

Učinak ekstrakata ružmarina i maslačka na promjenu adhezije mikroflore i patogena za epitelne stanice jezika

Čučković, Florentina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:480620>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2017

Florentina Čučković
698/USH

**UČINAK EKSTRAKATA
RUŽMARINA I MASLAČKA NA
PROMJENU ADHEZIJE
MIKROFLORE I PATOGENA ZA
EPITELNE STANICE JEZIKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ksenije Durgo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice mag.ing Ane Huđek.

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo koja me usmjeravala i vodila kroz diplomski rad te djelila sa mnom svoja znanstvena i stručna znanja i savjete koji su mi pomogli pri izradi diplomskog rada. Također, zahvaljujem se asistentici mag.ing Ani Huđek koja mi je pomogla pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je bila najveća podrška tijekom mog cjelokupnog školovanja pa tako i tijekom fakultetskih dana. Hvala vam neizmjereno na pruženoj ljubavi, razumijevanju, strpljenju i povjerenju.

I na kraju želim se zahvaliti svim prijateljima koji su mi uljepšavali dane provedene na fakultetu i stvorili uspomene kojih ću se uvijek rado sjećati.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UČINAK EKSTRAKATA RUŽMARINA I MASLAČKA NA PROMJENU ADHEZIJE MIKROFLORE I PATOGENA ZA EPITELNE STANICE JEZIKA

Florentina Čučković, 698/USH

Sažetak: Danas je sve poželjnija primjena prirodnih konzervansa u hrani kao zamjena za sintetičke konzervanse. Ružmarin i maslačak intenzivno se istražuju s obzirom na antibakterijska svojstva kako bi se njihovi ekstrakti mogli koristiti kao prirodni konzervansi. Također, biljni ekstrakti mogu utjecati na vezanje mikroorganizama za epitel stanica probavnog sustava te utjecati na stabilnost mikroflore i razvoj bolesti. Cilj ovog istraživanja je bio testirati utjecaj ekstrakata cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) i lista ružmarina (LR) na adheziju patogenih bakterija *E. coli* i *S. enterica* te bakterija oralne mikroflore *L. plantarum* i *L. fermentum* na epitelne stanice jezika CalB1. Stanice su tretirane netoksičnim koncentracijama ekstrakata tijekom jednog ili dva sata te bakterijama. Postotak inhibicije vezanja (PIV) *E. coli* u odnosu na kontrolu je bio u rasponu od 38.9-60.52%, s time da je LM 0,5x 1 h imao najveći inhibitorni utjecaj na vezanje. Raspon PIV-a kod *S. enterica* je iznosio 57.01-70.46%, a najveći inhibitorni utjecaj je imao ekstrakt CM 0,5x 2 h. Kod bakterije *L. plantarum* za ekstrakte CM 0,5x 1h i LM 1x 1h PIV iznosi 23.16 % i 53.04 %, dok su ekstrakti CM 0,5x 2h i LM 0,5x 1 h poboljšavali vezanje bakterije za stanice za 35.63% i 29.37 % u odnosu na kontrolu. LM 0,5x 1h je utjecao na inhibiciju vezanja *L. fermentum* u postotku od 28.17%, dok su ekstrakti CM 0,5x 2 h i LR 0,5x 1 h povećavali vezanje za 81.04% i 65.69% u odnosu na kontrolu.

Ključne riječi: ružmarin; maslačak; *E. coli*, *S. enterica*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, CalB1

Rad sadrži: 53 stranice, 9 slika, 10 tablica, 106 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Durgo

Pomoć pri izradi: mag.ing, Ana Huđek.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Draženka Komes (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. Prof.dr.sc. Višnja Bačun-Družina (član)
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković (zamjena)

Datum obrane: 26. rujan 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of biochemical engineering
Laboratory for biology and genetics of microorganisms

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

EFFECT OF ROSEMARY AND DANDELION EXTRACTS ON MODIFICATION OF MICROFLORA AND PATHOGENIC BACTERIA FOR EPITHELIAL CELLS OF TONGUE

Florentina Čučković, 698/USH

Abstract: Today, there is an increasing trend of use of natural preservatives in food as a substitute for synthetic preservatives. Rosemary and dandelion are intensively investigated with regard to antibacterial properties so that their extracts can be used as natural preservatives. Also, herbal extracts can have effect on microorganisms adhesion to the epithelial cells of digestive tract and affect the stability of microflora and the development of the disease. The aim of this study was to investigate the influence of dandelion flower (CM), dandelion leaf (LM) and rosemary leaf (LR) extracts on the adhesion of pathogenic bacteria *E. coli* and *S. enterica* and bacteria of oral microflora *L. plantarum* and *L. fermentum* to epithelial cells of tongue CalB1. Cells were treated with non-toxic concentrations of extracts for one to two hours and bacteria. The inhibition percent of binding (PIV) of *E. coli* compared to the control was in the range of 38.9-60.52%. LM extract (0,5x 1h) had the greatest inhibitory binding effect on *E. coli*. The range of PIV in *S. enterica* was 57.01-70.46% and the largest inhibitory effect had a CM extract (0,5x 2h). Extracts CM 0,5x 1h and LM 1x 1h influence on inhibition binding of *L. plantarum* in percentage of 23.16% and 53.04%, while CM 0.5x 2h and LM 0.5x 1h extracts improve binding of bacteria to cells by 35.63% and 29.37% comparing with control. LM 0.5x 1h influenced *L. fermentum* binding inhibition at 28.17%, while CM 0.5x 2 h and LR 0.5x 1 h extracts increased binding by 81.04% and 65.69% in comparison to control.

Keywords: rosemary, dandelion, *E. coli*, *S. enterica*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, CalB1

Thesis contains: 53 pages, 9 figures, 10 tables, 106 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ksenija Durgo, Full Professor

Technical support and assistance: MSc Ana Huđek, Assistant

Reviewers:

1. PhD Draženka Komes, Full Professor
2. PhD Ksenija Durgo, Full Professor
3. PhD Višnja Bačun-Družina, Full Professor
4. PhD Ksenija Marković, Associate Professor/ (substitute)

Thesis defended: 26th September 2017

Sadržaj

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.UVOD | 1 |
| 2.TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Fitokemikalije i čajevi bogati fitokemikalijama | 3 |
| 2.2.Maslačak..... | 5 |
| 2.2.1 Opće karakteristike maslačka | 5 |
| 2.2.2. Biološki aktivne komponente maslačka..... | 5 |
| 2.3.Ružmarin | 7 |
| 2.3.1 Opće karakteristike ružmarina | 7 |
| 2.3.2 Biološki aktivne komponente ružmarina | 8 |
| 2.4.Mikroorganizmi..... | 10 |
| 2.4.1. Karakteristike laktobacila i enterobakterija | 10 |
| 2.4.1.1. Laktobacili | 10 |
| 2.4.1.2. Enterobakterije..... | 11 |
| 2.4.2. Općenite karakteristike bakterijskih sojeva: <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>L. plantarum</i> i <i>L. fermentum</i> | 12 |
| 2.4.2.1. <i>E. coli</i> K-12 MG1655 | 12 |
| 2.4.2.2. <i>Salmonela enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> | 13 |
| 2.4.2.3. <i>Lactobacillus fermentum</i> | 15 |
| 2.4.2.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> | 15 |
| 2.5 Primjena <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> metoda u istraživanjima interakcija mikroorganizama i organizama..... | 16 |
| 2.6. Vežanje bakterija u usnoj šupljini | 17 |
| 2.6.1. Vežanje bakterija na epitelne stanice jezika | 17 |
| 3.EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 3.1.Priprema ekstrakata, bakterija i humanih stanica | 19 |
| 3.1.1. Priprema ekstrakata | 19 |
| 3.1.2. Uzgoj i priprema bakterijskih i humanih stanica | 19 |
| 3.2.Materijali | 20 |
| 3.2.1. Hranjive podloge | 20 |
| 3.2.2. Priprema otopina za eksperimente | 21 |
| 3.3.Metode..... | 22 |
| 3.3.1. Određivanje optičke gustoće bakterija i izrada mikro razrijeđenja..... | 22 |
| 3.3.2. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakata na bakterijske sojeve | 23 |
| 3.3.3. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakata na epitelne stanice jezika | 23 |
| 3.3.4. Testiranje utjecaja ekstrakata na vežanje bakterija za epitel stanica jezika | 24 |
| 3.4. Statistička obrada podataka | 25 |
| 4.REZULTATI I RASPRAVA | 26 |
| 4.1. Rezultati testiranja citotoksičnosti ekstrakata na bakterije <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>L. fermentum</i> i <i>L. plantarum</i> | 26 |
| 4.2. Rezultati testiranja citotoksičnosti ekstrakata na epitelne stanice jezika CalB1 | 27 |
| 4.2.1. Usporedba srednjih vrijednosti postotka preživljenja epitelnih stanica s obzirom na različito vrijeme tretmana ekstraktima..... | 32 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3. Rezultati postotka vezanja bakterija na epitelne stanice jezika uslijed djelovanja primjenjenih ekstrakata..... | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI | 41 |
| 6. LITERATURA | 42 |

1.UVOD

Danas postoji sve veći interes za fitokemikalije kao nove izvore prirodnih antioksidativnih i antimikrobnih sredstava. Sigurnosni aspekti sintetičkih konzervansa još su uvijek kontroverzni, a neki znanstveni istraživači ih smatraju odgovornima za mnoge kancerogene i teratogene osobine (Moreira i sur., 2005).

Veliki broj biljaka posjeduje antibakterijska svojstva zbog čega danas raste trend uporabe prirodnih konzervansa u prehrambenoj industriji koji su u manjoj mjeri ili uopće nisu štetni za zdravlje ljudi u odnosu na sintetske konzervanse. Biljke koje su korištene u ovom istraživanju su list i cvijet maslačka te list ružmarina. Ružmarin se tradicionalno koristi u prehrani kao začim i njegova antibakterijska svojstva su već jako dobro poznata. Što se tiče maslačka danas i nema puno znanstvenih istraživanja o potencijalnim mogućnostima iskorištenja njegovih antibakterijskih i ostalih potencijalnih svojstava, iako se zbog svoje određene ljekovite djelotvornosti koristio dugi niz godina u narodnoj medicini. Svrha ovog istraživanja je utvrditi imaju li maslačak i ružmarin utjecaj na promjenu vezanja oralnih i patogenih bakterija na epitelne stanice jezika CalB1. Unosom hrane i pića u usnu šupljinu se ostvaruje prvi kontakt bakterija i organizma te je to mjesto gdje započinje adhezija u slučaju unosa patogenih bakterija u određenoj koncentraciji. Sposobnost adhezije i kolonizacije patogene bakterije na stanice domaćina je važna karakteristika patogenih bakterija da bi uopće došlo do infekcije organizma domaćina.

Konzumiranjem određene hrane u organizam se mogu unijeti i probiotici koji imaju povoljan učinak na zdravlje čovjeka, a neka istraživanja pokazuju da je, kao i kod patogenih bakterija, izrazito važna njihova sposobnost vezanja na stanice u probavnom sustavu kako bi mogli obavljati svoju funkciju u organizmu. Međutim, većina probiotika unesena hranom se izluči putem fecesa. Ovim istraživanjem utvrdit će se mogu li ekstrakti ružmarina i maslačka utjecati na promjenu vezanja dvije probiotičke kulture *L. fermentum* i *L. plantarum* te dvije patogene bakterije *E. coli* i *S. enterica* u usnoj šupljini.

Lactobacillus plantarum i *Lactobacillus fermentum* su prirodno dio oralne mikroflore ili se mogu unijeti u organizam preko hrane. *L. plantarum* je izoliran iz autohtone hrvatske fermentirane masline, dok je *L. fermentum* izoliran iz ljudske sline. Druge dvije vrste bakterija

koje će biti korištene u ovom radu su patogene bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* serovarus *Typhimurium*. Patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT21 i *Escherichia coli* K-12 MG1655 izolirane su iz crijeva zaraženih pacijenata.

Koncentracije biljaka koje će se koristiti u eksperimentu odgovaraju koncentracijama koje se koriste za uobičajenu konzumaciju čaja napravljenih od navedenih biljaka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FITOKEMIKALIJE I ČAJEVI BOGATI FITOKEMIKALIJAMA

Fitokemikalije su tvari koje se prirodno nalaze u biljkama. Adekvatnim unosom biljaka s visokim udjelom fitokemikalija jača se imunološki sustav čovjeka. Do sada je identificirano nekoliko stotina fitokemikalija. Njihova koncentracija u određenoj namirnici biljnog porijekla često se očituje u živim bojama, a osim boje daju biljci miris i okus. Fitokemikalije prisutne u biljkama su: karotenoidi, flavonoidi, indoli i glukozinolati, inozitoli, izoflavoni, izotiocijanati, polifenoli i terpeni. Svaka od spomenutih kategorija obuhvaća veliki broj spojeva. Nedostatak fitokemikalija u svakodnevnoj prehrani može indirektno utjecati na oslabljenje imuniteta, dok s druge strane konzumiranje namirnica bogatih raznim fitokemikalijama podupire funkcioniranje i proizvodnju imunoloških stanica te pridonosi cjelokupnom očuvanju zdravlja organizma. Glavni zaštitni učinci fitokemikalija u ljudskom organizmu su onemogućavanje stvaranje slobodnih radikala i kancerogenih tvari, reduciranje upalnih procesa, sprječavanje oštećenja DNA i sudjelovanje u obnavljanju DNA strukture, usporavanje rasta stanica raka, reguliranje hormona te apoptoza oštećenih stanica (AICR, 2017).

Krajem 20. stoljeća započela je sve veća upotreba fitokemikalija u funkcionalnoj hrani. Da bi se neka fitokemikalija našla na tržištu kao dodatak prehrani ili dio neke funkcionalne hrane potrebno je napraviti istraživanje kojim će se utvrditi sigurna granica za konzumiranje te tvari, a zatim te rezultate istraživanja provesti kroz zakone koji se odnose na sigurnost, označavanje i zdravstvene tvrdnje za proizvode koji sadrže fitokemikalije (Dillard i German, 2000)

Čajevi koji se već tradicionalno koriste za ublaživanje simptoma kod određenih bolesti i stanja su čajevi od koprive, kamilice, đumbira, mente, matičnjaka, ružmarina te zeleni čaj. Sve ove biljke bogate su fitokemikalijama koje su zaslužne za biološki aktivna svojstva koje imaju i zbog kojih su pogodne za poboljšanje i očuvanje ljudskog zdravlja. Međutim, još uvijek su potrebna dodatna istraživanja kojima se trebaju potvrditi zdravstvene prednosti biljnih čajeva te utvrditi siguran raspon njihove konzumacije koji je povezan s tim prednostima i razjasniti potencijalne mehanizme djelovanja. U tablici 1 nalazi se popis čajeva te stanja i bolesti kod kojih su pokazali da ublažavaju simptome, pridonose izlječenju ili preveniraju nastanak bolesti (Khan i Mukhtar, 2013).

Tablica 1. Popis čajeva i njihovih pozitivnih djelotvornih svojstava na određene simptome, stanja i bolesti (Khan i Mukhtar, 2013)

| Čaj od koprive | Čaj od kamilice | Čaj od lavande | Čaj od matičnjaka |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • anemija • povišeni krvni tlak • reuma i artritis • prehlada • infekcija mokraćnog sustava | <ul style="list-style-type: none"> • nadutost, probavne smetnje • nesanica, napetost i stres | <ul style="list-style-type: none"> • anksioznost, depresija • nadutost i grčevi • respiratorne smetnje | <ul style="list-style-type: none"> • uznemirenost, anksioznost, nesanica • genitalne ranice (virus „herpes simplex“) |
| Čaj od ružmarina | Zeleni čaj | Čaj od đumbira | Čaj od mente |
| <ul style="list-style-type: none"> • opuštanje mišića • žučni mjehur i jetra • kašalj, astma | <ul style="list-style-type: none"> • inhibicija kancerogenih tvari i slobodnih radikala • snižavanje kolesterola i triglicerida u krvi | <ul style="list-style-type: none"> • mučnina • artritis • jačanje imunološkog sustava | <ul style="list-style-type: none"> • olakšavanje probave hrane • nadutost • uznemirenost, nesanica |

Iako se za prevenciju i liječenje bolesti biljke koriste otkako je čovječanstva, zadnjih 30-ak godina razvojem farmaceutske industrije i ostalih tehnologija razne biljke koje prije nisu bile toliko značajne u narodnoj medicini se istražuju i promatraju se njihova ljekovita, antioksidativna, antibakterijska i ostala korisna svojstva. Jedna od njih je i maslačak.

2.2. MASLAČAK

2.2.1 Opće karakteristike maslačka

Maslačak (*Taraxacum officinale*) je član obitelji biljaka *Asteraceae* (*Compositae*). Porijeklom je iz Europe i široko je distribuirana u toplijim umjerenim zonama sjeverne hemisfere. Maslačak se smatra netoksičnom biljkom koja ima diuretsko, antireumatsko te protuupalno djelovanje (Fon Quer, 1962; Bisset i sur., 1994). Također, ima i antioksidativno djelovanje te moguće blagotvorno djelovanje protiv razvoja raka i kardiovaskularnih bolesti. Maslačak je potpuno jestiva biljaka. Lišće, korijenje i cvijeće se koriste u različitim vrstama prehrambenih proizvoda (Escudero i sur., 2003). Kemijske analize sadržaja hranjivih tvari su pokazale da maslačak sadrži velike količine minerala, proteina, vlakana, vitamina te uravnoteženu kombinaciju elemenata u tragovima što ga čini korisnim izvorom mikronutrijenata (Escudero i sur., 2003; Souci i sur., 2008; Shi i sur., 2008). Listovi maslačka se mogu kuhati i procijediti, te piti kao čaj. Ekstrakt maslačka se može koristiti i za promjenu arome i okusa nekog prehrambenog proizvoda (Leung i Foster, 1996; Rivera-Nunez, 1991).

2.2.2. Biološki aktivne komponente maslačka

Prema radu Schütz i suradnika (2006) maslačak sadrži niz fitokemikalija koje imaju potencijalno pozitivan učinak na zdravlje (Tablica 2). Gorčina maslačka dolazi od seskviterpen laktona. Konkretno radi se o spojevima eudezmanolid i germakranolid koji joj daju gorčinu i jedinstveni su za ovu biljku. Promatrajući cjelokupnu biljku, glavni seskviterpen laktoni uglavnom se pojavljuju kao glikozidi, a to su taraksakolidi, dihidrobenzofuranil laktucini, ikserin, taraksična kiselina i ainsliozid (Schutz i sur. 2006, Yarnell i Abascal, 2009).

Iako većinu bioloških spojeva maslačka čine seskviterpen laktoni (istraživanja pokazuju da imaju protuupalne i antitumorske efekte), biljka također sadrži fenilpropanoide (protuupalno djelovanje), terpenoide, polisaharide (jačaju imunološki sustav, imaju pozitivno djelovanje na jetru te antitumorska svojstva) i inulin (imunostimulirajuća funkcija).

Nekoliko studija pokazuju da je maslačak također bogat izvor vitamina (A, C, D, E i B), kolina, inozitola, lecitina i minerala (kalija, kalcija, natrija, magnezija, željeza, silicija, bakara, fosfora, cinka, mangana) (Chevallier, 1996; Gallaher i sur. 2006; Kalny i sur., 2007).

Značajno je da fitokemijski sastav maslačkaka ovisi o sezoni u kojoj se skuplja, o vremenu berbe, kao i drugim ekološkim čimbenicima, a razlikuje se među cvjetovima, lišćem i korijenima

biljke. Kao primjer konačni sadržaj inulina u korijenu maslačka određen je pretvorbom inulina u levulozu (koja varira od 2% u proljeće do 40% u jesen) i ostalih šećera tijekom aktivnog razdoblja životnog ciklusa biljke (Fon Quer, 1962; Schutz, 2006). Kao što je spomenuto, seskviterpen laktoni daju gorak okus biljci, što se posebno može zamijetiti konzumiranjem listova maslačka, osobito kad se bere u proljeće. Od slobodnih sterola prisutnih u listovima maslačka tijekom cijele godine, sitosterol je najbrojniji, nakon čega slijede stigmasterol i kampesterol. Međutim, razina slobodnih metilnih sterola je najviša tijekom zimskih mjeseci, dok su razine estera sitosterola i cikloestola estera najviša tijekom proljeća i ljeta (Westerman i Roddick, 1981).

Tablica 2. Terpeni i fenolne komponente lista maslačka (Gonzalez-Castejon i sur., 2012)

| Terpeni | | Fenolne komponente | | |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------|
| Seskviterpen laktoni | Triterpeni/ fitosteroli | Fenolne kiseline | Flavonoidi | Kumarini |
| taraksinična kiselina β - D-glukopiranozid | β -sitosterol | cikorijina kiselina | luteolin 7- <i>O</i> - glukozid | cikorin |
| 11,13- dihidrotaraksinična kiselina (β -D- glucopiranozid) | β -amirin | monokofeoiltartarična kiselina | luteolin 7- <i>O</i> - rutinozid | eskulin |
| | arnidiol | kofeinska kiselina | apigenin 7 - <i>O</i> - glukozid | |
| | | klorogenična kiselina | kvercetin 7- <i>O</i> - glukozid | |
| | | ρ -hidroksifenilacetična kiselina | izorhamnetin 3- <i>O</i> -glucoside | |

Tablica 3. Fenolne komponente cvijeta maslačka (Gonzalez-Castejon i sur., 2012)

| Fenolne komponente | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Fenolne kiseline | Flavonoidi |
| kofeinska kiselina | luteolin 7- <i>O</i> -glukozid |
| klorogenična kiselina | luteolin 7-diglukozid |
| monokofeiltartarična kiselina | slobodni luteolin |
| | slobodni krizoeriol |

2.3. RUŽMARIN

2.3.1 Opće karakteristike ružmarina

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*, obitelj *Lamiaceae*) je biljka široko rasprostranjena duž sjeverne i južne obale Sredozemnog mora te se često uzgaja u domaćinstvu u mnogim dijelovima svijeta. Ima tamnozeleno, igličaste listove i svjetlo plave cvjetove. Osušeni ili svježi listovi ružmarina koriste se kao začini za meso, peciva, kao biljni čaj te sastojak nekih drugih namirnica. Također se koristi i pri izradi parfema i sapuna (Al-Sereiti i sur., 1999). Istraživanja su pokazala da ružmarin ima potencijalno terapijsko djelovanje na organizam čovjeka jer sadrži antioksidanse koji mogu biti važni za prevenciju određenih bolesti (Mahmoud i sur., 2005).

Eterično ulje ružmarina ima antifungalni i antimikrobni učinak, dok se ekstrakt ružmarina koristi često i kao konzervans u prehrambenoj industriji, prije svega zbog svog antioksidativnog djelovanja (Angioni i sur., 2004; Santoyo i sur., 2005). Europska unija je odobrila ekstrakt ružmarina (E392) kao siguran i učinkovit prirodni antioksidans za očuvanje hrane (FSA, 2016).

Također je poznato da se u mnogim zemljama ružmarin koristio u tradicionalnoj medicini, daleko izvan svoje prirodne mediteranske regije u kojoj raste. Ružmarin ima brojna svojstva, a neka od njih su antibakterijsko (Bozin i sur., 2007) i antikancerogeno (Cheung i Tai, 2007; Yesil-Celiktas, 2010), protuupalno (Gonzalez-Trujano i sur., 2007; Nogueira de Melo i sur., 2011.; M. Estevez i sur., 2007), antioksidativno (Bakirel i sur., 2008; Laura i sur., 2010), antidiuretsko (Haloui, 2000), hepatoprotektivno (Abdel-Wahhab, 2001; Sotelo-Felix, 2002) te pridonosi sprječavanju razvoja dijabetesa (Bakirel, 2008) i tromboze (Yamamoto i sur., 2005).

2.3.2 Biološki aktivne komponente ružmarina

Upotreba ružmarina u kulinarstvu, narodnoj medicini te u kozmetičke svrhe pripisuju se golemim rasponima kemijskih sastojaka koji sadržava, a zajednički naziv im je biljni sekundarni metaboliti (Tablica 3). Biljnim sekundarnim metabolitima pripada i grupa aromatskih spojeva, eterična ulja koja igraju vitalnu ulogu u mirisu i kulinarskim svojstvima biljke. U grupi eteričnih ulja u ružmarinu dominiraju spojevi 1, 8-cineol, α -pinen, kamfen, β -terpineol i borneol kao glavni sastojci (Atti-Santos i sur., 2005; Touafek i sur., 2004), a također su odgovorni i za različite farmakološke učinke kao što su antioksidativno (Estevez i sur., 2007) i antimikrobno (Bozin, 2007; Valgimigli, 2012) djelovanje.

Druga grupa sekundarnih metabolita ružmarina su polifenolni spojevi, koji uključuju flavonoide (homoplantagin, cirsimaritin, genkvanin, galokatehin, nepetrin, hesperidin i derivati luteolina) te derivate fenolne kiseline, npr. ružmarinska kiselina (Bai i sur., 2010; Del Bano i sur., 2004; Okamura i sur., 1994).

Daleko najvažnija skupina spojeva u ružmarinu, koja je posljednjih godina dobila značajnu pozornost, su polifenolni diterpeni. U tu skupinu pripadaju spojevi karnozol, karnozinska kiselina, rozmanol, epirsomanol, izorosmanol, metil karnozat, diterpen kinoni, roilanonska kiselina i rosmakinon B (Sotelo-Felix i sur., 2002).

Ti polifenoli pokazuju antitumorsko i antiupalno djelovanje. Osim toga, mogu imati ulogu u reguliranju aktivnosti i/ili ekspresije određenih enzimskih sustava te na taj način sudjelovati u fiziološkim procesima poput apoptoze i inhibicije rasta tumorskih stanica (Del Bano i sur., 2006). Najvažniji diterpeni u smislu biološkog značaja ružmarina su karnozinska kiselina i karnozol koji se i nalaze u najvećem postotku u ružmarinu u odnosu na druge spojeve

(karnozinska kiselina + karnozol ~ 5% suhe mase ružmarina) te zbog kojih ružmarin ima visoku antioksidativnu djelotvornost (Birtic i sur., 2015; Santos-Gomes i sur., 2003).

Kao i kod svih drugih biljaka koncentracija sekundarnih metabolita može varirati u ružmarinu zbog brojnih čimbenika okoline (npr. intenzitet sunčeve svjetlosti, voda, itd.) i uvjeta rasta (Hidalgo i sur., 1998; Tounekti i Munne-Bosch, 2012).

Tablica 4. Aromatski i polifenolni spojevi u ružmarinu

| Aromatski spojevi | Polifenolni spojevi | | |
|--------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|
| eterična ulja | flavonoidi | fenolne kiseline | polifenolni diterpeni |
| 1,8-cineol | homoplantagin | ružmarinska kiselina | karnozol |
| £-pinen | cirsimaritin | | karnozinska kiselina |
| kamfen | genkvanin | | rozmanol |
| £-terpineol | galokatehin | | epirsomanol |
| borneol | nepetrin | | izorosmanol |
| | hesperidin | | metil karnozat |
| | derivati luteolina | | diterpen kinoni |
| | | | roilanonska kiselina |
| | | | rosmakinon B |

2.4. MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi (MO) su oku nevidljivi organizmi koji se nalaze posvuda u prirodi. Skupini mikroorganizama pripadaju bakterije, gljivice, alge, protozoe, virusi i ostali heterogeni organizmi različiti po svojoj građi i životnim aktivnostima. Bakterije su najbrojnija skupina mikroorganizama. Bitne su u biološkoj evoluciji, osnova su svakog hranidbenog lanca u prirodi i nalaze se gotovo posvuda. Bakterije su i pripadnici fiziološke flore ljudi i životinja (obitavaju na koži, u usnoj i nosnoj sluznici, crijevima, spolnom sustavu) gdje imaju zaštitnu ulogu te povoljan učinak na zdravlje domaćina. Mikroorganizmi nastanjuju i prehrambene proizvode u svježem ili prerađenom stanju i to najčešće populacije bakterija i gljiva. Neke od ovih pripadaju korisnim vrstama (bakterije mliječne kiseline) jer sudjeluju u procesima prerade i sazrijevanja proizvoda, dok neke druge vrste mogu biti i opasni zagađivači hrane. Mikroorganizmi se prema djelovanju na ljude dijele na: MO koji imaju koristan učinak na zdravlje domaćina, patogeni MO koji izazivaju različite infektivne bolesti, nepatogene MO koji su bezopasni te uvjetno patogeni MO koji se u nekim dijelovima tijela normalno nalaze ne izazivajući smetnje, ali ako se nađu na drugom mjestu u ljudskom organizmu izazivaju bolest. Izvori patogenih, štetnih mikroorganizama mogu biti ljudi, kućni ljubimci, hrana, voda... (HAH, 2017)

Bakterije koje su vodeći uzročnici trovanja hranom su *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* i *E. coli O157*. Danas je sve veći broj bakterija koje su razvile otpornost prema antibioticima (rezistentne bakterije). Zato je važna higijena ruku, površina i pribora za pripremu hrane, odgovarajuća termička obrada i čuvanje hrane te izbjegavanje križne kontaminacije (HAH, 2017).

2.4.1. Karakteristike laktobacila i enterobakterija

Bakterijski sojevi koji su korišteni tijekom ovog istraživanja su *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus fermentum*, kao predstavnici *Lactobacillus* sojeva koji prirodno obitavaju u organizmu čovjeka te s druge strane patogene bakterije *Salmonella enterica* i *Escherichia coli* koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*.

2.4.1.1. Laktobacili

Laktobacili su dio crijevne mikroflore ljudskog organizma te dominiraju u tankom crijevu. Crijevna mikroflora koja kolonizira epitelne stanice crijeva je važna za ljudsko zdravlje jer mu osigurava određene esencijalne nutrijente (Salyers i Whitt, 2002). Tako bakterije crijevne mikroflore sintetiziraju biotin i folat te razgrađuju neprobavljive komponente hrane kao što su vlakna (O'Hara i Shanahan, 2006). Dobro je poznato da stabilna crijevna mikroflora može prevenirati rast patogenih bakterijskih sojeva (Guarner i Malagelada, 2003; Dogi i sur., 2008; Stecher i Hardt, 2008) čime pridonosi zaštiti organizma od štetnih mikroorganizama.

Neki laktobacili se koriste u prehrambenoj industriji za tehnološko poboljšavanje određenih mliječnih proizvoda, a ujedno velik broj tih sojeva ima i svojstva probiotika (Giraffa i Widyastuti, 2010). Međutim, spontano fermentirana hrana može biti veliki izvor za još nepoznate ili nedovoljno istražene *Lactobacillus ssp.* vrste koje mogu imati probiotička svojstva (Takeda i sur., 2006).

L. plantarum i *L. fermentum* pripadaju bakterijama crijevne mikroflore, a nalaze se u ustima i ostatku probavnog sustava (O'Hara i Shanahan, 2006).

2.4.1.2. Enterobakterije

Enterobacteriaceae (enterobakterije) ili crijevne bakterije su normalna mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja. Obitelj *Enterobacteriaceae* obuhvaća rodove: *Salmonella* (patogen), *Escherichia* (potencijalni patogen), *Shigella* (patogen), *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella* i *Erwinia*. Prisutnost enterobakterija u namirnicama indikator je fekalnog zagađenja, odnosno nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja i rukovanja s namirnicama. Namirnice u kojima se ustanovi prisutnost enterobakterija smatraju se zdravstveno neispravnima. Izolirane mikrobiološkim brisevima s površina, ruku osoblja i pribora ukazuju na fekalno zagađenje i nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju (Ewing, 1986).

2.4.2. Općenite karakteristike bakterijskih sojeva: *E. coli*, *S. enterica*, *L. plantarum* i *L. fermentum*

2.4.2.1. *E. coli* K-12 MG1655

U ovom eksperimentalnom istraživanju korišten je bakterijski soj *E. coli* K-12 MG1655. *E. coli* je gram negativna bakterija koja pripada obitelji enterobakterija (*Enterobacteriaceae*). Obitava u ljudskom organizmu kao dio crijevne mikroflore gdje je korisna bakterija, a istovremeno može biti i patogena za čovjeka i uzrokovati crijevne bolesti ili neke druge bolesti izvan probavnog trakta (Stecher i Hardt, 2008). Patogeni sojevi *E. coli* mogu nositi nekoliko faktora virulencije koji su izravno uključeni u patogenezu tih bakterija, iako komenzalni sojevi mogu također uzrokovati bolest kod domaćina (Stecher i Hardt, 2008; Johnson i sur., 1988).

E. coli se može klasificirati u četiri različite filogenetičke grupe: A, B1, B2 i D (Clermont i sur., 2000). Filogenetičke grupe A i B1 uglavnom se sastoje od prirodno prisutnih sojeva pronađenih u debelom crijevu domaćina (čovjeka ili životinje), te neki sojevi iz okoliša (Rijavec i sur., 2008). Te bakterije obično nemaju nikakve virulencijske faktore (Johnson i sur., 2001). Dok filogenetičke grupe B2 te manje opsežna grupa D obično nose virulencijski vezane gene (VGs) koji su najčešće povezani s bolestima izvan crijevnog trakta (Clermont i sur., 2000; Johnson i sur., 2001). Neka istraživanja upućuju da i sojevi grupe A i B1 mogu uzrokovati neke bolesti, iako to još nije potvrđeno (Bingen-Bidois i sur., 2002). Patogeni sojevi *E. coli* mogu uzrokovati tri glavna tipa infekcije: crijevne bolesti ili dijareju, infekcije urinarnog trakta i sepsu ili meningitis (Johnson, 1991; Nataro i Kaper, 1998).

Veliki je broj virulencijskih vezanih gena (VGs) koji omogućuju da soj *E. coli* koji uzrokuje infekcije izvan crijevnog trakta preživi nepovoljne okolišne uvjete i uzrokuje bolest kod domaćina. Ti virulencijski faktori su adhezini (npr. tip 1 fimbrije i P-pili), toksini (npr. hemolizin), polisaharidne kapsule (npr. K1 i K5), itd. Većina tih VGs-a su kontrolirani određenim kontrolnim genetičkim mehanizmima, odnosno dolazi do njihove ekspresije ovisno o okolišnim uvjetima kao što su pH, osmolarnost, temperatura, koncentracija aminokiselina itd. (Johnson, 1991; Holden i Gally, 2004).

2.4.2.2. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

Salmonella enterica je fakultativni anaerob i gram negativna bakterija, pokretljiva je i ima bičeve, pripada porodici *Enterobacteriaceae* (Bronze i Greenfield, 2005; Garrity i sur., 2005; Collins i Kennedy, 1983). Čovjek se najčešće inficira kad konzumira hranu i vodu koja je bila u kontaktu s inficiranim fecesom ili s inficiranom životinjom (Bronze i Greenfield, 2005; Murray i sur., 2007).

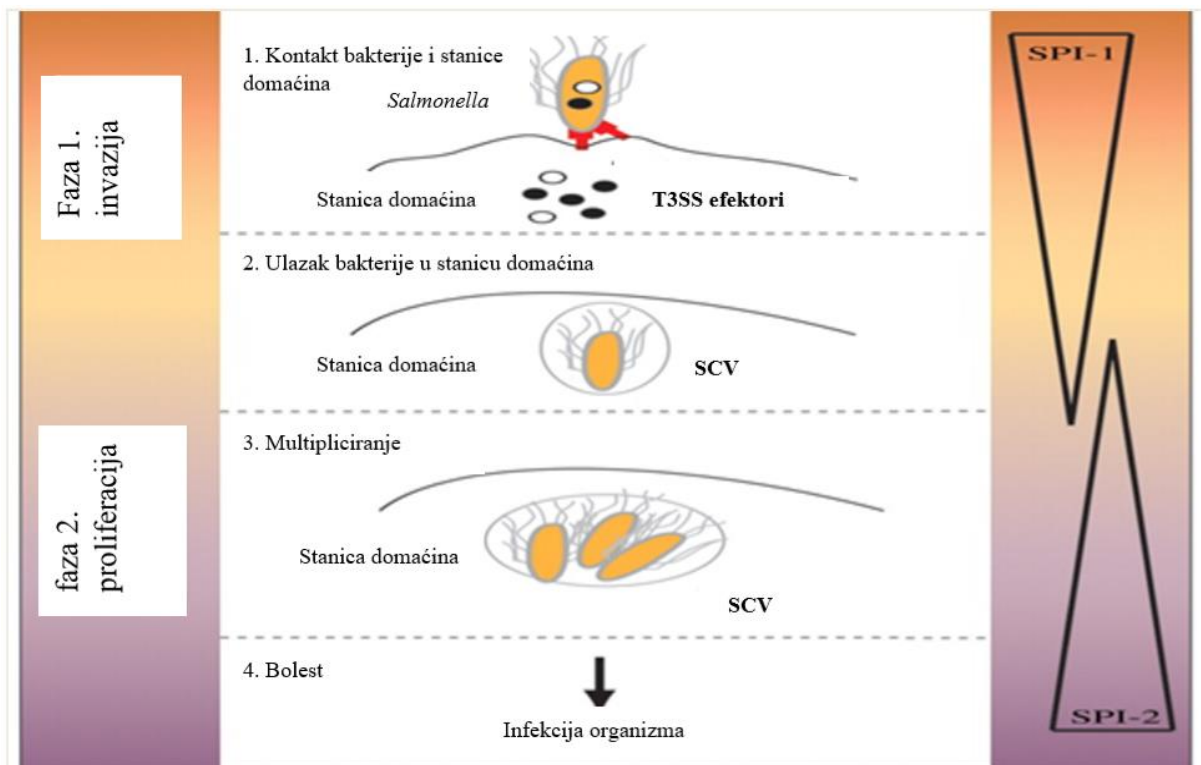
Hrana kod koje je dosad najčešće pronađena je perad, meso, jaja i mliječni proizvodi, iako može rasti gotovo na bilo kojoj hrani. Period inkubacije za salmoneloze je uglavnom između 5-72 sata (Krauss i sur., 2003). Bakterijski rod *Salmonella* se fizički može uništiti kuhanjem na temperaturi iznad 121°C, najmanje 15 minuta ili pečenjem na suhom zraku na temperaturi od 170°C, najmanje sat vremena. Također, može se i dezinficirati ozonom (Block, 2001).

Bakterijskom rodu *Salmonella* pripadaju genetski vrlo slične bakterije, na razini DNA sličnost se podudara oko 95-99%. Postoje tri glavna serovara soja *S. enterica*, a to su *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhi*. To su sojevi koji uzrokuje bolesti intestinalnog sustava. Svaki ovaj soj uzrokuje različite manifestacije bolesti, ali najčešći zajednički simptomi su mučnina, povraćanje, temperatura i smrt. Nakon što bakterija uđe u ljudski organizam putem hrane/vode dolaze do intestinalnog trakta i tu se vežu za crijevne resice. *S. enterica* ima veliki broj adhezivnih struktura, a to joj omogućuje lako vezanje na površinu stanica domaćina (Maloy, 2004).

Prvi snažan kontakt između domaćina i mikroba je preduvjet za pokretanje različitih procesa poput formiranja biofilma ili translokacije proteina, nakon čega slijedi ulazak bakterije u stanicu domaćina i kasnije širenje bakterije u organizmu. Bakterije iz roda *Salmonella* su razvile različite strategije za adheziju. Adhezivne strukture se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: fimbrijalne i nefimbrijalne adhezine (Soto i Hultgren, 1999). Fimbrije su proteinski dodaci na površini bakterije koji se pojavljuju u nekoliko kopija po stanici (Bäumler i Heffron, 1995). Nefimbrijalni adhezivi su neproteinski adhezini.

Osim toga, nekoliko površinskih struktura salmonela, čije glavne funkcije prvenstveno nisu uključene u adheziju, također doprinose kod kolonizacije tkiva domaćina. Jedna od tih površinskih struktura je flagela, dugi polimerni proteinski dodatak koji je neophodan za bakterijsku pokretljivost (Ramos i sur., 2004).

Sustav za lučenje tipa III (T3SS) je najbitniji za omogućavanje vezanja bakterija na epitel stanice i invazije bakterije u stanicu (Slika 1). Kad su bakterije vezane na epitel stanica njihov sustav za patogenost “*Salmonella pathogenicity island 1*” (SPI-1) uzrokuje translokaciju efektorskih proteina putem T3SS u stanicu domaćina. Tada dolazi do modificiranja citoskeleta stanice i to rezultira ulaskom bakterije u stanicu domaćina i formiranjem vakuole oko nje (SCVs). Bakterija se multiplicira u vakuoli pod utjecajem „*Salmonella pathogenicity island 2*“ (SPI-2) te njenim otpuštanjem iz vakuole dolazi do infekcije sustava. (Kosarewicz i sur., 2012).



Slika 1. Prikaz puta infekcije bakterijskim rodом *Salmonella* (Kosarewicz i sur., 2012)

Također, lipopolisaharid koji je komponenta stanične stijenke bakterije ima adhezivni učinak na humane stanice koji se pripisuje njegovom amfifilnom svojstvu (Nevola i sur., 1985) Zbog velikog broja adhezivnih mehanizama, a samim time i dobre prilagodljivosti u sustavu domaćina, salmonele su iznimno opasani patogeni.

2.4.2.3. *Lactobacillus fermentum*

L. fermentum je gram pozitivna bakterija, ne tvori spore i nepokretna je. Iako nije dominantna vrsta u crijevima, studije su pokazale da pokazuje probiotičke karakteristike. Ima sposobnost proizvodnje vodikovog peroksida, bakteriocina i bio-surfaktanta koji inhibiraju rast crijevnih i urogenitalnih patogena (Anukam i Reid, 2007; Kaur, 2013). Klinička ispitivanja pokazala su da je soj *L. fermentum* učinkovit u smanjenju intestinalnih patogena i povećava omjer probiotičkih bakterija kod zdravih ljudi (Shieh i sur., 2011).

Tulumoglu i sur. (2014) su proučavali imaju li sojevi *L. fermentum*, izolirani iz tulum sira, karakteristike probiotika. Istraživanja su pokazala da su sojevi *L. fermentum* LP3 i LP4 ispunili dovoljne kriterije kako bi bili probiotici te se ujedno koristili kao starter kulture u proizvodnji tulum sira ili drugih mliječnih proizvoda. Ti sojevi mogu preživjeti prilično nepovoljne gastro intestinalne uvjete kao što su niski pH, žučne kiseline i dobro se adsorbiraju na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta. Osim toga, inhibiraju rast patogenih bakterija, snižavaju kolesterol u krvi i pridonose očuvanju zdravlja domaćina. Ova studija je pokazala da *L. fermentum* ima probiotička svojstva, iako prirodno ne dominira u crijevnoj mikroflori čovjeka.

2.4.2.4. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum, kao i svi probiotici, je korisna bakterija koja ima pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Jedna je od preko 50 vrsta *Lactobacillus*. Prvi je put izolirana iz ljudske sline. Nalazi se u biljkama, ali i u probavnom traktu životinja i ljudi. Koristi se u fermentaciji određene hrane kao što su kiseli kupus, kiseli krastavci te kruh od kiselog tijesta. Osim što doprinosi normalnom zdravlju probavnog sustava općenito, pokazalo se da je taj soj učinkovit i kod liječenja sindroma iritabilnog kolona (IBS-eng. *irritable bowel syndrome*), Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Pokazuje i sposobnost proizvodnje aminokiseline L lizin-a, koja je važna za sintezu kolagena.

Među najnovijim istraživanjima o soju *L. plantarum* pokazano je da je djelotvoran u sprečavanju alergije na soju. Kod fermentiranih proizvoda od soje, tamo gdje se koristio *L.*

plantarum dobiven je novi proizvod koji kod 99% ljudi, koji su inače alergični na soju, takav proizvod nije izazvao nikakvu imunološku reakciju.

Kod zdravih osoba *L. plantarum*, kao i ostale korisne bakterije u crijevima, sprječava rast patogenih bakterija. Vrlo je otporna bakterija na većinu antibiotika, što je vrlo pogodno za ljudski organizam jer antibiotici uzrokuju rast kvasaca, čime se remeti probava i stanje organizma, dok *L. plantarum* sprječava hiperprodukciju kvasaca (Arena i sur., 2016).

2.5 PRIMJENA *in vitro* I *in vivo* METODA U ISTRAŽIVANJIMA INTERAKCIJA MIKROORGANIZAMA I ORGANIZAMA

In vitro i *in vivo* metode imaju različite uloge u istraživanju te i jedna i druga metoda imaju prednosti i nedostatke. *In vitro* metoda (lat., „u staklu“) odnosi se na ispitivanje utjecaja određenih kemijskih ili bioloških komponenata koje se provodi izvan živog organizma i uglavnom uključuje izolirana tkiva, organe ili stanice. *In vivo* metoda (lat., „unutar živog“) uključuje testiranje utjecaja kemijskih ili bioloških komponenata na cijelim živim organizmima, obično na životinjama, a može uključivati i ljude i biljke.

Ovisno o svrsi istraživanja, *in vitro* metode mogu biti vrlo pogodne za dobivanje odgovarajućih informacija, dok se za neke druge eksperimente ne mogu primjenjivati. *In vitro* metode omogućuju istraživačima da relativno precizno utvrde kako i zašto određeni faktor izaziva ili sprječava nastanak neke bolesti. U eksperimentalnim studijama u *in vitro* uvjetima istraživači mogu ispitati niz događaja koji se odvijaju pri djelovanju nekog faktora na stanice u strogo kontroliranim uvjetima. Obično nakon što se u *in vitro* uvjetima utvrdi da neka tvar ima neko određeno svojstvo, istraživanje se dalje nastavlja primjenom *in vivo* metoda.

Prednosti *in vitro* metoda su što se uvjeti istraživanja mogu kontrolirati i prilagođavati; visok je stupanj ponovljivosti, testiranje je brzo i nije skupo, potrebna je mala količina materijala za testiranje, mogu se koristiti humane stanice i tkiva te se smanjuje ispitivanje na životinjama. Nedostaci su što se ne mogu utvrditi adekvatne doze određene tvari koja ima pozitivan učinak na zdravlje čovjeka, ne mogu se testirati interakcije između tkiva i organa i ne mogu se ispitati kronični efekti. Također, svojstvo koje je određena tvar pokazala da ima u *in vitro* metodi ne mora biti ista za složeni sustav kao što je organizam čovjeka.

In vivo metode podrazumjevaju istraživanja na životinjama i na ljudima. U slučaju da se *in vitro* metodom utvrdi neko svojstvo za određenu tvar, da bi se ona našla na tržištu obično se moraju provesti dodatne analize korištenjem *in vivo* metoda. Prednosti *in vivo* metoda kod animalnih studija u odnosu na *in vitro* metode je to što se može istražiti kako ta određena tvar djeluje na sve organe unutar sustava. Međutim, ipak se ti rezultati trebaju uzeti s rezervom s obzirom da se ljudski organizam razlikuje od životinjskog. Osim toga, postoje i etički principi kojih se istraživači trebaju pridržavati korištenjem *in vivo* metoda (Bradamante i Jurić-Lekić, 2000).

2.6. VEZANJE BAKTERIJA U USNOJ ŠUPLJINI

Usnu šupljinu čine usne, unutrašnja strana obraza, jezik, nepce i zubi. Svi ti elementi usne šupljine imaju različitu površinu, pa se samim time i na njih vežu različiti mikroorganizmi koji imaju određen sastav i metabolizam koji je usklađen s biološkim svojstvima stanice na koju su vezani. Pioneerove vrste koloniziraju površine obložene slinom stvarajući određene stereokemijske interakcije adhezin-receptor te mijenjaju lokalne uvjete okoline. Na taj način se razvija stabilna zajednica biofilma koja ima aktivnu ulogu u uobičajenom razvoju fiziologije staništa i obrani domaćina od patogena (Marsh, 2009).

Cijela usna šupljina je obložena slinom koja također ima utjecaj na ekologiju usta (Scannapieco, 1994). pH sline je između 6,75-7,25, što pogoduje rastu mnogih mikroorganizama. Glavni organski sastojci sline su proteini i glikoproteini, poput amilaze, mucina, imunoglobulina (uglavnom IgA), lizozima, laktoferina i sialoperoksidaze. Ti sastojci su važni za oralnu mikrofloru jer im omogućuju adheziju pomoću intermolekularne interakcije na površini usne šupljine i stvaranje početnog filma bakterija (Gibbons, 1989; Lamont i Jenkinson, 2000). Također, ti sastojci djeluju kao primarni izvori hranjivih tvari (ugljikohidrati i proteini) koji potiču rast oralne mikroflore (Beighton, 1986; van der Hoeven 1998).

2.6.1. Vezanje bakterija na epitelne stanice jezika

U normalnim uvjetima dorzalna površina jezika je ružičaste boje ili je prekrivena tankim bijelim naslagama. Površinu kolonizira mnoštvo bakterija, uglavnom u području brazdi, fisura i oko jezičnih papila. Ta anatomska skrovišta stvaraju pogodne uvjete za razvoj mikroorganizama jer su slinom zaštićena od ispiranja. Niska razina kisika pogoduje razvoju anaerobnih mikroorganizama (Roldán i sur., 2003). Jezične naslage sastoje se od vidljivoga

bijelo-smeđeg sloja vezanog za površinu dorzuma jezika, a čine ga odljuštene epitelne stanice, krvne stanice, metaboliti, hranjive tvari i bakterije. Pronađeno je da je na jednu epitelnu stanicu na dorzum jezika vezano više od 100 bakterija, a samo oko 25 bakterija adherira na jednu stanicu u svim ostalim dijelovima usne šupljine (Yaegaki i Coil, 2000). Površinu jezika opisao je Maeda (2006) i to kao površinu koja se sastoji od okomito položenih papila.

Epitelne stanice su stanice koje oblažu sve organe te su gusto stisnute jedna uz drugu. One su barijera između vanjskih tvari i unutrašnjosti tijela, te su najčešće prvo mjesto u tijelu koje napadaju mikroorganizmi te se tek onda šire dalje u tijelu.

Površina jezika pokrivena je slojevitim pločastim epitelom, koji je na gornjoj površini modificiran u nitaste papile (fungiform, filiform i cirkumvalate). Te papile, na površini imaju bjelkasti orožnjeni dio koji doprinosi hrapavosti jezika te olakšava svojstvo jezika da miješa hrane prilikom žvakanja. Na staničnoj membrani epitelnih stanica su vezani posebni receptori koji primaju podražaj. Podraženi receptori tih stanica šalju signale prema mozgu gdje se informacija obrađuje što ljudski organizam registrira kao određeni podražaj (okus, dodir) (SIU SOM, 2012).

U ovoj studiji korištene se ljudske stanice karcinoma epitela jezika CalB1.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. PRIPREMA EKSTRAKATA, BAKTERIJA I HUMANIH STANICA

3.1.1. Priprema ekstrakata

10 g cvijeta maslačka, lista maslačka i lista ružmarina preliveno je s 200 mL vruće vode. Nakon pola sata ekstrakcije, dobiveni ekstrakti su upareni i liofilizirani. Pripremljeni liofilizati korišteni su za pripremu ishodišnih i radnih otopina korištenih u eksperimentima. Ekstrakti su izrađeni u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu.

3.1.2. Uzgoj i priprema bakterijskih i humanih stanica

U ovom radu su korišteni bakterijski sojevi: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus fermentum*. Kako bi se dobila dovoljna količina stanica za provođenje eksperimenata, bakterijske stanice su uzgajane u potpunim hranjivim, tekućim podlogama do eksponencijalne faze rasta. 100 μ L bakterijskih sojeva *Salmonella enterica* i *Escherichia coli* nacijepnjene su u LB podlogu i uzgajane na 37 °C 18 sati uz aeraciju. 100 μ L sojeva *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus fermentum* nacijepnjeno je u MRS podlogu. Stanice su uzgajane u anaerobnim uvjetima na 37 °C 20 sati.

Ljudske stanice carcinoma epitela jezika CalB1 uzgajane su u RPMI mediju uz dodatak 10 % fetalnog seruma u atmosferi s 5 % CO₂ i na temperaturi od 37 °C. Stanice jezika donirane su s Instituta Ruđer Bošković. Uzgajane su u monosloju u T-boci u CO₂ inkubatoru. Stanice se mogu odvojiti mehanički ili kemijski. Mehanički se odvajaju struganjem, međutim tada se oštećuje sama stanica, dok se kemijski stanice odvajaju djelovanjem enzima tripsina. U ovom istraživanju stanice su za eksperimente bile pripremljene korištenjem 0,025%-tne otopine tripsina. Iz T-boce najprije se izvadi medij, jedanput se ispere medij s par mL tripsina, a potom se dodaje 3-4 mL tripsina i T-boca se vraća u inkubator na 15-ak minuta kako bi tripsin djelovao. Nakon toga se na mikroskopu pogleda jesu li se stanice dobro odvojile, ako jesu u T-bocu se dodaje 4-5 mL medija kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Zatim se otpipetira

jedna kapljica uzorka i stavi se 10 μL u Bürker Türkovu pločicu te se na mikroskopu izbroje stanice. Dobije se broj stanica koji se nalazi u volumenu od 0,1 mm^3 te se izračuna koji broj stanica se nalazi u 1 cm^3 , tj. u jednom mL

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Hranjive podloge

Tablica 5. Sastav LB hranjive podloge

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|------------------|----------|
| Bakto-tripton | 10 g |
| Kvašćev ekstrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Destilirana voda | 1000 mL |

Tablica 6. Sastav MRS hranjive podloge

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|------------------|----------|
| MRS Broth | 16.56 g |
| Destilirana voda | 600 mL |
| Agar | 9 g |

Sastav LB i MRS hranjive podloge prikazani su u tablici 5 i 6. Podloge su pripremljene prema uputama proizvođača i sterilizirane u autoklavu prije korištenja, pri temperaturi 121°C u trajanju od 15 minuta i tlaku od 1 bar.

Tablica 7. Sinnonsov citratni agar

| | |
|------------------------------------|---------|
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ | 1 g |
| K_2HPO_4 | 1g |
| NaCl | 5g |
| Natrij citrat | 2g |
| Na_2SO_4 | 0,2g |
| Agar | 15g |
| bromtimolno modriilo | 0,08 |
| destilirana voda | 1000 mL |

Sastav Sinnonsovog citratnog agara je prikazan u tablici 7. Nakon dodavanja svih komponenata provodi se sterilizacija tikvice pri temperaturi od 110 °C kroz 15 minuta i tlaku od 0,5 bar.

Tablica 8. Sastav M9-minimalne podloge za enterobakterije s laktozom

| 1.dio | | 2.dio | |
|----------------------------------|---------|---------------------------------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ | 6 g | 1 M MgSO ₄ | 2 mL |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g | 1 M CaCl ₂ | 100 μL |
| NaCl | 0,5 g | 20 % laktoza | 10 mL |
| NH ₄ Cl | 1 g | TIAMIN (2 mg mL ⁻¹) | 1 mL |
| AGAR | 15 g | | |
| Destilirana voda | 1000 mL | | |

Izrada M9-minimalne podloge s laktozom prikazana je u tablici 8. Kad se svi sastojci (prikazani u tablici 8, 1.dio) sjedine u tikvici potrebno ih je sterilizirati pri temperaturi od 130°C, tlaku od 1 bar kroz 15 minuta. Nakon sterilizacije, kada se sadržaj malo ohladi, ali je još uvijek vruć, u sterilnim uvjetima dodaju se sastojci navedeni sastojci prikazani u tablici 8 (2.dio).

Sastav PBS-a je prikazan u Tablici 9. Sterilizacija pufera provodi se pri temperaturi od 121°C i tlaku 1 bar kroz 15 minuta.

Tablica 9. Sastav PBS-a

| | | |
|------------------------------------------------------|---------|--------|
| NaCl | 8 g | 2,4 g |
| KCl | 0,2g | 0,06g |
| Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O | 1,15g | 0,35g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2g | 0,06g |
| Destilirana voda | 1000 mL | 300 mL |

3.2.2. Priprema otopina za eksperimente

Ekstrakti

Iz dobivenih liofilizata pripremljene su ishodišne otopine deset puta veće koncentracije. Iz tih otopina pripremane su radne otopine u koncentracijama: 0,5x, 1x, 2,5x i 5x. Koncentracija 1x

predstavlja sadržaj bioaktivnih tvari prisutnih u uobičajeno pripremljenim napitcima namijenjenim za konzumaciju.

NR (*Neutral Red*)

Otopina *Neutral red*-a je pripremljena tako što je u 99% medija dodano 1% *Neutral red* otopine koncentracije 5 mg mL⁻¹.

Otopina za odbojavanje

Otopina za odbojavanje je pripremljena tako da sadrži 50% etanola, 49% vode i 1% octene kiseline.

0.01 % otopina Triton X

0.01 % otopina Triton X je pripremljena tako je u 9.9 mL PBS-a dodano 100 µL Triton X.

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje optičke gustoće bakterija i izrada mikro razrijeđenja

Kako bi se odredio broj bakterijskih stanica na kojima će se ispitivati citotoksični učinak ekstrakata prvo je potrebno odrediti nakon kojeg vremena se pojedini soj nalazi u ekspanzionalnoj fazi. Nakon što su bakterije nacijeppljene u odgovarajuće tekuće podloge, svakih sat vremena je mjerena optička gustoća (OD) na spektrofotometru ($A=600$ nm) za svaki soj te su sojevi svakih sat vremena nacijeppljivani na krute podloge do milijuntog razrijeđenja. Kao slijepa proba korišten je samo medij, MRS ili LB, ovisno o bakterijskom soju kojem je mjerena apsorbancija. Sojevi *L. plantarum* i *L. fermentum* su nacijeppljeni na MRS krute podloge koje su sadržavale nalidiksinsku kiselinu, *S. enterica* je nacijeppljena na citratnu krutu podlogu, dok je *E. coli* nacijeppljena na M9 krutu podlogu koja sadrži laktozu. Nacijeppljene podloge spremljene su u termostat na 37 °C gdje su ostale preko noći. Nakon 24 sata bakterije na pločama su prebrojane te je prema dobivenim rezultatima određeno vrijeme ekspanzionalne faze za svaki pojedini soj.

3.3.2. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakata na bakterijske sojeve

Kako bi se ispitalo postoji li citotoksičan učinak ekstrakata na bakterijske sojeve u eksperimentu su korištene koncentracije 0,5x, 1x, 2,5x i 5x veće od uobičajene koncentracije koju bi sadržavala jedna šalica čaja koja sadrži 2 g osušenog cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) ili lista ružmarina (LR), prelivena s 200 mL vruće vode. 50 μ L odgovarajuće koncentracije ekstrakta otpipetirano je u Eppendorf epruvete te 50 μ L bakterijskog soja. Ukupni volumen u Eppendorf epruveti iznosio je 100 μ L. Eppendorf epruvete su stavljene na tresilicu na sat vremena pri temperaturi od 37 °C. Nakon sat vremena stanice su naciepljene u razrijeđenjima od deset tisuća do milijun puta na odgovarajuću ploču za svaki soj. Ploče su preko noći ostavljene u termostatu. Drugi dan je prebrojan broj bakterija koji je porastao.

3.3.3. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakata na epitelne stanice jezika

100 μ L stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} naciepljuje se u mikrotitarske pločice. Nakon vezivanja, stanice se tretiraju odgovarajućim koncentracijama pripremljenih ekstrakata. Da bi se dobile koncentracije ekstrakata 0,5x, 1x, 2,5x i 5x uzeti su alikvoti iz ishodišne otopine i dodani u medij. U svaki bunarić u mikrotitarskoj ploči dodano je po 100 μ L određene koncentracije ekstrakata te su napravljene po 3 replike svake koncentracije. Tretman stanica s ekstraktima trajao je jedan, odnosno dva sata. Svaki eksperiment ponovljen je tri puta. Nakon tretmana, sa stanica se uklanja medij s ekstraktima te se stanice ispiru s otopinom PBS-a. U bunariće je dodano po 100 μ L *Neutral red* boje razrijeđene u mediju. Ploča je stavljena u CO₂ inkubator na 45 min. Nakon toga je izvađen medij s bojom te su stanice isprane s po 100 μ L PBS-a. Ploča je stavljena u hladnjak te je drugi dan dodana otopina za odbojavanje. U zadnji bunarić na ploči, također se stavlja otopina za odbojavanje te on služi kao kontrola. Na spektrofotometruje izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 520 nm.

3.3.4. Testiranje utjecaja ekstrakata na vezanje bakterija za epitel stanica jezika

U ploče s 24 bunarića nacijepljuje se po 1 mL stanica 10^5 mL^{-1} . Iz dobivenih rezultata citotoksičnosti, određene su netoksične koncentracije ekstrakata kao i vrijeme izlaganja stanica u kojem ne dolazi do toksičnog učinka. S obzirom na to, stanice epitela jezika tretiraju se izabranim netoksičnim koncentracijama ekstrakata u odgovarajućem vremenu.

To su koncentracije CM 0,5x kojim su stanice tretirane 1 i 2 sata, 0,5x i 1x LM kojim su stanice tretirane 1 sat, te 0,5x LR tretirane 1 sat. Za svaku koncentraciju su napravljene dvije replike te su preostala 2 bunarića služili kao kontrola. Kontrolu su činile stanice tretirane samo medijem (bez ekstrakata). Na slici 2 nalazi se skica izvedbe eksperimenta.



Slika 2. Odabrane koncentracije ekstrakata i vremenski period tretiranja stanica CalB1

K-kontrola; CM-cvijet maslačka; LM-list maslačka; LR-list ružmarina

Nakon što je prošlo odgovarajuće vrijeme stanice su isprane dva puta s PBS-om. Na stanice je dodano po 0,5 mL bakterijskog soja čiji je OD podešen na 0,25-0,50 pri apsorpciji od 600 nm. U prvih 12 bunarića nacijepljena je bakterija *Lactobacillus fermentum* pri podešenom OD-u od 0,390, a druga polovica ploče je nacijepljena s *Lactobacillus plantarum* pri podešenom OD-u od 0,315. Na drugu ploču na prvu polovicu nacijepljena je *S. enterica* pri OD od 0,329, a na drugu polovicu ploče nacijepljena je *E. coli* pri OD od 0,410.

Kako bi se podesila optička gustoća bakterija, bakterije su prvi dan ranije nacijepnjene po 200 μ L u 5 mL odgovarajuće podloge, te je drugi dan suspenzija centrifugirana. Supernatant je otpipetiran te je dodan ostatak suspenzije, a centrifugiranje je ponovljeno. Supernatant se ponovo odbaci te se dodaje PBS, bakterije se ponovo centrifugiraju te se postupak ponavlja još jedanput. Par mikrolitara centrifugiranog soja je uzeto i dodano u medij pogodan za stanice, te je pri 600 nm mjeren OD bakterija i podešen pri već napisanim vrijednostima.

Stanice su potom tretirane pola sata bakterijama te je ploča držana u termostatu na 37°C. Nakon toga stanice su isprane dva puta s PBS-om i tretirane 0,01 %-tnim Tritonom X, te je ploča odstajala u termostatu 15 minuta.

Razrijeđenja stanica pripremljena su u mikrotitarskoj pločici, do milijuntog razrijeđenja. Bakterije su nacijepnjene na odgovarajuće selektivne podloge i stavljene u termostat, a nakon 2 dana su izbrojane porasle bakterije.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu SPSS 17.0 (IBM, Chicago, SAD) korištenjem *one way* ANOVA testa uz statističku značajnost od 95%.

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1.REZULTATI TESTIRANJA CITOTOKSIČNOSTI EKSTRAKATA NA BAKTERIJE *E. coli*, *S. enterica*, *L. fermentum* i *L. plantarum*

Citotoksičnost ekstrakata na bakterijama je proučavana tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta bakterija. Rezultati su pokazali da niti jedan od primijenjenih ekstrakata (CM, LM, LR) u koncentracijama 0,5x, 1x, 2,5x i 5x nije imao citotoksičan učinak na niti jedan bakterijski soj (rezultati nisu prikazani).

Ti rezultati se djelomično slažu s istraživanjem Ghaima i sur. (2013) koji su utvrdili da maslačak ima slabo antibakterijsko djelovanje na *E. coli*, dok na neke druge bakterije korištene u eksperimentu nije imao nikakav citotoksičan učinak. Sličnu studiju su proveli Ionescu i sur. (2013) testirajući antimikrobnu aktivnost hidroalkoholnih ekstrakata određenih biljaka uključujući i list maslačka na više bakterijskih sojeva te su rezultati pokazali da je maslačak imao blago antibakterijsko djelovanje na sojeve *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Salmonella abony enterica* NCTC 6017. Jedno od objašnjenja koje može pojasniti izostanak antibakterijskog učinka ekstrakata istraživanih u ovom radu vezano je za otapalo koje se koristi za ekstrakciju bioaktivnih komponenti. Naime, Ionescu i Ghaima su koristili hidroalkoholno otapalo kojim se iz biljaka ekstrahiralo puno više bioaktivnih tvari nego što je to moguće korištenjem vodenog otapala koje je korišteno kao sredstvo za ekstrakciju u ovom radu, a samim time i citotoksični učinak ekstrakta je manji iako su koncentracije korištene u svim eksperimentima bile približno jednake. Također, bitan faktor je i vrijeme izlaganja stanica istraživanim ekstraktima. U prijašnjim istraživanjima, vrijeme tretmana bakterijskih stanica s ekstraktima bilo je 24 sata, dok je u ovom istraživanju maksimalno vrijeme izlaganja stanica ekstraktima bilo 2 sata. To vrijeme je izabrano s obzirom na približavanje eksperimentalnim uvjeta realnim, naime, teško je vjerojatno da će bakterije prisutne u usnoj šupljini moći biti izložene djelovanju bioaktivnih tvari 24 sata u nekom realnom sustavu.

Iako u ovom istraživanju rezultati nisu pokazali da ružmarin ima citotoksično djelovanje na bakterije, većina istraživanja ipak pokazuju da ima. Genena i sur. (2008) su proučavali antimikrobnu aktivnost ružmarina ekstrahiranog pomoću superkritičnog CO₂. Prema

rezultatima su zaključili da ružmarin ima antibakterijsku aktivnost na *E. coli* i neke druge bakterije, ali je ta aktivnost manje učinkovita kod gram negativnih bakterija u odnosu na gram pozitivne bakterije.

Također, Unalan i sur. (2011) su u svojoj studiji utvrdili da ružmarin posjeduje antibakterijska svojstva. Cilj studije koju su proveli bila je procijeniti imaju li ekstrakti nara i ružmarina utjecaj na mikrobiološke, fizikalno-kemijske i senzorske kvalitete, te samim time na rok trajanja, tijekom skladištenja ribe grenlandskog iverka pakiranog u modificiranoj atmosferi (MAP, eng. *modified atmosphere packaging*). Dominantna mikroflora koja uzorkuje kvarenje fileta iverka su *Lactobacillus spp.* Ova istraživanja su pokazala da je filet odgovarao karakteristikama svježije ribe i imao nisku koncentraciju laktobacila čak nakon 23 dana, po čemu bi se moglo zaključiti da ružmarin posjeduje antibakterijska svojstva.

Još jedno istraživanje je pokazalo da ružmarin djeluje citotoksično na gram pozitivne bakterije. Kozłowska i sur. (2015) su istraživali utjecaj određenih začina na laktobacile. Ružmarin je pokazao da ima snažno inhibitorno djelovanje na *L. acidophilus* i *L. delbrueckii* te nešto slabije na dva soja *L. plantarum* 299v i *L. plantarum* NCAIM 13,01834 na kojima je provedeno istraživanje. Ovi rezultati sugeriraju da nije preporučljivo koristiti ekstrakt ružmarina kao aditiv u mliječnim i mesnim proizvodima u kojima je prisutan *L. plantarum* s obzirom da ima citotoksičan učinak na taj soj.

4.2. REZULTATI TESTIRANJA CITOTOKSIČNOSTI EKSTRAKATA NA EPITELNE STANICE JEZIKA CalB1

Kako bi se ispitaio citotoksični učinak ekstrakata na epitelne stanice jezika, stanice su tretirane ekstraktima u različitim koncentracijama te nakon što je prošlo sat vremena/dva sata stanice su isprane PBS-om, a preživljenje je određeno *Neutral red* metodom. Rezultati su pokazali da su ekstrakti utjecali na postotak preživljenja stanica ovisno o njihovoj koncentraciji. Što je koncentracija ekstrakta bila viša postotak preživljenja tretiranih stanica je bio manji u odnosu na kontrolne stanice čime se može zaključiti da kod nekih ekstrakata pri određenoj koncentraciji postoji citotoksično djelovanje na stanice.

U tablici 10 su prikazane srednje vrijednosti citotoksičnog učinka cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) i lista ružmarina (LR) s pripadajućim standardnim devijacijama.

Tablica 10. Srednje vrijednosti preživljenja stanica izražene u postotku, tretirane ekstraktima (CM, LM, LR) pri odgovarajućoj koncentraciji kroz jedan ili dva sata

| vrijeme tretiranja | 1 sat | | | | 2 sata | | | |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | 0,5x | 1x | 2,5 | 5x | 0,5x | 1x | 2,5 | 5x |
| KE | 0,5x | 1x | 2,5 | 5x | 0,5x | 1x | 2,5 | 5x |
| CM SVP (%) | 79,30* | 72,82* | 85,67 | 74,82* | 70,38^{d,*} | 78,23^{d,*} | 78,51^{d,*} | 52,78^{a,b,c,*} |
| st.dev | 3,57 | 6,71 | 7,33 | 3,68 | 2,48 | 10,63 | 11,86 | 7,74 |
| LM SVP (%) | 89,70^c | 89,01^c | 62,16^{a,b,d,*} | 84,99^{b,c} | 105,83^{b,c,d} | 51,17^{a,*} | 57,17^{a,*} | 48,83^{a,*} |
| st.dev | 5,54 | 9,83 | 9,53 | 8,59 | 18,21 | 5,86 | 15,69 | 10,17 |
| LR SVP (%) | 59,01^{d,*} | 45,37* | 60,19^{d,*} | 51,50^{a,c,*} | 59,12^{b,*} | 32,00^{a,d,*} | 44,70* | 40,33^{b,*} |
| st.dev | 7,60 | 6,94 | 6,39 | 4,33 | 9,52 | 4,50 | 5,33 | 7,65 |

KE-koncentracija ekstrakata; SVP- srednja vrijednost preživljenja; CM- cvijet maslačka; LM- list maslačka; LR- list ružmarina

Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: *-kontrolu, a-koncentraciju 0,5x; b-koncentraciju 1x, c-koncentraciju 2,5x; d-koncentraciju 5x

Rezultati testa su pokazali da kod ekstrakta cvijeta maslačka (CM) pri svim koncentracijama tijekom tretmana od jednog i dva sata postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, što znači da je CM citotoksičan za stanice u svim koncentracijama i tijekom jednog i dva sata tretiranja. Srednja vrijednost postotka preživljenja stanica tretiranih koncentracijama od 0,5x do 5x tijekom jednog sata te od 0,5x do 2,5x tijekom 2 sata kreće se u rasponu od 70-85% što ustvari pokazuje da su te koncentracije blago toksične za stanice, dok je koncentracija 5x tijekom tretmana od 2 sata iznimno toksična za stanice s obzirom da je srednja vrijednost postotka preživljenja 52, 78 %.

Nakon statističke obrade podataka utvrđeno je da LM nije toksičan pri koncentracijama 0,5x i 1x tijekom tretmana stanica ekstraktom tijekom jednog sata, dok su koncentracije 2,5x i 5x toksične za stanice. Tijekom dvosatnog tretmana stanica ekstraktom rezultati su pokazali da koncentracija od 0,5x nema citotoksičan učinak, dok je za ostale koncentracije test pokazao da postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, dakle ostale koncentracije imaju citotoksičan učinak.

Ovi rezultati se relativno slažu s istraživanjem kojeg su provodili He i sur. (2011) o farmakološkim aktivnostima maslačka. Promatrali su postoji li mogućnost da vodeni ekstrakt maslačka ima antivirusno djelovanje na virus gripe humani A/PR/8/34 i WSN (H1N1) te testirali citotoksičnosti ekstrakta maslačka na humanim stanicama. Humane stanice A594 ili MDCK (eng. *Maldin-Darby canine kidney*) su tretirane određenom količinom ekstrakta maslačka u rasponu od 0,1563 do 20 mg mL⁻¹ tijekom 48 sati. Istraživanjem su odredili da je CC₅₀ ekstrakta maslačka 8.47 mg mL⁻¹.

U ovom radu određena je citotoksična koncentracija ekstrakata koja ubija 50 % humanih epitelnih stanica. Tako je dobiveno da CC₅₀ iznosi 14.09 mg mL⁻¹. Kod ekstrakta lista maslačka CC₅₀ tijekom tretmana od jednog sata iznosi 52.75 mg mL⁻¹, a tijekom dva sata tretmana iznosi 17.05 mg mL⁻¹.

Iako je maslačak poznati tradicionalni biljni lijek s dugom poviješću, od nedavno su dostupne samo ograničene znanstvene informacije koje opravdavaju njegovu uporabu. Smatra se da maslačak ima nisku razinu toksičnosti zbog nedostatka određenih toksina ili alkaloida, koje sadrže neke druge biljke. Među prvim poznatim znanstvenim istraživanjima u kojima je korišten ekstrakt korijena maslačka u *in vivo* studijama na miševima (intraperitonealni unos) određeno je da srednja letalna doza (LD₅₀) iznosi od 28,8-36,6 g ekstrakta na kilogram tjelesne mase miševa (Racz-Kotillai i sur., 1974).

Neka druga istraživanja su također pokazala nisku razinu toksičnosti maslačka. Kunići koji su oralno tretirani s 3-6 g ekstrakta maslačka na kilogram tjelesne mase nisu pokazivali vidljive znakove akutne toksičnosti (Akhtar i sur., 1985). Međutim, zbog prisutnosti seskviterpen lakton taraksične kiseline (glukopiranozil ester maslačaka) maslačak može uzrokovati alergijski kontaktni dermatitis (Jovanović i sur., 2004; Lundh i sur., 2006).

Statističkom obradom podataka nakon testiranja učinka ekstrakta lista ružmarina pri svim koncentracijama tijekom tretmana od jednog i dva sata dokazano je da postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, što znači da je LR citotoksičan za stanice u svim koncentracijama i tijekom jednog i dva sata tretiranja. Tijekom tretmana od jednog sata CC₅₀ iznosi 15.21 mg mL⁻¹, a tijekom dva sata tretmana iznosi 8.83 mg mL⁻¹.

Velik broj istraživanja proveden je ispitivajući citotoksičan učinak ružmarina na različite stanične linije. Rezultati naše studije odgovaraju rezultatima većine drugih istraživanja. Salih i sur. (2015) su provodili studiju kako bi se procijenili antitumorski učinci vodenog i metanolnog ekstrakta ružmarina na skeletnim mišićnim tumorskim stanicama rabdomiosarkoma (RD, eng. *rhabdomyosarcoma*) i na zdravoj staničnoj liniji fibroblastima mišjeg embrija (MEF, eng. *mouse embryo fibroblast*). Stanične linije RD i MEF su tretirane 24 sata koncentracijama ekstrakta ružmarina 50, 100, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i procijenjen je njihov postotak inhibicije rasta (PGI, eng. *percentage growth inhibition*). Rezultati su pokazali da su svih pet koncentracija biljnih ekstrakata pokazalo anti-tumorsko djelovanje na stanice ovisno o koncentraciji. Manje koncentracije su pokazale niže citotoksične učinke. Metanolni ekstrakt bilježio je bolje vrijednosti PGI-a nego vodeni ekstrakt u RD staničnim linijama, dok su manje razlike vrijednosti PGI-a između metanolnog i vodenog ekstrakta zabilježene kod MEF stanične linije. Maksimalna inhibicija proliferacije postignuta je pri najvišoj koncentraciji 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Najviša koncentracija ekstrakta ružmarina koju su koristili Salih i sur. (2015) ekvivalentna je najnižoj koncentraciji korištenoj u ovoj studiji (0,5x LR). Salih i sur. (2015) su dobili rezultate u kojima PGI tijekom tretmana RD stanične linije najvećom koncentracijom ekstrakta iznosi 82 i 84% za vodeni i metanolni ekstrakt, što znači da postotak preživljenja stanica iznosi 18 i 16%. Međutim, za MEF staničnu liniju su dobili rezultate da je PGI 14 i 15% za vodeni i metanolni ekstrakt, što znači da postotak preživljenja iznosi 86 i 85%. Naša studija je pokazala da tijekom tretmana epitelnih stanica jezika vodenim ekstraktom ružmarina 0,5x postotak preživljenja iznosi 50,01 i 50,12 % tijekom jednog i dva sata tretmana.

Ove razlike se mogu objasniti time što su se tijekom oba istraživanja koristile različite stanične linije, različita vremena tretiranja, ali i različita otapala pri pripremi ekstrakata ružmarina pa prema tome i ekstrakt ružmarina na njih različito djeluje.

Još jedno istraživanje čiji su rezultati pokazali citotoksičan učinak vodenog ekstrakta ružmarina na staničnu liniju crvenog luka (*Allium cepa*) je studija koju su proveli Cardoso i sur. (2014). Stanice *Allium cepa L.* su učestali testni sustav za procjenu citotoksičnosti vodenih ekstrakata ljekovitih biljaka. Cardoso i sur. (2014) pripremili su četiri koncentracije sirovog vodenog ekstrakta lista ružmarina (0,02, 0,04, 0,06 i 0,08 mg mL^{-1}) kojima su tretirane stanice korijena crvenog luka u vremenu od 24 i 48 sati. Rezultati su pokazali da je ekstrakt imao antiproliferativno djelovanje na stanice pri svim koncentracijama i tijekom 24 i 48 sati. Stoga se može zaključiti da pri navedenim koncentracijama ružmarin ima citotoksično djelovanje na stanice crvenog luka.

Također, Yesil-Celiktasis i sur. (2010) su procjenjivali djelovanje vodenih i alkoholnih ekstrakata lista *R. officinalis*, u koncentracijama od 12,50 do 47,55 mg mL⁻¹, na humanim staničnim linijama NCI-H82 (karcinom pluća), DU-145 (karcinom prostate), Hep-3B (hepatocelularni karcinom), K-562 (kronična mijelogena leukemija) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) i potvrdili da je ružmarin značajno inhibirao podjelu svih tih stanica.

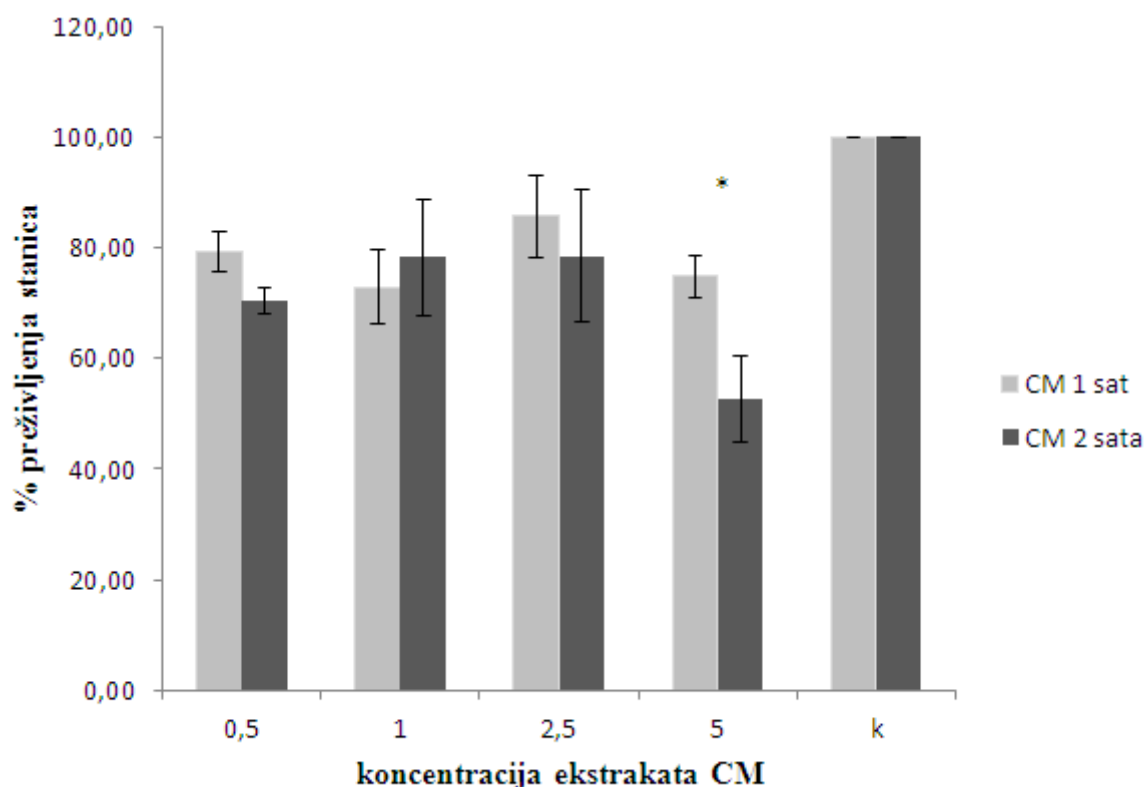
Mehanizam citotoksičnog djelovanja spojeva iz ružmarina na stanice objasnili su Visanji i sur. (2006). Prema svojim rezultatima, tvrde da velike doze diterpen karnozola iz ružmarina utječu na dijeljenje stanica, odnosno da diterpen karnozol djeluje na B1 cikline tijekom procesa diobe i tako onemogućava pravilno formiranje diobenog vretena.

Što se tiče rezultata postotka preživljenja stanica očekivanja su bila da će postotak preživljenja biti obrnuto proporcionalan s povećanjem koncentracije ekstrakata. Međutim, kod nekih viših koncentracija, npr. kod ekstrakta LR pri koncentraciji 2,5x tijekom tretmana od jednog sata dobiveni rezultati pokazuju da je postotak preživljenja veći nego kod stanica tretiranih istim ekstraktom koncentracije 1x. To se može objasniti time da postoji mogućnost da ekstrakti ili višak boje nisu dobro isprani tijekom provedbe eksperimenta i samim time povećavaju apsorbanciju. Na mikroskopu se može vidljivo uočiti da je broj mrtvih stanica veći što je koncentracija ekstrakata tijekom tretmana bila viša.

4.2.1. Usporedba srednjih vrijednosti postotka preživljenja epitelnih stanica s obzirom na različito vrijeme tretmana ekstraktima

Korištenjem ANOVA testa te grafičkih prikaza u MO Excel programu uspoređeno je postoji li statistički značajna razlika između tretmana stanica istim ekstraktima i pri istim koncentracijama, ali pri različitom vremenu.

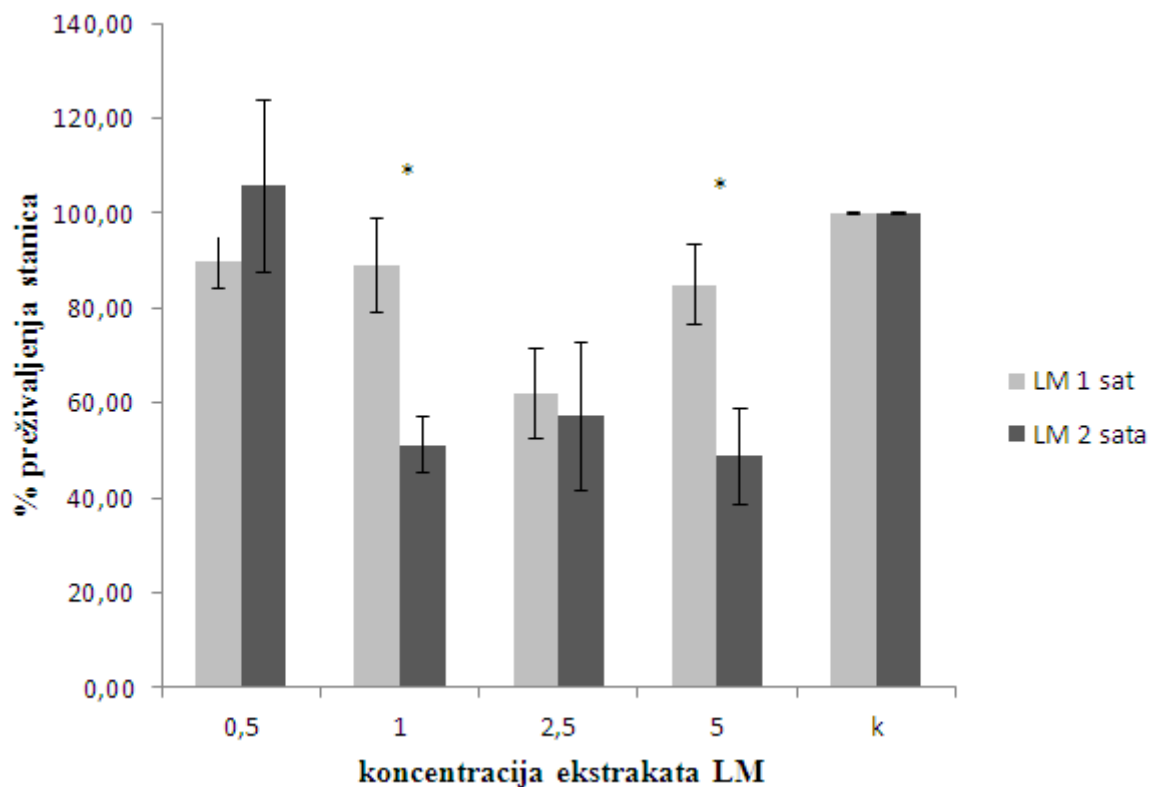
Dobiveni rezultati prikazani na Slici 3 uspoređuju postotak preživljenja stanica epitela jezika tretiranih ekstraktom CM pri istim koncentracijama unutar jednog i dva sata tretiranja



*-Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vremena tretmana

Slika 3. Usporedba postotka preživljenja stanica epitela jezika tretiranih ekstraktom CM pri istim koncentracijama u različitom vremenu

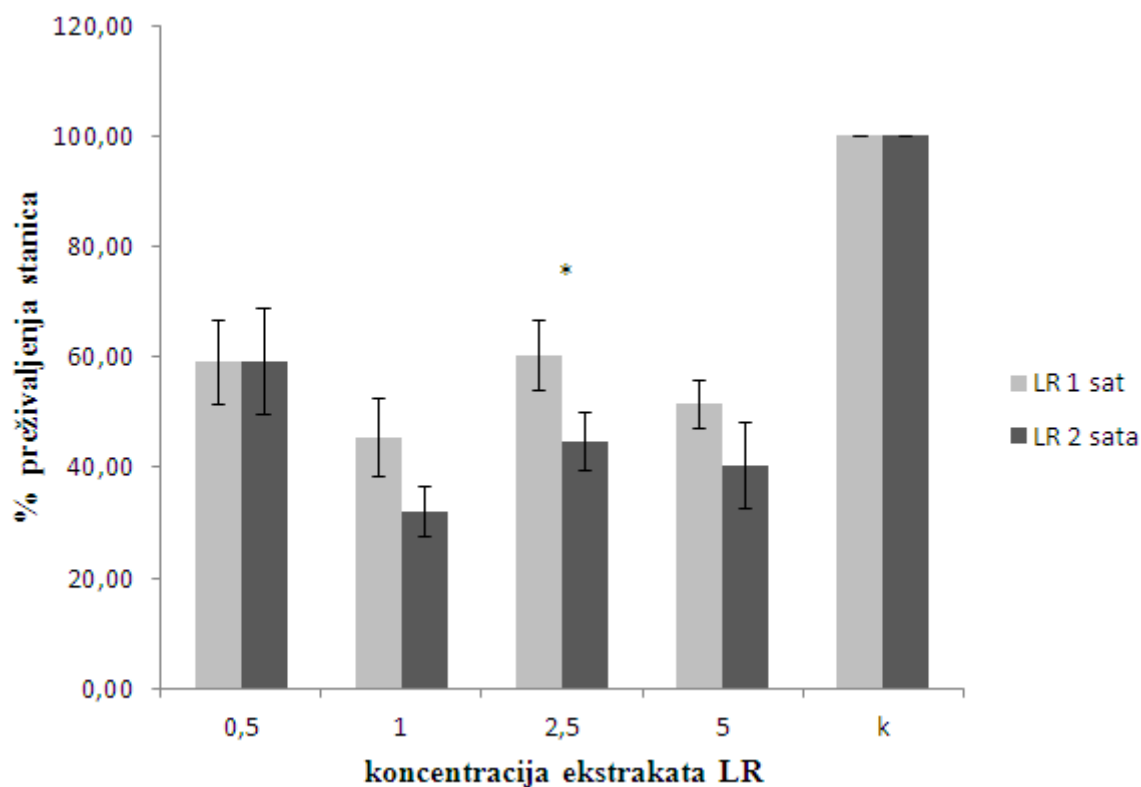
Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između tretmana stanica ekstraktom cvijeta maslačka pri istim koncentracijama unutar jednog i dva sata tretmana, osim pri koncentraciji 5x, gdje postoji statistički značajna razlika između tretmana ekstraktima unutar jednog i dva sata.



*-Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vremena tretmana

Slika 4. Usporedba postotka preživljenja stanica epitela jezika tretiranih ekstraktom LM pri istim koncentracijama u različitom vremenu

Dobiveni rezultati prikazani na Slici 4 pokazuju da postoji statistički značajna razlika unutar sat vremena i dva sata tretiranja stanica koncentracijama 1x i 5x kod ekstrakta lista maslačka. Time se može zaključiti da vrijeme tretiranja utječe na povećanje postotka citotoksičnosti ekstrakata lista maslačka u ovisnosti o koncentraciji.



*-Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vremena tretmana

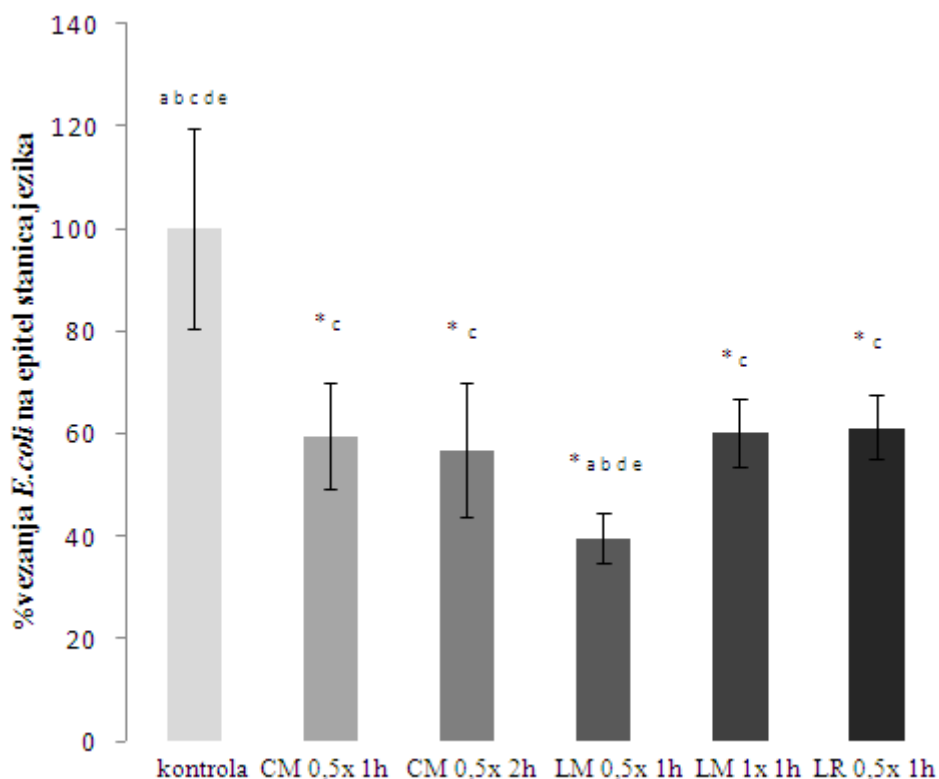
Slika 5. Usporedba postotka preživljenja stanica epitela jezika tretiranih ekstraktom LR pri istim koncentracijama u različitom vremenu

Dobiveni rezultati prikazani na Slici 5 pokazuju da postoji statistička značajka između koncentracija 2,5x kod ekstrakta lista ružmarina kojim su tretirane stanice. Koncentracija 2,5x nakon 2 sata ima veći citotoksičan učinak u odnosu na istu koncentraciju pri tretmanu od jedan sat.

4.3. REZULTATI POSTOTKA VEZANJA BAKTERIJA NA EPITELNE STANICE JEZIKA USLIJED DJELOVANJA PRIMIJENJENIH EKSTRAKATA

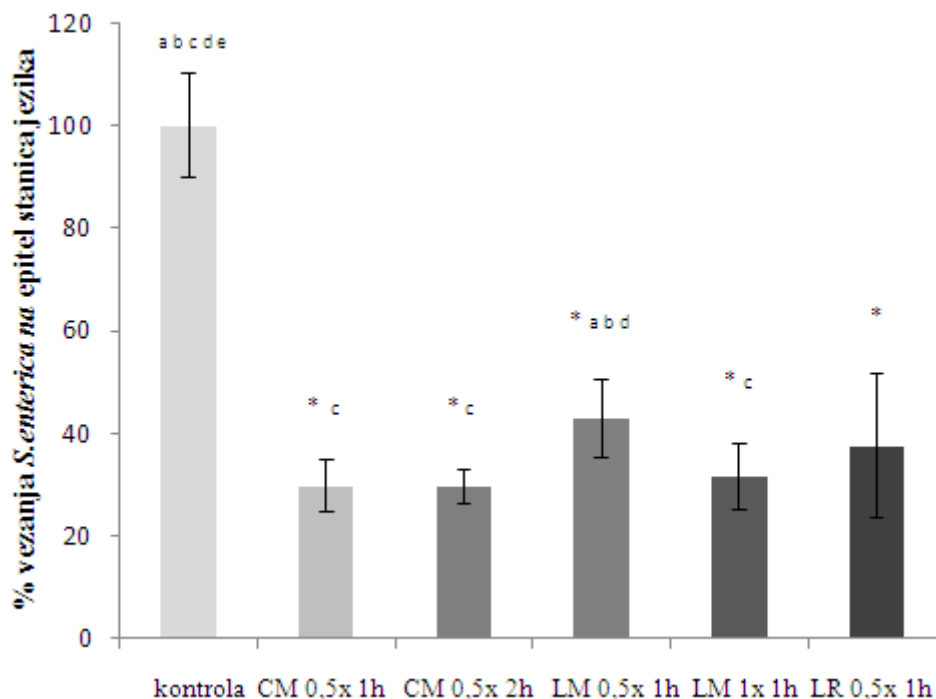
Prema vrijednostima dobivenim u eksperimentima u kojima se određivao citotoksični učinak ekstrakata na bakterijske stanice i stanice epitela usne šupljine, određeni su eksperimentalni uvjeti pri kojima se pratio učinak ekstrakata na promjenu adhezije bakterijskih stanica za epitel. Tako su istražene koncentracije i određena su vremena tretmana: CM 0,5x 1h, CM 0,5x 2h, LM 0,5 1h, LM 1x 1h, LR 0,5x 1h. Te koncentracije i vremena tretmana koji su uzeti za ispitivanje utjecaja ekstrakata na vezanje bakterija na epitel stanica jezika odabrani su jer su bili netoksični ili najmanje toksični od ostalih koncentracija za epitel stanica jezika i bakterijske sojeve.

Za bakterije *E. coli* i *S. enterica* rezultati pokazuju da je postotak vezanja bakterije za epitel stanica jezika koje su prethodno tretirane u određenoj koncentraciji navedenih ekstrakata statistički značajno manji u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani na Slici 6 i 7.



Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0.05$) u odnosu na : *-kontrolu; a-CM 0,5x 1 h; b-CM 0,5x 2 h; c-LM 0,5x 1 h; d- LM 1x 1 h; e-LR 0,5x 1 h

Slika 6. Postotak vezanja *E. coli* na epitelne stanice jezika ovisno o primjeni različitih ekstrakata cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) i lista ružmarina (LR)



Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0.05$) u odnosu na : *-kontrolu; a-CM 0,5x 1 h; b-CM 0,5x 2 h; c-LM 0,5x 1 h; d- LM 1x 1 h; e-LR 0,5x 1 h

Slika 7. Postotak vezanja *S. enterica* na epitelne stanice jezika ovisno o primjeni različitih ekstrakata cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) i lista ružmarina (LR)

Tijekom obrade podataka treba uzeti u obzir da su ekstrakti CM pri koncentraciji 0,5x te ekstrakt lista ružmarina pri koncentraciji 0,5x citotoksični za stanice epitela jezika što također može utjecati na niži postotak vezanja bakterije *E. coli* i *S. enterica* na epitel stanica jezika.

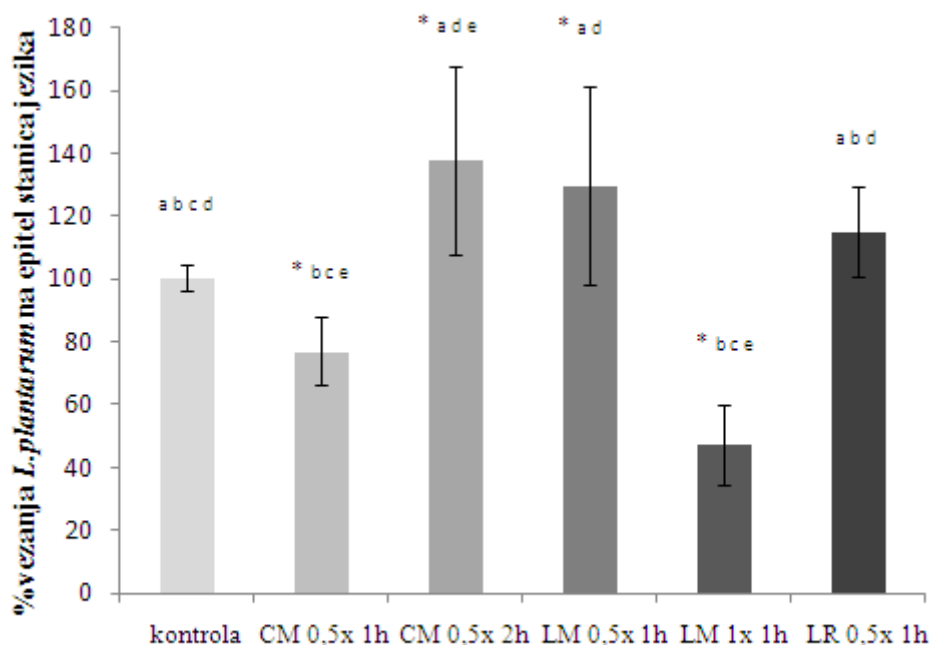
Rezultati našeg istraživanja podudaraju se sa studijom koju su napravili Roubos-van den Hil i sur. (2009). Ta studija je imala za cilj istražiti učinak prerađene soje tijekom uzastopne faze fermentacije i različitih vremena fermentacije na adheziju enterotoksičnog soja *Escherichia coli* (ETEC) K88 na epitelne stanice crijevnih resica i na Caco-2 staničnu liniju te razjasniti mehanizam djelovanja. Ekstrakti sirove, natopljene i kuhane soje smanjili su prianjanje ETEC-a na epitelne stanice crijevne resice za 40%. Ekstrakti fermentirane soje su smanjili adheziju za 80% ili više na epitelne stanice crijevne resice. Prianjanje ETEC-a na Caco-2 stanice je smanjeno za 50% u prisustvu ekstrakata fermentirane soje. Ekstrakti fermentirane

soje smanjuju adheziju ETEC na epitelne stanice crijeva svinjskog i ljudskog podrijetla, čime se može spriječiti dijareja i slične crijevne bolesti uzrokovane patogenima *E. coli*. Ovo smanjeno prijanjanje je uzrokovana interakcijom između ETEC K88 bakterija i spojeva iz soje. Studija je pokazala da ekstrakti soje ne inhibiraju rast bakterija, što znači da nemaju antibakterijsko djelovanje, imaju isključivo antiadhezivni učinak.

Trenutno nema puno dostupnih istraživanja o utjecaju ekstrakata maslačka i ružmarina na adheziju bakterija na epitelne stanice probavnog trakta. Međutim, postoje neka istraživanja u kojima su korišteni neki drugi biljni ekstrakti te se ispitivao njihov inhibitorni učinak na adheziju oralnih bakterija u usnoj šupljini. Wang i sur. (2013) su proveli studiju koja je proučavala utjecaj pet različitih ekstrakata čajeva (zeleni, oolong, crni, pu-erh i krizantema) i njihovih komponenata (epigalokatehin galat i galna kiselina) na vezanje pet oralnih patogena (*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 i *Actinomyces naeslundii* ATCC 51655) na HGF-1 gingvalne stanične linije. Ekstrakti pu-erh čaja i čaja krizanteme značajno ($p < 0.05$) smanjuju vezanje sojeva *Streptococcus* do $4 \log \text{CFU}^{-1}$, dok je utjecaj ostalih čajeva bio dosta mali. Postoji mogućnost da ekstrakti čaj pu-erha i kizanteme imaju potencijal za reduciranje vezanja oralnih patogena na gingvalno tkivo i time poboljšanje zdravlja oralnog mekog tkiva. Wang i sur. (2013) su zaključili da je razlog inhibitornog učinka ekstrakata pu-erh čaja i krizantema čaja na vezanje bakterija je visok udio tanina čiji se udio povećava s povećanim stupnjem fermentacije čajeva.

Rezultati ove studije su pokazali da ekstrakti ružmarina i maslačka mogu imati inhibitorni učinak na vezanje laktobacila ili mogu povećavati njihovo vezanje na epitelne stanice jezika ovisno o koncentraciji ekstrakata.

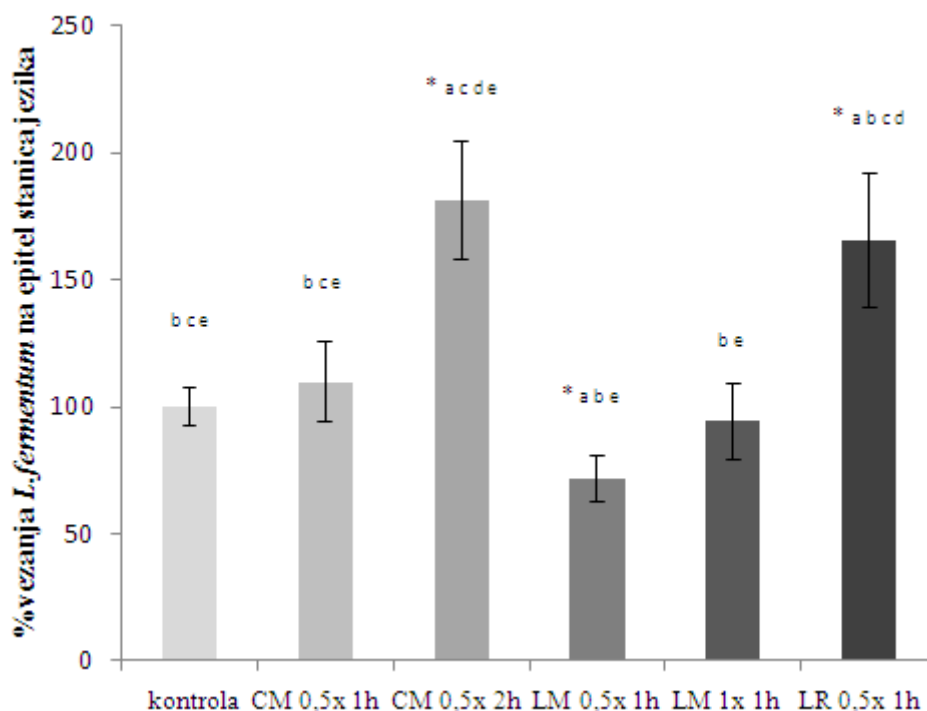
Slike 8. i 9. pokazuju utjecaj ekstrakata CM, LM i LR na adheziju *L. fermentum* i *L. plantarum* na epitelne stanice jezika.



Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0.05$) u odnosu na : *-kontrolu; a-CM 0,5x 1 h; b-CM 0,5x 2 h; c-LM 0,5x 1 h; d- LM 1x 1 h; e-LR 0,5x 1 h

Slika 8. Postotak vezanja *L. plantarum* na epitelne stanice jezika ovisno o primjeni različitih ekstrakata cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) i lista ružmarina (LR)

Rezultati dobiveni za *L. plantarum* pokazuju da ekstrakti CM 0,5x 1h i LM 1x 1h statistički značajno utječu na smanjeno vezanje bakterije na epitel stanica jezika u odnosu na kontrolu, dok ekstrakti CM 0,5x 2h i LM 0,5x 1h statistički značajno utječu na povećano vezanje iste bakterije. LR 0,5x 1h prema statistički rezultatima nema nikakav utjecaj na vezanje bakterije.



Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0.05$) u odnosu na : *-kontrolu; a-CM 0,5x 1 h; b-CM 0,5x 2 h; c-LM 0,5x 1 h; d- LM 1x 1 h; e-LR 0,5x 1 h

Slika 9. Postotak vezanja *L. fermentum* na epitelne stanice jezika ovisno o primjeni različitih ekstrakata cvijeta maslačka (CM), lista maslačka (LM) i lista ružmarina (LR)

Rezultati dobiveni za *L. fermentum* pokazuju da ekstrakti CM 0,5x 2h i LR 0,5x 1h statistički značajno utječu na poboljšano vezanje bakterije na epitel stanica jezika u odnosu na kontrolu, dok ekstrakt LM 0,5x 1h statistički značajno utječu na smanjeno vezanje iste bakterije. CM 0,5 1h i LM 1x 1h prema statistički rezultatima nemaju nikakav utjecaj na vezanje bakterije.

Anatoly Bezkorovainy (2001) je napravio studiju u kojoj je za cilj imao odgovoriti na pitanje vežu li se egzogeno primijenjeni probiotici na stanice sluznice debelog crijeva nakon konzumiranja hrane bogate probioticima ili prolaze kroz organizam i izlučuju se fecesom. Stope preživljavanja probiotika koji uopće uspiju doći do debelog crijeva nakon unosa hrane procijenjene su na 20-40% kod određenih sojeva, a glavne su prepreke za preživljavanje kiselost želuca i djelovanje žučnih soli. Do sada su istraživanja pokazala da se maksimalni probiotički učinak postiže ako su probiotici vezani na sluznicu crijeva, ali nema dokaza da se egzogeno

primijenjeni probiotici pridržavaju na stanicama sluznice. Umjesto toga, čini se da prolaze kroz organizam izlučeni fecesom bez vezanja ili umnožavanja. Stoga, da bi se dobio kontinuirani egzogeni probiotički učinak, probiotička kultura se mora unositi svakodnevno. Međutim, određene egzogeno unesene supstance poboljšavaju djelovanje i egzogenih i endogenih probiotika. Laktuloza i određeni spojevi koji sadrže fruktozu, nazvani prebiotici, ne probavljaju se u tankom crijevu i dolaze nepromijenjeni u debelo crijevo, gdje ih selektivno koriste probiotici. Najpovoljniji učinci mogu se, stoga, dobiti konzumiranjem egzogenih probiotika u kombinaciji s prebioticima, ili samim konzumiranjem prebiotika.

Ekstrakti ružmarina i maslačka korišteni u ovoj studiji bi mogli naći primjenu u prehrambenoj industriji kao kombinacija ekstrakata s određenim namirnicama u svrhu poboljšanja vezanja probiotika na epitelne stanice probavnog sustava. Međutim, za široku primjenu potrebna su daljnja istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakti cvijeta maslačka, lista maslačka, lista ružmarina primijenjeni u eksperimentu u koncentracijama 0,5x, 1x, 2,5x i 5x nemaju citotoksičan učinak na bakterijske sojeve: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Escherichia coli* i *Salmonella enterica*.
2. Ekstrakt cvijeta maslačka (CM) i lista maslačka (LM) pri koncentracijama od 0,5x, 1x i 2,5x bili su slabo toksični tijekom jednosatnog i dvosatnog tretmana na CalB1 stanice, dok je najveća koncentracija (0,5x) pokazala citotoksično djelovanje. Ekstrakt lista ružmarina (LR) u navedenim koncentracijama tijekom oba vremenska tretmana ima citotoksično djelovanje.
3. Svi ekstrakti u korištenim koncentracijama inhibiraju vezanje bakterija *E. coli* i *S. enterica* na staničnu liniju CalB1, pokazujući adhezivni učinak.
4. Ekstrakt cvijeta maslačka (0,5x) pri kraćem tretmanu inhibira, a pri dužem poboljšava vezanje bakterija *L. plantarum* i *L. fermentum*. Niža koncentracija lista maslačka (0,5x) poboljšava vezanje bakterije *L. plantarum*, dok ista koncentracija inhibira vezanje *L. fermentum*. Veća koncentracija lista maslačka (1x) inhibira vezanje *L. plantarum* tijekom jednog sata tretmana. List ružmarina (0,5x) povećava vezanje *L. fermentum* tijekom jednog sata tretmana za epitelne stanice jezika.
5. Ekstrakti cvijeta maslačka, lista maslačka i lista ružmarina ili određeni spojevi izolirani iz tih ekstrakata mogu naći svoju primjenu u prehrambenoj industriji kao aditivi u cilju sprječavanja vezanja patogenih bakterija *E. coli* i *S. enterica* na epitelne stanice jezika ili kao sastojci hrane u svrhu poboljšavanja vezanja *L. plantarum* i *L. fermentum* za epitelne stanice jezika i ostatak probavnog sustava.

6. LITERATURA

Abdel-Wahhab, K. G. E.-D. , El-Shamy, K. A., El-Beih, N. A. E.-Z., Morcy, F.A., Manna, F. A. E. (2001) Protective effect of a natural herb (*Rosmarinus officinalis*) against hepatotoxicity in male albino rats. *Comunicata Scientiae*. **2(1)**, 9–17.

AICR (2017) Phytochemicals: The Cancer Fighters in Your Foods. AICR- American Institute for Cancer Research, <http://www.aicr.org/reduce-your-cancer-risk/diet/elements_phytochemicals.html?utm_source=mmenu>. Pristupljeno 5. lipnja 2017.

Akhtar, M. S., Khan, Q. M., Khaliq, T. (1985) Effects of *Portulaca oleraceae* (kulfa) and *Taraxacum officinale* (dhudhal) in normoglycaemic and alloxantreated hyperglycaemic rabbits. *J. Pak. Med. Assoc.* **35**, 207–210.

Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., Sen, P. (1999) Pharmacology of rosemary *Rosmarinus officinalis* Linn. and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp. Biol.* **37**, 124-130.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M. (2004) Chemical composition, plant genetic difference, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* **52 (11)**, 3530-3535.

Anukam, K. C., Reid, G. (2007) *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* with probiotic potentials isolated from the vagina of healthy nigerian women. *Res. J. Microbiol.* **2**, 81–87.

Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D. (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Front Microbiol.* **7**, 464.

Atti-Santos, A. C., Rossato, M., Pauletti, G. F., Rota, L.D, Rech, J. C., Pansera, M. R, Agostini, F., Serafini, L. A., Moyna, P. (2005) Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Braz. Arch. Biol. Techn.* **48(6)**, 1035–1039.

Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.S., Shao, X., Pan, M. H., Ho, C. T. (2010) Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* **58** (9), 5363–5367.

Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O. U., Ulgen, S. G, Yardibi, H. (2008) “In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits,” *J. Ethnopharmacol.* **116** (1), 64–73.

Bäumler, A. J., Heffron F. (1995) Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**, 2087–2097.

Beighton, D., Smith, K., Hayday, H. (1986) The growth of bacteria and the production of exoglycosidic enzymes in the dental plaque of macaque monkeys. *Archs. Oral. Biol.* **31**, 829–835.

Bezkorovainy, A. (2001) Probiotics: determinants of survival and growth in the gut1–3. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 399–405.

Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., Loukil, C., Barraud, D., Bingen, E. (2002) Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* **70**, 3216–3226.

Birtic, S., Dussort, P., Pierre, F.-X., Bily, A. C., Roller, M. (2015) Carnosic acid. *Phytochemistry.* **115**, 9–19.

Bisset, N. G., Phillipson, J. D., Czygan, F. C. (1994) Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis, CRC Press, Boca Raton, str.486–489.

Block, S. S. (2001) *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5 izd., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **55**(19), 7879–7885.

Bradamante, Ž., Jurić-Lekić, G. (2000) Metode istraživanja *in vitro* i *in vivo*, Medicinska Naklada, Zagreb.

Bronze, M. S., Greenfield, R. A. (2005) Biodefence principles and pathogenshorizon bioscience, Horizon Bioscience, United Kingdom.

Cardoso, G. H., Dantas, E. B., Sousa, F. R., Peron, A. P. (2014) Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (*Labiatae*) in plant test system. *Braz. J. Biol.* **74(4)**, 886-889.

Cheung, S., Tai, J. (2007) Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.* **17(6)**, 1525–1531.

Chevallier, A. (1996) The encyclopedia of medicinal plants, Dorling Kindersley, Ltd., NewYork.

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558.

Collins, C. H., Kennedy, D. A. (1983) Laboratory-acquired Infections, 4.izd., Butterworth-Heinemann, Oxford, str. 272-312.

Del Bano, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M. P., Del Río, J. A., Ortuno, A., Ibarra, I. (2004) Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.* **52(16)**, 4987–4992.

Del Bano, M. J., Castillo, J., Garcia, O. B., Lorente, J., Martin-Gil, R., Acevado C., Alcaraz, M. (2006) Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J. Agric. Food Chem.* **54(6)**, 2064-2068.

Dillard, C. J., German, J. B. (2000) Review phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1744–1756.

Dogi, C. A., Galdeano, C. M., Perdigón, G. (2008) Gut immune stimulation by non pathogenic gram (+) and gram (-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. *Cytokine*. **41**, 223–231.

Escudero, N. L., De Arellano, M. L., Fernandez S. (2003) *Taraxacum officinale* as a food source. *Plant Foods Hum Nutr*. **58**,1–10.

Estevez, M., Ramirez, R., Ventanas, S., Cava, R. (2007) Sage and a rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. *J. Food Sci. Technol*. **40** (1), 58–65.

Ewing, W. H. (1986) Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4. Izdanje, Elsevier, New york, str. 536.

Fon Quer, P. (1962) Plantas Medicinales, Editorial Labor SA, Barcelona.

FSA (2016) Current EU approved additives and their E Numbers. FSA- Food Standards Agency, <<https://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist>>. Pristupljeno 7.svibnja 2017.

Gallaher, R. N, Gallaher, K., Marshall, A. J., Marshall, A. C. (2006) Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *J. Food Compos. Anal*. **19**, 53–57.

Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2.izd., Springer, New York.

Genena, A. K., Hense, H., Junior A .S., Machado de Souza, S. (2008) Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. **28**(2), 463-469.

Ghaima, K. K., Hashim, N. M., Ali, S. A. (2013) Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *J. Appl. Pharm. Sci*. **3**(5), 96-99.

Gibbons, R. J. (1989) Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J. Dent. Res.* **68**, 750–760.

Giraffa, G., Chanishvili, N., Widyastuti Y. (2010) Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.* **161**, 480-487.

Gonzalez-Trujano, M. E., Pena, E. I. , Martinez, A. L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., López-Muñoz, F. J. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J. Ethnopharmacol.* **111(3)**, 476–482.

Guarner, F., Malagelada, J. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **360**, 512–519.

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.-B., Lyoussi, B. (2000) Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology* **71(3)**, 465–472.

He, W., Han, H., Wang, W., Gao, B. (2011) Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. *Virol. J.* **8**, 538.

Hidalgo, P. J., Ubera, J. L., Tena, M. T., Valcarcel, M. (1998) Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* **46(7)**, 2624–2627.

Holden, N. J., Gally, D.L. (2004) Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J. Med. Microbiol.* **53**, 585–593.

Ionescu, D., Predan, G., Rizea, G. D., Mihele, D., Dune, A., Ivopol, G., Ioniță, C. (2013) Antimicrobial activity of some hydroalcoholic extracts of artichoke (*Cynara scolymus*), burdock (*Arctium lappa*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Food Nutr. Sci.* **5**, 21.

Johnson J. R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol. Rev.* **4**, 80–128.

Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A. L. (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **183**, 78–88.

Johnson, J. R., Moseley, S. L., Roberts, P. L., Stamm, W.E. (1988) Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect. Immun.* **56**, 405–412.

Jovanović, M., Poljacki, M., Mimica-Dukić, N., Boza, P., Vujanović, L.J., Duran, V., Stojanović, S. (2004) Sesquiterpene lactones mix patch testing supplemented with dandelion extract in patients with allergic contact dermatitis, atopic dermatitis and non-allergic chronic inflammatory skin diseases. *Contact Dermatitis.* **51**, 101–110.

Kalny, P., Fijałek, Z., Daszczuk, A., Ostapczuk, P. (2007) Determination of selected microelements in Polish herbs and their infusions. *Sci Total Environ.* **381**, 99–104.

Kaur B., Balgir P. P., Mittu B., Kumar B., Garg N. (2013) Biomedical applications of fermenticin HV6b isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 8-16.

Khan, N., Mukhtar, H. (2007) Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* **81(7)**, 519-533.

Kosarewicz, A., Königsmaier, L., Marlovits, T. C. (2012) The blueprint of the type-3 injectisome. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **367(1592)**, 1140-1154.

Kozłowska, M., Ścibisz, I., Zaręba, D., Ziarno, M. (2015) Antioxidant properties and effect on lactic acid bacterial growth of spice extracts. *CyTA- Journal of Food.* **13(4)**, 573-577.

Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H. D., Schiefer, H. G., Slenczka, W., von Graevenitz, A., Zahner, H. (2003) *Zoonoses Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*, 3 izd., ASM press, Washington.

Lamont, R. J., Jenkinson, H. F. (2000) Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity, Horizon Scientific Press, Wymondham, str. 131–68.

Laura, P.-F., Garzon, M. T, Vicente, M. (2010) Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J. Agric. Food Chem.* **58(1)**, 161–171.

Leung, A.Y, Foster, S. (1996) Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics, 2.izd., JohnWiley & Sons, Inc., New York.

Lundh, K., Hindsen, M., Gruvberger, B., Moller, H., Svensson, A., Bruze, M. (2006) Contact allergy to herbal teas derived from Asteraceae plants. *Contact Dermatitis.* **54**, 196–201.

Maeda, M. (2006) Dermoscopic patterns of the filiform papillae of the tongue in patients with Sjögren's syndrome. *J. Dermatol.* **33(2)**, 96-102.

Mahmoud, A. A., Shihry, S. S., Son, B. W. (2005) Diterpenoid quinones from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry.* **66**, 1685-1690.

Maloy, S. (2004) Stanely Maloy, Ph.D. – Home Page, < <http://www.salmonella.org/info.html> >. Pristupljeno 3.travnja 2017.

Marsh, P. D, Lewis, M., Williams, D., Marsh, P., Martin, M., Lewis, M., Williams, D. (2009) Marsh and Martin's oral microbiology, 5. izd., Churchill Livingstone, Cardiff.

Marinculić, A., Habrun, B., Barbić, LJ., Beck, R. (2009) Biološke opasnosti u hrani. HAH-Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/potrosacki-kutak/bioloske-opasnosti-u-hrani/>>. Pristupljeno 19. Svibnja 2017.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., del Valle, C. E., Roura, S. I. (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *J. Food Sci. Technol.* **38(5)**, 565-570.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2007) Manual of Clinical Microbiology, 9.izd., ASM Press, Washington.

Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142-156.

Nevola, J. J., Stocker, A., Laux, D. C., Cohen, P. S. (1985) Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infet. Immun.* **50**, 152–159.

Nogueira de Melo, G. A., Grespan, R., Fonseca, J. P., Farinha T. O., Silva, E. L., Romero, A. L., Bersani-Amado, C. A., Cuman, R. K. (2011) *Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits *in vivo* and *in vitro* leukocyte migration. *J. Med. Food* **14(9)**, 944–949.

O'Hara, A. M., Shanahan F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports.* **7**, 688–693.

Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A. (1994) Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry.* **37(5)**, 1463–1466.

Racz-Kotilla, E., Racz, G., Solomon, A. (1974) The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animals. *Planta Med.* **26**, 212–217.

Ramos H. C., Rumbo, M., Sirard, J.C. (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* **12**, 509–517.

Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B., Žgur-Bertok, D. (2008) Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1329–1334.

Rivera-Nunez, D. (1991) *Taraxacum vulgare* (Lam.) Schrank = *Taraxacum officinale* Weber, Incafo, Madrid, str. 1024–1026.

Roldán, S., Herrera, D., Sanz, M. (2003) Biofilms and the tongue: therapeutical approaches for the control of halitosis. *Clin. Oral. Investig.* **7(4)**, 189-97.

- Roubos-van den Hil, P. J., Nout, M. J. R., Beumer, R.R., van der Meulen, J., Zwietering, M. H. (2009) Fermented soya bean (tempe) extracts reduce adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal epithelial cells. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1013–1021.
- Salyers, A. A., Whitt, D. D. (2002) Bacterial pathogenesis: a molecular approach, ASM Press, Washington DC.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* **160(9)**, 1025–1032.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., Reglero, G. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* **68(4)**, 790-795.
- Scannapieco, F. A. (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Oral. Biol. Med.* **5**, 203–248.
- Schütz, K., Carle, R., Schieber, A. (2006) *Taraxacum* –a review on its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 313–323.
- Schütz, K., Muks, E., Carle, R., Schieber, A. (2006) Separation and quantification of inulin in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) roots by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Biomed. Chromatogr.* **20**, 1295–1303.
- Salih, S. M., Alobaidi, K. H., Alobaidi, Z. F. (2015) Cytotoxic effect of *Rosmarinus officinalis* L. leaf extracts on tumor cell line. *Journal of Al-Nahrain University* **18(4)**, 98-102.
- Shi, S., Zhao, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Jiang X., Huang, K. (2008) Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-radical-scavenging detection-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments. *J. Chromatogr.* **1209 (1-2)**, 145–152.

SIU SOM (2012) Oral Cavity. SIU SOM- Southern Illinois University School of Medicine <<http://www.siumed.edu/~dking2/erg/oralcav.htm> SIU SOM, 2012>. Pristupljeno 5.travnja 2017.

Sotelo-Felix, J. I., Martinez-Fong, D., De laTorre, P. M. (2002) Protective effect of carnosol on CCl4-induced acute liver damage in rats. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* **14(9)**, 1001–1006.

Soto, G. E., Hultgren, S. J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* **181**, 1059–1071.

Souci, S. W., Fachmann W., Kraut H. (2008) Food Composition and Nutrition Tables, 7.izd., Med Pharm Scientific, Stuttgart.

Stecher, B., Hardt, W. (2008) The role of microbioita in infectious disease. *Trends Microbiol.* **16**, 107–114.

Takeda, K., Suzuki, T., Shimada, S. I., Shida, K., Nanno, M., Okumura, K. (2006) Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin. Exp. Immunol.* **146(1)**, 109-115.

Touafek, O., Nacer, A., Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau, C. (2004) Chemical composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* cultivated in the Algerian Sahara. *Chem. Nat. Compd.* **40(1)**, 28–29.

Tounekti, T., Munne-Bosch, S. (2012) Enhanced phenolic diterpenes antioxidant levels through non-transgenic approaches. *Crit. Rev. Plant Sci.* **31(6)**, 505–519.

Tulumoglu, S., Kaya, H. I., Simsek, O. (2014) Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe* **30**, 120-125.

Ünalán, İ. U., Dalgaard, P., Korel, F. (2011) Effect of pomegranate (*Punica granatum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts on shelf-life for chilled Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) fillets in modified atmosphere packaging at 2 °C. *Proceedings Of The International Food Congress Novel Approaches In Food Industry* **1**, 189-196.

Valgimigli, L. (2012) Essential oils as natural food additives: composition, applications, antioxidant and antimicrobial properties, nova science publishers, New York.

Van der Hoeven, J. S. (1998) oral biofilms and plaque control, harwood, Amsterdam, str.57–82.

Visanji, J. M., Thompson, D. G., Padfield, P. J. (2006) Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett.* **237** (1),130-136.

Wang, Y., Chung, F. F. L., Lee, S.M., Dykes, G. A. (2013) Inhibition of attachment of oral bacteria to immortalized human gingival fibroblasts (HGF-1) by tea extracts and tea components. *BMC Res. Notes.* **6**,143.

Westerman, L., Roddick, J. G. (1981) Annual variation in sterol levels in leaves of *Taraxacum Officinale* Weber. *Plant Physiol.* **68**, 872–875.

Yaegaki K., Coil, J. M. (2000) Examination, classification, and treatment of halitosis; clinical perspectives. *J. Can. Dent. Assoc.* **66**(5), 257-261.

Yamamoto, J., Yamada, K., Naemura, A., Yamashit T., Arai, R. (2005) Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition* **21**(5), 580–587.

Yarnell, E., Abascal K., (2009) Dandelion *Taraxacum officinale* and *T. mongolicum*. *Integr. Med.* **8**, 35–38.

Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. (2010) Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Food Hum. Nutr.* **65(2)**,158-163.