{cm}^2$, a le pri poskusu z adheriranim *C. jejuni* K49/4. Pri paralelnem poskusu z gentamicinom so bile vrednosti TEER podobne kot v kontrolnem vzorcu. Glede na izmerjene vrednosti TEER, naši rezultati kažejo, da imajo adherirane bakterije *C. jejuni* K49/4 večji vpliv na integriteto celičnega monosloja kot invadirane (Slika 14). Slednje je najverjetneje posledica replikacije *C. jejuni* K49/4 na površini celic PSI, zaradi česar je prišlo do motenj v presnovni aktivnosti v črevesnem mikrookolju ter porušena medcelična integriteta polariziranega črevesnega epitela (Šikić Pogačar in sod., 2010). Naši rezultati se skladajo z ugotovitvami ostalih študij, kjer so opazili le blago znižanje TEER 24 h po infekciji polariziranega celičnega monosloja v primerjavi s kontrolnim vzorcem (neinficiranim polariziranim celičnim monoslojem) (Brás in Ketley, 1999; Konkel in sod., 1992; Louwen in sod., 2012; Murphy in sod., 2011). Brás in Ketley (1999) ter Louwen s sod. (2012) so zaključili, da le blago znižanje TEER v prvih 24 urah od infekcije nakazuje, da *C. jejuni* skozi polarizirani celični monosloj prehaja transcelularno s transcitozo (endocitoza na apikalni in eksocitoza na bazolateralni strani), glede na to, da so tesni stiki med celicami ostali v prisotnosti *C. jejuni* intaktni. Po drugi strani smo opazili, v paralelnem poskusu z gentamicinom, le blago znižanje TEER v primerjavi z neinficirano kontrolo, zato sklepamo, da ko je *C. jejuni* K49/4 znotraj evkariontske celice, nima več vpliva na medcelično integriteto in se lahko diseminira po gostitelju (Šikić Pogačar in sod., 2010).

Edina študija, v kateri so uporabili prašičje enterocite in sicer IPEC-1, je študija Murphy in sod. iz leta 2011, kjer so ugotovili, da znižanje TEER dobro korelira s povečanjem transcitoze *C. jejuni* skozi epitelni monosloj. Zanimivo je, da obstajajo tudi študije, ki podpirajo paracelularno prehajanje *C. jejuni* skozi polarizirani celični monosloj brez znižanja TEER. Ena izmed študij, ki podpira paracelularni mehanizem, je študija Boehmova in sod. iz leta 2012. V njeni študiji je bil *C. jejuni* sposoben zelo hitro prehajati skozi celični monosloj rakastih celic želodca MKN-28, saj so ga že v prvih 15-30 minutah po infekciji s *C. jejuni* določili pod filtrom oz. na bazolateralni strani celičnega monosloja. Ker so v isti študiji bakterije znotraj celične kulture opazili šele 4-6 h po infekciji, ta opažanja podpirajo paracelularno prehajanje *C. jejuni* skozi celični monosloj in izključujejo transcelularni mehanizem prehajanja. V isti študiji so nadalje pokazali, da je HtrA proteaza prisotna v supernatantu, ki v pogojih *in vitro* "reže" ekstracelularno NTF domeno E-kaderina med epitelnimi celicami, čeprav točnega mesta na E-kaderinu še niso ugotovili in je predmet raziskav. Avtorji predlagajo, da je tekom infekcije odstranitev NTF domene na E-kaderinu strogo kontrolirana, začasna in lokalna, ter da bakterije začnejo izločati HtrA v supernatant šele, ko vstopijo v medcelični prostor. Ker epitelne celice konstantno sintetizirajo nove beljakovine E-kaderina, se odstranjene beljakovine hitro nadomestijo. Ta hipoteza tudi

razlaga, zakaj ne pride do značilnega padca TEER pri prehajanju *C. jejuni* skozi polarizirani monosloj, saj *C. jejuni* "zapira vrata za seboj".

V naši študiji smo zasledili bakterije v mediju pod filtrom 3 h po infekciji polariziranega celičnega monosloja PSI (Preglednica 7) (Šikić Pogačar in sod., 2010). Naši rezultati so potrdili rezultate študije Konkel in sod. (1992), kjer so ugotovili, da je do največje stopnje translokacije prišlo že 4 h po infekciji polariziranih celic Caco-2. Zanimivo je, da v študiji Rees in sod. (2008), s prav tako polariziranimi celicami Caco-2, kampilobaktrov na bazolateralni strani celic niso zaznali prej kot 8 h po infekciji. V svoji študiji je Louwen s sod. (2012), pokazal, da prisotnost gangliozidom podobnega LOS omogoča še boljše prehajanje *C. jejuni* skozi polarizirani monosloj celic Caco-2.

Rezultati naše študije podpirajo transcelularni mehanizem prehajanja *C. jejuni* skozi polarizirani celični monosloj. Vendar glede na študijo Boehme s sod. (2012), ne moremo popolnoma izključiti tudi paracelularnega prenosa *C. jejuni*, kar bi bilo zanimivo v prihodnosti tudi preveriti. V večjem številu in dlje časa so bile prisotne bakterije v paralelnem poskusu, kjer nismo uporabili gentamicina, kar nakazuje na kontinuirano prehajanje adheriranega *C. jejuni* skozi epitelni monosloj. Kljub temu pa 24 h po infekciji na bazolateralni strani bakterij ni bilo več mogoče zaslediti, kar je najverjetneje posledica inkubacije v mediju za celične kulture ter v pogojih, ki niso idealni za tega patogena, ampak za celične kulture.

5.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R

Pred glavnim poskusom protiadhezijske učinkovitosti izbranih izvlečkov smo najprej testirali protimikrobno delovanje izvlečkov in s tem približno določili koncentracijsko območje za testiranje protiadhezijske aktivnosti izvlečkov. Sklepamo, da so za protimikrobno delovanje izvlečkov v naši študiji v največji meri odgovorne fenolne spojine. Že od nekdaj je znano, da imajo rastlinski izvlečki, bogati s fenolnimi spojinami in eterična olja, protimikrobno delovanje. Zato se tudi konstantno raziskuje nove rastline in rastlinski izvlečki oz. eterična olja ter preverja njihovo protimikrobno delovanje. Največ zanimanja med polifenoli so pritegnili flavan-3-oli, flavonoli in tanini, predvsem zaradi svojega širokega spektra delovanja in boljše protimikrobne aktivnosti. Poleg tega večina flavan-3-olov, flavonolov in taninov zavira številne virulencne dejavnike patogenih mikroorganizmov (kot npr. preprečitev nastajanje biofilmov in vezave na gostiteljsko celico, nevtralizacija bakterijskih toksinov), obenem delujejo sinergistično z antibiotiki (Daglia, 2012).

Zaradi celične zgradbe je protimikrobno delovanje izvlečkov oz. fenolnih spojin bolj izraženo pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Cueva in sod., 2010; Valsaraj in sod., 1997). Verjetni mehanizem protimikrobnega delovanja fenolnih kislin predstavlja močno zakisanje v perimembranskem prostoru (Vattem in sod., 2005), zaradi sproščanja H^+ ionov fenolnih kislin (Choi in Gu, 2001). Zaradi zakisanja pride do sprememb v membranskem potencialu patogenih bakterij, zaradi česar se poveča njena permeabilnost ter vpliva tudi na Na-K

črpalko, ki je vključena v sintezo ATP (Vattem in sod., 2005). Ta mehanizem pojasnjuje večjo občutljivost po Gramu pozitivnih bakterij na fenolne spojine z ozirom, da slednje nimajo zunanje membrane, zaradi česar bolj prepuščajo fenolne spojine, kar privede do znotrajceličnega zakisanja in do ireverzibilnih sprememb Na⁺-K⁺ ATP-aznih črpalk, ki povzroči celično smrt. Glede na študijo Valsaraj in sod. iz leta 1997, v kateri so pregledali 78 različnih rastlinskih izvlečkov, se nam je zdelo zanimivo preveriti protimikrobno delovanje izvlečkov v koncentracijskem območju 1-10mg/ml v končni raztopini. Iz tega razloga smo v naši študiji začeli z najvišjo testirano koncentracijo izvlečkov pri 10 mg/ml, ki smo jo nižali vse do 0,02 mg/ml.

Natančen mehanizem protimikrobnega delovanja vina še ni popolnoma znan, vendar so študije *in vitro* že pokazale, da so za protimikrobno delovanje vina delno odgovorni etanol in organske kisline (predvsem vinska, jabolčna, mlečna in očetna kislina) (Boban in sod., 2010). V vinu so najbolj zastopane kisline jabolčna in vinska, njihovo protimikrobno delovanje pa je še bolj izraženo pri nizkih vrednostih pH, kot so v vinu (Carneiro in sod., 2008). V največji meri je za protimikrobno delovanje vina odgovorno sinergično delovanje etanola, organskih kislin ter nizke vrednosti pH. Carneiro s sod. je leta 2008 v svoji študiji pokazal, da so imele organske kisline protimikrobno delovanje proti *C. jejuni* le v kombinaciji z etanolom (Carneiro in sod., 2008). V naši študiji smo uporabili izvleček tropin po stiskanju grozdja sorte Modri pinot (GE). Tropine kot stranski produkt v predelavi vina predstavljajo ceneni izvor farmakološko aktivnih snovi. Sestavljene so večinoma iz grozdnih pečk, kožic in pecljev ter so bogat vir taninov, ki so odgovorni za astringentni okus vina. Tanini so ligandi, ki lahko tvorijo topne in netopne komplekse z beljakovinami in polisaharidi ter vežejo nase kovinske ione (Scalbert, 1991). Protimikrobno delovanje, zaradi vezave železa in keliranja esencialnih kovinskih ionov, je v literaturi zelo dobro opisano (Scalbert, 1991). V svoji študiji so Nagayama in sod. leta 2002 pokazali, da so kampilobaktri zelo občutljivi za florotanine, ki so jih izolirali iz rjavih alg (*Ecklonia kurome*). Protimikrobno delovanje so pripisali vezavi taninov na celične beljakovine in encime (Nagayama in sod., 2002). Tanini se vežejo tudi na prehranske beljakovine in aminokisline, kar pomeni pomanjkanje esencialnih hranil za bakterije (Anderson in sod., 2012). Rezultati naše študije so pokazali, da je imel GE pri koncentraciji 1,25 mg/ml minimalno inhibitorno delovanje proti *C. jejuni* K49/4, saj je prišlo le do 22 % inhibicije bakterijske rasti. Rezultati protimikrobnega delovanja v naši študiji so bili podobni drugim študijam, v katerih so testirali vino in grozdne kožice (Gaňan in sod., 2009) na različnih patogenih mikroorganizmih iz hrane (Katalinić in sod., 2013). Nedavno so Gaňan in sod. (2012) odkrili, da nekatere fenolne spojine, ki so prisotne v vinu in v stranskih produktih pridelave vina, značilno zmanjšajo živost kampilobaktrov glede na uporabljeno koncentracijo. Tudi Silván in sod. so v študiji iz leta 2013 proučevali protimikrobno delovanje izvlečka iz grozdnih pečk proti različnim sevom *C. jejuni*. Rezultati študije so pokazali močno inhibicijo rasti kampilobaktrov zaradi izvlečka iz grozdnih pečk (Silván in sod., 2013). Zanimivo je, da so v študiji Timothe s sod. iz leta 2007, glede na vrsto grozdja, potrdili večjo ali enako inhibicijo rasti *S. mutans* z izvlečkom iz grozdnih tropin kot iz grozdnih jagod, kljub temu, da je bila vsebnost fenolnih spojin v vzorcih različna (Timothe in sod., 2007).

Zaradi visoke vsebnosti fenolnih spojin so oljčni listi, kot stranski produkt pridelave oljčnega olja, pritegnili veliko pozornost. Glavna fenolna spojina v listih oljke je oleuropein, sledijo mu: verbaskozid, luteolin-7-*O*-glukozid, tirozol, hidroksitirozol in apigenin-7-glukozid (Lee in Lee, 2010). Na njihovo vsebnost v končnem izvlečku vplivajo tudi priprava ter sušenje listov (Ahmad-Qasen in sod., 2013). Fenolne spojine iz oljčnih listov imajo antioksidativno (Somova in sod., 2003) in protimikrobno delovanje proti *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* (Sudjana in sod., 2009). V študiji Lee in Lee (2010) navajata, da je imelo protimikrobno delovanje izvlečka iz oljčnih listov večji protimikrobni učinek kot posamezne izolirane fenolne spojine, zaradi aditivnega in sinergističnega delovanja mešanice fitospojin, ki so prisotne v izvlečkih. V študiji Pereira in sod. iz leta 2007 so ugotovili, da visoka vsebnost oleuropeina in drugih spojin prispeva k boljšemu protimikrobnemu delovanju izvlečka iz oljčnih listov (Pereira in sod., 2007). Za hidroksitirozol in oleuropein so že ugotovili, da delujeta inhibitorno proti večim humanim respiratornim in črevesnim patogenom, kot so *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* (Bisignano in sod., 1999). Oljčni listi naj bi bili koristni pri daljši uporabi antibiotikov, ker bi lahko preprečili razvoj oportunističnih patogenov, saj so se v študiji Neu iz leta 1992 pokazali kot zelo uspešni pri preprečevanju rasti patogenov iz rodov *Klebsiella* in *Pseudomonas*, dveh rodov, ki predstavljata velik problem zaradi razvoja odpornosti proti antibiotikom (Neu, 1992). Natančen mehanizem protimikrobnega delovanja oleuropeina in sorodnih spojin še ni znan, najverjetneje delujejo kot površinsko aktivne snovi, ki vplivajo na celično membrano. Oleuropein lahko stimulira fagocitozo patogenih mikroorganizmov, pri virusih pa vpliva na sintezo aminokislin in na ta način preprečuje širjenje virusov in inhibira njihovo replikacijo (Soler-Rivas in sod., 2000). Tudi v naši študiji smo z metodo mikrodilucije potrdili minimalno inhibitorno koncentracijo za *C. jejuni* K49/4 pri 1,25 mg/ml, pri kateri je prišlo do 15 % inhibicije rasti populacije kampilobaktrov, kar je primerljivo z drugimi izvlečki, bogatimi s fenolnimi spojinami (Katalinić in sod., 2013). Naši rezultati so potrdili rezultate študije Sudjana in sod. iz leta 2009, kjer so določili vrednosti MIK za izvleček oljčnih listov za *C. jejuni* med 0,3 in 2,5 mg/ml (Sudjana in sod., 2009). Razpon vrednosti MIK je posledica uporabe različnih kultivarjev oljk v tej študiji.

Timijan je še ena mediteranska rastlina oz. dišavnica, ki predstavlja bogat vir fenolnih spojin, predvsem luteolin-7-*O*-glukuronida, apigenin-7-*O*-glukuronida in rožmarinske kisline ter njenih derivatov. Le malo študij obstaja, kjer se uporablja izvleček timijana, bolj pogosta je uporaba eteričnega olja z namenom protimikrobnega ali antioksidativnega delovanja. Glavni spojini eteričnega olja timijana sta timol in karvakrol in sta tudi v največji meri odgovorna za protimikrobno delovanje eteričnega olja (Juven in sod., 1994). Kemijska analiza TE in TE-R je pokazala zelo podobno vsebnost luteolin-7-*O* glukuronida, apigenin-7-*O*-glukuronida in rožmarinske kisline, vendar je bila vsebnost luteolin-7-*O* glukuronida in apigenin-7-*O*-glukuronida nekoliko nižja v TE (Šikić Pogačar in sod., 2015b). V študiji iz leta 2008 so v 27 vzorcih timijana določili 3,25 – 14,47 mg/g luteolin-7-*O* glukuronida, 11,04 – 35,31 mg/g rožmarinske kisline (Fecka in Turek, 2008). V naši študiji je, glede na vrednost MIK, imel TE zmerno protimikrobno delovanje, primerljivo z drugimi rastlinskimi izvlečki (Klančnik in sod., 2012a). TE-R je imel nižjo MIK v primerjavi s TE in tudi večji vpliv na rast *C. jejuni*

K49/4, kar glede na zelo podobno sestavo dveh izvlečkov očitno ni posledica spojin, ki so v izvlečku prisotne v najvišjih koncentracijah. Pri koncentracijah, ki so bile večje od MIK, je TE-R bistveno bolj inhibiral rast *C. jejuni* K49/4. Verjetno so se v TE-R še bolj koncentrirale nehlapne spojine, ki so v TE prisotne v manjših koncentracijah in so tudi te odgovorne za protimikrobno delovanje izvlečka (Šikić Pogačar in sod., 2015b). Obenem tudi sinergističnega delovanja nehlapnih spojin z glavnimi fenolnimi spojinami izvlečka ne moremo zanemariti. Tako kot pri OE smo tudi s TE-R potrdili, da protimikrobna aktivnost ni zmanjšana v odpadnem materialu, ki ostaja po destilaciji eteričnega olja (Šikić Pogačar in sod., 2015b).

V naši študiji smo preverili tudi protimikrobno delovanje SEE in hdSEE-R, dveh izvlečkov pridobljenih iz rastline *Alpinia katsumadai*, bogatih s fenolnimi spojinami. Kemijska analiza hdSEE-R je pokazala podobno sestavo glavnih spojin kot v izhodiščnem izvlečku SEE, le njihova koncentracija je bila v odpadnem materialu nekoliko nižja, kar je lahko posledica razgradnje glavnih fenolnih spojin v procesu hidrodestilacije (Klančnik in sod., 2012a). Vendar, glede na vrednosti MIK ter zmerno do izrazito protimikrobno delovanje SEE in hdSEE-R proti *C. jejuni* K49/4 smo v naši raziskavi pokazali, da hidrodestilacija ni zmanjšala bioaktivnosti hdSEE-R (Šikić Pogačar in sod., 2015a). Ostale študije so pokazale različno protimikrobno delovanje eteričnega olja drugih vrst *Alpinia*, so pa imele višje vrednosti (MIK do 28,6 µg/ml) ali so bile celo brez kakršnegakoli protimikrobnega delovanja (Santos in sod., 2012; Yusoff in sod., 2011). V naši študiji sta imela najbolj izrazito protimikrobno delovanje izvlečka SEE in hdSEE-R, njihovo protimikrobno delovanje pa je bilo primerljivo z drugimi rastlinskimi izvlečki, npr. grozdnih kožic (Katalinić in sod., 2013). Tudi v študiji Oonmetta-aree in sod. iz leta 2006 so določili podobno vrednost MIK izvlečka *Alpinia galanga* Linn., in sicer za *S. aureus* je bila vrednost MIK 0,325 mg/ml (Oonmetta-aree in sod., 2006). Pri hdSEE-R smo ponovno pokazali, da je lahko ostanek po destilaciji eteričnega olja, zaradi svoje kemijske sestave in visoke vsebnosti fenolnih spojin, surovina, ki jo je možno še naprej izkoristiti. Izvlečki GE, OE, TE in SEE vsebujejo tudi eterična olja, za katera je znano, da če so dodana v koncentraciji, ki inhibira bakterijsko rast, povzročajo spremembe v sestavi maščobnih kislin membrane, povečajo prepustnost zunanje membrane pri po Gramu negativnih bakterijah, zaradi česar pride do izgube ionov in komponent, ki so vezane na zunanjo membrano bakterij (Solórzano-Santos in Miranda-Novales, 2011).

5.3 CITOTOKSIČNOST IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R

Pri oceni potencialne uporabnosti rastlinskih izdelkov, tudi pri rastlinah, ki se že tradicionalno uporabljajo, je potrebno preveriti njihove možne toksične učinke (McGraw in sod., 2007). Iz tega razloga, da ne bi imeli naši izvlečki citotoksično delovanje, kar bi nam lahko dalo lažno pozitivne rezultate pri testu protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov, smo na izbranih celičnih linijah (PSI in H4) testirali tudi citotoksičnost in po testiranju dokončno določili koncentracijsko območje za testiranje protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov. Citotoksičnost na celičnih linijah PSI in H4 smo določali z dvema metodama, in sicer z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega ter z metodo, ki jo je opisal Mossmann (1983) in temelji na uporabi raztopine MTT.

Pri vrednosti MIK ali nižjih koncentracijah pri testiranju citotoksičnosti izvlečka GE na celicah PSI nismo zaznali nobene citotoksičnosti. Le najvišja koncentracija GE (5 mg/ml) je uničila 30 % celic PSI. Pri vrednosti MIK je bila citotoksičnost GE za celice H4 < 10 %, pri nižjih koncentracijah GE ni bil toksičen za slednje celice. Tudi pri ostalih izvlečkih OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R, koncentracije, ki so nižje kot MIK niso povzročile nobene citotoksičnosti na celični kulturi PSI. Pri celicah H4 so izvlečki GE, OE in TE pri koncentracijah, nižjih od MIK, povzročili le < 10 % citotoksičnosti. Slednje so torej bile bolj občutljive kot PSI za izvlečke GE, OE in TE, kar je najverjetneje posledica strukturnih in funkcionalnih razlik na celični površini in posledično večje občutljivosti celic H4 za aktivne spojine v uporabljenih izvlečkih. Izvlečki TE-R, SEE in hdSEE-R imajo tako nizke vrednosti MIK, da pri slednji koncentraciji niso povzročili nobene toksičnosti na celicah H4. Citotoksičnost izvlečkov v različnih študijah je težko primerjati, predvsem zaradi zelo velikih razlik v kemijski sestavi izvlečkov pripravljenih iz različnih rastlin ter tudi zaradi manjšega števila študij, kjer so citotoksičnost testirali na celičnih linijah ne-karcinogenega izvora (Šikić Pogačar in sod., 2015a; Šikić Pogačar in sod., 2015b). V podobni študiji iz leta 2011 so Bensch in sod. testirali citotoksičnost in protiadhezijsko učinkovitost 21 rastlinskih izvlečkov. V študiji so uporabili celice humanega adenokarcinoma HT-29, zaradi česar je težko primerjati njihovo študijo z našo. V študiji Bensch s sod. (2011) so izvlečki povzročili < 20 % citotoksičnost na celicah HT-29; od teh je polovica izvlečkov (*C. officinalis*, *M. recutita*, *E. angustifolia*, *E. purpurea*, *Z. officinale*, *H. canadensis*, *G. glabra*, *P. incarnata*, *T. impetiginosa*, *S. marianum* in *C. longa*) kazala manj kot 10 % citotoksičnosti pri koncentraciji 5 mg/ml. V naši študiji pa je tako visoka koncentracija (5 mg/ml) povzročila najmanj 30 % citotoksičnost in največ 70 % na obeh celičnih linijah ne-karcinogenega izvora, kar med drugim kaže na večjo občutljivost celic ne-karcinogenega izvora. Vendar uporaba ne-karcinogene celične linije vsekakor daje boljši vpogled in predstavlja boljši model za proučevanje citotoksičnosti rastlinskih izdelkov/izvlečkov na zdravih celicah ter tudi za proučevanje interakcij patogen – enterocit.

Natančen mehanizem citotoksičnosti izvlečkov ni znan, vsekakor pa je obseg citotoksičnosti poleg celične kulture, odvisen od kemijske sestave izvlečkov. Toksičnost je kompleksen pojav in je lahko posledica direktne celične poškodbe, fiziološkega učinka na membranski transport, vnetnega delovanja itd. (Freshney, 2011). Vrednosti IC₅₀ so za vse uporabljene izvlečke okrog 5 mg/ml na celicah PSI, kar je dokaj visoka vrednost in je rezultat nizke koncentracije "aktivnih, citotoksičnih" spojin v izvlečku. Sklepamo, da bi se citotoksičnost zelo povečala, če bi na celični kulturi testirali le določene frakcije izvlečkov, oz. če bi izolirali in testirali posamezne aktivne spojine iz izvlečkov. Uporabljeni izvlečki GE, OE, TE in SEE vsebujejo še hlapne komponente, glede na to, da pri njih nismo odstranili eterično olje. Te hlapne sestavine izvlečka prispevajo k znatni citotoksičnosti, saj povzročajo kot lipofilne spojine, razpad membranskih struktur in depolarizacijo mitohondrijske membrane (Bakkali in sod., 2008). Znano je tudi, da eterična olja delujejo kot pro-oksidanti, ki lahko vplivajo na različne membranske strukture znotraj evkariontske celice (kot je npr. mitohondrij). Odvisno od vrste izvlečka in vsebnosti eteričnega olja, imajo lahko slednji citotoksično delovanje na žive celice, vendar večinoma niso genotoksična (Burt, 2004).

5.4 PROTIADHEZIJSKO DELOVANJE IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R PRI RAZLIČNIH METODAH INKUBACIJE VZORCEV

Glavni cilj, ki smo si ga postavili v tej doktorski nalogi, je bil preveriti, če izbrani izvlečki lahko preprečijo vezavo *C. jejuni* K49/4 na črevesne epitelne celice PSI in H4. V predposkusih smo z metodo mikrodilucije določili MIK vrednosti za uporabljene izvlečke: za GE, OE in TE 1,25 mg/ml; za TE-R 0,625 mg/ml; za hdSEE-R 0,5 mg/ml in za SEE 0,25 mg/ml. Pri koncentracijah manjših od 0,625 mg/ml na celicah PSI in H4 nismo zaznali nobene citotoksičnosti izvlečkov. Torej, po preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov proti *C. jejuni* K49/4 in citotoksičnosti izvlečkov na celičnih linijah PSI in H4, smo v poskusu protiadhezijske učinkovitosti izvlečkov GE, OE, TE in TE-R uporabili koncentracijski razpon od 0,2 do 200 µg/ml, kar je vsaj 6 krat nižja koncentracija od MIK za izbrane izvlečke. Pri SEE in hdSEE-R smo se odločili za nekoliko nižji koncentracijski razpon, in sicer od 0,2 do 50 µg/ml, kar je vsaj 10 krat nižja koncentracija od MIK za ta dva izvlečka. Za vse proučevane izvlečke smo ugotovili stabilno protiadhezijsko delovanje, ki se ni spreminjalo značilno znotraj izbranega koncentracijskega območja, kar je pomembna lastnost, saj kaže njihovo potencialno uporabnost za različne namene (Šikić Pogačar in sod., 2015a; Šikić Pogačar in sod., 2015b).

Rastline predstavljajo dragocen vir bioaktivnih spojin, vendar je le malo študij, ki so raziskovale njihove protiadhezijske lastnosti. Z namenom preprečevanja adhezije *C. jejuni* na različne celične kulture so tako že uporabili izvleček sadeža okra (*Abelmoschus esculentus*), eterično olje pomaranče, izvleček akacije (*Acacia farnesiana*) (Bensch in sod., 2011; Castillo in sod., 2011; Lengsfeld in sod., 2007). Prav tako so uporabili manoproteine, različne oligosaharide in visokomolekularne snovi kot so polisaharidi (pektin, arabinogalaktani, ramnogalakturonani, fukani itd.) (Gaňan in sod., 2009; Wang in sod., 2015; Wittschier in sod., 2007). Uporaba protimikrobnih snovi in snovi s protiadhezijskim delovanjem v nižjih koncentracijah je primernejša kot uporaba konvencionalnih protimikrobnih snovi, ki so specifično narejene, da po vstopu v gostitelja, lahko preidejo skozi zunanjo bakterijsko membrano (Krachler in Orth, 2013). Protimikrobna zdravila, ki povzročijo sproščanje bakterijskih toksinov in endotoksinov, imajo tudi škodljiv učinek na zdravje bolnika (Rogers in Paton, 2009). Zato je glavna prednost pri uporabi protiadhezijskih snovi v tem, da nimajo protimikrobnega delovanja in je zato razvoj odpornosti malo verjeten, saj ne vplivajo na fiziologijo ali metabolizem patogena (Ofek in sod., 2003). Specifični mehanizem adheriranja ali invadiranja, ki ga uporabljajo kampilobaktri, še ni popolnoma jasen, čeprav bo nedavno sekvenciranje celotnega genoma *C. jejuni* zagotovo olajšalo natančno opredelitev procesa in tarčnih molekul (Gaňan in sod., 2012).

Številne študije so pokazale, da ima zmerno pitje vina ugodno delovanje na zdravje ljudi, predvsem zaradi visoke vsebnosti polifenolov v grozdju, oz. še posebej v kožicah in pečkih (Daglia in sod., 2010; Gaňan in sod., 2012; Palombo, 2011). Dealkoholizirano rdeče vino je v študiji Daglia s sod. iz leta 2010, uspešno preprečilo adhezijo *S. mutans* na s slino prevlečene diske iz hidroksiapatita. Slednje je testirano pri koncentracijah, kjer ni bilo protimikrobnega

učinka in je zmanjšana adhezija posledica vezave na receptorje na diskih iz hidroksiapatita in/ali modificiranja bakterijskih adhezinov (Daglia in sod., 2010). Še bolj zanimiva je študija Timothe in sod. iz leta 2007, v kateri so testirali ekstrahirane polifenole iz grozdnih tropin na številnih virulenčnih faktorjih *S. mutans* in pokazali, da je preprečevanje rasti biofilma odvisno od vsebnosti polifenolov v izvlečku. Slednje ima velik pomen za živilsko industrijo, kjer pri predelavi surovin nastajajo številni odpadni produkti oz. stranski proizvodi (Timothe in sod., 2007). V naši študiji je GE pokazal slabšo protiadhezijsko aktivnost v primerjavi z ostalimi izvlečki, kar bi se najverjetneje izboljšalo z uporabo le določenih frakcij izvlečka ali posameznih aktivnih komponent. Kljub slabšemu protiadhezijskemu delovanju GE, je njegova uporaba zanimiva pri preprečevanju okužb povzročenih s *C. jejuni*. Čeprav so že objavljene študije, kjer so uporabili fenolne spojine rastlinskega izvora (Bensch in sod., 2011; Friedman in sod., 2002; Nannapaneni in sod., 2009), nismo zasledili nobene študije, v kateri bi uporabili izvleček iz odpadne pogače po stiskanju grozdja.

V naši študiji smo pokazali učinkovito preprečevanje adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI z izvlečki OE, TE in TE-R, in sicer za okrog 30 % v koncentracijskem razponu od 0,78 – 200 µg/ml, kjer ni protimikrobnega delovanja izvlečkov in ne citotoksičnosti za celični liniji. Predvsem je zanimivo boljše protiadhezijsko delovanje odpadnega materiala OE in TE-R v primerjavi s TE pri nizkih koncentracijah izvlečkov (Šikić Pogačar in sod., 2015b). Prav tako nismo zasledili študij, ki bi preverile protiadhezijske lastnosti izvlečka semen *A. katsumadai*. Tudi pri tem izvlečku smo pokazali dobro protiadhezijsko aktivnost odpadnega materiala (hdSEE-R) po hidrodestilaciji eteričnega olja, ki se ponavadi zavrže in ostane neizkoriščeno. Slednje nakazuje, da za protiadhezijsko delovanje izvlečka niso pomembne le hlapne snovi, temveč tudi ostale snovi, ki ostanejo v odpadnem materialu po hidrodestilaciji eteričnega olja (Šikić Pogačar in sod., 2015a). V naši študiji sta SEE in hdSEE-R imela najbolj izraženo protiadhezijsko delovanje, predvsem pri nižjih koncentracijah. Toivanen s sod., je leta 2011 proučeval protiadhezijsko delovanje različnih polifenolnih frakcij in je dokazal, da je visoka vsebnost fenolnih snovi dober indikator bioaktivnosti (Toivanen in sod., 2011). V naši študiji je imel večjo vsebnost fenolnih spojin izvleček SEE, vendar glede na primerljivo protiadhezijsko delovanje hdSEE-R, predvidevamo, da poleg fenolnih snovi prispevajo k protiadhezijski učinkovitosti izvlečkov tudi druge snovi (Šikić Pogačar in sod., 2015a). Sklepamo, da je protiadhezijska učinkovitost naših izvlečkov rezultat sinergističnega delovanja različnih spojin v izvlečku (Šikić Pogačar in sod., 2015a). Flavonoidi, kot je na primer pinocembrin, lahko potencirajo protiadhezijsko delovanje izvlečkov. V študiji iz leta 2011, so na primer Lavigne in sod. dokazali, da propolis, ki vsebuje pinocembrin, še dodatno izboljša protiadhezijski učinek proantocianidinov v preprečevanju adhezije uropatogene *E. coli* (Lavigne in sod., 2011).

Z namenom proučevanja mehanizma vezave *C. jejuni* K49/4 na celice PSI, smo v nadaljevanju raziskave uporabili različne metode predinkubacije celic z izvlečki ali s *C. jejuni* K49/4. Pri izvlečku GE je istočasna inkubacija celic PSI z izvlečkom in bakterijskim inokulumom zmanjšala vezavo *C. jejuni* K49/4 za celice PSI. Verjetna razlaga je direkten učinek GE na celične receptorje, na katere bi se *C. jejuni* vezal, kot sta predlagala Krachler in Orth pri mutantih, odpornih proti antibiotikom (Krachler in Orth, 2013). Vezava *C. jejuni*

K49/4 na celice PSI je bila še bolj inhibirana v vzporednem poskusu, v katerem smo celično kulturo predinkubirali s GE in nato dodali bakterijski inokulum. Ti rezultati nam še dodatno potrjujejo vezavo GE na receptorje epitelnih celic. Tudi pri OE, TE in TE-R smo prišli do podobnih ugotovitev. Ko smo na celično kulturo PSI istočasno dodali izvlečke in bakterijski inokulum, je bila vezava *C. jejuni* K49/4 manjša kot v kontroli. Ko smo celice predinkubirali z izvlečki, je bila vezava *C. jejuni* K49/4 na evkariontsko celico še slabša, vendar še vedno bolj izrazita kot v primeru, ko sta bila izvleček in bakterijski inokulum dodana istočasno. Iz tega sklepamo, da OE, TE in TE-R vplivajo na receptorska mesta na evkariontski celici. Ponovno smo potrdili dobro biološko aktivnost odpadnega materiala (OE in TE-R) in tudi primerljivo biološko aktivnost kot v izhodiščnem materialu (TE). Slednji rezultati potrjujejo potencial odpadnega materiala za njihovo uporabo v novih strategijah preprečevanja okužb. Pri SEE in hdSEE-R je predinkubacija celic z izvlečki povzročila podobno inhibicijo vezave *C. jejuni* K49/4 kot v paralelnem poskusu, kjer sta bakterijski inokulum in izvleček dodana istočasno. Zato sklepamo, da SEE in hdSEE-R vplivata na celične receptorje in prav tako na bakterijske adhezine (Šikić Pogačar in sod., 2015a).

Nekateri avtorji so opazili, da lahko določeni oligosaharidi izpodrinejo že adherirane patogene na evkariontske celice, vendar so slabo učinkoviti ali pa sploh neučinkoviti v primerjavi s predinkubacijo celic z oligosaharidi pred dodatkom bakterijskega inokuluma (Shoaf in sod., 2006). Rezultati naše študije se zato ujemajo z rezultati študije Shoaf s sod. iz leta 2006. Drugi avtorji zato dajejo prednost predinkubiranju patogena z oligosaharidi ali drugimi snovmi z namenom preprečevanja bakterijske vezave na evkariontsko celico (Lee in sod., 2006; Ruiz-Palacios in sod., 2003; Wittschier in sod., 2007) in smatrajo to metodo za uspešno. Ostali pa so pokazali, da ima tudi istočasen dodatek bakterijskega inokuluma in oligosaharidov inhibitorni učinek oligosaharidov na bakterijsko vezavo na evkariontsko celico (Rhoades in sod., 2005; Shoaf in sod., 2006). V svoji študiji iz leta 2010 so Gaňan in sod. inkubirali *C. jejuni* z oligosaharidi 1 h pred okužbo celične kulture Caco-2 vendar so ugotovili, da predinkubacija bakterijskega inokuluma z oligosaharidi ni imela nobenega učinka na vezavo kampilobaktrov na Caco-2 celice in da se rezultati ne razlikujejo od poskusa, v katerem sta celicam Caco-2 bakterijski inokulum in oligosaharidi dodani istočasno (Gaňan in sod., 2010).

V prihodnje bi bilo zanimivo predinkubirati *C. jejuni* K49/4 z našimi izvlečki (GE, OE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R) in preveriti, če bi se inhibicija adhezije na celice PSI razlikovala od poskusa, v katerem so istočasno dodani bakterijski inokulum in izvlečki. Čeprav je adhezija *C. jejuni* K49/4 ob uporabi izvlečkov zmanjšana za največ 40 % je razlika v primerjavi s kontrolo značilna. Sklepamo, da bi adhezija *in vivo* bila še slabša zaradi obrambnih mehanizmov celic kot je mukozna plast, ki predstavlja fizično oviro in lahko mikroorganizmom močno omeji dostop do epitelnih celic ali peristaltike, ki mehansko odstranjuje ne-adherirane bakterije. Naši rezultati so razširili tudi spekter uporabnosti različnih aktivnih spojin in so pokazali uporabnost sub-inhibitornih koncentracij izvlečkov (in še bolj odpadnega materiala), ki ne vplivajo na bakterijsko rast, lahko pa preprečijo adhezijo patogenih bakterij na gostiteljsko celico in s tem vsaj omilijo bakterijsko okužbo ali potek bolezni. Zanimivo je, da se med TE in TE-R ter SEE in hdSEE-R protiadhezijska aktivnost ni dosti razlikovala, kar nakazuje na

podobno biološko aktivnost odpadnega materiala po hidrodestilaciji in s tem tudi potencial za uporabo odpadnega materiala v novih strategijah preprečevanja bakterijskih okužb.

5.5 VPLIV IZVLEČKOV GE, OE, TE, TE-R, SEE IN hdSEE-R NA INVAZIVNOST IN ZNOTRAJCELIČNO PREŽIVETJE *C. jejuni* K49/4

Mehanizem invazije za kampilobaktrije še ni popolnoma jasen, vsekakor pa bo nedavna določitev celotnega genoma *C. jejuni* povečala možnosti za pojasnitev teh mehanizmov (Kudirkiene in sod., 2013). Invazivnost kampilobaktrov v epitelni celični kulturi je dober pokazatelj izida bolezni *in vivo*, kar pomeni, da je sposobnost invazije v celični modeli uporaben pokazatelj njegove patogenosti (Friis in sod., 2005). Slabša bakterijska adhezivnost na celično kulturo direktno vpliva na število uspešno invadiranih bakterij. Tako kot adheriranje na črevesne epitelne celice, so posledična invazija, znotrajcelično preživetje/razmnoževanje in širjenje skozi gostitelja, pomembni mehanizmi s pomočjo katerih kampilobaktri povzročijo bolezen (Park, 2002; Rubeša-Mihaljević in sod., 2007; Šikić Pogačar in sod., 2009; 2010).

V prejšnjih študijah smo že pokazali, da je adheriran *C. jejuni* K49/4 sposoben dobro invadirati v epitelne in fagocitne celice ter tudi preživeti znotraj njih (Rubeša-Mihaljević in sod., 2007; Šikić Pogačar in sod., 2009, 2010). V naši študiji je manjše število invadiranih bakterij v celični kulturi posledica slabše začetne adhezije zaradi uporabljenih izvlečkov, vendar se je *C. jejuni* K49/4 že po 5 urah znotraj celic PSI začel množiti in je število znotrajceličnih bakterij doseglo kontrolo in ostalo visoko do konca opazovalne periode. Zanimivo je, da je na začetku infekcije prišlo do prehodnega zmanjšanja števila *C. jejuni* K49/4, najverjetneje kot posledica prilagajanja na novo okolje. Zelo hitro se je znotrajcelični *C. jejuni* K49/4 opomogel in je kinetika rasti že 10 h po infekciji bila podobna kot v kontrolnem vzorcu, brez dodanih izvlečkov. Če primerjamo sposobnost invazije *C. jejuni* K49/4 iz prejšnjih študij, kjer je bil izpostavljen sub-letalnim stresom (Klančnik in sod., 2009; Rubeša Mihaljević in sod., 2007; Šikić Pogačar in sod., 2009, 2010) je sposobnost invadiranja in znotrajceličnega preživetja znotraj celic PSI ob dodatku izvlečkov nekoliko slabše.

V podobni študiji iz leta 2010 so Gaňan in sod. na celicah Caco-2 proučevali vpliv oligosaharidov na adhezijo in invazijo *C. jejuni*. Ugotovili so, da je protiadhezijski učinek oligosaharidov močno povezan s koncentracijo dodanih oligosaharidov, čeprav so vse koncentracije v testiranem območju od 0,05 do 2,5 mg/ml v določeni meri zmanjšale invazijo *C. jejuni* v celice Caco-2. Najmanjša invazija (le okrog 5 %) je bila v primeru, ko so uporabili največjo koncentracijo oligosaharidov, in sicer 2,5 mg/ml. Rezultati naše študije podpirajo ugotovitve omenjene študije. Tudi v našem poskusu so najvišje koncentracije izvlečkov imele največji učinek na preprečevanje invazije *C. jejuni* K49/4, vendar smo v našem poskusu uporabili bistveno nižje koncentracije. V našem poskusu je najvišja koncentracija izvlečka 0,2 mg/ml pri izvlečkih GE, OE, TE in TE-R za največ 40 % preprečila invazijo *C. jejuni* K49/4. Pri SEE in hdSEE-R smo pri najvišji uporabljeni

koncentraciji izvlečkov (0,05 mg/ml) opazili celo za 60 % zmanjšano invazijo. Zelo verjetno je, da bi pri še višjih koncentracijah, ki še niso citotoksične, invazija bila še nižja. Naši rezultati so jasno pokazali, da so izvlečki GE, TE, TE-R, SEE in hdSEE-R sposobni preprečiti invazijo *C. jejuni* K49/4 v celični model prašičjih črevesnih enterocitov PSI. Ponovno je bila, pri preprečevanju invazije v celice PSI, uporaba izvlečkov iz odpadnega materiala (TE-R in hdSEE-R) enako ali še bolj uspešna kot izhodiščni materiali. Menimo, da bi lahko predstavljala uporaba odpadnega materiala pri nadzoru *C. jejuni* novo možnost iskanja alternative uporabi antibiotikov v krmi rejnih živali.

6 SKLEPI

- Potrdili smo prvo zastavljeno hipotezo, da je *C. jejuni* K49/4 sposoben adherirati/invadirati in preiti skozi tridimenzionalen funkcionalen celični model prašičjih enterocitov PSI. Adherirani *C. jejuni* K49/4 je znižal transepitelno upornost (TEER) prašičjega črevesnega epitela, medtem ko je imel invadirani *C. jejuni* K49/4 bistveno manjši vpliv na TEER. Ti rezultati nakazujejo, da *C. jejuni*, enkrat ko je znotraj gostiteljske celice, nima več učinka na medcelično integriteto monosloja.
- *C. jejuni* K49/4 je sposoben hitro preiti skozi polarizirani sloj epitelnih celic glede na to, da smo že 3 h po okužbi celic zaznali kampilobakte na bazolateralni strani vodnjakov, brez znatnega zmanjšanja vrednosti TEER, kar nakazuje na transcelularni prenos *C. jejuni* skozi funkcionalni celični monosloj.
- Koncentracije GE nižje od 50 µg/ml niso vplivale na sposobnost adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice PSI. Istočasna inkubacija celic PSI z OE, TE in TE-R ter *C. jejuni* K49/4 je zmanjšala adhezivnost *C. jejuni* K49/4 na celice PSI znotraj koncentracijskega razpona: 0,78 µg/ml - 200 µg/ml. V primerjavi s kontrolo so izvlečki OE, TE in TE-R inhibirali adhezijo *C. jejuni* K49/4 za 30 %, kar je bilo tudi statistično značilno. Izvlečka SEE in hdSEE-R sta pokazala protiadhezijsko aktivnost v koncentracijskem razponu od 0,2 µg/ml do 50 µg/ml. Izvlečka SEE in hdSEE-R sta imela pri koncentraciji 12,5 µg/ml najizrazitejše protiadhezijsko delovanje, saj sta za 30 % zmanjšala adhezivnost *C. jejuni* K49/4 na celice PSI. Protiadhezijska učinkovitost vseh izvlečkov je bila dokaj stabilna znotraj testiranega koncentracijskega območja.
- GE je imel v uporabljeni koncentraciji 50 µg/ml izrazitejše protiadhezijsko delovanje na celice H4 kot pri celicah PSI z zmanjšanjem adhezije *C. jejuni* K49/4 za > 20 %. Že nizka koncentracija TE, TE-R in SEE (12,5 µg/ml) je bila z > 30 % inhibicijo adhezije *C. jejuni* K49/4 na celice H4 zelo učinkovita. S tem smo potrdili tudi drugo postavljeno hipotezo.
- Sklepamo, da je nižje število znotrajceličnih kampilobaktrov, 3 h po okužbi celic ob istočasnem dodatku izvlečkov, direktna posledica protiadhezijske aktivnosti izvlečkov.
- Inhibicija adhezije je bila največja v primeru, ko smo celice PSI predhodno inkubirali z izvlečki (GE, OE, TE in TE-R), najmanjša pa v primeru, ko so bile celice PSI predinkubirane s *C. jejuni* K49/4. Iz tega lahko sklepamo, da se slednji izvlečki vežejo na receptorje evkariontske celice, ter na ta način onemogočijo vezavo bakterij na njihovo površino. Znižanje adhezije po enourni predinkubaciji celic PSI s SEE ali hdSEE-R, je bilo pri obeh izvlečkih podobno in primerljivo z istočasnim dodatkom izvlečkov in bakterijskega inokuluma na celice PSI. Sklepamo, da izvlečka SEE in hdSEE-R vplivata na celične receptorje in tudi na bakterijske adhezine.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Poleg adhezije in invazije je bakterijska translokacija skozi črevesni epitel pomembna virulentna lastnost, ki kampilobaktrom omogoča širjenje skozi gostitelja, kar lahko privede do hujšega poteka bolezni oz. do sistemske bolezni. V naši raziskavi je imela adhezija *C. jejuni* K49/4 močen vpliv na transepitelno upornost (TEER) prašičjega črevesnega epitela, kar se je odražalo z znatnim znižanjem TEER polariziranih črevesnih epitelnih celic PSI. Nismo pa ugotovili nobene povezave med TEER in sposobnostjo translokacije *C. jejuni* K49/4. Poleg tega smo zasledili *C. jejuni* K49/4 v bazalnem delu vodnjaka že 3 h po infekciji polariziranega črevesnega epitela, brez znatnega zmanjšanja vrednosti TEER, kar nakazuje na transcelularni prenos *C. jejuni* K49/4 skozi funkcionalni celični monosloj.

Campylobacter sp. so zelo občutljivi za različne metode čiščenja in dezinfekcije v živilski industriji ter na okoljske strese. Vendar so hkrati, vse bolj odporni proti spremembam v okolju in protimikrobnim zdravilom, zaradi česar je vse bolj ogrožena učinkovitost nadzora nad okužbami s *Campylobacter* sp. v živilski industriji in prehranski verigi. Tako je še zmeraj potreba po novih načinih, ki bi zmanjšali ali odpravili bolezni, ki jih povzročajo patogeni mikroorganizmi v hrani brez izvajanja pritiska za nastanek odpornih bakterij proti antibiotikom in tudi brez škodljivega učinka na mikrobioto gostitelja. Alternativna strategija, ki bi uporabljala nizke odmerke bioaktivnih snovi in bi preprečila bakterijsko adhezijo je zanimiv način, s katerim bi se teoretično odpravila okužba v začetni fazi. Začasna ali popolna preprečitev adhezije tega patogena na črevesni epitel lahko prepreči rast bakterij, formiranje mikrokolonij in kasneje zrelih biofilmov na biotskih ali abiotskih površinah v industriji. Vendar pa je za varno uporabo naravnih protimikrobnih sredstev in uspešen nadzor kampilobaktrov z alternativnimi strategijami, ki bi preprečile adhezijo teh bakterij, potrebno določiti protiadhezijsko učinkovitost naravnih bioaktivnih spojin na abiotske in biotske površine. Čeprav narava ponuja neomejene vire potencialno novih bioaktivnih snovi, te niso dovolj raziskane in njihovi mehanizmi delovanja so večinoma neznani. Poleg čistih fenolnih spojin, imajo naravne snovi zaradi svoje kemijske raznolikosti neomejene možnosti uporabe. Vse več raziskovalne pozornosti namenjajo izolaciji bioaktivnih spojin iz stranskih kmetijskih proizvodov ali odpadkov, ki so bogati s fenolnimi spojinami ter se raziskuje njihovo delovanje.

V naši raziskavi smo predstavili "alternativno strategijo" za varen nadzor kontaminacije s kampilobaktri s preprečevanjem njihove sposobnosti vezave. Naši rezultati so pokazali, da se rastlinski izvlečki iz odpadnih ali stranskih kmetijskih proizvodov lahko uporabljajo kot nova in obetavna terapevtska sredstva, z možno uporabo v medicini in industriji. Pokazali smo protimikrobno in protiadhezijsko aktivnost izvlečka grozdnih tropin sorte Modri pinot (GE), izvlečka oljčnih listov (OE), izvlečka timijana (TE) in hidrodestilacijskega preostanka (TE-R), izvlečka semen izvlečka rastline *Alpinia katsumadai* (SEE) in hidrodestilacijskega preostanka (hdSEE-R) znotraj velikega koncentracijskega območja. Pri preverjanju citotoksičnosti izvlečkov so se celice H4 izkazale za bolj občutljive na dodatek izvlečkov kot celice PSI, kar

odraža razlike v strukturnih in funkcionalnih lastnostih celične površine. Poleg tega smo uporabili TE-R in hdSEE-R, izvlečka iz odpadnega materiala po pripravi eteričnih olj, ki še vsebujeta bioaktivne spojine. Glede na podobno protiadhezijsko učinkovitost TE-R in hdSEE-R ter njenega prvotnega izvlečka, lahko sklepamo, da hlapne snovi, ki so prisotne v TE in SEE (ne pa tudi v TE-R in hdSEE-R), ne prispevajo bistveno k opazovani protiadhezijski aktivnosti izvlečkov.

Z uporabo takšnega "odpadnega materiala" smo uspeli izboljšati ekonomičnost postopka oz. doseči proces z največjim skupnim izkoristkom, saj je proizvodnja eteričnega olja zelo drag proces, pri katerem nastajajo ogromne količine odpadne vode in trdnega preostanka. Izvlečka semen *A. katsumadai* sta pokazala izrazito protiadhezijsko aktivnost proti *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI in H4 tudi pri zelo nizkih koncentracijah, kjer vpliv protimikrobnega in citotoksičnega delovanja na protiadhezijsko učinkovitost lahko popolnoma izključimo. Naši rezultati so jasno pokazali, da so izvlečki odpadnega materiala (GE in OE) ter sam odpadni material (TE-R in hdSEE-R) učinkoviti pri preprečevanju nespecifične in specifične adhezije *C. jejuni* K49/4 na evkariontske celice. Protiadhezijsko delovanje teh izvlečkov je bilo stabilno znotraj velikega koncentracijskega območja (0,2 - 50 µg/ml), kar je pomembna lastnost, saj omogoča veliko možnosti uporabe. Uporabljeni izvlečki imajo, najverjetneje z blokiranjem celičnih receptorjev in bakterijskih adhezinov ter inhibicijo ključnih bakterijskih encimov potencial v profilaksi, za preprečevanje in zdravljenje kampilobakterioz. Naši obetavni rezultati pri preprečevanju adhezije *C. jejuni* K49/4, kažejo na možnost vključevanja v krmo za rejne živali z namenom zmanjšanja kolonizacije. Učinkovitost uporabljenih izvlečkov bi se najverjetneje izboljšala z nadaljnjim frakcioniranjem in prečiščevanjem bioaktivnih snovi. Rezultati naše študije so jasno pokazali na možnost uporabe bioaktivnih snovi iz odpadkov kot novih protimikrobnih in protiadhezijskih snovi.

7.2 SUMMARY

Besides adhesion and invasion, bacterial translocation into intestinal subepithelial tissues is considered an important virulence trait, allowing campylobacters to disseminate throughout the host, which may lead to severe systemic disease. In our study, adherence of *C. jejuni* K49/4 strongly affected the pig intestinal epithelium, as reflected by a significant decrease in TEER of polarized intestinal epithelial cells. No correlation between TEER and the translocation capacity of *C. jejuni* K49/4 was observed. Additionally, campylobacters were detected in the basal chamber of a functional small-intestinal epithelial cell model at 3 hours postinfection, without a significant reduction in the TEER value, suggesting transcellular transport of *C. jejuni* K49/4 through cell monolayer.

Furthermore, *Campylobacter* sp. is extremely susceptible to a wide variety of food-processing methods and environmental stresses. However, at the same time, they are increasingly resistant to constantly changing environments and to antimicrobials, hence compromising the effectiveness of the control of *Campylobacter* in the food chain. There is the need to combat infections without providing selection pressure for the emergence of such resistant bacteria, and also without having deleterious effects on the host microbiota. An alternative strategy that uses low doses of bioactive phytochemicals and targets bacterial adhesion is an interesting method that might eliminate infection at early stages. Delaying or even completely blocking the attachment of this pathogen to the surface of the intestine could prevent bacterial growth, formation of microcolonies and later mature biofilms on such surfaces. However, for safe application and successful control of *Campylobacter* with alternative strategies that target the attachment of these bacteria, it is necessary to determine the anti-adhesion efficiencies of natural bioactive compounds to abiotic and biotic surfaces. Although natural resources can offer unlimited sources of potential new agents, their mechanisms of action have not been studied in detail and are mainly unknown. In addition to pure phenolic compounds, natural products provide unlimited opportunities, because of their range of chemical diversity. Attempts are also being made to identify and evaluate the properties of bioactive compounds in agricultural by-products, traditional products, and in other raw materials that are rich in phenols that have nutritional importance, and/or have the potential for applications in food safety. In our study, we have presented an alternative strategy for the safe control of *Campylobacter* contamination by targeting their adhesion properties. We suggest that bioactive plant extracts and their waste material, and agricultural by-products, can be used as promising novel therapeutic agents, with possible medical and industrial applications. We have presented the antimicrobial and anti-adhesive activities across a large concentration range of ethanolic extracts from dry cake leftover after pressing Pinot noir grapes (GE), olive leaves extract (OE), thyme extract (TE) and its residue after hydrodistillation of essential oil (TE-R), extract of seeds of *Alpinia katsumadai* (SEE), and its residue after hydrodistillation of essential oil (hdSEE-R). When testing cytotoxicity of these extracts, the H4 cells proved to be more sensitive to the addition of extracts than the PSI cells, which reflects the differences in the structural and functional characteristics of the cell surface. Furthermore, we collected the TE-R and hdSEE-R that were left after the preparation of the essential oils, which still contain bioactive phytochemicals. As TE-R and hdSEE-R were as effective as their initial extract, we

concluded that the volatiles present in TE and SEE, but not in TE-R and hdSEE-R, do not significantly contribute to the observed anti-adhesive effects.

However, through the use of "waste material" we were able to achieve a process with maximum overall benefit, as essential oil production remains high cost, uses large amounts of waste water, and leaves the solid residue. The *A. katsumadai* extracts showed strong anti-adhesive activities against *C. jejuni* K49/4 for PSI and H4 cells even at very low concentrations, where antimicrobial and cytotoxic effects can be excluded as having any influence on the anti-adhesion activities of SEE and hdSEE-R. Our results clearly showed that the "waste material" such as GE, TE-R and hdSEE-R, along with the OE as the residual material of olive oil production, can prevent non-specific and specific adhesion of *Campylobacter jejuni* to eucaryotic cells. The anti-adhesion activities of these extracts were stable across a large concentration range (0.2-50 µg/ml), which is an important characteristic that makes their use possible in different applications. Presumably through blocking receptors and bacterial adhesins or inhibition of essential bacterial enzymes these extracts have a potential for prevention and treatment of *Campylobacter* infections. These promising results in prevention of adhesion of *C. jejuni* K49/4 make them good candidates to be included in animal feeds in that way reducing colonisation of intestinal pathogens. The effectiveness of extracts used in our study could most likely be improved through further fractionation and purification of the active ingredients. It indicates the potential use of such bioactive waste as a new antimicrobial and anti-adhesion agent.

7.3 SAŽETAK

Pored adhezije i invazije, se bakterijska translokacija u dublja subepitelna tkiva smatra važnom osobinom virulentnosti, koja ujedno omogućuje kampilobakterijama diseminaciju unutar domaćina, što može rezultirati teškom, sistemskom bolesti. U našem istraživanju je adhezija *C. jejuni* K49/4 snažno utjecala na crijevni epitelij stanica svinje, što se reflektiralo u značajnom smanjenju TEER polariziranih crijevnih epitelnih stanica PSI. Nismo utvrdili nikakvu povezanost između translokacijskog kapaciteta *C. jejuni* K49/4 i TEER. Osim toga, *C. jejuni* K49/4 smo potvrdili na bazolateralnoj strani funkcionalnog modela epitelnih stanica tankog crijeva već 3 sata nakon infekcije, bez značajnog smanjenja TEER vrijednosti što upućuje na transcelularni transport *C. jejuni* K49/4 kroz stanični monosloj.

Nadalje, *Campylobacter* sp. je izuzetno osjetljiv na mnoge metode koje se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji te na utjecaje iz okoliša. Međutim, u isto vrijeme su te bakterije postale sve otpornije na stalne promjene u okolišu kao i na protimikrobna sredstva, zbog čega je postala ugrožena učinkovitosti kontrole i nadzora *Campylobacter* sp. u prehrambenom lancu. Zbog toga postoji potreba za nove načine borbe protiv infekcija, bez stvaranja pritiska za razvoj takvih otpornih bakterija, a također i bez utjecaja na mikrobiotu domaćina. Alternativna strategija koji koristi niske doze bioaktivnih fitokemikalija i cilja na bakterijsku adheziju je zanimljiva metoda pomoću koje bi se teoretično infekcija uklonila u ranoj fazi. Odgađanjem ili čak potpunim blokiranjem vezanja ovog patogena na površinu crijevnog epitelijskog mogla bi se spriječiti rast bakterija, formiranje mikrokolonija i kasnije zrelog biofilma na tim površinama. Međutim, za sigurnu primjenu i uspješan nadzor nad *Campylobacter* sp. s alternativnim strategijama, koje su usmjerene na adheziju tih bakterija, je potrebno odrediti anti-adhezijsku učinkovitost prirodnih bioaktivnih spojeva na različitim površinama, tako abiotičkim kao i biotičkim površinama. Iako priroda nudi neograničene izvore potencijalnih novih agenata, njihovi mehanizmi djelovanja nisu još istraženi i uglavnom su nepoznati. Osim čistih fenolnih spojeva, prirodni produkti pružaju neograničene mogućnosti, zbog široke kemijske različitosti. Pokušava se također i identificirati te procijeniti bioaktivna svojstva poljoprivrednih nusproizvoda i otpadnih materijala kao i drugih sirovina, koje su bogate fenolima.

U našem istraživanju smo predstavili alternativnu strategiju za siguran nadzor kontaminacije s *C. jejuni* ciljajući na njihovu adheziju. Smatramo da se bioaktivne biljne ekstrakte i ekstrakte njihovog otpadnog materijala, te poljoprivrednih nusproizvoda, može koristiti kao obećavajuća nova terapijska sredstva, s mogućnošću aplikacije u medicini i industriji. Predstavili smo protimikrobnu anti-adhezivnu aktivnost preko velikog koncentracijskog raspona ekstrakta iz grožđa sorte Pinot crni (GE), ekstrakta lišća od masline (OE), timijana (TE) i otpadnog materijala nakon hidrodestilacije eteričnog ulja (TE-R), te ekstrakta iz sjemenki biljke *Alpinia katsumadai* i otpadnog materijala nakon hidrodestilacije eteričnog ulja (hdSEE-R). Prilikom testiranja citotoksičnosti naših ekstrakata su se stanice H4 pokazale kao osjetljivije na dodatak ekstrakta nego PSI stanice, što je najvjerojatnije posljedica razlike u strukturnim i funkcionalnim karakteristikama površine stanica. S obzirom da smo željeli testirati anti-adhezivnu sposobnost otpadnog materijala smo pripremili ekstrakte i iz otpadnog

materijala, koji je ostao nakon hidrodestilacije eteričnih ulja iz timijana (TE-R) i *A. katsumadai* (hdSEE-R). S obzirom da su se TE-R i hdSEE-R pokazali jednako učinkovitim kao i njihovi izvorni biljni ekstrakti smo zaključili da hlapljivi spojevi koji su prisutni u TE i SEE, a ne u TE-R i hdSEE-R značajno ne doprinose opaženoj anti-adhezivnosti ekstrakata.

S upotrebom takvog otpadnog materijala uspjeli smo postići process s najvećom mogućom dobrobiti, s obzirom da je proizvodnja eteričnih ulja jako skupa i koristi velike količine vode, a ostaje puno tvrdog otpada. Ekstrakti *A. katsumadai* su pokazali snažnu anti-adhezivu aktivnosti protiv *C. jejuni* K49/4 na stanicama PSI i H4 čak i pri vrlo niskim koncentracijama, gdje se protimikrobno i citotoksično djelovanje ekstrakata može isključiti. Naši rezultati su jasno pokazali da otpadni materijal, kao što su GE, TE-R i hdSEE-R, uz OE kao nusprodukt pri proizvodnji maslinovog ulja, može spriječiti nespecifičnu i specifičnu adheziju *Campylobacter jejuni* na eukariotske stanice. Anti-adhezivne aktivnosti ovih ekstrakata su bile stabilne unutar širokog raspona koncentracija (od 0,2 do 50 µg/ml), što je važno obilježje koje čini mogućim njihovu upotrebu u različitim aplikacijama. Ovi ekstrakti vjerovatno blokiranjem staničnih receptora ili bakterijskih adhezina te inhibicijom bakterijskih enzima imaju potencijal za prevenciju i liječenje infekcija s *C. jejuni*. Obećavajući rezultati u prevenciji adhezije *C. jejuni* K49/4 čini ih dobrim kandidatima, koji bi se mogli uključiti u stočnu hranu te na taj način smanjiti kolonizaciju crijevnih patogena. Učinkovitost ekstrakata u našoj studiji se najvjerojatnije može dodatno poboljšati daljnjom frakcinacijom i čišćenjem aktivnih sastojaka.

8 VIRI

- Aguiar V. F., Donoghue A. M., Arsi K., Reyes-Herrera I., Metcalf J. H., de los Santos F., Blore P. J., Donoghue D. J. 2013. Targeting motility properties of bacteria in the development of probiotic cultures against *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 5: 435 – 441.
- Ahmad-Qasem M. H., Canovas J., Barrajon-Catalan E., Micol V., Carcel J. A., Garcia-Perez J. V. 2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17: 120 – 129.
- al-Makhlac H., McGuire J., Daeschel M. 1994. Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3560 - 3565.
- Altekruse S. F., Stern N. J., Fields P. I., Swerdlow D. L. 1999. *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 1: 28 – 35.
- Alugupalli K. R., Kalfas S. 1997. Characterization of the lactoferrin-dependent inhibition of the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* to fibroblasts and to a reconstituted basement membrane. *APMIS*, 105: 680 - 688.
- Anderson R. C., Vodovnik M., Min B. R., Pinchak W. E., Krueger N. A., Harvey R. B., Nisbet D. J. 2012. Bactericidal effect of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Campylobacter jejuni* *in vitro*. *Folia Microbiologica*, 57: 253 – 257.
- Asakura H., Yamasaki M., Yagamoto S., Igimi S. 2007a. Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters*, 275, 2: 278 – 285.
- Asakura M., Samosornsuk W., Taguchi M., Kobayashi K., Misawa N., Kusumoto M., Nishimura K., Matsuhisa A., Yamasaki S. 2007b. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 42, 5 – 6: 174 - 183.
- Ashgar S. S. A., Oldfield N. J., Wooldridge K. G., Jones M. A., Irving G. J., Turner D. P. J., Ala'Aldeen D. A. A. 2007. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *Journal of Bacteriology*, 189, 5: 1856 – 1865.
- Awad W. A., Molnár A., Aschenbach J. R., Ghareeb K., Khayal B., Hess C., Liebhart D., Dublec K., Hess M. 2015. *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. *Innate Immunity*, 21: 151- 160.
- Babakhani F. K., Bradley G. A., Joens L. A. 1993. Newborn piglet model for campylobacteriosis. *Infection and Immunity*, 61: 3466 - 3475.
- Bachtiar B. M., Coloe P. J., Fry B. N. 2007. Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49: 149 – 154.

- Backert S., Hofreuter D. 2013. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*, 95: 8 - 23.
- Baek K. T., Vegge C. S., Brøndsted L. 2011. HtrA chaperone activity contributes to host cell binding in *Campylobacter jejuni*. *Gut Pathogens*, 3: 13, doi: 10.1186/1757-4749-3-13: 7 str.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chemistry and Toxicology*, 46: 446 - 475.
- Balkovetz D. F., Katz J. 2003. Bacterial invasion by paracellular route: divide and conquer. *Microbes and Infection*, 5: 613 - 619.
- Baltzell J. K., Bazer F. W., Miguel S. G., Borum P. R. 1987. The neonatal piglet as a model for human neonatal carnitine metabolism. *Journal of Nutrition*, 117: 754 – 757.
- Banin E., Brady K. M., Greenberg E. P. 2006. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2064 – 2069.
- Batista U. 2005. Gojenje sesalskih celic v *in vitro* pogojih. Ljubljana, Študentska založba: 64 str.
- Bell C., Kyriakides A. 2009. *Campylobacter*. A practical approach to the organism and its control in foods. 1st ed. Oxford, Wiley – Blackwell: 372 str.
- Bensch K., Tiralongo J., Schmidt K., Matthias A., Bone K. M., Lehmann R., Tiralongo E. 2011. Investigations into the antiadhesive activity of herbal extracts against *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research*, 25: 1125–1132.
- Bereswill S., Fischer A., Plickert R., Haag L. M., Otto B., Kühl A. A., Dashti J. I., Zautner A. E., Muñoz M., Loddenkemper C., Gross U., Göbel U. B., Heimesaat M. M. 2011. Novel murine infection models provide deep insights into the "Ménage à Trois" of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PloS ONE*, 6, 6: e20953, doi: 10.1371/journal.pone.0020953: 13 str.
- Bernbom N., Jorgensen R. L., Ng Y. Y., Meyer R. L., Kingshott P., Vejborg R. M., Klemm P., Besenbacher F., Gram L. 2006. Bacterial adhesion to stainless steel is reduced by aqueous fish extract coatings. *Biofilms*, 3: 25 – 36.
- Bhaskara Reddy M.V., Angers P., Gosselin A., Arul J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47, 8: 1515 – 1520.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. 1999. On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 971 - 974.
- Biswas D., Itoh K., Sasakawa C. 2000. Uptake pathways of clinical and healthy animal isolates of *Campylobacter jejuni* into INT-407 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29, 3: 203 - 211.
- Blaser M. J., Engberg J. 2008. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. V: *Campylobacter*. 3rd ed. Nachamkin I., Szymanski C. M. (eds.). Washington, ASM Press: 99 – 121.
- Boban N., Tonkic M., Budmir D., Modun D., Sutlovic D., Punda-Polic V., Boban M. 2010. Antimicrobial effects of wine: Separating the role of polyphenols, pH, ethanol and other wine components. *Journal of Food Science*, 75, 5: M322 - M326.

- Boehm M., Hoy B., Rohde M., Tegtmeyer S., Bæk K.T., Oyarzabal O.A., Brøndsted L., Wessler S., Backert S. 2012. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. *Gut Pathogens*, 4: 3, doi: 10.1186/1757-4749-4-3: 12 str.
- Bolton D. J. 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48: 99 – 108.
- Bosma J. W., Siegert C. E. H., Peerbooms P. G. H. 2010. Reduction of biofilm formation with trisodium citrate in haemodialysis catheters: a randomized controlled trial. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 25: 1213 – 1217.
- Bouckaert J., Berglund J., Schembri M. 2005. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Molecular Microbiology*, 55: 441 – 455.
- Bras A. M., Ketley M. J. 1999. Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial monolayers. *FEMS Microbiology Letters*, 179: 209 – 215.
- Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M. (eds.) 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 2: The proteobacteria: Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2nd ed. New York, Springer: 1388 str.
- Brown D. R., Timmermans J. P. 2004. Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, 1: 50 – 54.
- Buelow D. R., Christensen J. E., Neal-McKinney J. M., Konkel M. E. 2011. *Campylobacter jejuni* survival within human epithelial cells is enhanced by the secreted protein CiaI. *Molecular Microbiology*, 80, 5: 1296 – 1312.
- Butzler J. P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 868-876.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253.
- Byrd J. A., Hargis B. M., Caldwell D. J., Bailey R. H., Herron K. L., McReynolds J. L., Brewer R. L., Anderson R. C., Bischoff K. M., Callaway T. R., Kubena L. F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poultry Science*, 80: 278 – 283.
- Callaway T. R., Edrington T. S., Anderson R. C., Harvey R. B., Genovese K. J., Kennedy C. N., Venn D. W., Nisbet D. J. 2008. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Animal Health Research Reviews*, 9: 217 – 225.
- Campbell S., Duckworth S., Thomas C. J., McMeekin T. A. 1987. A note on adhesion of bacteria to chicken muscle connective tissue. *Journal of Applied Microbiology*, 63, 1: 67 – 71.
- Cappelier J. M., Federighi M. 2000. Demonstration of a protein synthesis in starved *Campylobacter jejuni* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 63 – 67.
- Carneiro A., Couto J. A., Mena C., Queiroz Hogg T. 2008. Activity of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 19: 800 - 805.
- Carrillo C. D., Taboada E., Nash J. H., Lanthier P., Kelly J., Lau P. C., Verhulp R., Mykytczuk O., Sy J., Findlay W. A., Amoako K., Gomis S., Willson P., Austin J. W., Potter A., Babiuk L., Allan B., Syzmanski C. M. 2004. Genome-wide expression analyses of

- Campylobacter jejuni* NCTC1168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 20327 - 20338.
- Castillo S. L., Heredia N., Contreras J. F., Garcia S. 2011. Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Food Science*, 76, 6: M421 – M426.
- Castro-Garza J., Barrios-Garcia H. B., Cruz-Vega D. E., Said-Fernandez S., Carranza-Rosales P., Molina-Torres C. A., Vera-Cabrera L. 2007. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 733 – 737.
- Cencič A., Langerholc T. 2010. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 141: S4 - S14.
- Chang C., Miller J. F. 2006. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infection and Immunity*, 74: 5261 - 5271.
- Choi S., Gu M. B. 2001. Phenolic toxicity – detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 248 - 255.
- Cole K., Farnell M. B., Donoghue A. M., Stern N. J., Svetoch E. A., Eruslanov B. N., Volodina L. I., Kovalev Y. N., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Levchuk V. P., Pokhilenko V. D., Borzenkov V. N., Svetoch O. E., Kudryavtseva T. Y., Reyes-Herrera I., Blore P. J., Solis de los Santos F., Donoghue D. J. 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poultry Science*, 85: 1570 – 1575.
- Connell H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S., Svanborg C. 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 93: 9827 – 9832.
- Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130–135.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318 – 1322.
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 564 – 582.
- Crushell E., Harty S., Sharif F., Bourke B. 2004. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? *Pediatric Research*, 55, 1: 3 – 12.
- Cueva C., Moreno-Arribas M. V., Martín-Álvarez P. J., Bills G., Vicente M. F., Basilio A., Rivas L. C., Requena T., Rodríguez J. M., Bartolomé B. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161, 5: 372 – 382.
- Daglia M., Stauder M., Papetti A., Signoretto C., Giusto G., Canepari P., Pruzzo C., Gazzani G. 2010. Isolation of red wine components with anti-adhesion and anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, 119:1182 - 1188.
- Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 174 – 181.

- Dasti J. I., Malik Tareen A., Lugert R., Zautner A. E., Groß U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 205–211.
- Day C. J., Semchenko E. A., Korolik V. 2012. Glycoconjugates play a key role in *Campylobacter jejuni* infection: interactions between host and pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 9, doi: 10.3389/fcimb.2012.00009: 8 str.
- Day C. J., Tiralongo J., Hartnell R.D., Logue C.-A., Wilson J. C. von Itzstein M., Korolik V. 2009. Differential carbohydrate recognition by *Campylobacter jejuni* strain 11168: influences of temperature and growth conditions. *PLoS One*, 4: e4927, doi:10.1371/journal.pone.0004927: 11 str.
- Day Jr. W.A., Sajecki J. L., Pitts T.M., Joens L. A. 2000. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. *Infection and Immunity*, 68, 11: 6337 – 6345.
- Del Campo J. D., Amiot M. J., Nguyen C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 10: 1359 – 1368.
- Doyle A., Griffiths J. B. 1999. Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology. 1th ed. Chichester, Wiley: 332 str.
- EFSA/ECDC. 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12, 2: 3547, doi:10.2903/j.efsa.2014.3547: 312 str.
- EFSA. 2012. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10: 2598, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2598: 233 str.
- El S. N., Karakaya S. 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67, 11: 632 - 638.
- Elsinghorst E. A. 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods in Enzymology*, 236: 405 – 420.
- Epps S. V., Harvey R. B., Hume M. E., Phillips T. D., Anderson R. C., Nisbet D. J. 2013. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 6292 – 6304.
- Eucker T. P., Konkel M. E. 2012. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cellular Microbiology*, 14, 2: 226 – 238.
- Evans M. R., Ribeiro C. D., Salmon R. L. 2003. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 10: 1219 – 1225.
- Fantini J. 1992. Differentiation in human colon tumor cells. Importance of autocrine growth factors. *Cancer Journal*, 5, 2: 78-83.
- Farnell M. B., Donoghue A. M., Cole K., Reyes-Herrera I., Blore P. J., Donoghue D.J. 2005. *Campylobacter* susceptibility to ciprofloxacin and corresponding fluoroquinolone concentrations within the gastrointestinal tracts of chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1043 – 1050.
- Fecka I., Turek S. 2008. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 10: 1039 -1053.

- Fernandez F., Sharma R., Hinton M., Bedford M. R. 2000. Diet influences the colonization of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 1793 – 1801.
- Fernando U., Biswas D., Allan B., Willson P., Potter A. A. 2007. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 194 – 200.
- Flanagan R. C., Neal – McKinney J. M., Dhillon A. S., Miller W. G., Konkel M. E. 2009. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and Immunity*, 77, 6: 2399 – 2407.
- Freshney I. R. 2011. Culture of animal cells: A manual of basic techniques. 4th ed. New Jersey, Wiley-Liss Publication: 600 str.
- Friedman C. R., Hoekstra R. M., Samuel M., Marcus R., Bender, J. Shiferaw B., Reddy S., Ahuja S. D., Helfrick D. L., Hardnett F., Carter M., Anderson B., Tauxe R. V. 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases*, 38: S285- S296.
- Friedman M., Henika P. R. Mandrell R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 10: 1545 - 1560.
- Friis L. M., Pin C., Pearson B. M., Wells J. M. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiology Methods*, 61: 145 – 160.
- Gañan M., Collins M., Rastall R., Hotchkiss A. T., Chau H. K., Carrascosa A. V., Martinez-Rodriguez A. J. 2010. Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 181 - 185.
- Gañan M., Martínez-Rodríguez A. J., Carrascosa A. V. 2009. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 20: 739 – 742.
- Gañan M., Silvan J. M., Carascosa A. V., Martinez-Rodriguez A. J. 2012. Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. *Food Control*, 24: 6 - 14.
- Gaynor E. C., Cawthraw S. F., Manning G., MacKichan J. K., Falkow S., Newell D. G. 2004. The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 186, 2: 503–517.
- Gaynor E. C., Wells D. H., MacKichan J. K., Falkow S. 2005. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence - associated phenotypes. *Molecular Microbiology*, 56, 1: 8 – 27.
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74, 6: 594 – 602.
- Gillies R. J., Didier N., Denton M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, 159: 109–113.

- Giugliano L.G., Ribeiro S.T., Vainstein M.H., Ulhoa, C. J. 1995. Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 42: 3 - 9.
- Gormley F. J., MacRae M., Forbes K. J., Ogden I. D., Dallas J. F., Strachan N. J. C. 2008. Has retail chicken played a role in the decline of human campylobacteriosis? *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2: 383 -390.
- Grant C. C. R., Konkel M. E., Cieplak Jr., W., Tompkins L. S. 1993. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in non polarized and polarized epithelial cell cultures. *Infection and Immunity*, 61: 1764 – 1771.
- Gubina M., Železnik Z., Mehle J., Zajc-Satler J., Dragaš A. Z. 1982. Enterotoxin activity of *Campylobacter* species. V: *Campylobacter*. Newell D. G. (ed.). Lancaster, MTP Press Limited: 188 – 195.
- Guerry P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15: 456 – 461.
- Guerry P., Alm R. A., Power M. E., Trust T. J. 1992. Molecular and structural analysis of *Campylobacter* flagellin. V: *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Nachamkin I., Blaser M. J., Tompkins L. S. (eds.). Washington, ASM Press: 267–281.
- Guerry P., Szymanski C. M. 2008. *Campylobacter* sugars sticking out. *Trends in Microbiology*, 16, 9: 428 – 435.
- Guerry P., Szymanski C. M., Prendergast M. M., Hickey T. E., Ewing C. P., Pattarini D. L., Moran A. P. 2002. Phase variation of *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness *in vitro*. *Infection and Immunity*, 70, 2: 787–793.
- Haddad N., Marce C., Magras C., Cappelier J. M. 2010. An overview of methods used to clarify pathogenesis mechanisms of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection*, 73, 4: 786–802.
- Hancock V., Ferries L., Klemm P. 2008. The ferric yersinia bactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154: 167-175.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi A. K., Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 8: 639 – 652.
- Hendrixson D. R. 2006. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Molecular Microbiology*, 61: 1646–1659.
- Hendrixson D. R., DiRita V. J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular Microbiology*, 52: 471 – 484.
- Hermans D., Van Deun K., Martel A., Van Immerseel F., Messens W., Heyndrickx M., Haesebrouck F., Pasmans F. 2011. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42: 82, doi: 10.1186/1297-9716-42-82: 14 str.
- Hickey T. E., Baqar S., Bourgeois A. L., Ewing C. P., Guerry P. 1999. *Campylobacter jejuni* - stimulated secretion of interleukin-8 by INT 407 cells. *Infection and Immunity*, 67, 88–93.
- Hickey T. E., Majam G., Guerry P. 2005. Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity*, 73, 8: 5194 – 5197.

- Hofreuter D., Novik V., Galan J. E. 2008. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe*, 4: 425 – 433.
- Hu L., Kopecko D. J. 1999. *Campylobacter jejuni* 81 – 176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infection and Immunity*, 67, 8: 4171 – 4182.
- Hu L., Kopecko D. J. 2008. Cell biology of human host cell entry by *Campylobacter jejuni*. V: *Campylobacter*. 3rd ed. Nachamkin I., Szymanski C. M. (eds.). Washington, ASM Press: 297 – 313.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 3: 237 – 257.
- IVZ. 2012. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2011. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 46 - 47.
- Jayaprakasha G., Selvi T., Sakariah K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36: 117 – 122.
- Jeršek B., Poklar Ulrich N., Skrt M., Gavarić N., Božin B., Smole Možina S. 2014. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. *Arhiv za higijeno rada i toksikologiju*, 65, 2: 199-208.
- Jin S., Joe A., Lynett J., Hani E. K., Sherman P., 2001. JlpA, a novel surface exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39: 1225 – 1236.
- Juven B. J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626– 631.
- Kale A., Phansopa C., Suwannachart C., Craven C. J., Rafferty J. B., Kelly D. J. 2011. The virulence factor PEB4 (Cj0596) and the periplasmic protein Cj1289 are two structurally related SurA-like chaperones in the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 21254 – 21265.
- Kalischuk L. D., Inglis G. D., Buret A. G. 2009. *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathogens*, 1: 2, doi: 10.1186/1757-4749-1-2: 10 str.
- Karlyshev A. V., Everest P., Linton D., Cawthraw S., Newell D. G., Wren B. W. 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology*, 150: 1957 – 1964.
- Katalinić V., Smole Možina S., Generalić I., Skroza D., Ljubenković I., Klančnik A. 2013. Polyphenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* varieties. *International Journal of Food Properties*, 16: 45 - 60.
- Keener K. M., Bashor M. P., Sheldon B. W., Katharlou S. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 105 - 116.
- Kelly C. G., Younson J. S., Hikmat B. Y., Todryk S. M., Czisch M., Haris P. I., Flindall I. R., Newby C., Mallet A. I., Ma J. K., Lehner T. 1999. A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. *Nature Biotechnology*, 17: 42 - 47.

- Kervella M., Pagès J. M., Pei Z., Grollier G., Blaser M. J., Fauchère J. L. 1993. Isolation and characterization of two *Campylobacter* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cell membranes. *Infection and Immunity*, 61, 8: 3440 – 3448.
- Ketley J. M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143: 5 - 21.
- Kim M., Ashida H., Ogawa M., Yoshikawa Y., Mimuro H., Sasakawa C. 2010. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host and Microbe*, 8, 1: 20 – 35.
- Klančnik A., Možina Smole S., Zhang Q. 2012a. Anti-*Campylobacter* activities and resistance mechanisms of natural phenolic compounds in *Campylobacter*. *PLOS ONE*, 7: e51800, 10.1371/journal.pone.0051800: 10 str.
- Klančnik A., Gröblacher B., Kovač J., Smole Možina S. 2012b Anti-*Campylobacter* and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 5: 1249 – 1262.
- Klančnik A., Zorman T., Smole Možina S. 2008. The effect of low temperature, starvation and oxidative stress on physiology of *Campylobacter jejuni* cells. *Croatica Chemica Acta*, 81: 41- 46.
- Klančnik A., Guzej B., Hadolin Kolar M., Abramovič H., Smole Možina S., 2009. *In-vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72: 1744 – 1752.
- Klemm P., Vejborg R.M., Hancock V. 2010. Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 451-459.
- Klingberg D. T., Pedersen H. M., Cencič A., Budde B. B. 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7528 – 7530.
- Konkel M. E., Larson C. L., Flanagan R. C. 2010. *Campylobacter jejuni* FlpA binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. *Journal of Bacteriology*, 192: 68 – 76.
- Konkel M. E., Cieplak W. Jr. 1992. Altered synthetic response of *Campylobacter jejuni* to cocultivation with human epithelial cells is associated with enhanced internalization. *Infection and Immunity*, 60: 4945 – 4949.
- Konkel M. E., Garvis S. G., Tipton S. L., Anderson Jr., D. E., Cieplak Jr., W. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 24: 953 – 963.
- Konkel M. E., Kim B. J., Klena J. D., Young C. R., Ziprin R. 1998. Characterization of thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 66: 362–366.
- Konkel M. E., Kim B. J., Rivera-Amill V., Garvis S. G. 1999. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 32: 691 – 701.
- Konkel M. E., Klena J. D., Rivera-Amill V., Monteville M. R., Biswas D., Raphael B., Mickelson J. 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 186: 3296 – 3303.
- Konkel M. E., Monteville M. R., Klena J. D., Joens L. A. 2003. *In vitro* and *in vivo* models used to study *Campylobacter jejuni* virulence properties. V: *Microbial food safety in animal*

- agriculture: current topics. Torrence M. E., Isaacson R. E. (eds.). Iowa, Blackwell Publishing Company: 195 – 210.
- Konkel M. E., Monteville M. R., Rivera-Amill V., Joens L. A. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni* mediated enteritis. *Intestinal Microbiology*, 2, 2: 55 - 71.
- Kovač J. 2015. Antimicrobial and modulatory activity of selected phytochemicals and epidemiological characteristics of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni*: doctoral dissertation. Doktorska disertacija (s področja biotehnologije). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 135 str.
- Krachler A. M., Orth K., 2013. Targeting the bacteria-host interface. Strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*, 4, 4: 284 – 294.
- Krause-Gruszczynska M., Van Alphen L. B., Oyarzabal O. A., Alter T., Hänel I., Schliephake A., König W., Van Putten J. P. M., Konkel M. E. 2007. Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 274: 9 – 16.
- Kudirkienė E., Bunevičienė J., Sernienė L., Ramonaitė S., Olsen J. E., Malakauskas M. 2013. Importance of the producer on retail broiler meat product contamination with *Campylobacter* spp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 2293 – 2298.
- Kumar C. G. in Anand S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9 – 27.
- Larsson A., Johansson S. M. C., Pinkner J. S. 2005. Multivariate design, synthesis, and biological evaluation of peptide inhibitors of FimC/FimH protein-protein interactions in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Chemistry*, 48: 935 – 945.
- Lane J. A., Mehra R. K., Carrington S. D., Hickey R. M. 2010. The food glycome: a source of protection against pathogen colonization in the gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 1 – 13.
- Langerholc T., Maragkoudakis P. A., Wollgast J., Gradisnik L., Cencič A. 2011. Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 1: S11 – S20.
- Lastovica A. J. 2006. Emerging *Campylobacter* spp: the tip of the iceberg. *Clinical Microbiology Newsletter*, 28, 7: 49 – 56.
- Lastovica A. J., On S. L. W., Zhang L. 2014. The family *Campylobacteraceae*. V: The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria. 4th ed. Rosenberg E., DeLong E. E., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds.). Berlin, Springer - Verlag: 307 – 335.
- Lavigne J. P., Vitrac X., Bernard L., Bruyère F., Sotto A. 2011. Propolis can potentialise the anti-adhesion activity of proanthocyanidins on uropathogenic *Escherichia coli* in the prevention of recurrent urinary tract infections. *BMC Research Notes*, 4: 522, doi: 10.1186/1756-0500-4-522: 7 str.
- Lee O. H., Lee B. Y. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101, 10: 3751 – 3754.
- Lee J. H., Shim J. S., Lee J. S., Kim M. K., Chung M. S., Kim K. H. 2006. Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria. *Carbohydrate Research*, 341, 9: 1154 – 1163.

- Lee M. Y., Lee N. H., Seo C. S., Lee J. A., Jung D., Kim J. H., Shin H. K. 2010. *Alpinia katsumadai* seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1746 - 1752.
- Lee S. E., Shin H. T., Hwang H. J., Kim J. H. 2003. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research*, 17: 1041 – 1047.
- Lengsfeld C., Faller G., Hensel A. 2007. Okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry *in vitro* but not *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*, 135: 113 - 125.
- Leon-Kempis R., Guccione E., Mulholland F., Williamson M. P., Kelly D. J. 2006. The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Molecular Microbiology*, 60: 1262–1275.
- Lertsethtakarn P., Ottemann K. M., Hendrixson D. R. 2011. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual Review of Microbiology*, 65: 389 – 410.
- Li Z., Lou H., Ojcius D. M., Sun A., Sun D., Zhao J., Lin X., Yan J. 2014. Methyl-accepting chemotaxis proteins 3 and 4 are responsible for *Campylobacter jejuni* chemotaxis and jejuna colonization in mice in response to sodium deoxycholate. *Journal of Medical Microbiology*, 63: 343 – 354.
- Louwen R., Heikema A., van Belkum A., Ott A., Gilbert M., Ang W., Endtz H. P., Bergman M. P., Nieuwenhuis E. E. 2008. The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. *Infection and Immunity*, 76: 4431–4438.
- Louwen R., Nieuwenhuis E. E. S., van Marrewijk L., Horst-Kreft D., de Ruiter L., Heikema A. P., van Wamel W. J. B., Wagenaar J. A., Endtz H. P., Samsom J., van Baarlen P., Akhmanova A., van Belkumh A. 2012. *Campylobacter jejuni* translocation across intestinal epithelial cells is facilitated by ganglioside-like lipooligosaccharide structures. *Infection and Immunity*, 80, 9: 3307 – 3318.
- Lunney J. K. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 3: 179 – 184.
- MacCallum A., Hardy S. P., Everest P. H. 2005. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. *Microbiology*, 151: 2451 – 2458.
- Mansfield L. S., Schauer D. B., Fox J. G. 2008. Animal models of *Campylobacter jejuni* infections. V: *Campylobacter*. 3rd ed. Nachamkin I., Szymanski C. M. (eds.). Washington, ASM Press: 367 – 381.
- Masanta W. O., Heimesaat M. M., Bereswill S., Tareen A. M., Lugert R., Gross U., Zautner A. E. 2013. Modification of intestinal microbiota and its consequences for innate immune response in the pathogenesis of campylobacteriosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2015: 526860, doi:10.1155/2013/526860: 10 str.
- Mason K. L. in Huffnagle G. B. 2009. Control of mucosal polymicrobial populations by innate immunity. *Cellular Microbiology*, 11: 1297 – 1305.
- McGaw L. J., Steenkamp V., Eloff J. N. 2007. Evaluation of *Athrixia* bush tea for cytotoxicity, antioxidant activity, caffeine content and presence of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 16 - 22.

- McSweegan E., Walker R. I. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infection and Immunity*, 53, 1: 141 – 148.
- Min G., Stolz M., Zhou G. 2002. Localization of uroplaktin Ia, the urothelial receptor for bacterial adhesin FimH, on the six inner domains of the 16 nm urothelial plaque particle. *Journal of Molecular Biology*, 317: 697 – 706.
- Ming Man S. 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8: 669 – 685.
- Monteville M. R., Konkell M. E. 2002. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infection and Immunity*, 70, 12: 6665 – 6671.
- Monteville M. R., Yoon J. E., Konkell M. E. 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the cadf outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*, 149: 153 – 165.
- Mossmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 6: 55 - 63.
- Müller J., Schulze F., Müller W., Hänel I. 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize chick gut. *Veterinary Microbiology*, 113, 1: 123 – 129.
- Murga R., Ruiz R., Beltran S., 2000. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3408 – 3412.
- Murphy C., Carroll C., Jordan K. N. 2006. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 623 – 632.
- Murphy H., Cogan T., Humphrey T. 2011. Direction of neutrophil movements by *Campylobacter* - infected intestinal epithelium. *Microbes and Infection*, 13: 42 – 48.
- Nagayama K., Iwamura Y., Shibata T., Hirayama I., Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 6: 889 – 893.
- Nan P., Zhao J., Feng Y., Zhong Y. 2004. Chemical composition of the essential oils of two *Alpinia* species from Hainan islands, China. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59c: 157 - 160.
- Nannapaneni R., Chalova V. I., Crandall P. G., Ricke S. C., Johnson M. G., O'Bryan C. A. 2009. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 43 – 49.
- Navaneethan U., Giannella R. A. 2008. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology and Hepatology*, 5, 11: 637 - 647.
- Neal-McKinney J. M., Konkell M. E. 2012. The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 3, doi: 10.3389/fcimb.2012.00031: 15 str.
- Neu H. C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257: 1064 - 1073.
- Newman J. 1995. How breast milk protects newborns. *Scientific American*, 273: 76-79.

- Nguyen H. T. T., Corry J. E. L., Miles C. A. 2006. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 908 – 913.
- Nguyen V. T., Barlow R. S., Fegan N., Turner M. S., Dykes G. A. 2013. Role of capsular polysaccharides and lipooligosaccharides in *Campylobacter* surface properties, autoagglutination, and attachment to abiotic surfaces. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 6: 506 – 513.
- Niemann H. H., Schubert W. D., Heinz D. W. 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes and Infection*, 6: 101 - 112.
- Novik V., Hofreuter D., Galán J. E. 2009. Characterization of a *Campylobacter jejuni* VirK protein homolog as a novel virulence determinant. *Infection and Immunity*, 77, 12: 5428 – 5436.
- Ofek I., Goldhar J., Sharon N. 1996. Anti-*Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices. *Advances in Experimental and Medical Biology*, 408: 179 - 184.
- Ofek I., Goldhar J., Zafiri D., Lis H., Adar R., Sharon N. 1991. Anti-*Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices. *New England Journal of Medicine*, 324: 1599 – 1599.
- Ofek I., Mirelman D., Sharon N. 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, 265: 623 -625.
- Ofek I., Hasty D. L., Sharon N. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38: 181 - 191.
- Oh E., Jeon B. 2015. Contribution of surface polysaccharides to the resistance of *Campylobacter jejuni* to antimicrobial phenolic compounds. *Journal of Antibiotics*, 69: 591 – 593.
- Ok-Hwan L., Boo-Yong L. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751 – 3754.
- Oonmetta-aree J., Suzuki T., Gasaluck P., Eumkeb G. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 10: 1214 – 1220.
- Palma M., Taylor L. 1999. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical extraction and analysis for antibacterial and agrochemical activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 5044 – 5048.
- Palombo E. A. 2011. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1: 680354, doi:10.1093/ecam/nep067: 15 str.
- Parthasarathy G., Mansfield L. S. 2009. Recombinant interleukin-4 enhances *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal pig epithelial cells (IPEC-1). *Microbial Pathogenesis*, 47: 38 – 46.
- Park S. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177 - 188.
- Parkhill J., Wren B. W., Mungall K., Ketley J. M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R. M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A. V., Moule S., Pallen M. J., Penn C. W., Quail M. A., Rajandream K. M., Rutherford A. H. M., van Vliet S.,

- Whitehead S., Barrell B. G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665 – 668.
- Pearson A. D., Greenwood M., Healing T. D., Rollins D., Shahamat M., Donaldson J., Colwell R. R. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4: 987 – 996.
- Pearson A. D., Greenwood M. H., Feltham R. K., Healing T. D., Donaldson J., Jones D. M., Colwell R. R. 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: Intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 12: 4614 – 4620.
- Pei Z. H., Burucoa C., Grignon B., Baqar S., Huang X. Z., Kopecko D. J., Bourgeois A. L., Fauchere, J. L., Blaser M. J. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infection and Immunity*, 66: 938 – 943.
- Pei Z., Blaser M. J. 1993. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 18717 – 18725.
- Pereira A. P., Ferreira I. C. F. R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P. B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. A. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12: 1153 - 1162.
- Petrovska B. B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6: 1 – 5.
- Pickett C. L., Pesci E. C., Cottle D. L., Russell G., Erdem A. N., Zeytin H. 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infection and Immunity*, 64, 6: 2070 – 2078.
- Pickett C.L., Whitehouse C.A. 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends in Microbiology*, 7: 292 – 297.
- Pikner J. S., Remaut H., Buelens F., Miller E., Aber V., Pemberton N., Hedenström M., Larsson A., Seed P., Waksman G., Hultgren S. J., Almqvist F., 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 103: 17897 - 17902.
- Pipenbaher N., Moeller P. L., Dolinšek J., Jakobsen M., Weingartl H., Cencič A. 2009. Nitric oxide (NO) production in mammalian non-tumorigenic epithelial cells of the small intestine and macrophages. *International Dairy Journal*, 19: 166 – 171.
- Poly F., Guerry P. 2008. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24: 27 - 31.
- Poly F., Serichatalergs O., Schulman M., Ju J., Cates C. N., Kanipes M., Mason C. 2011. Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 5: 1750 – 1757.
- Pratt L. A., Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30: 285 – 293.
- Radšel-Medvešček A. 2002. Kampilobakterioza. V: Infekcijske bolezni. Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. (ur). Ljubljana, Tangram: 109 - 109.

- Rathinam V. A. K., Hoag K. A., Mansfield L. S. 2008. Dendritic cells from C57BL/6 mice undergo activation and induce Th1-effector cell responses against *Campylobacter jejuni*. *Microbes and Infection*, 10: 1316 – 1324.
- Rauha J., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Kalevi P., Vuorela H., Vuorela P. 2000. Antibacterial effect of Finnish plant extracts containing flavonoids and the phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 3 – 12.
- Rees L. E. N., Cogan T. A., Dodson A. L., Birchall M. A., Bailey M., Humphrey T. J. 2008. *Campylobacter* and IFN γ interact to cause a rapid loss of epithelial barrier integrity. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14, 3: 303 – 309.
- Rhoades J. R., Gibson G. R., Formentin K., Beer M., Greenberg N., Rastall R. A. 2005. Caseinoglycomacropptide inhibits adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human cells in culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 10: 3455 – 3459.
- Ribet D., Cossart P. 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17, 3: 173 - 183.
- Rivera-Amill V., Kim B. J., Seshu J., Konkel M. E. 2001. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *Journal of Infectious Diseases*, 183: 1607 – 1616.
- Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A. – H., Khalel K. I. 2013. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Industrial Crops and Products*, 43: 827 – 831.
- Rogers T. J., Paton J. C. 2009. Therapeutic strategies for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 7, 6: 683 – 686.
- Rubeša Mihaljević R., Šikić Pogačar M., Klančnik A., Brumini G., Smole Možina S., Abram M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43: 120 - 125.
- Ruiz-Palacios G. M., Cervantes L. E., Ramos P., Chavez-Munguia B., Newburg N. W. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 14: 112 – 120.
- Samuelson D. R., Eucker T. P., Bell J. A., Dybas L., Mansfield L. S., Konkel M. E. 2013. The *Campylobacter jejuni* CiaD effector protein activates MAP kinase signaling pathways and is required for the development of disease. *Cell Communication and Signaling*, 11: 79, doi: 10.1186/1478-811X-11-79: 15 str.
- Sanderson I. R., Ezzell R. M., Kedinger M., Erlanger M., Xu Z. X., Pringault E., LeonRobine S., Louvard D., Walker W. A. 1996. Human fetal enterocytes *in vitro*: modulation of the phenotype by extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 15: 7717-7722.
- Santos G. K. N., Dutra K. A., Barros R. A., da Câmara C. A. G., Lira D. D., Gusmão N. B., Navarro D. M. A. F. 2012. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 40: 254 - 260.
- Saotome K., Morita H., Umeda M. 1989. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro*, 3, 4: 317 – 321.

- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 12: 3875 - 3883.
- Senior N. J., Bagnall M. C., Champion O. L., Reynolds S. E., La Ragione R. M., Woodward M. J., Salguero F. J., Titball R. W. 2011. *Galleira mellonella* as an infection model for *Campylobacter jejuni* virulence. *Journal of Medical Microbiology*, 60: 661 - 669.
- Seung-Joo L., Katumi U., Takayuki S., Kwang-Geun L. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91: 131 – 137.
- Sharon N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760: 527 – 537.
- Shoaf K., George L., Mulvey G., Armstrong D., Robert W. 2006. Hutkins prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 74: 6920 - 6928.
- Signoretto C., Canepari P., Stauder M., Vezzulli L., Pruzzo C. 2012. Functional foods and strategies contrasting bacterial adhesion. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 1 – 8.
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P. A., Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2: 200, doi: 10.3389/fmicb.2011.00200: 12 str.
- Silván J. M., Mingo E., Hidalgo M., de Pascual-Teresa S., Carrascosa A. V., Martínez-Rodríguez A. J. 2013. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp. *Food Control*, 29: 25 – 31.
- Skirrow M. B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *British Medical Journal*, 2: 9 – 11.
- Slifkin M., Doyle R. J. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 3: 197 - 218.
- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011a. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 91 - 98.
- Smole Možina S., Kovač J., Lušicki M. 2011b. Prevalence and antibiotic resistance of thermotolerant *Campylobacter* spp. in retail chicken meat - trends in Slovenia and EU. V: Köfer J., Schobesberger H. (ur.). Proceedings of the 15th International Congress of the International Society for Animal Hygiene, July 3 - 7, Vienna, Austria. XV ISAH Congress 2011. Animal hygiene and sustainable livestock production: innovations in hygiene, nutrition and housing for healthy food from healthy animals. Köfer J., Schobesberger H. (eds.). Vienna, ISAH: 169 - 171.
- Smole Možina S., Uzunović-Kamberović S. 2005. *Campylobacter* spp. as emerging food-borne pathogen - incidence, detection and resistance. *Medicinski glasnik*, 2, 1: 2 - 15.
- Snelling W. J., Matsuda M., Moore J. E., Dooley J. S. G. 2005. Under the microscope. *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297 – 302.
- Soler-Rivas C., Espin J. C., Wichers G. J. 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Food Science and Agriculture*, 80: 1013 - 1023.
- Solis de los Santos F., Hume M., Venkitanarayanan K., Donoghue A. M., Hanning I., Slavik M. F., Aguiar V. F., Metcalf J. H., Reyes-Herrera I., Blore P. J., Donoghue D.J. 2010. Caprylic acid reduces enteric *Campylobacter* colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations. *Journal of Food Protection*, 73: 251 – 257.

- Solomon E. B., Hoover D. G. 1999. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *Journal of Food Safety*, 19: 121 – 136.
- Solórzano-Santos F., Miranda-Navales M. G. 2011. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 1 – 6.
- Sommerlad S. M. in Hendrixson D. R. 2007. Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*. 189: 179 – 186.
- Somova L. I., Shode F. O., Ramnanan P., Nadar A. 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 2-3: 299 – 305.
- Stahl B., Thurl S., Zeng J. R., Karas M., Hillenkamp F., Steup M., Sawatzki G. 1994. Oligosaccharides from human-milk as revealed by matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 223: 218 – 226.
- Stahl M., Ries J., Vermeulen J., Yang H., Sham H. P., Crowley S. M., Badayeva Y., Turvey S. E., Gaynor E. C., Li X., Vallance B. A. 2014. Novel mouse model of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis reveals key pro-inflammatory and tissue protective roles for Toll-like receptor signaling during infection. *PLoS Pathogens*, 17: e100926, doi: 10.1371/journal.ppat.100426: 16 str.
- Stern N. J., Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Pokhilenko V. D., Levchuk V. P., Svetoch O. E., Seal B. S. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 3111 – 3116.
- Sudjana A., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T. V., Hammer K. A. 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 461 – 463.
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Smole Možina S., Cencič A. 2010. Attachment, invasion, and translocation of *Campylobacter jejuni* in pig small-intestinal epithelial cells. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 5: 589 - 595.
- Šikić Pogačar M., Rubeša Mihaljević R., Klančnik A., Brumini G., Abram M., Smole Možina S. 2009. Survival of stress exposed *Campylobacter jejuni* in the murine macrophage J774 cell line. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 1: 68 - 73.
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Bucar F., Langerholc T., Smole Možina S. 2015a. *Alpinia katsumadai* extracts inhibit adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* in animal and human foetal small intestine cell lines. *Phytotherapy Research*, 29: 1585-1589.
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Bucar F., Langerholc T., Smole Možina S. 2015b. Anti-adhesion activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract, thyme post-distillation waste, and olive (*Olea europaea* L.) leaf extract against *Campylobacter jejuni* on polystyrene and intestine epithelial cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.7391: 8 str. (v tisku)
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Vučković D., Mičetić-Turk D., Raspor P., Cencič A., Abram M., Smole Možina S. 2012. Experimental models to study the impact of food-related conditions on virulence properties of poultry meat isolate *Campylobacter jejuni*. V: 6th Central European Congress on Food, 23-26 May, Novi Sad, Serbia. Lević J. (ur.).

- Proceedings of 6th Central European Congress on Food: CEFood congress. Novi Sad, University of Novi Sad, Institute of Food Technology: 431-636.
- Tauxe R. V. 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 31 – 41.
- Tegtmeier N., Rohde M., Backert S. 2011. Clinical presentations and pathogenicity mechanisms of foodborne infection. V: *Microbial food safety*. Oyarzabal O. A., Backert S. (eds.). New York, Springer: 13 - 31.
- Thies F. L., Karch H., Hartung H. P., Giegerich G. 1999. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *Campylobacter jejuni* groESL bicistronic operon. *Microbiology*, 145: 89 – 98.
- Timothe J., Bonsi I. A., Paddilla-Zakour O. I., Koo H. 2007. Chemical characterization of red wine grapes (*Vitis vinifera*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 10200 – 10207.
- Toivanen M., Huttunen S., Lapinjoki S., Tikkanen-Kaukanen C. 2011. Inhibition of adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions. *Phytotherapy Research*, 25: 828 - 832.
- Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U. W., Adsersen A., Nyman U. 1997. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 58, 2: 75 – 83.
- van Vliet A. H. M., Ketley J. M. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 45 – 56.
- Vattem D. A., Lin Y. T., Ghaedian R., Shetty K. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, 40: 1583 - 1592.
- Vejborg R. M., Klemm P. 2008. Blocking of bacterial biofilm formation by a fish protein coating. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3551 – 3558.
- Vučković D., Abram M., Dorić M. 1998. Primary *Campylobacter jejuni* infection in different mice strains. *Microbial Pathogenesis*, 24: 263 – 268.
- Wagenaar J. A., Van Bergen M. A. P., Mueller M. A., Wassenaar T. M., Carlton R. M. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology*, 109: 275 – 283.
- Wang S., Wang J., Mou H., Luo B., Jiang X. 2015. Inhibition of adhesion of intestinal pathogens (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella Typhimurium*) by common oligosaccharides. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 4: 360 – 365.
- Wassenaar T. M., Blaser M. J. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, 1: 1023 – 1033.
- Wassenaar T. M., Engelskirchen M., Park S., Lastovica A. J. 1997. Differential uptake and killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. *Medical Microbiology and Immunology*, 186: 139 – 144.
- Watson R. O., Galán J. E. 2008. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PloS Pathogens*, 4, 1: e14, doi: 10.1371/journal.ppat.0040014: 14 str.

- Wittschier N., Lengsfeld C., Vortheims S., Stratmann U., Ernst J. F., Verspohl E. J., Hensel A. 2007. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, 59: 777 - 786.
- Wooldridge K. G., Ketley J. M. 1997. *Campylobacter* - host cell interactions. *Trends in Microbiology*, 5: 96 - 102.
- Wu Y. in Outten F. W. 2009. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbriae expression. *Journal of Bacteriology*, 191: 1248 - 1257.
- Xiao X., Si X., Tong X., Li G. 2011. Preparation of flavonoids and diarylheptanoid from *Alpinia katsumadai* hayata by microwave - assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 81: 265 – 269.
- Yan S. S., Pendrak M. L., Foley S. L., Powers J. H. 2005. *Campylobacter* infection and Guillain–Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 5: 285 - 305.
- Yang J., Dai Y., Xia Y.-F., Huang W. Z., Wang Z.-T. 2009. *Alpinia katsumadai* hayata prevents mouse sepsis induced by cecal ligation and puncture through promoting bacterial clearance and downregulating systemic inflammation. *Phytotherapy Research*, 23, 2: 267 - 273.
- Yao R., Burr D. H., Doig P., Trust T. J., Niu H., Guerry P. 1994. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Molecular Microbiology*, 14: 883 - 893.
- Yao R., Burr D.H., Guerry P. 1997. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Molecular Microbiology*, 23: 1021 – 1031.
- Yilmaz Y., Toledo R. T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 255 – 260.
- Young V. B., Mansfield L. S. 2005. *Campylobacter* infection – clinical context. V: *Campylobacter*: Molecular and cellular biology. Ketley J. M., Konkel M. E. (eds.). Norfolk UK, Horizon Bioscience: 1 - 12.
- Young K. T., Davis L. M., DiRita V. J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 665 – 679.
- Yusoff M. M., Ibrahim H., Hamid N. A. 2011. Chemical characterization and antimicrobial activity of rhizome essential oils of very closely allied *Zingiberaceae* species endemic to borneo: *Alpinia ligulata* K. Schum and *Alpinia nieuwenhuizii* Val. *Chemical Biodiversity*, 456: 916 - 923.
- Zeitouni S., Guyard-Nicodème M., Kempf I. 2013. Comparison of adhesion, invasion, motility, and toxin production of *Campylobacter* strains and their resistant mutants. *Microbial Drug Resistance*, 19, 2: 130 – 137.
- Zhang Q., Plummer P. J. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*. V: *Campylobacter*. 3rd ed. Nachamkin I., Szymanski C. M. (eds.). Washington, ASM Press: 263 – 277.
- Zhou G., Mo W. J., Sebbel P. 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. *Journal of Cell Science*, 114: 4095 – 4103.

- Zilbauer M., Dorrell N., Wren B. W., Bajaj-Elliott M. 2008. *Campylobacter jejuni* - mediated disease pathogenesis: an update. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102: 123 - 129.
- Zorman T., Smole Možina S. 2002. Classical and molecular identification of thermotolerant Campylobacters from poultry meat. Food Technology and Biotechnology, 2: 177 – 184.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Dušanki Mičetić-Turk. Hvala da ste me vključili v vaš tim gastroenterologov na Kliniki za pediatrijo. Prav tako sem hvaležna za vse nasvete, spodbudne misli pri izvajanju raziskovalnega dela, ter klepete in moralno podporo v času doktorskega študija.

Iskreno se zahvaljujem tudi somentorici, prof.dr. Sonji Smole Možina, ki me je spodbudila za nadaljnje raziskovalno delo in vpis na doktorski študij. Hvala vam da ste mi omogočili delo v timu prof. dr. Franz Bucarja v Grazu, na Institute of Pharmaceutical Sciences. Hvala vam za vso znanje, nasvete, podporo in pomoč med izvajanjem raziskovalnega dela in pisanja znanstvenih člankov.

Prav tako se iskreno zahvaljujem preminuli prof. dr. Avreliji Cencič, da mi je omogočila delo v njenem laboratoriju v Laboratorijskem centru za biokemijo, genetiko, biotehnologijo in molekularno biologijo Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru.

Za strokoven in kritičen pregled doktorske naloge se iskreno zahvaljujem predsednici komisije prof. dr. Ireni Rogelj ter članici komisije doc. Dr. Tjaši Danevčič. Dela ste imele več kot dovolj z mojimi hrvaškimi izrazi in oblikovanjem stavkov.

Najlepše se zahvaljujem tudi dr. Maji Abram za nasvete in pomoč pri pisanju člankov. Hvala vam da ste si vzela čas v vašem prenatrpanem urniku za pomoč pri pripravi na zagovor doktorske disertacije.

Ogromna hvala dr. Anji Klančnik za nasvete, konstantno podporo in spodbujanje pri pisanju člankov. Hvala za vse klepete in pomoč! Ogromno sem se naučila med najinim sodelovanjem.

Hvala dr. Tomažu Langerholcu za nasvete pri izvajanju raziskovalnega dela v Laboratorijskem centru za biokemijo, genetiko, biotehnologijo in molekularno biologijo Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru.

Hvala prof. dr. Franzu Bucarju da me je sprejel v svoj tim na Inštitutu za Farmakologijo. Zahvaljujem se za vse nasvete in pomoč pri pripravi in analizi rastlinskih izvlečkov. Hvala za odlično atmosfero v vašem laboratoriju in nepozabno izkušnjo.

Hvala Lidiji Gradišnik, strokovnjakinji s področja razvoja celičnih kultur, za vso znanje, nasvete in podporo v času mojega dela v laboratoriju.

Velika zahvala gre Tanji Botić za moralno podporo med študijem. Hvala za dobre "brainstorminge" in nasvete med pisanjem doktorske naloge.

Hvala Lini Burkan za pregled, urejanje in dokončno oblikovanje doktorske disertacije ter dobro voljo.

Zahvala gre tudi mag. Vesni Ješe Janežič za vse posredovane informacije in usmeritve pri postopkih glede oddaje doktorske naloge. Hvala za koristne nasvete, pomoč in prijaznost tekom študija.

Zahvaljujem se tudi dr. Martinu Trapečarju, Carini Pinto Kozmus, mag. Eneku Madorranu, dr. Primožu Trevenu, mag. Maksimiljanu Brusu, dr. Mariu Gorenjaku in vsem ostalim za dobro družbo v laboratoriju!

Hvaležna sem tudi Dušanovim staršem za moralno podporo tekom doktorskega študija, za pregled naloge in varstvo otrok.

Posebna zahvala gre tudi mojim staršem in Dušanu za moralno podporo in nesebično pomoč pri nastajanju in oblikovanju tega dela. Hvala bratu za pošiljanje vseh člankov in knjig do katerih jaz nisem imela dostopa. Najlepša hvala tudi za statistično analizo rezultatov.

Hvala tudi mojim otrokom, Lovru, Mii in Mari, niste me pustili spati zadnjih 7 let kar mi je včasih otežalo delo, a je bilo zaradi vas bolj zabavno! Lovri hvala za entuzijazem (pri 4 letih!) pri delu s celičnimi kulturami, za vse tiste poletne noči, ko si z mano, namesto v postelji, bil ob 22h zvečer v laboratoriju, pripravljaj svoje mikrotiterske ploščice in jih opazoval pod mikroskopom! Zdaj smo opravili "domačo nalogo" in se končno posvetimo letom primernim nalogam!

PRILOGE

Priloga A: Transepitelna električna upornost (TEER) in potencial (TEP) polariziranega 3D modela celic PSI po izpostavitvi *C. jejuni* K49/4

Annex A: Transepithelial electrical resistance (TEER) and potential (TEP) of polarized PSI cells exposed to *C. jejuni* K49/4

	TEER (Ω)		TEP (V)	
	Invadirani <i>C. jejuni</i>	Adherirani <i>C. jejuni</i>	Invadirani <i>C. jejuni</i>	Adherirani <i>C. jejuni</i>
1. dan	72,6 \pm 19,33	72,6 \pm 19,33	2,3 \pm 0,62	2,3 \pm 0,62
2. dan	184,2 \pm 23,03	184,2 \pm 23,03	2,89 \pm 0,76	2,89 \pm 0,76
3. dan	314,6 \pm 37,41	314,6 \pm 37,41	3,85 \pm 0,64	3,85 \pm 0,64
4. dan	506,6 \pm 177,39	506,6 \pm 177,39	25,6 \pm 4,76	25,6 \pm 4,76
5. dan	1437,1 \pm 182,55	1437,1 \pm 182,55	27,40 \pm 5,75	27,40 \pm 5,75
6. dan	1594 \pm 199,34	1594 \pm 199,34	27,20 \pm 6,41	27,20 \pm 6,41
7. dan	1610 \pm 201,31	1610 \pm 201,31	14,20 \pm 8,99	14,20 \pm 8,99
8. dan	1525,33 \pm 133,05	1470,6 \pm 207,8	30,00 \pm 15,98	17,9 \pm 5,5
9. dan	1604,75 \pm 155,76	1553 \pm 166,7	39,60 \pm 5,95	12,2 \pm 7,3
10. dan	1692,13 \pm 151,26	1678,1 \pm 120,9	23,34 \pm 3,48	2,7 \pm 3,8
11. dan	1820,75 \pm 83,16	1000,4 \pm 381,1	25,33 \pm 6,29	-2,3 \pm 0,9
12. dan	1565,88 \pm 276	980,625 \pm 235,14	3,56 \pm 7,62	-9,6 \pm 0,4

Priloga B1: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka Modri pinot (GE) proti *C. jejuni* K49/4

Annex B1: Absorbance measurements for determining the antibacterial activity of Pinot noir extract (GE) against *C. jejuni* K49/4

GE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	1,905	1,640	1,734	1,756	0,134
5,00		1,353	1,387	1,396	1,369	0,017
2,50		0,943	0,986	1,046	0,991	0,05
1,25		0,663	0,629	0,726	0,673	0,040
0,63		0,483	0,487	0,552	0,501	0,038
0,31		0,473	0,463	0,524	0,487	0,032
0,16		0,432	0,424	0,435	0,430	0,005
0,02		0,421	0,392	0,403	0,405	0,014
10,0		4 h inkubacije	1,857	1,605	1,735	1,732
5,00	1,352		1,391	1,369	1,371	0,019
2,50	0,962		0,991	1,050	1,001	0,044
1,25	0,696		0,665	0,762	0,707	0,049
0,63	0,570		0,602	0,617	0,596	0,024
0,31	0,577		0,608	0,704	0,629	0,066
0,16	0,567		0,658	0,652	0,625	0,051
0,02	0,536		0,542	0,565	0,547	0,015
10,0	6 h inkubacije		1,907	1,679	1,791	1,792
5,00		1,366	1,395	1,381	1,380	0,014
2,50		0,999	1,013	1,068	1,027	0,036
1,25		0,803	0,759	0,841	0,801	0,041
0,63		0,963	0,977	0,973	0,971	0,007
0,31		1,025	0,998	1,088	1,037	0,046
0,16		0,995	0,991	0,985	0,990	0,005
0,02		0,876	0,931	0,968	0,925	0,046
10,0		8 h inkubacije	1,920	1,727	1,807	1,818
5,00	1,400		1,422	1,395	1,405	0,014
2,50	1,060		1,059	1,119	1,079	0,034
1,25	0,947		0,875	0,941	0,921	0,039
0,63	0,998		1,071	1,015	1,028	0,038
0,31	1,053		1,073	1,185	1,104	0,071
0,16	0,996		1,039	1,013	1,016	0,021
0,02	0,903		0,971	0,980	0,951	0,042
10,0	10 h inkubacije		1,914	1,729	1,811	1,818
5,00		1,396	1,421	1,383	1,400	0,019
2,50		1,110	1,109	1,162	1,127	0,030
1,25		1,013	0,993	1,062	1,023	0,035
0,63		1,185	1,253	1,253	1,230	0,039
0,31		1,195	1,273	1,336	1,268	0,070
0,16		1,138	1,190	1,185	1,171	0,028
0,02		1,063	1,135	1,167	1,122	0,053

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B1: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka Modri pinot (GE) proti *C. jejuni* K49/4

GE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	1,886	1,786	1,830	1,834	0,050
5,00		1,392	1,438	1,396	1,408	0,025
2,50		1,076	1,151	1,189	1,139	0,057
1,25		1,076	1,057	1,134	1,089	0,040
0,63		1,204	1,240	1,364	1,269	0,083
0,31		1,230	1,285	1,356	1,290	0,063
0,16		1,167	1,190	1,208	1,188	0,020
0,02		1,125	1,158	1,210	1,164	0,042
10,0		22 h inkubacije	1,959	1,878	1,914	1,917
5,00	1,407		1,436	1,451	1,431	0,022
2,50	1,301		1,334	1,333	1,322	0,018
1,25	1,683		1,680	1,719	1,694	0,021
0,63	1,516		1,447	1,517	1,493	0,040
0,31	1,475		1,460	1,488	1,474	0,014
0,16	1,407		1,307	1,294	1,336	0,061
0,02	1,483		1,343	1,331	1,385	0,084
10,0	24 h inkubacije		1,993	1,921	1,924	1,946
5,00		1,460	1,502	1,459	1,473	0,024
2,50		1,355	1,390	1,371	1,372	0,017
1,25		1,700	1,690	1,701	1,697	0,006
0,63		1,538	1,444	1,512	1,498	0,048
0,31		1,532	1,497	1,496	1,508	0,020
0,16		1,446	1,379	1,353	1,392	0,047
0,02		1,421	1,422	1,383	1,408	0,022

Priloga B2: Vrednosti absorbanc pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka oljčnih listov (OE) proti *C. jejuni* K49/4

Annex B2: Absorbance measurements for determining the antibacterial activity of olive tree leaves extract (OE) against *C. jejuni* K49/4

OE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	0,754	0,672	0,688	0,704	0,043
5,00		0,606	0,545	0,543	0,564	0,035
2,50		0,457	0,467	0,446	0,457	0,010
1,25		0,459	0,431	0,442	0,444	0,014
0,63		0,431	0,427	0,429	0,429	0,002
0,31		0,425	0,412	0,404	0,414	0,010
0,16		0,420	0,414	0,420	0,418	0,003
0,02		0,409	0,406	0,417	0,410	0,005
10,0		4 h inkubacije	0,691	0,615	0,653	0,653
5,00	0,622		0,558	0,552	0,577	0,038
2,50	0,457		0,472	0,448	0,459	0,012
1,25	0,457		0,434	0,444	0,445	0,011
0,63	0,471		0,479	0,474	0,474	0,004
0,31	0,484		0,494	0,463	0,480	0,015
0,16	0,497		0,491	0,505	0,498	0,007
0,02	0,533		0,518	0,507	0,519	0,013
10,0	6 h inkubacije		0,674	0,609	0,642	0,641
5,00		0,622	0,563	0,566	0,583	0,033
2,50		0,460	0,472	0,454	0,462	0,009
1,25		0,471	0,561	0,505	0,512	0,045
0,63		0,858	0,888	0,897	0,881	0,020
0,31		0,910	0,928	0,905	0,914	0,012
0,16		0,968	0,973	0,994	0,978	0,013
0,02		0,995	0,963	0,966	0,974	0,017
10,0		8 h inkubacije	0,671	0,613	0,66	0,648
5,00	0,632		0,571	0,563	0,588	0,037
2,50	0,474		0,471	0,448	0,464	0,014
1,25	0,647		0,894	0,861	0,800	0,134
0,63	1,036		1,08	1,070	1,062	0,023
0,31	1,068		1,067	1,044	1,059	0,013
0,16	1,041		1,056	1,087	1,061	0,023
0,02	1,000		0,984	1,026	1,003	0,021
10,0	10 h inkubacije		0,669	0,614	0,652	0,645
5,00		0,630	0,571	0,572	0,591	0,033
2,50		0,655	0,476	0,453	0,528	0,110
1,25		1,095	1,211	1,205	1,170	0,065
0,63		1,258	1,311	1,283	1,284	0,026
0,31		1,129	1,250	1,228	1,202	0,064
0,16		1,221	1,257	1,144	1,207	0,057
0,02		1,166	1,144	1,192	1,167	0,024

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B2: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka oljčnih listov (OE) proti *C. jejuni* K49/4

OE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	0,681	0,575	0,647	0,634	0,054
5,00		0,630	0,575	0,576	0,593	0,031
2,50		0,738	0,475	0,457	0,556	0,157
1,25		1,117	1,240	1,236	1,197	0,069
0,63		1,238	1,312	1,283	1,277	0,037
0,31		1,234	1,257	1,24	1,243	0,011
0,16		1,227	1,271	1,252	1,250	0,022
0,02		1,176	1,188	1,221	1,195	0,023
10,0		22 h inkubacije	0,698	0,584	0,655	0,645
5,00	0,631		0,580	0,581	0,597	0,029
2,50	1,498		1,018	1,182	1,100	0,243
1,25	1,264		1,303	1,340	1,302	0,038
0,63	1,277		1,246	1,251	1,258	0,016
0,31	1,335		1,274	1,236	1,281	0,049
0,16	1,325		1,330	1,363	1,339	0,020
0,02	1,383		1,294	1,362	1,346	0,046
10,0	24 h inkubacije		0,715	0,592	0,696	0,667
5,00		0,645	0,591	0,592	0,609	0,030
2,50		1,503	1,049	1,215	1,132	0,229
1,25		1,281	1,317	1,336	1,311	0,027
0,63		1,284	1,25	1,258	1,264	0,017
0,31		1,356	1,276	1,236	1,289	0,061
0,16		1,324	1,332	1,375	1,343	0,027
0,02		1,380	1,300	1,365	1,348	0,042

Priloga B3: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka timijana (TE) proti *C. jejuni* K49/4

Annex B3: Absorbance measurements for determining the antibacterial activity of Thyme extract (TE) against *C. jejuni* K49/4

TE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	0,446	0,440	0,447	0,443	0,003
5,00		0,435	0,425	0,447	0,435	0,011
2,50		0,410	0,408	0,366	0,394	0,024
1,25		0,411	0,418	0,421	0,416	0,005
0,63		0,392	0,409	0,416	0,405	0,012
0,31		0,411	0,394	0,414	0,406	0,010
0,16		0,406	0,409	0,404	0,406	0,002
0,02		0,396	0,386	0,403	0,395	0,008
10,0		4 h inkubacije	0,449	0,442	0,450	0,447
5,00	0,439		0,428	0,449	0,438	0,010
2,50	0,413		0,410	0,367	0,396	0,025
1,25	0,414		0,418	0,421	0,417	0,003
0,63	0,441		0,449	0,457	0,449	0,008
0,31	0,498		0,467	0,498	0,487	0,017
0,16	0,493		0,520	0,538	0,517	0,022
0,02	0,495		0,490	0,506	0,497	0,008
10,0	6 h inkubacije		0,450	0,443	0,450	0,447
5,00		0,439	0,428	0,449	0,438	0,010
2,50		0,414	0,410	0,368	0,397	0,020
1,25		0,415	0,431	0,433	0,426	0,009
0,63		0,732	0,757	0,785	0,758	0,026
0,31		0,863	0,837	0,880	0,860	0,021
0,16		0,888	0,935	0,920	0,914	0,024
0,02		0,875	0,876	0,894	0,881	0,010
10,0		8 h inkubacije	0,441	0,439	0,449	0,443
5,00	0,441		0,428	0,445	0,438	0,008
2,50	0,414		0,410	0,367	0,397	0,026
1,25	0,426		0,589	0,584	0,533	0,092
0,63	0,911		0,973	0,932	0,938	0,031
0,31	0,992		1,010	1,008	1,003	0,009
0,16	1,001		1,081	1,010	1,030	0,043
0,02	0,956		0,994	0,972	0,974	0,019
10,0	10 h inkubacije		0,444	0,441	0,449	0,444
5,00		0,442	0,429	0,447	0,439	0,009
2,50		0,414	0,410	0,368	0,397	0,025
1,25		0,750	0,975	1,010	0,911	0,141
0,63		1,132	1,158	1,159	1,149	0,015
0,31		1,164	1,139	1,168	1,157	0,015
0,16		1,162	1,177	1,144	1,161	0,016
0,02		1,111	0,962	1,022	1,031	0,074

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B3: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka timijana (TE) proti *C. jejuni* K49/4

TE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	0,445	0,443	0,451	0,446	0,004
5,00		0,442	0,431	0,448	0,440	0,008
2,50		0,415	0,412	0,369	0,398	0,025
1,25		0,873	1,117	1,134	1,041	0,146
0,63		1,139	1,157	1,178	1,158	0,019
0,31		1,190	1,162	1,200	1,184	0,019
0,16		1,189	1,191	1,161	1,180	0,016
0,02		1,163	1,130	1,148	1,147	0,016
10,0		22 h inkubacije	0,454	0,450	0,458	0,454
5,00	0,449		0,438	0,455	0,447	0,008
2,50	0,427		0,424	0,379	0,410	0,026
1,25	1,672		1,705	1,705	1,694	0,019
0,63	1,276		1,301	1,348	1,308	0,036
0,31	1,283		1,288	1,317	1,296	0,018
0,16	1,270		1,226	1,315	1,270	0,045
0,02	1,367		1,333	1,368	1,356	0,019
10,0	24 h inkubacije		0,451	0,451	0,458	0,453
5,00		0,448	0,438	0,454	0,446	0,008
2,50		0,425	0,422	0,378	0,408	0,026
1,25		1,650	1,678	1,685	1,671	0,018
0,63		1,268	1,278	1,367	1,304	0,054
0,31		1,295	1,291	1,332	1,306	0,022
0,16		1,279	1,244	1,326	1,283	0,041
0,02		1,390	1,351	1,382	1,374	0,020

Priloga B4: Vrednosti absorbanč pri določanju protimikrobnega delovanja preostanka po hidrodestilaciji TE (TE-R) proti *C. jejuni* K49/4

Annex B4: Absorbance measurements for determining the antibacterial activity of TE post-distillation residue (TE-R) against *C. jejuni* K49/4

TE-R		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	0,460	0,451	0,454	0,455	0,004
5,00		0,450	0,446	0,484	0,460	0,020
2,50		0,413	0,435	0,434	0,427	0,012
1,25		0,432	0,424	0,42	0,425	0,006
0,63		0,422	0,412	0,404	0,412	0,009
0,31		0,413	0,424	0,413	0,416	0,006
0,16		0,401	0,413	0,409	0,407	0,006
0,02		0,419	0,406	0,404	0,409	0,008
10,0		4 h inkubacije	0,468	0,457	0,463	0,462
5,00	0,458		0,456	0,460	0,458	0,002
2,50	0,415		0,440	0,440	0,431	0,014
1,25	0,437		0,427	0,423	0,429	0,007
0,63	0,435		0,435	0,433	0,434	0,001
0,31	0,469		0,502	0,526	0,499	0,028
0,16	0,520		0,553	0,584	0,552	0,032
0,02	0,522		0,524	0,531	0,525	0,004
10,0	6 h inkubacije		0,474	0,458	0,467	0,466
5,00		0,463	0,461	0,456	0,460	0,003
2,50		0,409	0,450	0,442	0,433	0,021
1,25		0,438	0,427	0,423	0,429	0,007
0,63		0,706	0,717	0,676	0,699	0,021
0,31		0,857	0,903	0,851	0,870	0,028
0,16		0,907	0,931	0,862	0,900	0,035
0,02		0,912	0,901	0,843	0,885	0,037
10,0		8 h inkubacije	0,477	0,459	0,469	0,468
5,00	0,462		0,461	0,453	0,4586	0,004
2,50	0,41		0,447	0,439	0,432	0,019
1,25	0,438		0,427	0,418	0,427	0,010
0,63	0,896		0,877	0,845	0,872	0,025
0,31	0,974		1,003	0,935	0,970	0,034
0,16	0,939		0,938	0,973	0,950	0,019
0,02	1,005		0,895	0,842	0,914	0,083
10,0	10 h inkubacije		0,481	0,453	0,464	0,466
5,00		0,469	0,457	0,454	0,460	0,007
2,50		0,411	0,443	0,440	0,431	0,017
1,25		0,439	0,418	0,409	0,422	0,015
0,63		1,097	1,117	1,075	1,096	0,021
0,31		1,141	1,139	1,103	1,127	0,021
0,16		1,122	1,110	1,108	1,113	0,007
0,02		1,159	1,115	1,074	1,116	0,042

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B4: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja preostanka po hidrodestilaciji TE (TE-R) proti *C. jejuni* K49/4

TE-R		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	0,484	0,455	0,468	0,469	0,014
5,00		0,473	0,461	0,453	0,462	0,010
2,50		0,413	0,449	0,443	0,435	0,019
1,25		0,441	0,421	0,412	0,424	0,015
0,63		1,166	1,148	1,111	1,141	0,028
0,31		1,171	1,205	1,159	1,178	0,023
0,16		1,150	1,149	1,131	1,143	0,010
0,02		1,202	1,137	1,102	1,147	0,050
10,0		22 h inkubacije	0,499	0,469	0,481	0,483
5,00	0,491		0,475	0,463	0,476	0,014
2,50	0,424		0,467	0,452	0,447	0,021
1,25	0,465		0,939	0,420	0,442	0,287
0,63	1,428		1,454	1,386	1,346	0,034
0,31	1,363		1,348	1,329	1,346	0,017
0,16	1,322		1,328	1,349	1,333	0,014
0,02	1,402		1,404	1,356	1,387	0,027
10,0	24 h inkubacije		0,504	0,471	0,489	0,488
5,00		0,496	0,482	0,465	0,481	0,015
2,50		0,425	0,474	0,453	0,450	0,024
1,25		0,466	1,002	0,421	0,4435	0,323
0,63		1,428	1,433	1,364	1,408	0,032
0,31		1,391	1,361	1,361	1,371	0,017
0,16		1,360	1,363	1,392	1,371	0,017
0,02		1,442	1,418	1,385	1,415	0,028

Priloga B5: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) proti *C. jejuni* K49/4

Annex B5: Absorbance measurements for determining the antibacterial activity of extract of seeds *Alpinia katsumadai* (SEE) against *C. jejuni* K49/4

SEE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	1,978	1,838	1,900	1,905	0,070
5,00		1,958	1,920	1,824	1,900	0,069
2,50		1,501	1,608	1,510	1,539	0,059
1,25		1,255	1,201	1,169	1,208	0,043
0,63		0,838	0,909	0,846	0,864	0,038
0,31		0,582	0,619	0,589	0,596	0,019
0,16		0,482	0,485	0,486	0,484	0,002
0,02		0,404	0,419	0,422	0,415	0,009
10,0		4 h inkubacije	1,917	1,790	1,870	1,859
5,00	1,878		1,864	1,802	1,848	0,040
2,50	1,512		1,565	1,501	1,526	0,034
1,25	1,317		1,246	1,212	1,258	0,053
0,63	0,873		0,965	0,89	0,909	0,048
0,31	0,581		0,625	0,591	0,599	0,023
0,16	0,467		0,473	0,483	0,474	0,008
0,02	0,396		0,412	0,415	0,407	0,010
10,0	6 h inkubacije		1,890	1,773	1,855	1,839
5,00		1,874	1,854	1,797	1,841	0,039
2,50		1,503	1,557	1,494	1,518	0,034
1,25		1,303	1,244	1,218	1,255	0,043
0,63		0,869	0,969	0,884	0,907	0,053
0,31		0,575	0,617	0,583	0,591	0,022
0,16		0,467	0,467	0,473	0,469	0,003
0,02		0,425	0,431	0,433	0,429	0,004
10,0		8 h inkubacije	1,884	1,758	1,854	1,832
5,00	1,844		1,848	1,779	1,823	0,038
2,50	1,498		1,547	1,503	1,516	0,026
1,25	1,302		1,256	1,233	1,263	0,035
0,63	0,866		0,959	0,903	0,909	0,046
0,31	0,566		0,605	0,590	0,587	0,019
0,16	0,460		0,458	0,474	0,464	0,008
0,02	0,467		0,467	0,469	0,467	0,001
10,0	10 h inkubacije		1,872	1,762	1,82	1,818
5,00		1,855	1,846	1,66	1,787	0,246
2,50		1,498	1,548	1,271	1,439	0,147
1,25		1,314	1,264	1,234	1,270	0,040
0,63		0,872	0,97	0,89	0,910	0,052
0,31		0,571	0,605	0,587	0,587	0,017
0,16		0,461	0,459	0,468	0,462	0,004
0,02		0,586	0,528	0,519	0,544	0,036

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B5: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja izvlečka semen *Alpinia katsumadai* (SEE) proti *C. jejuni* K49/4

SEE		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	1,857	1,751	1,799	1,802	0,053
5,00		1,854	1,834	1,634	1,774	0,121
2,50		1,509	1,564	1,274	1,449	0,154
1,25		1,322	1,269	1,232	1,274	0,045
0,63		0,894	0,987	0,886	0,922	0,056
0,31		0,576	0,619	0,586	0,593	0,022
0,16		0,462	0,463	0,467	0,464	0,002
0,02		0,613	0,557	0,56	0,576	0,031
10,0		22 h inkubacije	1,852	1,743	1,799	1,798
5,00	1,849		1,843	1,64	1,777	0,118
2,50	1,488		1,55	1,263	1,433	0,151
1,25	1,312		1,26	1,221	1,266	0,045
0,63	0,891		0,974	0,876	0,589	0,052
0,31	0,575		0,613	0,581	0,589	0,020
0,16	0,468		0,463	0,464	0,465	0,002
0,02	1,414		1,385	1,389	1,396	0,015
10,0	24 h inkubacije		1,855	1,741	1,805	1,800
5,00		1,857	1,846	1,642	1,781	0,121
2,50		1,499	1,553	1,268	1,440	0,151
1,25		1,334	1,263	1,225	1,279	0,055
0,63		0,903	0,986	0,886	0,925	0,053
0,31		0,583	0,621	0,583	0,595	0,021
0,16		0,468	0,464	0,465	0,465	0,002
0,02		1,402	1,383	1,378	1,387	0,012

Priloga B6: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja preostanka po hidrodestilaciji SEE (hdSEE-R) proti *C. jejuni* K49/4

Annex B6: Absorbance measurements for determining the antibacterial activity of SEE post-distillation residue (hdSEE-R) against *C. jejuni* K49/4

hdSEE-R		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	2,522	2,394	2,309	2,408	0,107
5,00		2,112	2,082	2,051	2,081	0,030
2,50		1,809	1,253	1,668	1,576	0,289
1,25		1,410	1,007	1,302	1,239	0,208
0,63		0,993	0,975	1,057	1,008	0,043
0,31		0,686	0,722	0,665	0,691	0,028
0,16		0,526	0,516	0,545	0,529	0,014
0,02		0,444	0,432	0,447	0,441	0,007
10,0		4 h inkubacije	2,531	2,306	2,263	2,366
5,00	1,846		2,079	2,025	1,983	0,121
2,50	1,812		1,285	1,652	1,583	0,270
1,25	1,431		1,046	1,323	1,266	0,198
0,63	1,028		0,978	1,071	1,025	0,046
0,31	0,717		0,727	0,685	0,709	0,022
0,16	0,535		0,534	0,565	0,544	0,017
0,02	0,463		0,457	0,459	0,459	0,003
10,0	6 h inkubacije		2,492	2,310	2,279	2,360
5,00		1,912	2,077	2,052	2,013	0,088
2,50		1,807	1,320	1,649	1,592	0,248
1,25		1,426	1,043	1,309	1,259	0,196
0,63		1,023	0,967	1,061	1,017	0,047
0,31		0,690	0,707	0,673	0,690	0,017
0,16		0,530	0,526	0,558	0,538	0,017
0,02		0,538	0,586	0,538	0,554	0,027
10,0		8 h inkubacije	2,594	2,502	2,436	2,510
5,00	1,920		2,138	2,123	2,060	0,121
2,50	1,851		1,226	1,758	1,804	0,337
1,25	1,451		1,056	1,385	1,297	0,211
0,63	1,037		0,983	1,070	1,030	0,043
0,31	0,697		0,715	0,678	0,696	0,018
0,16	0,537		0,527	0,570	0,544	0,022
0,02	0,635		0,669	0,629	0,644	0,021
10,0	10 h inkubacije		2,582	2,477	2,388	2,482
5,00		1,781	2,151	2,124	2,018	0,206
2,50		1,416	1,297	1,606	1,439	0,155
1,25		0,924	1,052	1,367	1,114	0,227
0,63		1,039	0,997	1,024	1,020	0,021
0,31		0,695	0,720	0,679	0,698	0,020
0,16		0,548	0,529	0,569	0,548	0,020
0,02		0,832	0,913	0,813	0,852	0,053

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B6: Vrednosti absorbanca pri določanju protimikrobnega delovanja preostanka po hidrodestilaciji SEE (hdSEE-R) proti *C. jejuni* K49/4

hdSEE-R		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	2,538	2,415	2,389	2,447	0,079
5,00		1,878	2,137	2,130	2,048	0,147
2,50		1,503	1,283	1,596	1,460	0,160
1,25		1,003	1,071	1,448	1,037	0,239
0,63		1,031	0,989	1,087	1,035	0,049
0,31		0,688	0,729	0,706	0,707	0,020
0,16		0,565	0,534	0,581	0,560	0,023
0,02		0,875	0,92	0,843	0,879	0,038
10,0		22 h inkubacije	2,582	2,410	2,393	2,461
5,00	1,883		2,165	2,131	2,059	0,153
2,50	1,494		1,303	1,600	1,465	0,150
1,25	0,952		1,058	1,413	1,005	0,241
0,63	1,027		0,991	1,057	1,025	0,033
0,31	0,685		0,719	0,692	0,698	0,017
0,16	1,217		0,860	0,700	0,780	0,264
0,02	1,509		1,485	1,45	1,481	0,029
10,0	24 h inkubacije		2,603	2,453	2,416	2,490
5,00		1,834	2,181	2,138	2,159	0,189
2,50		1,438	1,304	1,634	1,458	0,165
1,25		0,914	1,063	1,383	1,223	0,239
0,63		1,038	1,006	1,107	1,050	0,051
0,31		0,698	0,721	0,649	0,689	0,036
0,16		1,206	0,914	0,722	0,818	0,243
0,02		1,584	1,471	1,439	1,498	0,076

Priloga B7: Vrednosti absorbanca pri kontrolnem vzorcu s DMSO pri preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov proti *C. jejuni* K49/4

Annex B7: Absorbance measurements of control sample with DMSO in testing the antibacterial activity of extracts against *C. jejuni* K49/4

Kontrola z DMSO		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	2 h inkubacije	0,366	0,364	0,367	0,366	0,002
5,00		0,380	0,382	0,370	0,377	0,006
2,50		0,364	0,376	0,370	0,370	0,006
1,25		0,398	0,396	0,400	0,398	0,002
0,63		0,401	0,397	0,404	0,401	0,004
0,31		0,392	0,401	0,390	0,394	0,006
0,16		0,380	0,381	0,401	0,387	0,012
0,02		0,371	0,356	0,386	0,371	0,015
10,0	4 h inkubacije	0,366	0,367	0,367	0,367	0,001
5,00		0,400	0,403	0,387	0,397	0,009
2,50		0,400	0,409	0,406	0,405	0,005
1,25		0,456	0,435	0,447	0,446	0,011
0,63		0,473	0,457	0,462	0,464	0,008
0,31		0,495	0,488	0,471	0,485	0,012
0,16		0,502	0,518	0,523	0,514	0,011
0,02		0,480	0,497	0,522	0,500	0,021
10,0	6 h inkubacije	0,372	0,368	0,369	0,370	0,002
5,00		0,468	0,471	0,441	0,460	0,017
2,50		0,596	0,588	0,583	0,589	0,007
1,25		0,722	0,718	0,707	0,716	0,008
0,63		0,785	0,794	0,783	0,787	0,006
0,31		0,814	0,923	0,879	0,872	0,055
0,16		0,854	0,961	0,916	0,910	0,054
0,02		0,780	0,894	0,882	0,852	0,063
10,0	8 h inkubacije	0,367	0,363	0,364	0,365	0,002
5,00		0,667	0,677	0,621	0,655	0,030
2,50		0,778	0,759	0,766	0,768	0,010
1,25		0,942	0,934	0,988	0,955	0,029
0,63		0,987	1,011	1,028	1,009	0,021
0,31		1,022	1,061	1,066	1,050	0,024
0,16		0,955	1,072	1,092	1,040	0,074
0,02		0,870	0,961	1,023	0,951	0,077
10,0	10 h inkubacije	0,392	0,375	0,378	0,382	0,009
5,00		0,852	0,833	0,788	0,824	0,033
2,50		1,025	1,028	1,035	1,029	0,005
1,25		1,146	1,159	1,174	1,160	0,014
0,63		1,173	1,206	1,212	1,197	0,021
0,31		1,176	1,233	1,226	1,212	0,031
0,16		1,143	1,207	1,232	1,194	0,046
0,02		1,032	1,149	1,195	1,125	0,084

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge B7: Vrednosti absorbanc pri kontrolnem vzorcu s DMSO pri preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov proti *C. jejuni* K49/4

Kontrola z DMSO		Absorbanca ₅₉₅				
Konc. (mg/ml)		Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	st. dev.
10,0	12 h inkubacije	0,402	0,386	0,391	0,393	0,008
5,00		0,828	0,811	0,779	0,806	0,025
2,50		1,048	1,023	1,021	1,031	0,015
1,25		1,153	1,169	1,160	1,161	0,008
0,63		1,181	1,216	1,196	1,198	0,018
0,31		1,181	1,245	1,201	1,209	0,033
0,16		1,158	1,222	1,214	1,198	0,035
0,02		1,078	1,167	1,186	1,144	0,058
10,0		22 h inkubacije	0,546	0,460	0,489	0,498
5,00	1,008		1,012	0,985	1,002	0,015
2,50	1,086		1,073	1,065	1,075	0,011
1,25	1,203		1,166	1,229	1,199	0,032
0,63	1,228		1,219	1,210	1,219	0,009
0,31	1,286		1,219	1,260	1,255	0,034
0,16	1,283		1,244	1,223	1,250	0,030
0,02	1,339		1,315	1,343	1,332	0,015
10,0	24 h inkubacije		0,513	0,458	0,494	0,488
5,00		1,043	1,035	1,004	1,027	0,021
2,50		1,137	1,113	1,117	1,122	0,013
1,25		1,228	1,212	1,256	1,232	0,022
0,62		1,257	1,247	1,256	1,253	0,006
0,31		1,320	1,256	1,267	1,281	0,034
0,16		1,296	1,280	1,262	1,279	0,017
0,02		1,361	1,358	1,394	1,371	0,020

Priloga B8: Vrednosti absorbanca pri kontrolnem vzorcu pri preverjanju protimikrobnega delovanja izvlečkov proti *C. jejuni* K49/4

Annex B8: Absorbance measurements of control sample in testing the antibacterial activity of extracts against *C. jejuni* K49/4

Kontrola	Absorbanca ₅₉₅				
Čas inkubacije	Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	povprečje	St. dev.
2 h	0,405	0,370	0,400	0,392	0,018
	0,387	0,397	0,394	0,393	0,005
4 h	0,553	0,478	0,545	0,525	0,041
	0,491	0,478	0,474	0,481	0,009
6 h	0,950	0,884	0,936	0,923	0,035
	0,860	0,875	0,985	0,907	0,068
8 h	1,031	0,912	1,022	0,988	0,066
	0,842	1,062	1,083	0,996	0,133
10 h	1,163	1,126	1,189	1,159	0,032
	1,055	1,200	1,246	1,167	0,100
12 h	1,163	1,184	1,194	1,180	0,016
	1,102	1,213	1,246	1,187	0,075
22 h	1,427	1,303	1,303	1,344	0,072
	1,415	1,331	1,286	1,344	0,065
24 h	1,344	1,354	1,338	1,345	0,008
	1,372	1,304	1,308	1,328	0,038

Priloga C1: Citotoksičnost izbranih izvlečkov za celice PSI z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega

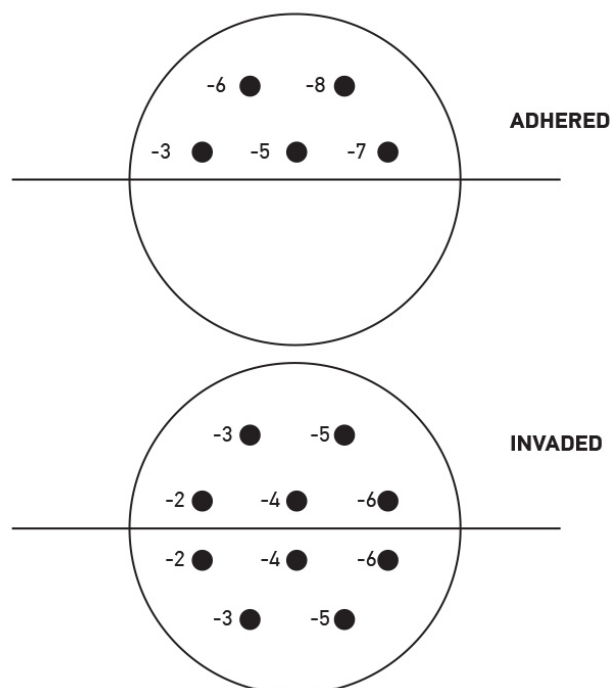
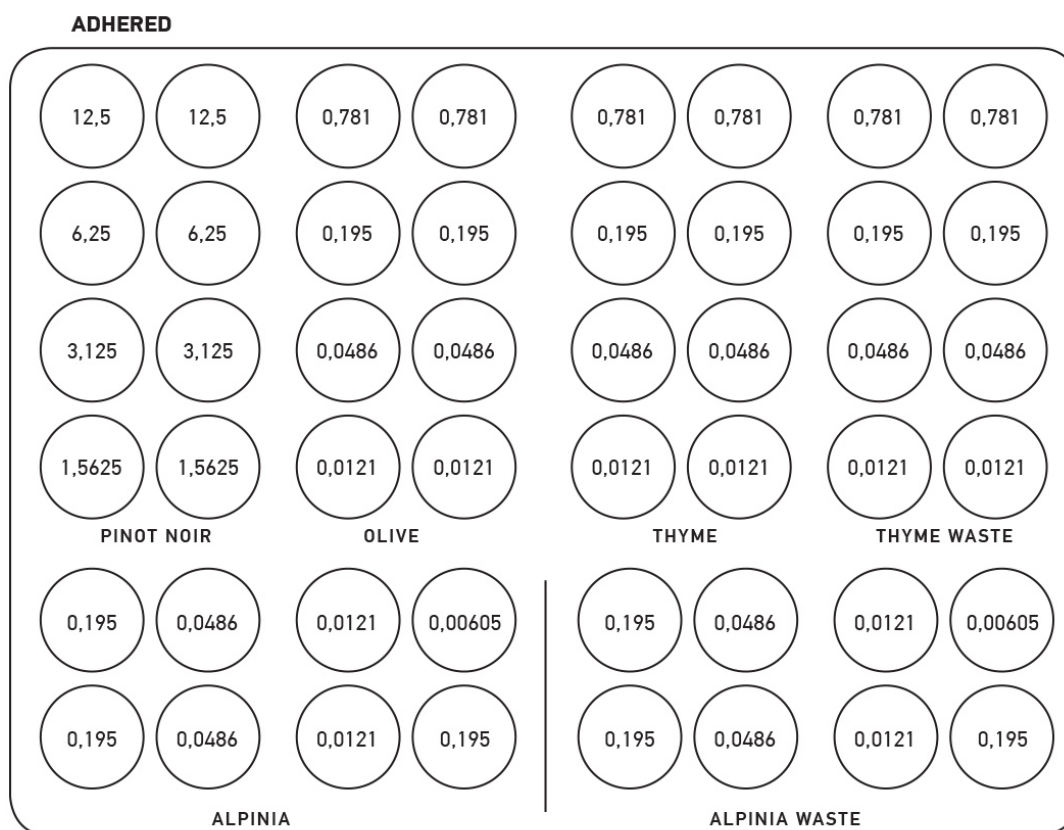
Annex C1: Cytotoxicity of selected extracts toward PSI cells using crystal violet staining

Konc. (mg/ml)	Absorbanca ₅₇₀							
	GE	OE	TE	TE-R	SEE	hdSEE-R	kontrola	10 % DMSO
5,00	1,042	1,164	1,124	0,853	0,883	0,809	1,444	0,318
	1,145	1,196	1,100	0,811	0,788	0,856	1,513	0,106
	1,052	1,042	1,253	0,848	0,936	0,927	1,632	0,203
2,50	1,262	1,477	1,450	1,302	1,311	1,362	1,721	0,128
	1,574	1,422	1,381	1,341	1,330	1,230	1,622	0,118
	1,484	1,393	1,566	1,270	1,323	1,294	1,713	0,113
1,25	1,434	1,736	1,773	1,435	1,480	1,658		
	1,582	1,495	1,646	1,755	1,439	1,529		
	1,720	1,643	1,652	1,649	1,420	1,634		
0,62	1,640	1,713	1,642	1,555	1,427	1,639		
	1,708	1,657	1,678	1,763	1,535	1,872		
	1,651	1,583	1,522	1,583	1,678	1,459		
0,31	1,577	1,594	1,742	1,646	1,702	1,609		
	1,240	1,648	1,518	1,773	1,413	1,751		
	1,618	1,774	1,582	1,574	1,656	1,678		
0,15	1,758	1,340	1,640	1,608	1,521	1,758		
	1,529	1,708	1,425	1,610	1,640	1,529		
	1,334	1,621	1,756	1,508	1,708	1,534		
0,02	1,744	1,415	1,617	1,720	1,621	1,634		
	1,852	1,365	1,534	1,677	1,573	1,613		
	1,772	1,843	1,732	1,650	1,489	1,654		

Priloga C2: Citotoksičnost izbranih izvlečkov za celice H4 z metodo barvanja celic z raztopino kristal vijoličnega

Annex C2: Cytotoxicity of selected extracts toward H4 cells using crystal violet staining

Konc. (mg/ml)	Absorbanca ₅₇₀							
	GE	OE	TE	TE-R	SEE	hdSEE-R	kontrola	10 % DMSO
5,00	0,769	0,941	0,774	0,600	0,451	0,409	1,357	0,112
	0,735	0,926	0,796	0,650	0,488	0,468	1,691	0,100
	0,723	1,135	0,610	0,697	0,436	0,427	1,795	0,174
2,50	1,220	1,257	1,250	0,996	0,811	0,862	1,413	0,155
	1,137	1,120	1,281	1,022	0,933	0,830	1,162	0,208
	1,286	1,296	1,265	1,143	0,836	0,894	1,746	0,216
1,25	1,279	1,388	1,373	1,335	1,310	1,420		
	1,370	1,368	1,346	1,455	1,280	1,300		
	1,352	1,311	1,352	1,349	1,450	1,342		
0,62	1,542	1,513	1,442	1,515	1,557	1,590		
	1,408	1,527	1,578	1,563	1,550	1,878		
	1,680	1,523	1,522	1,620	1,709	1,442		
0,31	1,874	1,547	1,545	1,446	1,700	1,657		
	1,560	1,854	1,415	1,572	1,532	1,469		
	1,637	1,478	1,512	1,503	1,600	1,520		
0,15	1,558	1,489	1,540	1,528	1,520	1,700		
	1,564	1,564	1,672	1,668	1,490	1,630		
	1,434	1,398	1,650	1,581	1,589	1,510		
0,02	1,644	1,515	1,517	1,750	1,752	1,623		
	1,552	1,325	1,504	1,674	1,623	1,522		
	1,520	1,443	1,621	1,548	1,500	1,490		



Priloga D: Shema infekcije PSI celic s *C. jejuni* K49/4 ob uporabi različnih koncentracij rastlinskih izvlečkov

Annex D: Sheme of PSI cells infection with *C. jejuni* K49/4 using different concentrations of extracts