

Mikrobiom kůže

Valerie Vintrlíková

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Valerie Vintrlíková
Osobní číslo:	T20400
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Mikrobiom kůže

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Studentka vypracuje literární rešerši na téma mikrobiom kůže.

II. Praktická část:

V praktické části prakticky otestuje in vitro model kůže s osazením symbiotickými bakteriemi.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [2] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.
- [3] DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kristýna Valášková**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce se věnuje kožnímu mikrobiomu a jeho tvorbě *in vitro* podmínkách. Jelikož je lidský mikrobiom v dnešní době velice diskutován, nabízí se pohled i na mikroorganismy naší kůže. Podle dosavadních výzkumů je zřejmé, že mikrobiota pokožky úzce komunikuje s imunitním systémem a je součinitelem při vzniku kožních onemocnění, kterým je například atopická dermatitida nebo akné. Tvorba kožního mikrobiomu *in vitro* otevírá dveře novému zkoumání, které by se zabývalo péčí o tuto biologickou bariéru. Jednou možnou variantou jsou kosmetické přípravky obohacené o aktivní látky podporující mikrobiom. Mikrobiom byl vytvořený monovrstvou buněčné linie HaCaT, na níž byly nasazeny bakteriální suspenze *M. luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Vyhodnocení proběhlo testem MTT a sledováním nabarvených buněk pod konfokálním mikroskopem.

Klíčová slova: mikrobiom kůže, imunitní systém, kožní bariéra, HaCaT buněčná linie, polymikrobiální model kůže

ABSTRACT

The Bachelor's thesis focuses on the skin microbiome and its *in vitro* formation. The microbiome is very debated nowadays, therefore a look at the microorganisms of our skin is offered. According to existing research, it is clear that skin microbiota closely interacts with the immune system and is a co-factor in the development of skin diseases such as atopic dermatitis or acne. The formation of the skin microbiome *in vitro* opens the door for new research to address the care of this biological barrier. One possible option is cosmetics products enriched with active substances that support the microbiome. A model was created by monolayer of the HaCaT cell line seeded with bacterial suspensions of *M. luteus*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*. The evaluation was performed by MTT assay and observation of stained cells under a confocal microscope.

Keywords: microbiome of skin, immune system, skin barrier, HaCaT cell line, polymicrobial skin model

Tímto bych chtěla velice poděkovat Ing. Kristýně Valáškové, za její odborné vedení, trpělivost a pomocnou ruku, kterou mi poskytla během tvorby této bakalářské práce. Velké díky nepochybně patří i mé rodině. Vaše neustálá podpora a víra v mé schopnosti mě motivovala během celého studia. Děkuju.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	8
1 KŮŽE	10
1.1 ANATOMIE KŮŽE	10
1.2 ÚLOHA KOŽNÍ BARIÉRY.....	13
2 MIKROBIOM KŮŽE.....	15
2.1 KOŽNÍ MIKROBIOTA	15
2.1.1 ZASTOUPENÍ MIKROORGANISMŮ NA KŮŽI	18
2.1.2 ETIOPATOGENEZE KŮŽE	20
2.2 VZTAH MIKROBIOMU K IMUNITNÍMU SYSTÉMU	22
3 MODEL KOŽNÍHO MIKROBIOMU	25
4 MATERIÁL A METODY	28
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	28
4.2 POUŽITÉ SOUPRAVY, CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	29
4.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	30
4.4 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY	31
4.4.1 RŮSTOVÁ KŘIVKA.....	31
4.4.2 POLYMIKROBIÁLNÍ MODEL KŮŽE	33
4.4.3 MTT TEST.....	35
5 VÝSLEDKY	39
5.1 KONSTRUKCE A ANALÝZA RŮSTOVÉ KŘIVKY	39
5.1.1 BAKTERIÁLNÍ KULTURA.....	39
5.2 VYHODNOCENÍ POLYMIKROBIÁLNÍHO MODELU KŮŽE.....	40
6 DISKUZE.....	47
ZÁVĚR	49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	58
SEZNAM OBRÁZKŮ	59
SEZNAM TABULEK.....	60

ÚVOD

U zdravého člověka tyto „štěnice“ pokojně koexistují, přičemž největší počet se vyskytuje v tenkém a tlustém střevě, ale také v celém těle. Mikrobiom je dokonce označen jako podpůrný orgán, protože hraje tolik klíčových rolí při podpoře přirozeného každodenního fungování lidského těla. – Harvard T.H. Chan School of Public Health v Bostonu [1].

Právě toto poznání nás žene dál k lepšímu pochopení interakce mikroorganismů k lidskému tělu. Nejprve se do veřejného povědomí začaly dostávat informace o mikrobiotě v našich střevech, které podle všeho komunikují s lidským mozkem. Předpokládá se, že mikrobiom ovlivňuje nejen naši náladu, ale má vliv i na duševní choroby, jako je deprese, autismus či mentální anorexie. Z toho důvodu byl zaveden pojem osa střevo-mozek [2].

S přibývajícím výzkumy se veřejnost setkává i se skutečností, že existuje mikrobiom kůže. Do prodejních řetězců se dostává kosmetika s nálepkami “microbiome balance“ nebo “microbiome-friendly“ zabezpečující vyvážený kožní mikrobiom. Otázkou ale především je, jak vůbec vypadá vyvážený a zdravý kožní mikrobiom, a zdali dokážou kosmetické přípravky ovlivnit složení kožního mikrobiomu, popřípadě podpořit kolonizaci komenzálních bakterií.

Jedním prostředkem, jak se k novým znalostem dopracovat, je vytvoření *in vitro* modelů mikrobiomu kůže. Tyto modely polymikrobiálního biofilmu mohou dopomoci k lepšímu pochopení komunikace mezi bakteriemi kolonizující kůži, a zároveň komunikaci bakterií s kožními buňkami [3]. Tímto způsobem bychom mohli sledovat, jak biofilm chrání keratinocyty před vnějšími vlivy, popřípadě sledovat způsoby, kterými lze mikrobiom optimalizovat, aby poskytoval kůži dostatečnou ochranu.

Příprava modelu mikrobiomu kůže proto byla cílem této bakalářské práce. Další vizí je jeho pozdějšího použití k testování kosmetických ingrediencí, jehož výsledky by sloužily jako předpoklad, zdali látka v kosmetickém produktu může ovlivnit složení nebo kondici kožní mikrobioty.

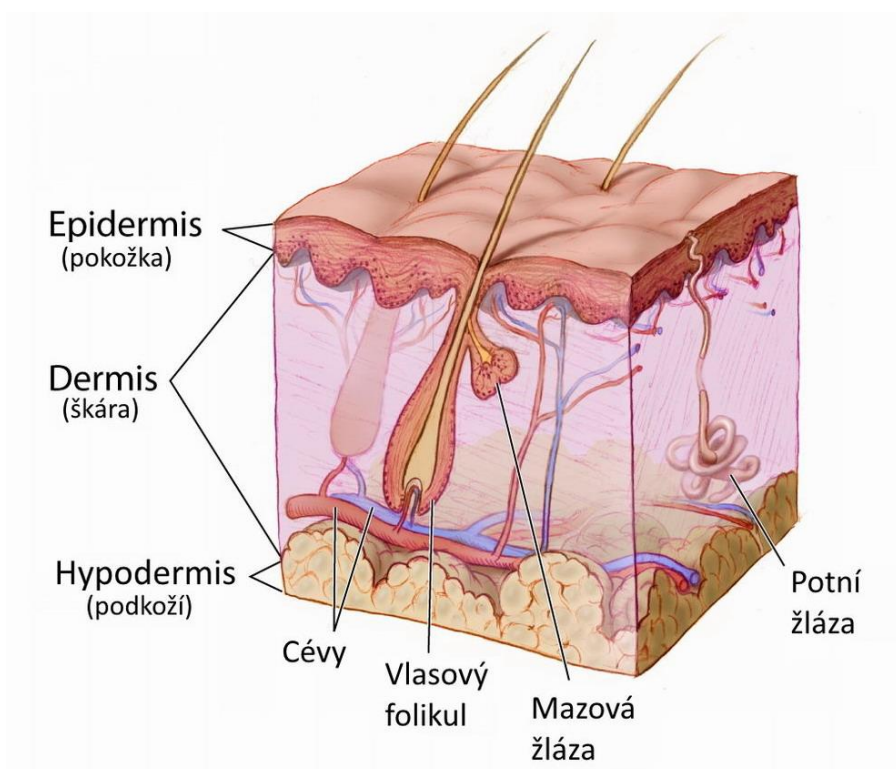
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE

Kůže, *cutis*, řec. *derma* je největší orgán lidského těla, který tvoří souvislou bariéru a odděluje organismus od vnějšího prostředí. Vnější prostředí je plné bakterií, virů apod., proto není divu, že se tyto mikroorganismy vyskytují i na naší kůži, kde se mohou podílet na správném fungování kožní bariéry, nebo v horším případě tuto funkci znemožňovat [4] [5].

1.1 Anatomie kůže

Tento orgán splňuje několik funkcí, a to funkci receptorovou, imunitní, metabolickou či termoregulační nebo ochrannou. Kůže se zároveň podílí na látkové výměně, protože v její struktuře jsou přítomné potní a mazové žlázy, které spolupracují s metabolickými procesy. Celkový rozsah kůže dosahuje zhruba 1,7–2,0 cm², její tloušťka zaujímá 0,5–4,0 mm, kdy nejsilnější vrstva je na stehnech a zádech, nejtenčí zase na horním víčku. Přibližná hmotnost činí 3 kg, avšak s tukovou tkání (podkožím) může vážit až 20 kg. Kůže je tvořena dvěma hlavními vrstvami: pokožka – epidermis a škára – dermis (Obrázek 1) [6] [5].



Obrázek 1 Schéma řezu surovou kůží. Upraveno [7]

Epidermis (pokožka)

Tato vrstva je složená z plochých jaderných buněk – keratinocytů, které se složitým procesem diferenciací mění na bezjaderné korneocyty. Spodní vrstvy epidermis mají schopnost dělení, svým dozráváním nahrazují odumřelé a olupující se buňky nejsvrchnější vrstvy. Vrstvy se dělí na *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a poslední vrstva se nazývá *stratum corneum* (SC) (Obrázek 2). Epidermis je bez jakýchkoliv cév, nicméně do hlubších vrstev prostupují nervová zakončení nebo pigmentové barvivo melanin [6] [8].

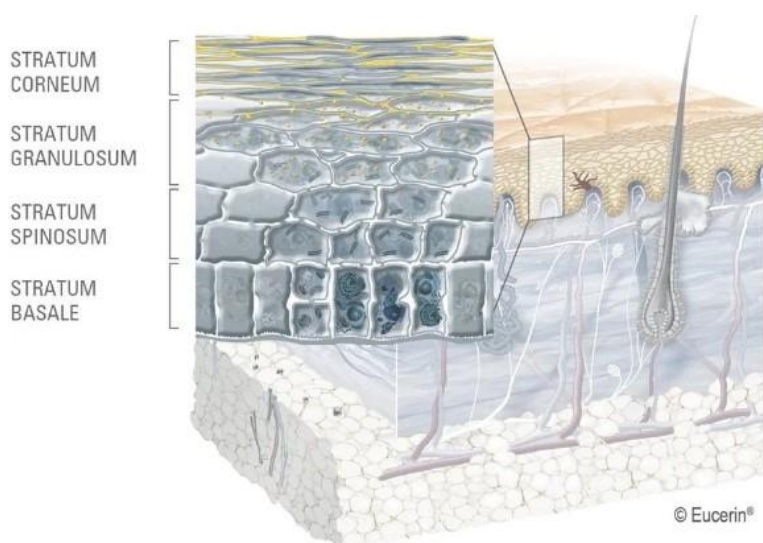
Bazální vrstva je nejspodnější vrstva epidermis, ve které jsou přítomny Merkelovy buňky – modifikované epidermální buňky sloužící jako smyslové receptory a melanocyty, což jsou buňky zodpovědné za produkci melaninu. Funkcí bazální vrstvy je neustálá produkce keratinocytů. Na ni navazuje ostnitá vrstva tvořena 8–10 řadami nepravidelných polyedrických buněk s cytoplazmatickými výběžky. Součástí jsou Langerhasovy buňky – dendritické buňky, které komunikují s imunitním systémem [9].

Ve struktuře epidermis má svoji roli i *stratum granulosum* neboli zrnitá vrstva. Zde začíná proces keratinizace – rohovatění. Lamelární granule ve vrstvě obsahují glykolipidy, které slouží k soudržnosti buněk pohromadě [9]. V horní vrstvě je syntetizován hyaluronan sodný zajišťující spolu s lipidy hydrataci rohové vrstvy [5]. V některých částech epidermis nalezneme i *stratum lucidum*, která se vyskytuje na nejvíce namáhaných místech na těle, tedy chodidlech a dlaních. Z toho důvodu je zde kůže silnější, aby odolala tlaku.

SC je tvořeno bezjadernými zploštělými korneocyty, které obklopuje lipidový matrix tvořený z ceramidů s dlouhým řetězcem, cholesterolem a volných mastných kyselin. Kvůli těmto lipidům se odlišuje od organizace jiných biologických membrán [10]. Díky hydrofobnímu charakteru lipidového matrixu je zpomaleno odpařování vody z nižších vrstev epidermis. Jedná se o transepidermální ztrátu vody (TEWL). Ta je definována jako množství vody, které se pasivně odpaří z kůže do vnějšího prostředí v důsledku tlaku vodní páry na obou stranách kožní bariéry. Průměrná TEWL je cca 300–400 ml/den [11].

Rohovou vrstvu SC lze rozdělit na dvě části – *SC disjunctum* a *SC conjunctum*. *SC disjunctum* tvoří povrchový ochranný film složený z mazu, potu a epidermálních buněk, které se odlupují. *SC conjunctum* zajišťuje pevné spojení korneocytů. V této vrstvě nalezneme NMF (Natural Moisturising Factors) zajišťující přirozenou hydrataci pokožky. Jejich příkladem

jsou ceramidy, kyselina hyaluronová, urea, kyselina alfa-pyrrolidin-karbonová nebo metabolity filagrinu [12].



Obrázek 2 Vrstvy epidermis. Převzato [13]

Dermis (škára)

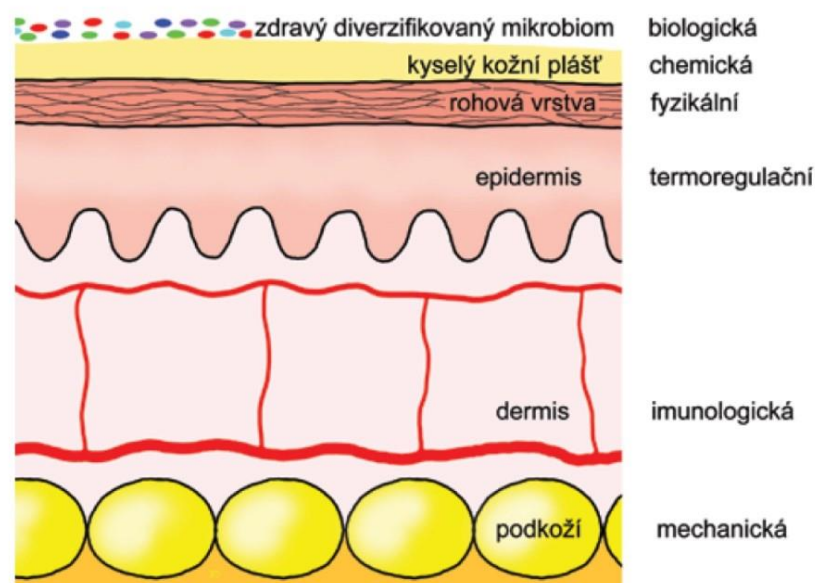
Hranice mezi epidermis a dermis není ostrá. Škára je prostřední vrstva kůže a je tvořena vazivovou tkání. Složení zahrnuje kolagen, elastickou tkáň a extracelulární složky. Najdeme v ní kapiláry vyživující kůži, vlasové folikuly, mazové žlázy, s tím související pilosebaceózní jednotku, která se skládá z vlasového folikulu a k ní připojené mazové žlázy. Dále se zde nachází nervová zakončení i specializované receptory – chemoreceptory a mechanoreceptory [6] [14]. Co se týče typů buněk v dermis, jde především o fibroblasty, histiocyty, mastocyty a adipocyty. Všechny tyto buňky zajišťují správnou strukturu a funkci dermis [14].

Subcutis (podkožní vazivo)

Jedná se o poslední vrstvu, kterou tvoří převážně síť z kolagenních a elastických vláken vyplněné vazivovými buňkami. Vyskytují se zde i tukové buňky, které slouží jako zásobárna energie a rozpouštědlo pro vitamíny A, D, E, K. Pomocí této vrstvy se může kůže posouvat [8].

1.2 Úloha kožní bariéry

Jelikož je kůže neustále vystavena vnějšímu okolí, vývoj bariérových systémů byl jedním z fyziologických podmínek pro život na souši. Tato bariéra reguluje průnik vody skrz pokožku, penetraci látek do kůže a zmírňuje vliv faktorů životního prostředí [12] [15]. Ochrana kůže je dynamická, a jestliže funguje správně, zajišťuje hladkou a elastickou kůži, která se přirozeně obnovuje [16]. Bariérový systém zabezpečuje vrstva epidermis, dermis i subcutis a mezi její funkce patří biologická, chemická, fyzikální, termoregulační, imunologická a mechanická ochrana (Obrázek 3) [17].



Obrázek 3 Kožní bariéra a její funkce podle vrstvy. Převzato [17]

Biologickou funkci obstarávají mikroorganismy na kůži. Tato vrstva může působit podobně jako pufr, tedy vyrovnává chemické rozdíly mezi kůží a vnějším okolím. Záleží na mikroorganismech, které převládají, a tedy na způsobu jejich metabolické aktivity [18]. Mikroby se přímo účastní fyziologických procesů probíhajících v kůži, komunikuje s imunitním systémem (podrobněji v podkapitole 2.2). Pomáhají stimulovat tvorbu antimikrobiálních peptidů AMP, nebo je mohou vytvářet samy (např. bakterie *Cutibacterium*) [19]. Mikrobiom ze své podstaty interaguje s patogenními mikroorganismy i keratinocyty a zajišťuje homeostázu pokožky. Pomáhají rozkládat maz a pot [20].

Chemickou funkci má na starosti kyselý plášť kožní. Primárně chrání kůži před nežádoucími mikroorganismy, a to díky pH pokožky, jež se pohybuje v rozmezí 4,5–5,5. Kyselé pH je způsobeno látkami, které kůže produkuje, tj. pot a kožní maz. Maz se rozkládá na kyselinu

mléčnou, aminokyseliny, volné mastné kyseliny apod. Buňky epidermis – keratinocyty a sebocyty, syntetizují primární AMP [16]. Tyto peptidy se díky svému kladně nabitému povrchu adherují na negativně nabitou bakteriální membránu, kde začnou probíhat různé mechanismy, které vedou k narušení membránové struktury. V důsledku toho se cytoplazmatický obsah vylije do okolí a nastává smrt bakterie [21].

Fyzikální funkci má rohová vrstva – SC. Zabraňuje vysychání kůže, díky principu cihly–malta. Cihly představují korneocyty a maltu směs lipidů, která se vyplňují prostory mezi korneocyty. Lipidy svojí polaritou korigují propustnost vody a jiných látek. Voda v kůži je nezbytná pro její správné fungování [22]. SC produkuje antioxidanty, které slouží k ochraně před fotooxidačním stresem, což je jev způsobený nerovnováhou mezi produkcí a akumulací kyslíkových reaktivních látek (ROS). Tyto látky vedou k poškození kožních buněk [16] [23].

Epidermis zprostředkovává menší ochranu před UV zářením. Kožním barvivo – melanin, nacházející se ve *stratum basale*, pohlcuje nebezpečné UV paprsky. Je to primární ochrana kůže a výše této ochrany souvisí s fototypem jedince. Důležitým kritériem pro ochranu před UV zářením je i tloušťka SC, silnější vrstva SC zajišťuje vyšší odraz paprsků UV, tím nepropustí paprsky do hlubších vrstev kůže [22].

Obnova bariérové struktury probíhá cca 4–8 týdnů. Jde o biologicko-reparační odpověď, pod kterou si můžeme představit zrychlené dělení buněk v bazální vrstvě epidermis, při kterém vznikají nové populace kožních buněk [12].

2 MIKROBIOM KŮŽE

Lidský mikrobiom je podle národního zdravotnického informačního portálu označení pro veškeré mikroorganismy, které žijí na lidském povrchu nebo v lidském těle [24]. Uvádí se, že na kůži můžeme najít až 1000 druhů bakterií, a že celkový počet mikroorganismů na naší kůži je 360krát vyšší nežli celkový počet lidských buněk [25] [26].

Součástí této vrstvy mikroorganismů jsou komenzální i patogenní bakterie, kvasinky a viry [24]. U pokožky vrstvu mikroorganismů doplňují roztoči. Ti jsou taxonomicky řazeny do kmene členovců, třídy pavoukovití, a podle nejnovějších studií by mohli přispět ke zdravému stavu pokožky [27]. Hovoříme-li o komenzálech, myslíme tím organismy, které jinému druhu či jedinci získávají potravu nebo jiné výhody, aniž by druh poškozovali. Zároveň ze spojení získávají živiny, úkryt, podporu či pohyb [28]. Naopak patogen je organismus fungující jiným způsobem jak komenzál. Jednoduše je schopný vyvolat onemocnění [29]. Může působit místním hnisáním nebo proniknout až do krevního oběhu, kde se šíří a způsobuje zánět [30].

V případě bakterií jde o prokaryotické jednobuněčné organismy, které mají jednoduchou buňku – nemá jádro a jejich kruhovitá dvoušroubovice DNA se nachází volně v cytoplazmě. Existuje více než bilion druhů, proto i jejich variabilita je vysoká [31] [32]. O virech můžeme říct, že to jsou nebuněčné organismy, které ke svému životu potřebují hostitelskou buňku, bez ní by nebyly schopny přežít a rozmnožovat se. Kvasinky jsou organismy řadící se do domény Eukaryota, která je stejně velká jako doména Prokaryot. Specifičtěji je řadíme do říše Hub, kde spadají do kategorie vřeckovýtrusné. Jejich předností je schopnost rozkládat monosacharidy za vzniku alkoholu a oxidu uhličitého [32].

2.1 Kožní mikrobiota

Mikrobiom člověka se začíná tvořit již v matčině lůně, ačkoliv se věřilo, že děloha matky je sterilní prostředí. Především placenta skrývá bohatý mikrobiom složený z nepatogenní komenzální mikroflóry, již tvoří bakteriální rody *Firmicutes*, *Tenericutes* nebo *Proteobacteria*. Kolonizace dítěte mikroby pak pokračuje během porodu, kdy novorozenci porození přirozenou cestou jsou osídleni bakteriemi z vaginálního prostředí, v němž převažují bakterie rodu *Lactobacillus*, *Prevotella* či *Sneathia*. Zatímco novorozenci porození císařským řezem se dostávají do styku s mikroorganismy z matčiny kůže, běžnými zástupci jsou *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Cutibacterium* [33][34] [35]. Podle studií se

očekává, že mikrobiální kolonizace pokožky kojenců má vliv na imunitní funkci kůže a další funkce kožní bariéry v následujících letech života [36].

Složení mikrobioty v následně ovlivňuje řada vnějších i vnitřních faktorů. Mezi ty vnější patří hygiena, klima, fyzická aktivita, sluneční záření, expozice vůči chemikáliím, tím pádem mikrobiom ovlivňují i polutanty v ovzduší a vodě. Příkladem vnitřního vlivu je pohlaví, věk, etnická příslušnost, hormonální systém nebo i míra stresu [33]. To svědčí o tom, že mikrobiom kůže je velice dynamický systém snažící se udržet v rovnováze. Liší se tak od střevního mikrobiomu, který je od 3. roku života prakticky stabilní [37]. Přes četné výzkumy však není stále zcela jasné, jestli nové druhy získáváme, nebo se jen mění množství již existujících kmenů na pokožce [34].

Vnitřní faktory

Jak bylo řečeno, mikrobiota se mění s věkem. V prepubertálním věku na pokožce můžeme najít větší množství bakterií rodu *Firmicute*, *Bacteroidete* a taky rozmanitější houbové zastoupení. Zároveň se snižuje počet druhů *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Během puberty se zvyšuje produkce hormonů stimulující produkci mazu, jež přispívá k rozmnožení lipofilních mikroorganismů, jako jsou *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp či plísňové *Malassezia* spp [34].

Mikroorganismy žijící v lidské kůži mohou mít vliv na procesy spojené se stárnutím kůže, to zahrnuje kontrolu imunitního systému, tolerance kůže vůči UV záření, tvorba a metabolismus chemických látek [38]. S přibývajícím věkem se přirozeně mění topografie a struktura kůže, což vede například k tvorbě vrásek, které také určitým způsobem ovlivňuje složení kožního mikrobiomu. Zároveň se snižuje funkce AMP, tudíž i z tohoto důvodu jsou senioři náchylnější ke kolonizaci mikroorganismů, především patogenů [39].

Rozlišnost mikrobiomu můžeme pozorovat i mezi ženou a mužem, za které může především fyziologie. Jedná se o rozdílný hormonální systém, pH kůže, tloušťka kůže, počet chlupů, potních a mazových žláz [40]. U žen byla zjištěna vyšší diverzita, která pravděpodobně vyplývá z tenčí kůže, méně kyselého pH a menší produkce potu [41]. Významný rozdíl nastává především jen v alfa diverzitě, což je označení pro diverzitu v populaci, naproti tomu beta diverzita pojednává o podobnosti či odlišnosti mezi populacemi. Tím pádem nelze striktně říct, že by se mikrobiom mezi ženou a mužem obecně významně lišil [42] [43].

Etnická příslušnost se může také jevit jako vnitřní vliv, který určuje složení mikrobioty. Ta však úzce souvisí s vnějšími faktory, jelikož každá etnická skupina se liší způsobem

životního stylu a hygienickými návyky. I přesto však vědci z University of Ulster došli k závěru, že hygiena ve skladbě mikrobioty hraje sekundární roli [44]. Byl sledován rozdíl mezi lidmi z Východní Asie, Evropy a Afriky. Dle výzkumu Leung a spol. je mikrobiální složení kůže u Číňanů výrazně jiné oproti Evropanům či Afričanům. Výsledky u Asiátů ukazovaly celkově vyšší hladinu bakterií [43] [45].

Vnější faktory

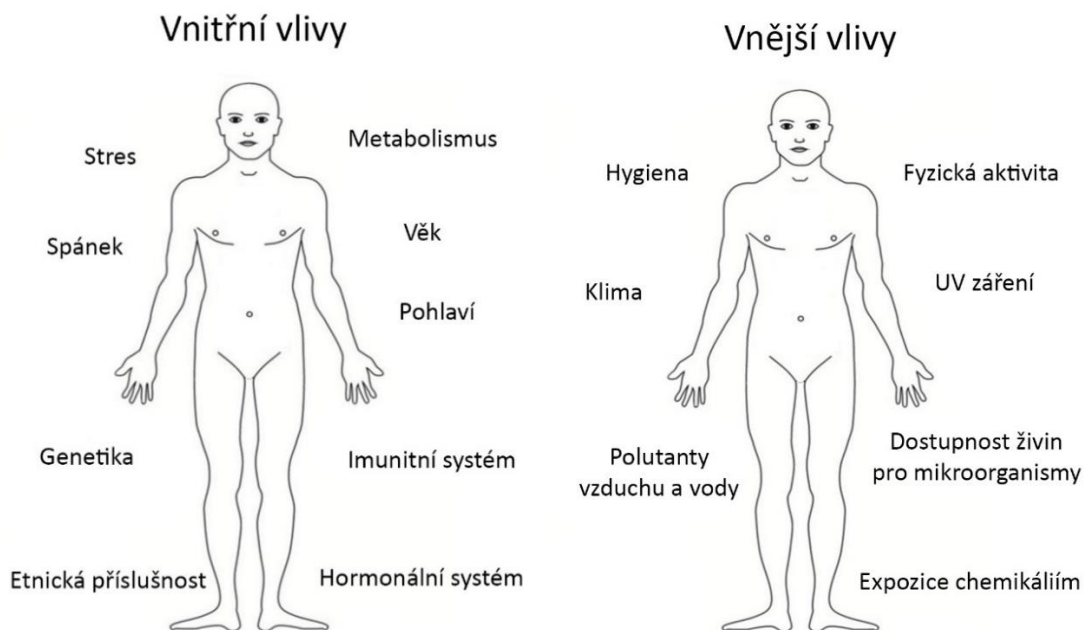
Relevantní ve skladbě mikrobioty je zejména prostředí daného jedince, druh denní činnosti či profese. Při sledování rozdílů kožního mikrobiomu obyvatel venkova a měst můžeme jednoznačně říct, že diferenci způsobuje stupeň expozice mikroorganismům z půdy, vody a biomasy používané v zemědělství nebo chovu hospodářských zvířat. I krátkodobý kontakt kůže s půdou a rostlinnými materiály vede ke změnám v mikrobiomu kůže. Jedním z důležitých zdrojů mikroorganismů ve venkovském prostředí jsou domácí a hospodářská zvířata [40].

Co se týče hygienických návyků, ve studii Staudinger a spol. prokázali, že make-up zvyšuje diverzitu mikrobioty [46]. Naproti tomu byly popsány účinky konzervačních látek v kosmetice, které potlačovaly nejen tvorbu biofilmu *S. aureus* a patogenní *C. acnes*, ale inhibovaly i růst komenzálních bakterií na kůži [47]. V dalších studiích se uvádí, že emulgátory podporují růst potenciálních patogenů, jako je *S. aureus*, nebo že úpravou své hygienické rutiny lidé mohou změnit a stabilizovat složení mikrobů na kůži, či se obohatit o prospěšné mikroorganismy pomocí tzv. skincare kosmetiky (kosmetika pečující o pleť) [47] [48].

Kožní mikrobiom je ovlivněn vnějšími podmínkami prostředí, včetně teploty, vlhkosti a slunečního záření. Především intenzivní expozice kůže UV záření může zvýšit její náchylnost k infekcím a narušit tak strukturu zdravého mikrobiomu. Vědec Li a spol. ve svém výzkumu zjistili, že sinice a laktobacily na povrchu kůže snižují intenzitu opálení a výskyt poškozené kůže spojené s tzv. fotostárnutím [38] [49]. Zároveň UV záření účinně inhibovalo růst *S. aureus* a *C. acnes* [50].

Na mikroby naší kůže mají bezpochyby vliv antibiotika, které se využívají k léčbě stále více. Mají účinek i přesto, že se ve většině případů podávají perorálně. Studie Zhang a spol. ukazují pokles bakteriálního složení v kožních ranách a snížení exprese AMP mikroorganismů, což vedlo k pomalejšímu hojení ran u myší [51]. V dalších studiích bylo

prokázáno, že lokální antibiotika mohou změnit rezidentní kožní bakterie na několik dní, a zároveň způsobit pokles komenzálních mikrobů *Staphylococcus* spp [43].



Obrázek 4 Vnitřní a vnější vlivy, které se podílejí na složení mikrobioty. Upraveno [39]

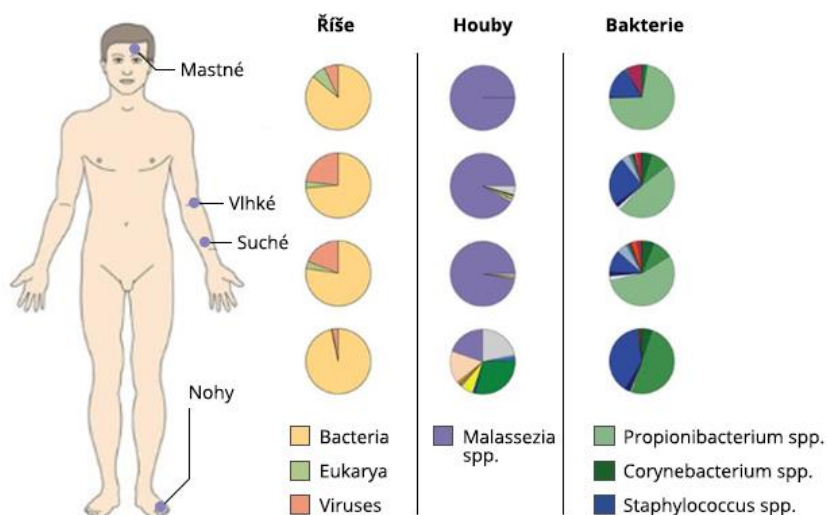
2.1.1 Zastoupení mikroorganismů na kůži

Složení a zastoupení mikrobioty můžeme rozdělit do tří skupin podle periody výskytu na objevující se příležitostně, v krátkých časových intervalech nebo vyskytující se na pokožce permanentně, jak je vidět na *Obrázek 5*. Následující odstavce budou věnované poslední a zároveň nejrozšířenější skupině – mikroorganismům kolonizující kůži permanentně.



Obrázek 5 Rozdělení mikroorganismů kolonizující kůži. Převzato [52]

Zastoupení mikroorganismů ovlivňuje charakteristika kůže. Roli hraje struktura i produkce mazu a potu. Podle *Obrázek 6* procentuálně nejvyšší zastoupení mají bakterie, pak viry, nakonec eukaryotní buňky.



Obrázek 6 Zastoupení mikroorganismu na zdravé kůži. Převzato [53]

Eukaryota zastupují houbové druhy i roztoči. Jedním příkladem je kvasinka *Malasezia* spp. Hraje především za komenzály, pravidelně komunikuje s imunitním systémem a stimuluje tvorbu AMP na keratinocytech. Kvasince se připisují i patogenní účinky, zejména u pokožky s atopickou dermatitidou může zvyšovat záněty [54] [55]. Mezi roztoče se řadí *Demodex folliculorum* a *Demodex brevis*, jejichž primární obživou je kožní maz v oblasti obličeje a mnohdy i epitelální buňky. Uvádí se, že se mohou živit dokonce bakteriálními mikroorganismy [55].

Virovou populaci můžeme rozdělit do dvou skupin, na bakteriofágy a eukaryotické viry – například *Polyoma* nebo *Circoviruses* a jejich přítomnost byla zaznamenána na zdravé kůži [56].

Jedny z nejčastějších bakteriálních zástupců jsou *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium* spp.

Představitel komenzálů kůže *Staphylococcus epidermis* se podle studií vyskytuje na kůži nejčastěji a zároveň je nejvýznamnější. Vylučuje totiž sfingomyelinázu, která podporuje produkci ceramidů v lidské kůži, a to nepřímo ovlivňuje kvalitu kožní bariéry [57]. Podle doktora Nakatsuji a doktora Gallo, kteří se zabývali mikrobiomem atopické pokožky, byla prokázána prospěšná interakce mezi *Staphylococcus epidermis* a kůží [58]. *S. epidermis*

produkuje kyselinu lipoteichoovou, která by mohla blokovat zánětlivou reakci buněk epitelu. Stejně tak produkuje i lipopeptid, který zvyšuje produkci AMP v lidských keratinocytech. *S. epidermis* svými metabolity také dokáže stimulovat funkci T-lymfocytů, díky tomu se předpokládá rychlejší hojení ran [58].

Micrococcus luteus získává své místo u kmenzálních mikroorganismů kůže právě proto, že produkuje antimikrobní účinky vůči několika patogenům, z nichž jedním je *Staphylococcus aureus* [59]. Na kůži kolonizuje i suchá místa a zároveň mu nevadí vyšší koncentrace potu, ze které čerpá sůl. Je charakteristický pro své karotenoidní zbarvení, proto poskytuje ochranu před UV zářením [60].

Anaerobní bakterie *Propionibacterium acnes* dominuje především v pilosebaceózní jednotce. Podílí se na udržování zdravé pokožky svojí produkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem a molekul inhibující jiné mikroorganismy. Zároveň je ale jednou z příčin zánětlivých infekcí kůže, z níž jedním je všem známé akné [61].

Streptococcus pyogenes, bakterie tvořící řetízky. Streptokoky můžeme rozdělit do tří skupin podle hemolýzy na krevním agaru, tedy rozkladu červených krvinek. *S. pyogenes* spadá do skupiny beta-hemolytické, to znamená, že úplně rozkládají červené krvinky. V této skupině se řadí do kategorie A, jež se od jiných liší složením buněčné stěny a antigenem. Tato bakterie je specifický patogen, který především u člověka způsobuje kožní vyrážky a jiné vysoce nakažlivé infekce. A to kvůli produkci exotoxinů a dalších látek narušující tkáň [62].

Příkladem patogenní bakterie kůže je známý koaguláza-pozitivní kok – *S. aureus*. Jestliže je koaguláza pozitivní, znamená to, že produkuje enzym vyvolávající koagulaci. Ačkoliv je kolonizace touto bakterií primárně neškodná, představuje velké riziko. Má na svědomí jak mírné, tak závažné infekce [63]. Větší hrozbou je mutací vzniklý meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA), který odolává látce methicilin přítomné v antibiotikách [64].

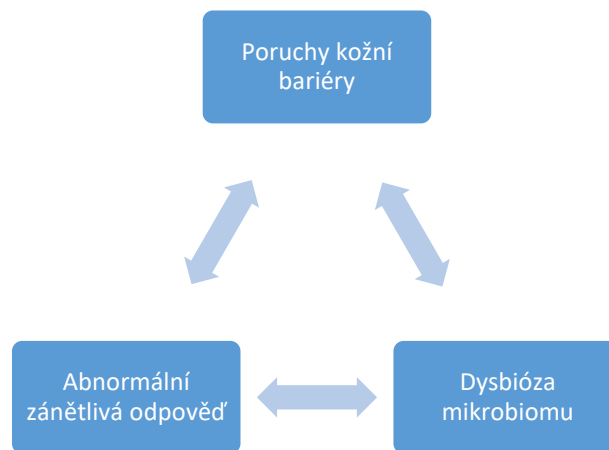
Pseudomonas aeruginosa, aerobní tyčinka, vyskytující se ve sladkovodních tocích. Způsobuje řadu onemocnění a chronických infekcí. Projevuje antibiotickou rezistenci, díky své polopropustné membráně a systému, který odráží pro ni nebezpečné látky [65].

2.1.2 Etiopatogeneze kůže

U zdravého jedince jsou mikroby na pokožce v rovnováze a převažují s neutrálním nebo pozitivním vlivem na organismus. Dojde-li k narušení této rovnováhy – dysbióze, může dojít

k řadě onemocnění. Například mikrobiální nerovnováha vaginální mikroflóry může zapříčinit vaginální kandidózu nejčastěji v důsledku přemnožení kvasinky *Candida albicans* [66]. Disbalance v dutině ústní má za následek vznik zubních kazů [67], výkyv ve střevní mikrobiotě může způsobit zánětlivé kožní nemoci [68].

Pojem etiopatogeneze kůže představuje soubor příčin a mechanismů, které vedly ke vzniku onemocnění [69]. Za vznikem kožního onemocnění je porucha funkce kožní bariéry, která úzce souvisí s mikrobiotou. Vzájemný vztah znázorňuje následující schéma (Obrázek 7), které uvádí souvislost mezi porušenou kožní bariérou, dybiózou a zánětlivou odpovědí imunitního systému. Avšak doposud není jasné, zdali je dysbióza primární, nebo je důsledkem poškození kožní bariéry [17].



Obrázek 7 Souvislost mezi kožní bariérou, dysbiózou mikrobiomu a zánětlivou odpovědí

Atopická dermatitida (AD)

AD je zánětlivé kožní onemocnění, jehož výskyt v průmyslových zemích stále narůstá. AD je zánětlivé kožní onemocnění, které postihuje 15–20 % dětí a 1–3 % dospělých [70]. Projevuje se suchými, svědivými a začervenalými ložisky na kůži [71]. Charakteristickým znakem AD, který je dobře známý, je zvýšená kolonizace bakterií *S. aureus*, která způsobuje nižší diverzitu mikrobů na kůži zapříčiněnou toxickými metabolity narušující biologické membrány [58] [72]. Vědci se také domnívají, že složení mikroflóry u osob postihující AD, je způsobeno dysfunkcí kožní bariéry, která spočívá v mutaci genu kódující filagrin [73]. Filagrin je protein zajišťující správnou strukturu SC, a tím je zabezpečena odpovídající funkce kožní bariéry [74].

Pro pokožku trpící AD je také typická snížená produkce AMP v kůži. Jestliže je tedy tato produkce snížena, je zřejmé, že kůže bude více kolonizovaná mikroorganismy.

Aknózní plet'

Ačkoliv není toto zánětlivé onemocnění zcela objasněné, změna bakteriálního osídlení je považována za jeden z hlavních faktorů, proč akné vzniká. Základní mechanismus spočívá ve zvýšené produkci mazu přispívající k zánětu pilosebaceózní jednotky, tím na kůži vzniká prostředí vhodné pro lipofilní bakterie. Hlavní bakterií spojovanou s onemocněním je *Propionibacterium acnes*, jejíž primární osídlení je právě v mazových folikulech. V těchto folikulech se začínají tvořit tzv. mikrokomedony, které se projevují prvními známkami zánětu a jsou prekurzorem komedonů. Zánět a lokální poškození kůže je způsobeno sekrecí bakteriálních enzymů, jako jsou enzymy štěpící tuky (lipázy), bílkoviny (protoázy) nebo kyselinu hyaluronovou (hyaluronidáza) [73].

2.2 Vztah mikrobiomu k imunitnímu systému

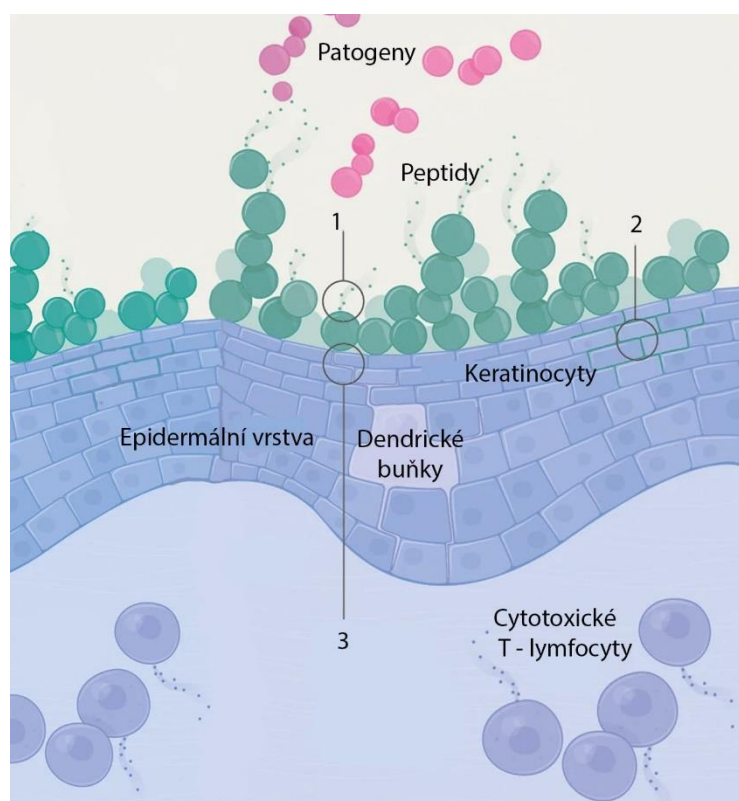
Imunitní systém označuje souhrn souboru buněk a chemických procesů, které chrání živého tvora před chorobami, cizími látkami apod. Můžeme rozdělit na dvě části: vrozenou imunitu a získanou imunitu. Liší se od sebe způsobem imunitní odpovědi.

Vrozená imunita reaguje rychle, její odpověď přichází během několika minut či hodin, nemá však imunologickou paměť, proto je reakce vždy stejná a méně efektivní. Je to první imunologický mechanismus, který bojuje proti patogenezí. Její hlavní jednotkou jsou dendritické buňky, leukocyty a makrofágy [75; 76]. Dendritické buňky se nachází převážně v kůži a ve sliznicích, můžeme je nalézt i v krvi nebo lymfě. Pohlcejí odumřelé tkáně nebo ty látky, které se rozpustí v mezibuněčné tekutině, načež jsou uvnitř buňky zpracovány a následně vystaveny na jejich povrch. Tímto způsobem reprezentují antigen, cizorodou látku, který je důležitý k imunologické odpovědi získané imunity [76].

Získaná imunita reaguje specificky. Charakterizuje ji imunologická paměť, která závisí na styku s antigenem, jež spustí imunitní odpověď. Receptory, které dokážou odhalit patogen, získáváme během života, tudíž jakmile se systém potká s patogenem podruhé, je schopný provést rychlejší a účinnější odpověď [77]. Důležitou součástí specifické imunity jsou T-lymfocyty, jejichž vývoj probíhá v kostní dřeni a dozrávání nastává v brzlíku. Tam získají i svoji imunokompetenci, díky řadě receptorů a koreceptorů, které jsou přizpůsobené k rozpoznání antigenu připojeného na MHC (Major Histocompatibility Complex). MHC glykoprotein je membránová jednotka bílkovinné povahy, která se nachází ve všech jaderných buňkách organismu. Bez tohoto mezikroku by T-lymfocyty nemohly analyzovat

patogen [78]. Mezi oběma imunitami panuje velká synergie, a pokud by nastala porucha tohoto systému, projevilo by se to zánětem, autoimunitním onemocněním nebo hypersenzitivní reakcí [75].

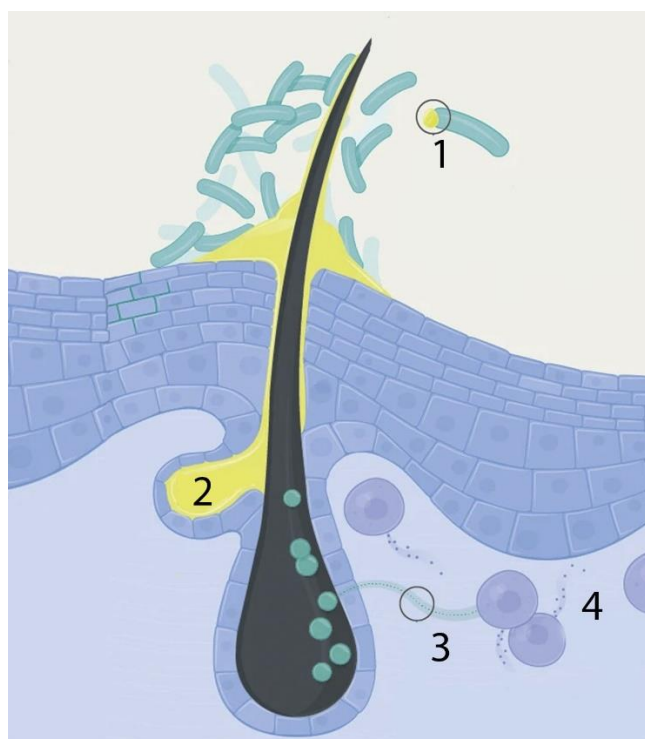
Celý proces komunikace probíhá tak, že se patogen dostane do bezprostřední blízkosti organismu – tedy ke kožní bariéře a sliznicím. Zdravý imunitní systém je v symbióze s kožní mikrobiotou a reaguje na podněty, aby předešla infekci [79]. Na následujícím obrázku je patrné, že bakterie (zelené kuličky) interagují s dendritickými buňkami (č. 2 v *Obrázek 8*), které vyšlou signál T-lymfocytům. Tento druh lymfocytů je schopný donutit buňky k apoptóze – buněčné smrti. Jiné druhy mikrobů, jako je komenzální *S. epidermis*, vylučují AMP, a to zabezpečuje prevenci před napadením patogenem (č.1 v *Obrázek 8*). Jiné bakterie zase svými metabolity mohou potlačit zánět a podpořit tak buněčnou komunikaci kožních keratinocytů, která je důležitá pro plnění správné funkce jakožto kožní bariéra (č.3 v *Obrázek 8*) [80].



Obrázek 8 Komunikace mikrobioty a T-lymfocytů. Převzato [80]

Jelikož jsou mikroorganismy na kůži těla přirozeně cizí, je potřeba, aby je tělo přijalo, respektive nesnažilo se je zničit. Tomu pomáhá, jak bylo zjištěno, komenzální bakterie *S. epidermis*, která kolonizuje kůži jako jedna z prvních. Metabolity mikrobu přichází

okamžitě po narození do styku s regulačními T-lymfocyty (druh buněk získané imunity jedince), které si navyknou na přítomnost těchto látek. V následujících letech pak imunitní systém ignoruje antigeny této bakterie, a tedy nespouští imunitní reakci [81]. Pokud ale dojde jedinec do styku s touto bakterií později, imunitní odpověď bude silná a zánětlivá. Zajímavostí je, že kůže dokáže patogen rozeznat již v novorozeneckém období, proto si tělo nevytvoří toleranci na přítomnost patogenních mikroorganismů a dokáže na ně reagovat [17]. Celou komunikaci můžeme vidět na *Obrázek 9*. Vlasový folikul je osídlen *S. epidermis* (malé kuličky), které svými metabolity přitahují regulační T-lymfocyty (č.3, 4 v *Obrázek 9*).



Obrázek 9 Komunikace bakterií s imunitním systémem. Převzato [82]

3 MODEL KOŽNÍHO MIKROBIOMU

Modelové systémy kůže a biofilmů jsou nezbytné pro pochopení komunikace kůže a mikrobioty. Modely kůže se začínají rychle vyvíjet, dnes věda může využít jak jednodušší 2D modely, tak i sofistikovanější 3D modely zahrnující imunitní odpověď, o kterou jsou jiné modely ochuzeny. Jiným možným modelem může být samotná tkáň lidského těla, která se z těla odebere a kultivuje [83].

Ex vivo

Jak bylo řečeno, existují *ex vivo* modely kožního mikrobiomu. Jejich výhodou je, že simulují prostředí *in vivo* lépe než uměle vytvořené modely v laboratoři. Mikrobiom u tohoto modelu je méně citlivý na změny, lépe se brání vůči patogenním procesům. Zároveň jejím potenciálem je sledovat mechanismy, které ovlivňují přechod bakterií na kůži a jejich následnou distribuci [84].

Modely fungují tak, že se odebere část kožní tkáně, buď lidské nebo zvířecí. Vzorky kůže se sterilizují a udržují v kultivačních nádobách. Následně proběhne inokulace mikroorganismy, které mají být zkoumané. Mezi poslední kroky patří inkubace v optimálních podmínkách a analýza interakce mikrobiom–kůže [85] [86].

In vitro

Zde se řadí modely kůže, na které jsou nasazené mikroorganismy. Pro teoretickou analýzu mikrobiomu lze použít 2D modely mikrobiomu, složené z monovrstvy lidských keratinocytů a na ni nasazené mikroorganismy. Přináší pouze předpoklad toho, jaké jsou mechanismy mikrobioty na kůži a předběžné testování různých látek, jelikož je tento systém limitován fyziologií pokožky [87]. Buňky ve 2D struktuře ztrácí různorodost svého fenotypu, což se projevuje na morfologii, vnitřní organizaci keratinocytu, a tím pádem i na sekreci a buněčné signalizaci. Omezení nastává i v případě přísunu živin, kyslíku, metabolitů a signálních molekul, které je neomezené oproti skutečnosti. Výhodou je ale jednoduchost a dostupnost tohoto systému. Jeho formování probíhá několik hodin, což poskytuje snadnou reprodukovatelnost či možnost interpretace [88].

Blíže k realitě se přibližují 3D modely kůže s mikrobiotou. 3D model se sice formuje déle než 2D kultura, poskytuje však přesnější výsledky. Tento simulovaný systém kůže může vznikat třemi způsoby: suspenzní kulturou na nepřilnavých plasticích, kulturou v koncentrovaném mediu nebo gelovitých látkách a v poslední řadě ve scaffoldech.

3D model zachovává morfologii, proto je zajištěna správná interakce mezi buňkami a jejím prostředím. Přístup k živinám je variabilní, stejně tak ke kyslíku, metabolitů a signálním molekulám. Omezení nastává v případě nákladů, času a s tím související opakovatelností a získání podobných výsledků. Nutno podotknout, že neexistuje ideální model 3D kůže, ale je žádoucí vybrat ten nejvhodnější pro daný výzkum a analýzu [88].

Všechny modely můžeme podrobit metagenomické analýze. Jde o analýzu genetické informace, díky které získáme informace o kvalitativním i kvantitativním složení kožního mikrobiomu. Poskytuje informace a hypotézy o mikrobiální funkci [89].

Další možnou analýzou je zkoumání mikrobiomu fluorescenční mikroskopií. Tato metoda využívá fluorescence, tedy stavu, kdy vzorek absorbuje energii neviditelného záření a emituje záření viditelného světla s delší vlnovou délkou. V praxi se musí k buňkám přidat fluorescenční barvivo, aby byly pozorovatelné pod mikroskopem [90].

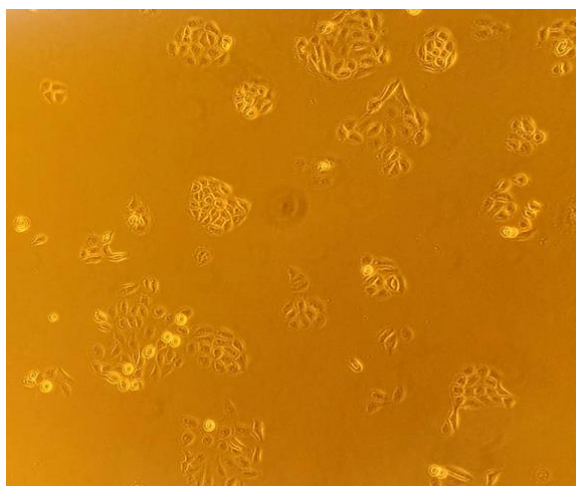
II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro vytvoření kožního mikrobiomu *in vitro* byla použita buněčná linie keratinocytů HaCaT. Jsou epidermálního původu, proto sloužila jako monovrstva představující kůži. Buněčná linie HaCaT byla kultivována v médiu RPMI (Gibco, ThermoScientific, USA) s 1% přídatkem antibiotik penicilin – streptomycin (GE Healthcare HyClone, United Kingdom) a 10% fetálního bovinního séra (FBS; BioSera, France). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích (TPP Trasadigen, Švýcarsko) v inkubátoru při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a 5 % CO₂ atmosféře.

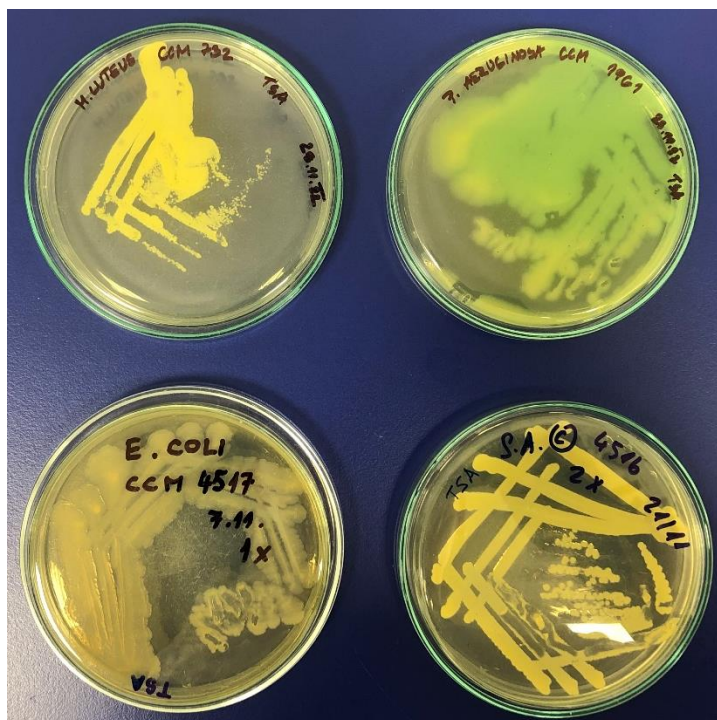
K dosažení vhodné viability byla provedena pasáž buněčné linie dvakrát týdně. Nejprve byla vyloučena kontaminace pod inverzním světelným mikroskopem IX51 (OLYMPUS Japan, Japonsko). Objem média byl následně vylit z kultivační lahve a buňky promyty 2x PBS. Po propláchnutí buněk a promytí byl přidán 1x trypsin/EDTA (Biosera, France) a následovala 5minutová inkubace. Po uvolnění buněk ode dna kultivační nádoby bylo přidáno kompletní kultivační médium – vznik buněčné suspenze. Viabilita a počet buněk byla stanovena pomocí Bürknerovy komůrky. Linie byla pasážována v poměru 1: 4.



Obrázek 10 Buňky HaCaT, zvětšeno 40x

K bakteriální kultivaci byly použity následující kultury, pořízené v České sbírce mikroorganismů, *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Micrococcus luteus* CCM 732 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (Obrázek 11). Bakterie bylo nutné před započítáním experimentu oživit z želatinových disků. Jednalo se o provedení kultivace na trypton sójovém agaru (TSA) v Petriho misce při 37 °C za aerobních podmínek. Následně byla

kolonie převedena do trypton sójového bujónu (TSB) a nechala se 24 h kultivovat pro následující práci.



Obrázek 11 Použité bakteriální kolonie – *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*

4.2 Použité soupravy, chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Hydrogenuhličitan sodný (kat. č.: 28000-31000; Penta Chemicals, Česká republika)
- Hydrogenuhličitan draselný (kat. č.: 15300-31000; Penta Chemicals, Česká republika)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, kat. č.: LM-S2041/500, BioSera, Francie)
- Fetální bovinní sérum (FBS kat. č.: FB-1280; Biosera, Francie)
- Methylenová modř (kat. č.: 66720, Sigma Aldrich, USA)
- MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (kat. č.: M1415.0005, Duchefa Biochemie, Nizozemí)
- Penicillin-Streptomycin 100X (kat. č.: XC-A4122/100; Biosera, Francie)
- RPMI 1640 médium (kat. č.: 31-800-105, Gibco, ThermoScientific, USA)

- RPMI 1640 médium, bez fenolové červeně (kat. č.: 11530406, Gibco, ThermoFisher Scientific, USA)
- Soybean casein digest lecithin polysorbate medium solution (SCDLP, kat. č.: M011, HiMedia Laboratories, Indie)
- Trypsin/EDTA 10X (kat. č.: XC-T1717/100; Biosera, France)
- Trypton sójový agar (TSA; kat. č.: M290, HiMedia Laboratories. Indie)
- Triton™ X-100 solution (kat. č.: 93443-100ML, Sigm Aldrich, USA)
- Formaldehyd 36-38% (kat. č.:1415,-11000, Penta s. r. o, Česká republika)
- ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ Reagent (kat. č.: R37110, ThermoFisher Scientific, USA)
- Hoechst 33258 (kat. č.: H1398, ThermoFisher, Scientific, USA)

Použité roztoky a jejich příprava

- Roztoky pro kultivaci bakterií

Mikrobiologický agar byl připraven smícháním 18 g Tryptone Soya Agar (TSA, HiMedia Laboratories. Indie) a 400 ml demineralizované vody. TSB bujón byl připraven smícháním 12,0 g M011 (Soyabean Casein Digest Medium, HiMedia Laboratories. Indie) a 400 ml demineralizované vody.

- Příprava methylenové modře

V odměrné baňce 100 ml se rozpustilo 1,5 g methylované modře v 95% ethanolu. Min. 3 dny se roztok nechal odstát překrytý buničinou. Z tohoto koncentrovaného roztoku se odebralo 30 ml do 100ml odměrné baňky a doplnilo se destilovanou vodou. Následně bylo přidáno 100 μ l 10% KOH, které se připravilo rozpuštěním 10 g KOH v 50 ml destilované vody. Přefiltrovaný roztok se zředil 1:20 s destilovanou vodou.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- 0,22 μ m stříkačkové filtry (kat. č.: 99722, TPP – Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Centrifuga 5702 R chlazený model pro vzorky závislé na teplotě (Eppendorf, ČR)

- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Německo)
- McFarlandův densitometr DEN-1B Grant-Bio (Grant Instruments, Velká Británie)
- Digestoř odtahovaná MERCI G NextGen (MERCİ s. r. o., ČR)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem (OLYMPUS Japan, Japonsko)
- Inkubátor s příslušenstvím Heracell™ 150i (Thermo Scientific, USA)
- Inkubátor INE 400 Memmert 531 (Mettler-Toledo, Německo)
- Inverzní mikroskop IX51 (OLYMPUS Japan, Japonsko)
- Jednorázové injekční stříkačky Injekt (Braun, Spolková republika Německo)
- Laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko)
- Laminární flowbox – Mikrobiological Safety Cabinet Class II type A2 Safemate 1.2 (BioAir S.p.A., Itálie)
- Třepačka Vortex GENIE 2 (Scientific Industries, USA)
- Ultrazvuk Elmasonic S 70 H s ohřevem (Elma, Spolková republika Německo)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Růstová křivka

Jedním z vyhodnocovacích postupů byla růstová křivka, která ve výzkumech slouží jako referenční hodnota. Při této metodě se sleduje kultivace mikroorganismů v čase, kdy mikroorganismy prochází několika fázemi: Lag fáze, fáze zrychleného růstu, Log fáze, fáze zpomaleného růstu, stacionární fáze a fáze odumírání, jak je znázorněno na následujícím obrázku (*Obrázek 12*) [91].

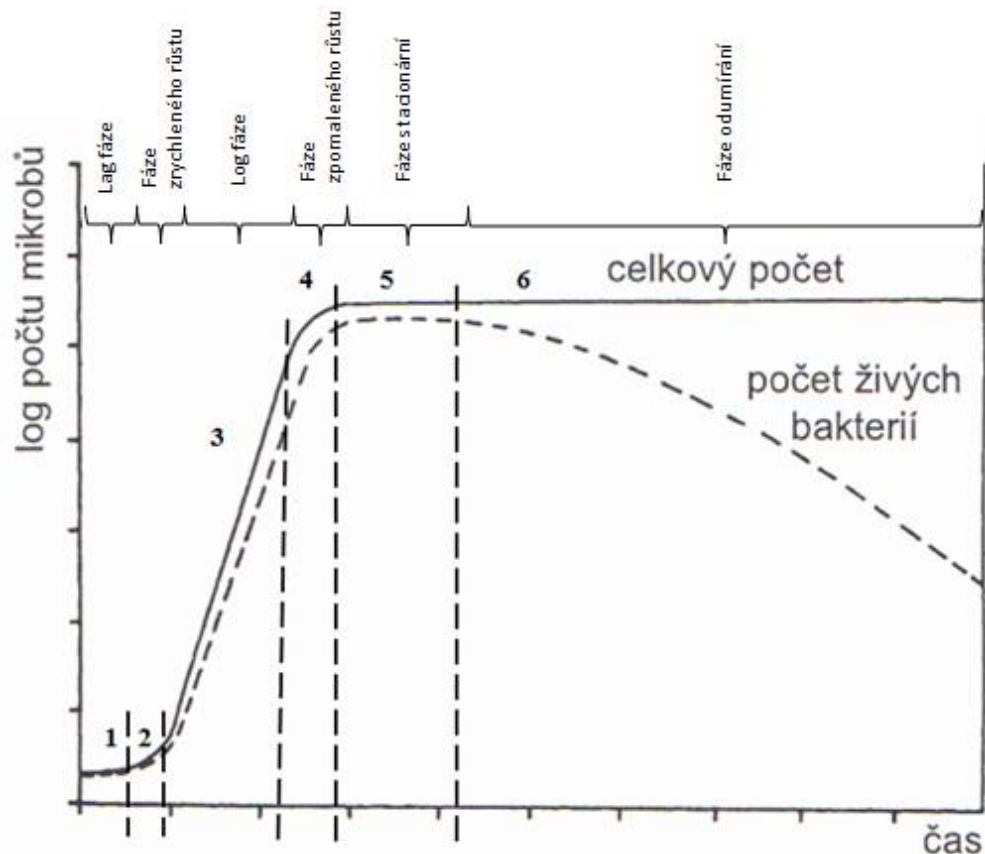
V lag fázi probíhá přizpůsobování a růst samotné buňky, aktivují se vhodné enzymy. V této fázi se buňky samy opravují, jestliže došlo k jejich poškození. Tato doba závisí na složení média, genetické výbavě buňky a buněčném druhu. Neadaptované buňky odumírají.

Fáze zrychleného růstu vyznačuje bod mezi lag a log fází, kdy jsou aktivované enzymy k rozmnožení a kultura se začíná rychle množit. Na to navazuje log fáze (logaritmická, exponenciální), kdy buňky intenzivně rostou, aktivně se rozmnožují a zdvojnásobují svůj

počet. V této fázi je dostatečné množství živin a všechny buňky se dělí konstantní maximální rychlostí. V této fázi jsou buňky využívány pro výzkum.

Ve fázi zpomaleného růstu naopak dochází ke zpomalení metabolismu a hromadění metabolitů. Tím předchází fázi stacionární (plateau fáze), zde se počet nových buněk vyrovnává s počtem odumřelých, dochází k vyčerpání živin. Buňky se začínají usazovat, vnímají, že nemají vhodné podmínky pro růst, proto některé sporulují.

Poslední fází je odumírání. Živiny jsou vyčerpány, také je zde příliš mnoho odpadních látek, buňka začíná odbourávat zásobní látky. Prostředí je příliš kyselé a tento nepříznivý stav vede k odumírání buněk [92] [93].



Obrázek 12 Růstová bakteriální křivka. Převzato [94]

Růstová křivka byla změřena na přístroji Tecan, který dokáže sledovat růst bakterií v čase a to tak, že jsou měřené optické změny hustoty vzorku – tedy to, jak se mění hustota a zákal vzorku. Je to jedna ze základních mikrobiologických technik, které dovolují sledovat růst bakterií při různých podmínkách [95].

K oživení bakteriálních mikroorganismů se připravil TSA agar. V rámci postupu oživení bakterií byla lahvička se želatinovými disky ponechána 10 minut při pokojové teplotě, aby při otevření nedošlo ke kondenzaci vody. Vyžíhanou očkovací kličkou byl vyjmut disk, aby se přilepil na špičku kličky a přenesl se do středu Petriho misky s TSA agarem. Disk byl zakápnut 5 kapkami TSB. Takto připravený disk se nechal 30 minut při laboratorní teplotě, poté byl rozočkován po povrchu agaru a inkubován 24 h v inkubátoru.

Další den se bakterie přeočkují z TSA agaru do TSB bujónu. Přeočkování je možné provést odebráním bakteriální kultury z agaru se vyžíhanou kličkou, která se následně přenesse do TSB bujónu. Pro vytvoření homogenní kultury důkladně zvortexujeme.

Po 24 hodinách se zkontroluje množství bakterií v suspenzi a případně se upraví tak, aby optická hustota (OD) byla 0,5. Po této úpravě se do 96jamkové mikrotitrační destičky napipetuje 195 μ l TSB média, ke kterému se přidá 5 μ l bakteriální suspenze. Jako blank (slepý vzorek) slouží čistý TSB bujón. Destička se uloží do readeru (přístroj Infinite M200 PRO Tecan, Švýcarsko), který provede 48 měření po 30 minutách. Měření se vyhodnocuje při 37 °C a vlnové délce 600 nm.

4.4.2 Polymikrobiální model kůže

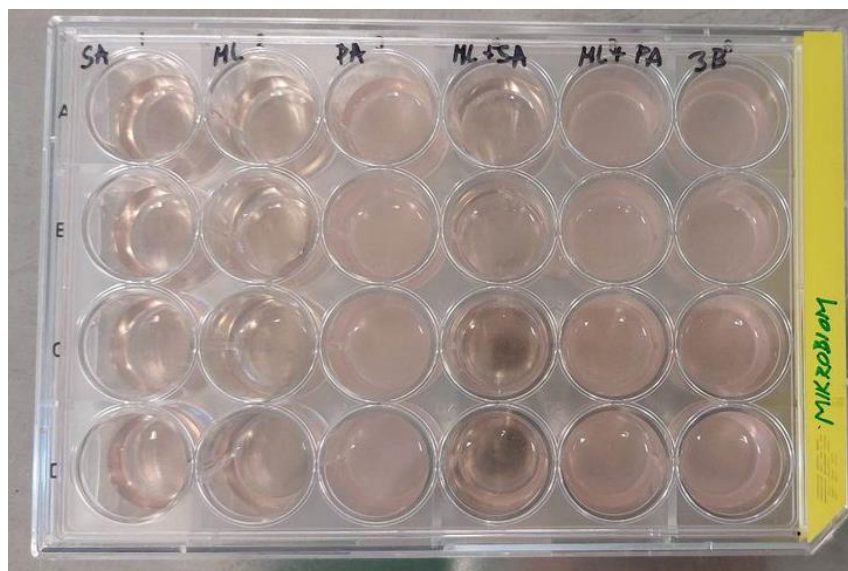
Dvourozměrný polymikrobiální model kombinující ko-kultivaci dermálních keratinocytů s komenzálními a patogenními bakteriemi je vhodný pro zkoumání interakcí, jak mezi samotnými bakteriemi (komezálové – patogeny), tak mezi kožními buňkami a potenciálním mikrobiomem. Byla tedy vytvořena monovrstva z buněk HaCaT, které byly rozmrazeny a přeneseny do kultivačního média RPMI 1640. Po vytvoření konfluentní monovrstvy byly zpasážovány a rozkultivovány v 24jamkových mikrotitračních destičkách. Jedna sloužila jako reference, do druhé destičky byly v dalších dnech přidány bakteriální suspenze. HaCaT se nechaly předem nakultivovat 3 dny v inkubátoru při 37 °C pro provedení experimentu.

Příprava bakteriálních suspenzí probíhala tak, že se z kolonie na agaru vyžíhanou kličkou přenesly bakterie do TBS. Učinilo se tak pro každou bakterii zvlášť – tedy pro *M. luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Bakterie v TBS se nechaly kultivovat v inkubátoru při 35 °C. Následující den se zvortexovaly pro vytvoření homogenního inokula, odebrán 1 ml bakteriální suspenze se zcentrifugoval po dobu 60 s při 13 000 rpm. Supernatan byl odsát a vzniklá peleta byla rozsuspendována v 10 ml PBS. Hodnota OD, která byla potřebná

k vytvoření biofilmu, činila OD 0,01 a následně byla zředěna v poměru 1:1000 pro bakterii *M. luteus* a *S. aureus*. V případě *P. aeruginosa* následovalo ředění v poměru 1:100 000.

Po 3denní kultivaci a vytvoření monovrstvy z buněk HaCaT bylo vyměněno staré medium za 850 μl čerstvého media. Načež připravené bakteriální suspenze (*M. luteus* a *S. aureus*) o objemu 150 μl byly přidány do jamek a kultivovány po dobu 40 h. Po jednodenní kultivaci byla přidána i suspenze *P. aeruginosa* a kultivace proběhla následujících 20 h. Na *Obrázek 13* je vidět, že první sloupec kolonizoval *S. aureus*, druhý *M. luteus*, třetí *P. aeruginosa*. V další sloupcích byly bakterie nakombinovány – 4. sloupec kombinace *M. luteus* a *S. aureus*, 5. sloupec *M. luteus* a *P. aeruginosa* a poslední sloupec byl vyhrazen pro kombinaci tří bakterií.

Po infikaci a 40h kultivaci přišlo na řadu barvení. Nejprve musely být buňky zafixovány, k tomu byl použit 4% formaldehyd, který se nechal 15 min odstát. V dalším kroku se buňky promyly PBS a umrtvily přidáním 0,5% Tritonu X-100. Ten byl po 5 min odsát a 3x promyt PBS. Posledním krokem bylo, že se přidalo do každé jamky PBS a k tomu 1 kapka barviva ActinGreenTM 488 a 10 μl 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ barviva Hoechst 33258. Po 30 min byla barviva v PBS naposledy odsáta a přidán PBS. Nabarvená buněčná kultura byla připravena k analýze pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81. Viz výsledky.

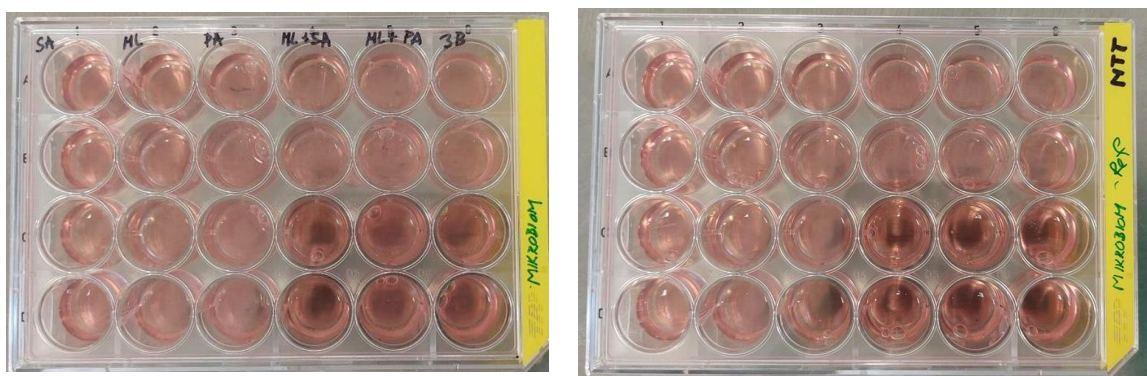


Obrázek 13 Buňky HaCaT a bakteriální suspenze

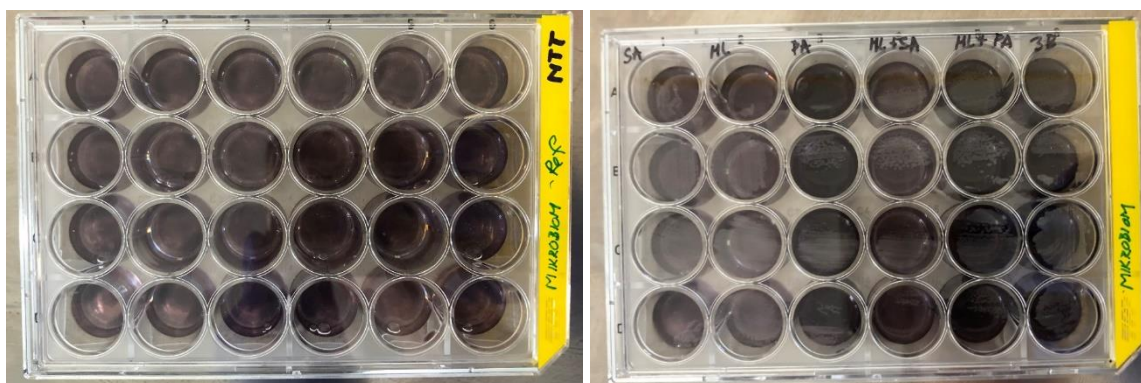
4.4.3 MTT test

Jedná se o rychlý kolorimetrický test využívající dehydrogenázy v aktivních mitochondriích živých buněk, který rozkládá tetrazoliový kruh MTT (3-(4,5dimethylthazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Měří se tak životaschopnost buněk, tzn. počet živých buněk je určen množstvím redukovaného MTT. Výsledkem je poté intracelulární fialově zbarvený formazan, solubilizován a kvantifikován spektrofotometricky při 570 nm. Čím je roztok tmavší, tím větší je počet životaschopných metabolicky aktivních buněk [96] [97]. Na viabilitu byly změřeny buňky HaCaT s bakteriemi tvořící mikrobiom a samotná buněčná linie HaCaT sloužila jako reference.

Pro tento úkon byly znovu připraveny dvě 24jamkové destičky jako v podkapitole Polymikrobiální model kůže. Před provedením samotného testu byla provedena kontrola buněk pod inverzním mikroskopem. V laminárním boxu se poté odsálo původní médium a napipetovalo se nové médium o objemu 800 μl . Následně bylo přidáno 24 μl MTT roztoku do jedné testované jamky, který byl předem zředěn na výslednou koncentraci 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ UPW. Vše se nechalo působit 4 hodiny v inkubátoru. Po uplynutí doby byl objem jamek odsán a přidalo se 500 μl DMSO pro 15min inkubaci. Na závěr proběhlo měření absorbance na přístroji Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko) při absorbanci 570 nm, vlnová délka pro referenci 690 nm. Viz výsledky.



Obrázek 14 Reference buněk HaCaT a mikrobiom po bezprostřední aplikaci MTT



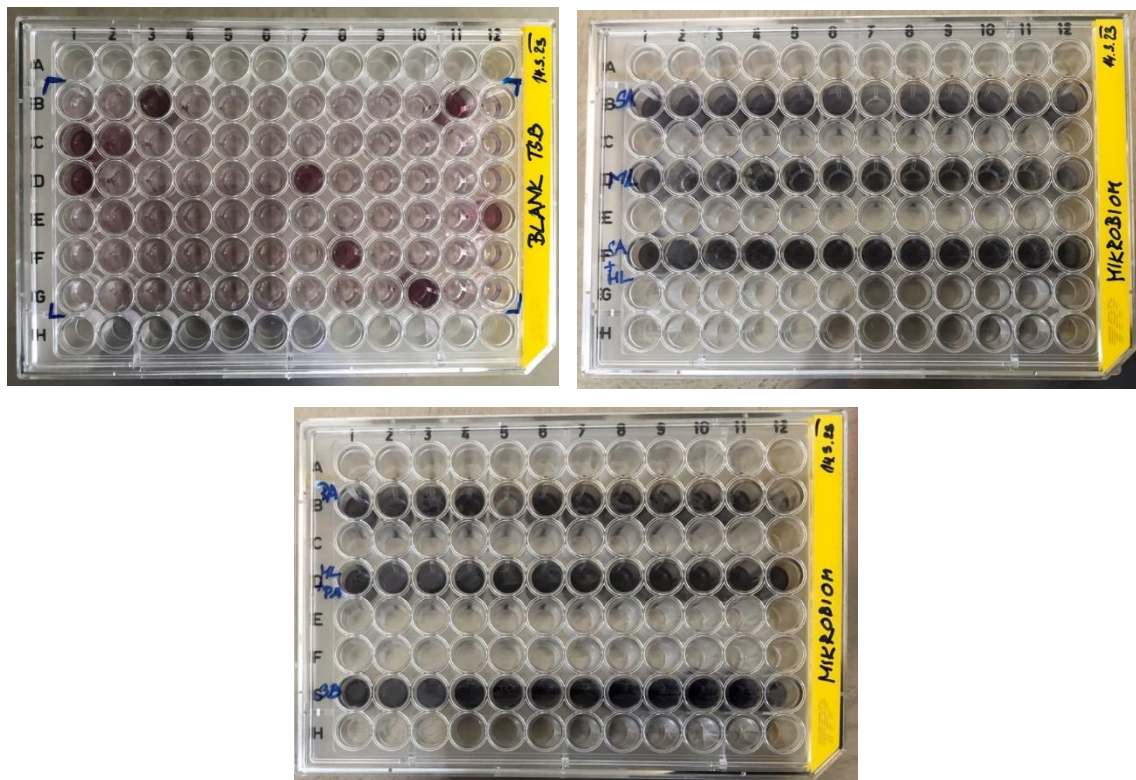
Obrázek 15 Reference buněk HaCaT a mikrobiom po 4h inkubaci MTT

Pomocí metody MTT jsme také stanovili průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce. Samotné bakterie po kultivaci v TBS byly zředěny a upraveny na výslednou optickou densitu OD 0,5 pomocí McFarlandova denziometru. Při této metodě je využit zvýšený zákal u bakterií pro přípravu testovacího inokula jako indexu růstu bakterií a počtu buněk (biomasy). Odečet, nazývaný OD, poté nepřímě odráží počet bakterií [98]. Při tomto OD bylo k 200 μl TBS v 96jamkové destičce napipetováno podle

Tabulka 1. Jako slepý vzorek (blank) posloužil samotný TSB. Na Obrázek 16 (první snímek) můžeme vidět, že některé jamky byly kontaminované. Hodnoty u těchto jamek byly pro výpočet průměru ignorovány.

Tabulka 1 Pipetované objemy do 96jamkové destičky

Počet bakteriálních suspenzí	TBS [μl]	Bakteriální suspenze [μl]
1	195	5,0
2	190	2,5
3	185	2,0



Obrázek 16 Blank a bakteriální suspenze pro vyhodnocení MTT testu

Z naměřených hodnot byla vypočítána schopnost tvorby biofilmu pomocí nepřímé metody na mikrotitrační destičce. Vzala se průměrná hodnota absorbance u blanku a sečetla se s trojnásobkem směrodatné odchylky průměru absorbance, díky tomu se vypočetlo OD_c .

Rovnice 1 Výpočet OD_c

$$OD_c = \text{prům. hodnota blank} + 3 \cdot \text{odchylka průměru}$$

S výsledkem OD_c byla vypočítána hodnota OD u každé bakteriální suspenze, a to podle následujícího výrazu.

Rovnice 2 Výpočet OD bakteriální suspenze

$$OD_{\text{bak.}} = \text{prům. absorbance suspenze} - OD_c$$

Vypočítané OD se porovná s OD_c . Tvorba biofilmu byla hodnocena dle 4 skupin: žádná tvorba biofilmu, slabá, mírná a silná. Bakterie netvořící biofilm měly průměrnou hodnotu absorbance menší než hraniční hodnota OD_c . Jedná se o průměrnou hodnotu reference, tj. nezaočkování mikroorganismem s hodnotami 3 směrodatných odchylek. Tato hraniční hodnota je zvolena dle normálního Gaussova rozdělení, které popisuje průměr včetně

3 směrodatných odchylek pokrývající pravděpodobnost hodnoty v 99,7 %. Slabá produkce biofilmu je určena do hodnoty dvojnásobku OD_c, mírná tvorba je v rozmezí dvojnásobku a čtyřnásobku OD_c a v poslední řadě nad tuto hodnotou OD_c jsou bakterie označeny jako tvořící silný biofilm [99].

Na základě následující tabulky se tedy určí, zdali bakterie tvoří biofilm či nikoliv [100].

Tabulka 2 Vyhodnocení biofilmu u bakterií

Velikost OD	Produkce mikrobiomu
$OD \leq OD_c$	Žádná
$OD_c < OD \leq 2 \cdot OD_c$	Slabá
$2 \cdot OD_c < OD \leq 4 \cdot OD_c$	Mírná
$4 \cdot OD_c < OD$	Silná

5 VÝSLEDKY

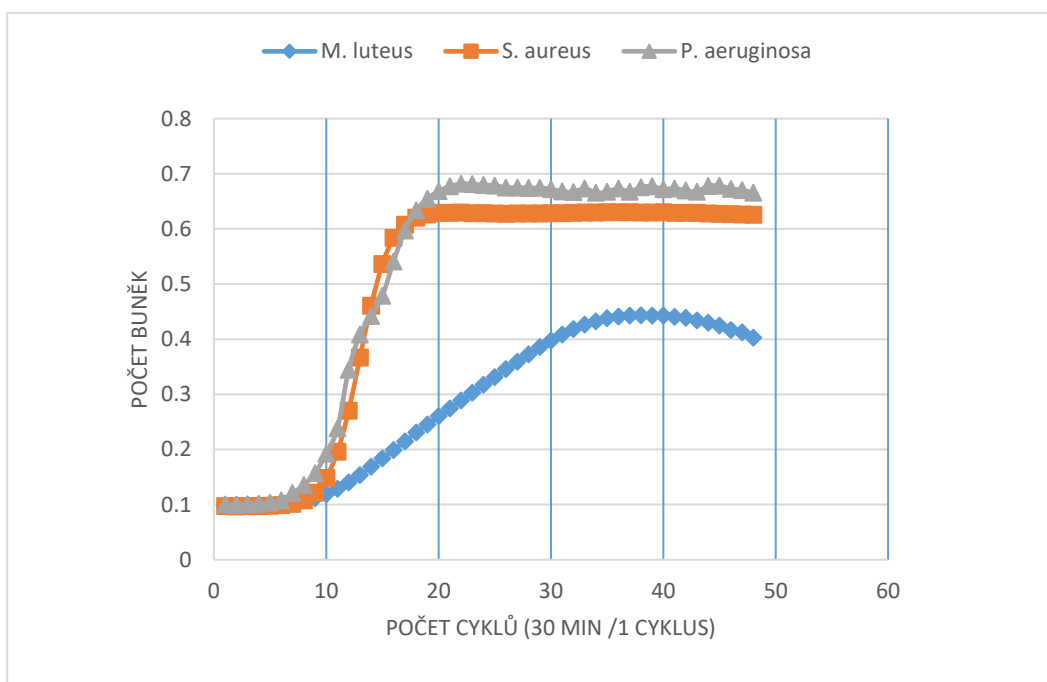
5.1 Konstrukce a analýza růstové křivky

5.1.1 Bakteriální kultura

Růstové křivky bakterií byly kvantifikovány na základě hodnot optické denzity a počtu buněk v čase. Bakteriální křivky byly měřeny při 37 °C a byla použita vlnová délka 600 nm. Pipetovaná OD pro bakterie se pohybovaly v rozmezí $OD\ 0,5 \pm 0,05$.

Na naměřených růstových křivkách můžeme vidět poměrně ideální růst, respektive tak, jak je zmiňované v literatuře. Je patrná Lag fáze, fáze zrychleného růstu, Log fáze, fáze zpomaleného růstu, stacionární fáze i počínající fáze odumírání. V případě *P. aeruginosa* a *S. aureus* mají obě růstové křivky přibližně stejný sigmoidní tvar. Bakterie prošly všemi růstovými fázemi, měření však bylo zastaveno ještě ve stacionární fázi, proto fáze odumírání chybí.

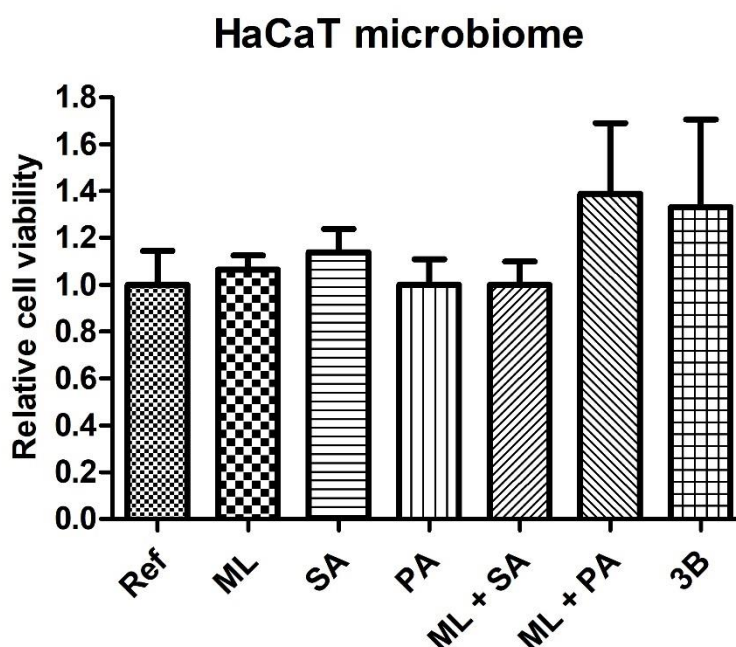
Odlíšný průběh růstu vykazoval *M. luteus*, u kterého nebyla fáze zrychleného růstu tak rapidní, jak napovídá literatura. Stejně tak se lišily fáze zpomaleného růstu a stacionární fáze, které probíhala rychleji. Z grafu je patrné, že i rychleji nastala fáze odumírání.



Obrázek 17 Růstové křivky bakterií

5.2 Vyhodnocení polymikrobiálního modelu kůže

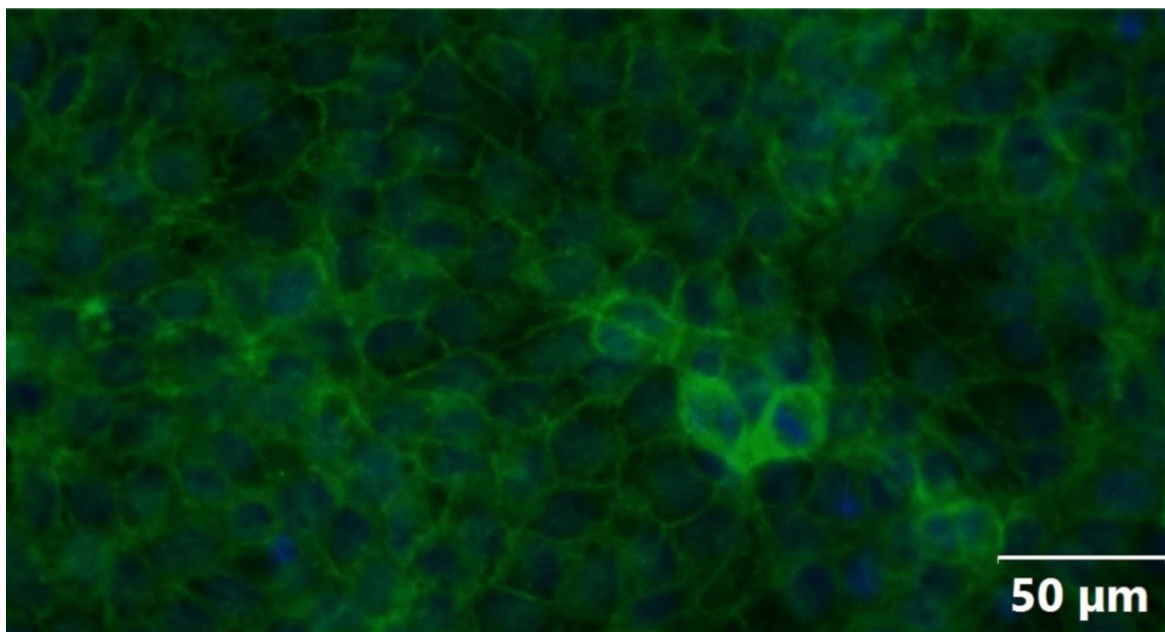
Na základě MTT testu bylo zjištěno, jaká je viabilita keratinocytů s bakteriemi. Nedostatkem tohoto testu je, že se počítá viabilita jak buněk HaCaT tak mikroorganismů. Tudíž nelze s jistotou říct, jestli přítomnost těchto bakterií pozitivně nebo negativně ovlivnila růst buněčné linie. Podle *Obrázek 18* nejvyšší viabilitu vykazovala kombinace *M. luteus* s *P. aeruginosa* společně s kombinací všech bakterií. Zároveň je u nich nejvyšší odchylka. Životaschopnost ostatních kombinací nebyla o mnoho vyšší jako reference, v případě *P. aeruginosa* a kombinace *M. luteus* a *S. aureus* dosahovala viability stejné hladiny jako reference.



Obrázek 18 Viabilita buněk HaCaT s mikroorganismy

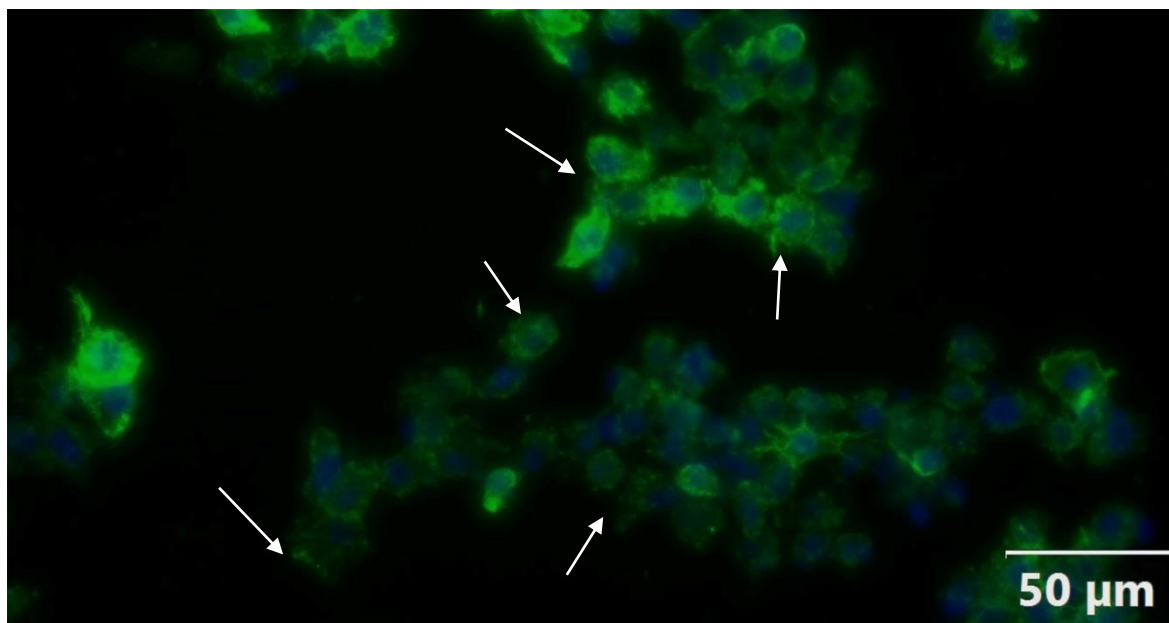
Pro zjištění morfologie a viability eukaryotních a bakteriálních buněk byla využita fluorescenční mikroskopie. Buněčná linie byla nabarvena fluorescenčními barvivy ActinGreenTM 488, které je využito v rámci určování struktury a funkce cytoskeletu, a Hoechst 33258 jako kontrastní barvivo pro určení jader buněk. Zároveň můžeme pozorovat integritu samotných buněk HaCaT a monovrstvy, kterou by měla linie tvořit. V ideálním případě kožního mikrobiomu tvoří keratinocyty monovrstvu ucelených a neporušených buněk, kolem kterých se seskupují bakteriální buňky. V experimentální části se povedlo

podobný případ vytvořit. Dle *Obrázek 20* až *Obrázek 25* lze vidět bakterie okolo cytoskeletu keratinocytů (vyznačeno bílými šípkami).

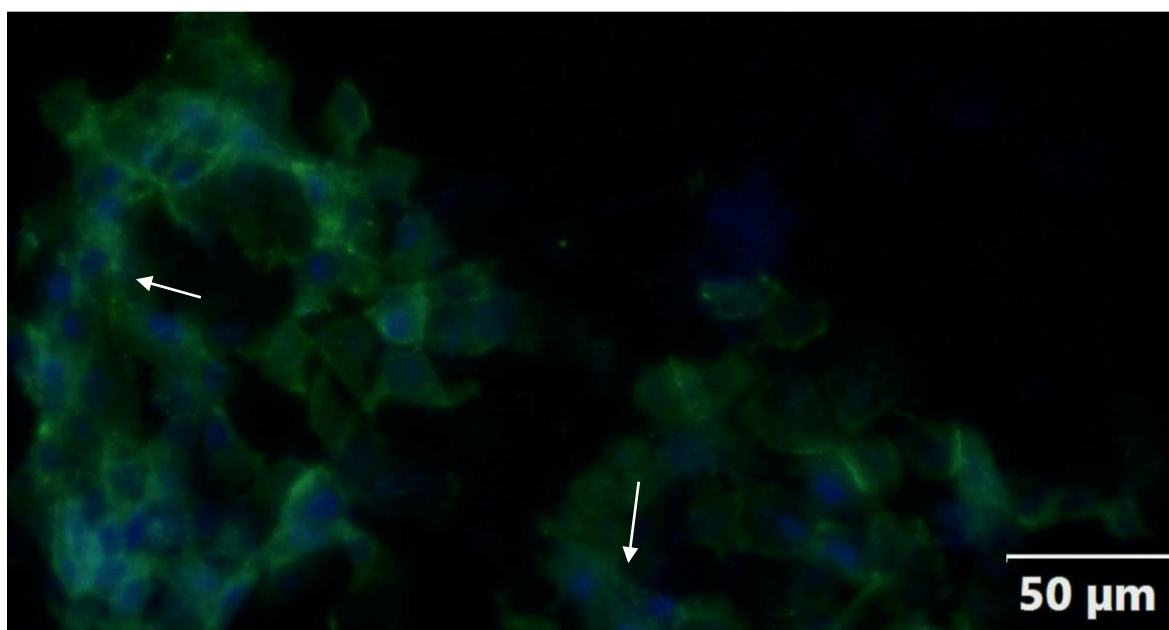


Obrázek 19 Reference – monovrstva buněk HaCaT

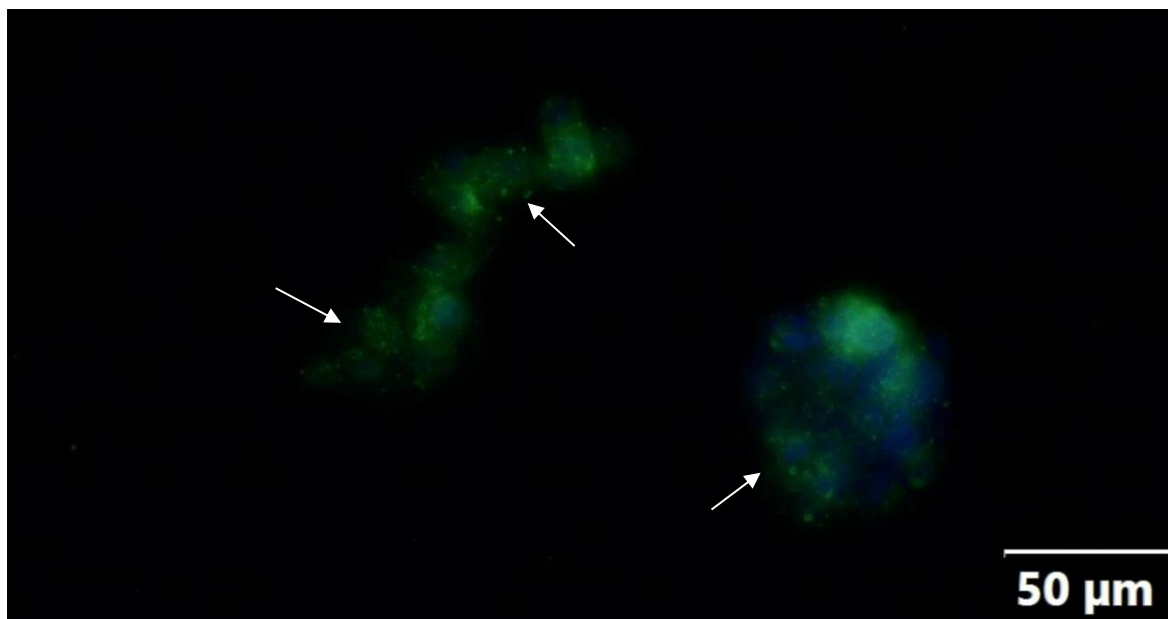
U kombinace HaCaT s komenzální bakterií *M. luteus* (*Obrázek 20*) byla morfologie buněk bez výrazných změn, cytoskelet nebyl narušen a buňky vykazovaly typický polygonální až okrouhlý tvar podobně jako reference. Počet keratinocytů byl vyšší než u kombinace s patogenními bakteriemi *S. aureus* a *P. aeruginosa* (*Obrázek 21*, *Obrázek 22*). V případě kombinace se *S. aureus* buňky keratinocytů neměly obvyklý tvar a bylo na nich znát poškození. U patogenu *P. aeruginosa* byly buňky znatelně poškozené, se známkami nekrotické buněčné smrti a jaderné fragmentace. Také je celkově viditelný nižší počet HaCaT buněk.



Obrázek 20 Buňky HaCaT s komenzálem *M. luteus*



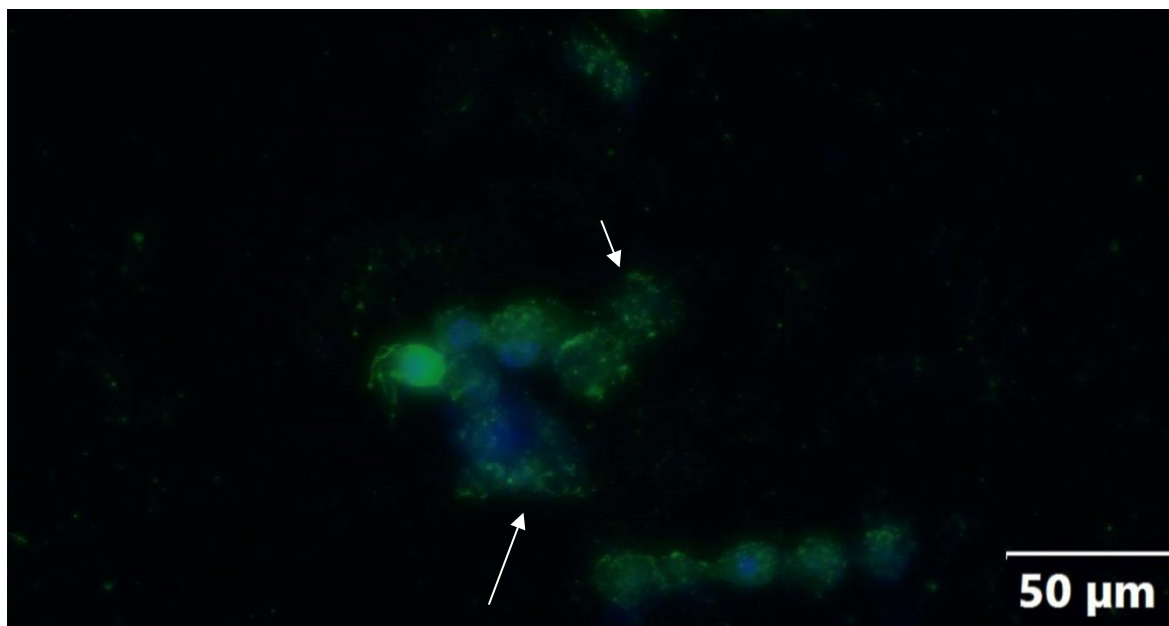
Obrázek 21 Buňky HaCaT s patogenem *S. aureus*



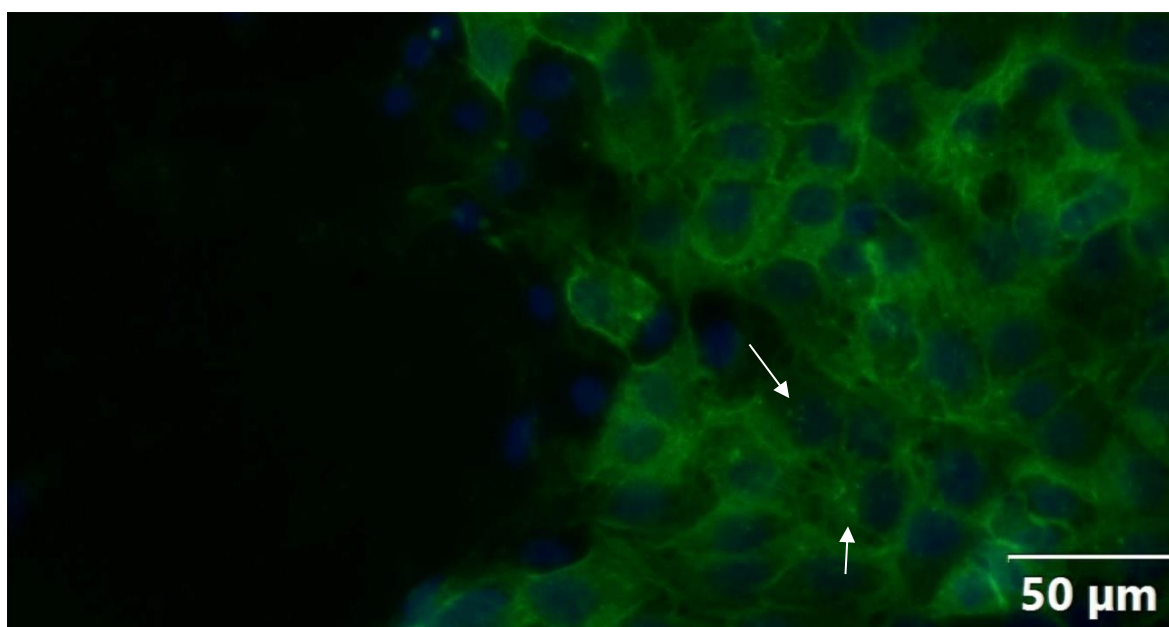
Obrázek 22 Buňky HaCaT s patogenem *P. aeruginosa*

V kombinaci patogenní bakterie *P.aeruginosa* s komenzálem *M. luteus* není příliš znát ochrana komenzální bakterie (Obrázek 23). I zde se vyskytovaly různorodé morfologické změny buněčné linie, stejně tak jako u HaCaT s *P. aeruginosa*. Viditelně poklesla integrita monovrstvy. U druhé kombinace, tedy *M. luteus* a *S. aureus*, měly buňky polygonální charakter a znatelné byly částečné změny na cytoskeletu (Obrázek 24). Linie buněk vykazovala menší viabilitu oproti referenci.

Jelikož byla dostupná pouze jedna komenzální bakterie vhodná pro tento experiment, nabízí se otázka, zda by jiný komenzál byl účinnější a jestli by dokázal keratinocyty ochránit před poškozením. Jednou z dalších komenzálních bakterií je například *S. epidermis*, jež svými metabolity zeslabuje zánětlivou odpověď buňky, ovšem bývá inhibována patogenem *P. aeruginosa* [3] [101].

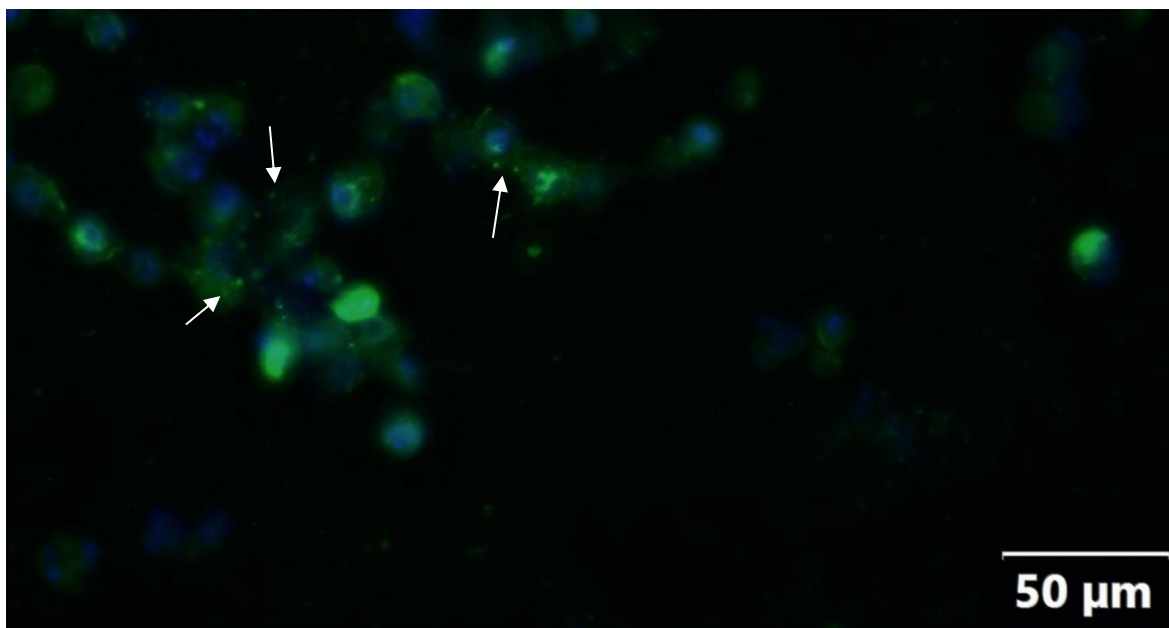


Obrázek 23 Buňky HaCaT s komenzálem *M. luteus* a patogenem *P. aeruginosa*



Obrázek 24 Buňky HaCaT s komenzálem *M. luteus* a patogenem *S. aureus*

U trojkombinace bakterií byly keratinocyty podstatně odolnější než se samostatným patogenem, avšak tvar buňky neodpovídal zdravé buňce HaCaT (Obrázek 25). Buňky byly menší, podobně jako u kombinace HaCaT s komenzálem *M. luteus*. Pozoruhodné je, že ačkoliv byly buňky kombinované s dvěma patogeny a jednou komenzální bakterií, keratinocyty nebyly zcela zničeny. Můžeme předpokládat, že komenzální bakterie jim poskytla alespoň částečnou ochranu a předešla úplnému zániku buněk HaCaT.



Obrázek 25 Buňky HaCaT s komenzálem *M. luteus* a patogeny *S. aureus* a *P. aeruginosa*

Rovněž byla stanovena tvorba biofilmu jednotlivých bakterií a jejich kombinací aplikované v rámci polymikrobiálního modelu. Vyhodnocení tvorby biofilmu metodou mikrotitrační destičky, podle *Tabulka 2*, vyšly pozitivně pro všechny případy. U jednotlivých bakterií *S. aureus* ($A_{570} = 1,228$), *M. luteus* ($A_{570} = 1,113$), *P. aeruginosa* ($A_{570} = 1,277$) byla vyhodnocena jako silně pozitivní (+++). U případných polymikrobiálních biofilmů – *S. aureus* a *M. luteus* ($A_{570} = 2,757$), *M. luteus* v kombinaci s *P. aeruginosa* ($A_{570} = 2,880$) a 3 typy bakterií ($A_{570} = 1,841$) byl biofilm taktéž hodnocen jako silně pozitivní (+++). Blank ($A_{570} = 0,057$) podle předpokladů netvořil žádný biofilm (0).

Tabulka 3 obsahuje přehled pro schopnost tvorby biofilmu.

Tabulka 3 Testované bakterie a jejich schopnost tvořit biofilm

Bakterie	Biofilm – kultivace v TSB
Blank	0
SA	+++
ML	+++
PA	+++
SA+ ML	+++

Bakterie	Biofilm – kultivace v TSB
PA + ML	+++
PA+ ML+SA	+++

Pozn.: 0 žádný biofilm, + slabý biofilm, ++ mírný biofilm, +++ silný biofilm

6 DISKUZE

Na model kožního mikrobiomu byla zvolená buněčná linie imortalizovaných lidských keratinocytů HaCaT, které se běžně podílejí na stavbě epidermis. Hojně se využívají jako modely ke studiu mechanismů kůže [102]. Jako komenzál byla zvolena bakterie *M. luteus* z toho důvodu, že se vyskytuje na kůži ve velkém množství a pomáhá k udržení kožní homeostázi. Za patogenní bakterie byly vybrány *S. aureus* a *P. aeruginosa*, jelikož se nejčastěji vyskytují při dysbióze, kožních onemocněních a společně kolonizují kožní rány [3].

Prvním důležitým krokem bylo zjistit, jestli zvolené bakterie jsou schopné tvorby biofilmu. To je důležitou charakteristikou, jelikož chrání tyto mikroorganismy před vnějšími poruchami, umožňují mikrobiální komunikaci a rozklad živin, což napomáhá jisté mikrobiální sukcesi a vývoji. Taková mikrobiální kolonizace prospěšnými bakteriemi může sama o sobě mít ochrannou funkci, a právě schopnost bakterií tvořit biofilmy má význam pro ochranu před infekcemi. Ochrana poskytovaná původní mikroflórou je jistou odolností vůči patogenní kolonizaci a je tak významným kožním obranným mechanismem, který brání proti exogenním bakteriím a houbám. Typickým příkladem může být zmiňovaný *S. epidermidis* se schopností tvořit biofilm spojivkové a obličejové kožní mikroflóry [103] [104].

Testované bakterie a jejich kombinace tvořily silně-pozitivní biofilm, avšak tato detekce proběhla pouze u bakterií kultivovaných na mikrotitrační destičce bez keratinocytů. Vše sloužilo k potvrzení faktu, že bakterie aplikované modelu kožního mikrobiomu mohou tvořit biofilm, být součástí kožní mikroflóry a ovlivnit její kondici.

U samotného modelu měla být výsledkem monovrstva HaCaT s polybakteriálním filmem, která by udržela integritu buněk i monovrstvy. Monovrstvu se podařilo udržet pouze u reference, v ostatních případech nešlo o perfektní monovrstvu, nicméně i přesto byly viditelné jak pozitivní, tak negativní změny eukaryotní buňky.

Pozitivní výsledek je vidět především u kombinace tří bakterií, kdy dva patogenní mikroorganismy nezpůsobily odumření keratinocytů, přestože jedním z nich byla agresivní bakterie *P. aeruginosa*. Důvodem může být složitý vztah mezi těmito patogeny, který je stále předmětem zkoumání. Jedním z poznatků je, že *P. aeruginosa* soutěží se *S. aureus* o místo a zdroj živin. Produkuje molekuly, které ovlivňují růst *S. aureus*, například jistá látka pyocyanin inhibuje oxidační dýchání *S. aureus*, nebo proteáza LasA zase dokáže buňku

S. aureus rozložit [105]. Kvůli této kompetitivní vlastnosti teoreticky mohla být monovrstva keratinocytů chráněna do té doby, než si patogen *P. aeruginosa* zabezpečil ideální podmínky pro existenci, a než se začal soustředit na další buňky – keratinocyty.

Podle obdobně provedeného experimentu, kdy na vrstvu HaCaT byly také nasazeny suspenze patogenů *S. aureus* a *P. aeruginosa*, avšak bez přítomnosti komenzální bakterie, bylo sledováno porušení celistvosti vrstvy. Buňky keratinocytů nezaujímaly polygonální tvar a celkově se lišily od reference [3]. Tím se rozpadá teorie o rivalitě mezi dvěma patogenními bakteriemi a dává prostor teorii, která pojednává o ochraně keratinocytů pomocí komenzálu *M. luteus*.

Kladně vyšla i kombinace *S. aureus* a *M. luteus*, kdy nebyly pozorovatelné žádné signifikantní změny na monovrstvě HaCaT. Důvodem mohl být fakt, že *S. aureus* nezpůsobuje infekci u zdravé kůže, ale pouze pokud dojde k narušení kožní bariéry nebo rovnováhy mikrobiomu [106]. Mohlo by se tedy předpokládat, že zdravé keratinocyty simulovaly zdravou kůži, tudíž nedošlo k výraznému poškození buněk. Mnohem zásadnější je však zjištění, že *M. luteus* silně inhibuje růst *S. aureus* [60]. Podobný efekt zaznamenaly vědci z Nottinghamu, kteří kombinovali *S. aureus* s dvěma komenzálními bakteriemi – *S. epidermis* a *M. luteus*. Buňky HaCaT udržely polygonální tvar, svoji integritu monovrstvy a celkově rozdíl od reference nebyl markantní [3].

Tento model je tedy vhodný ke sledování změn na keratinocytech, jejich podpory růstu a proliferace. Model by mohl sloužit i k testování látek podporující mikrobiom kůže. Podle morfologických vlastností keratinocytů můžeme určit, zdali došlo k podpoře komenzální nebo patogenní strany. Výhodou tohoto modelu je, že není příliš náročný na jeho provedení, lze jej snadno upravit například přidáním dalších komenzálních nebo patogenních mikroorganismů, nebo zvolit úplně jiné bakteriální druhy.

Mezi negativa *in vitro* modelu mikrobiomu kůže patří, že se nepočítá s aktivním imunitním systémem člověka, který je důležitou součástí této biologické bariéry. Model tedy může jen omezeně nahradit situaci *in vivo*. Nicméně i tak je klíčový pro studium mechanismů mezibuněčných interakcí [3].

ZÁVĚR

Mikrobiom kůže je dynamický systém, jehož fungování ovlivňuje řada vnějších i vnitřních vlivů. Slouží jako biologická bariéra kůže, která pomáhá stimulovat tvorbu antimikrobiálních peptidů. Tyto peptidy jsou produkovány především v keratinocytech a slouží jako ochrana před infekcí. Jestliže je mikrobiální vrstva narušená, dochází k porušení funkce kožní bariéry, které s sebou nese řadu kožních onemocnění.

Ačkoliv je udržení zdravé pokožky komplexní záležitostí, jednou z možností, jak toho docílit, je udržet mikrobiom v rovnováze. To ovšem není jednoduché, proto je zapotřebí poznat interakce mezi bakteriemi a mezi bakteriemi s kožními buňkami. Proto cílem bakalářské práce bylo vytvořit jednoduchý model kožního mikrobiomu v laboratorních podmínkách.

Kultivací kožních keratinocytů HaCaT byla vytvořena monovrstva buněk, na kterou byly nasazeny suspenze bakterií v různých kombinacích. Nejdůležitější byla kombinace dvou patogenních bakterií a jedné komenzální bakterie. Tato kombinace měla simulovat jednoduchý kožní mikrobiom. Fluorescenčním mikroskopem byly sledované mikroorganismy usazené na buněčné stěně keratinocytů a také jejich morfologické změny. Experiment ukázal, že je možno model mikrobiomu vytvořit *in vitro*, a že komenzální bakterie jsou schopné ochránit kožní buňky před destruktivními vlastnostmi patogenních mikrobů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *The Microbiome* [online]. Boston: Harvard T.H. Chan School of Public Health [cit. 2023-03-26].
- [2] SONNENBURG, Justin a Erica SONNENBURG. *Zdravá střeva: poznejte tajemství mikrobioty a získejte dlouhodobou kontrolu nad svou váhou, náladou a zdravím*. V Brně: Jan Melvil Publishing, 2016. ISBN 978-80-7555-999-9.
- [3] JORDANA-LLUCH, Elena, Vanina GARCIA, Alexander KINGDON, Nishant SINGH, Cameron ALEXANDER, Paul WILLIAMS a Kim HARDIE. A Simple Polymicrobial Biofilm Keratinocyte Colonization Model for Exploring Interactions Between Commensals, Pathogens and Antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, 11 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.00291
- [4] THOMAS LUGER, ect.l. Journal of Dermatological Science. *Science Direct*. 2021. Dostupné také z: https://www-sciencedirect-com.translate.google/science/article/abs/pii/S0923181121000840?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=wapp
- [5] PROF., MUDr. *Anatomie 3*. Grada, 2016.
- [6] PROF. MUDR. IVAN DYLEVSKÝ, DrSC. *Funkční anatomie*. Grada, 2009.
- [7] BLISS, Don. *Skin Anatomy* [online]. In: . [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=4604>
- [8] BRABCOVÁ, Ing.Bc.Soňa. *Péče o rány*. Praha 7: Grada Publishing, a.s., 2021. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=KWFsEAAAQBAJ&pg=PT7&dq=Lidsk%C3%A1+poko%C5%Beka&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwi8pLe7xrf6AhUZjaQKHdv3ABAQ6AF6BAgKEAI#v=onepage&q=Lidsk%C3%A1%20poko%C5%Beka&f=false>
- [9] YOUSEF, Hani, Mandy ALHAJJ a Sandeep SHARMA. *Anatomy, Skin (integument), Epidermis* [online]. 2022 [cit. 2023-04-23].
- [10] BOUWSTRA, Joke. *Sciencedirect*. 2006. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273606002410>
- [11] GOLARA HONARI, Howard. *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects*. Academic Press, 2014.
- [12] PROF. EMER. MUDR. JIŘÍ ZÁHEJSKÝ, DrSC. Role ceramidů v bariérové funkci kůže, jejich význam ve vývoji kožních onemocnění a jejich terapii. *Www.dermatologiepropraxi.cz*. 2013. Dostupné také z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2013/04/06.pdf>
- [13] *Jak kůže funguje - Struktura a funkce kůže* [online]. [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>
- [14] *National Library of Medicine*. 2021. Dostupné také z: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.translate.google/books/NBK535346/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=wapp
- [15] ELIÁŠ, MUDr. PubMed Central. *Skin Barrier Function*. 2010. Dostupné také z: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.translate.google/pmc/articles/PMC2843412/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=sc

- [16] KOLEKTIV, James. Understanding the Epidermal Barrier in Healthy and Compromised Skin: Clinically Relevant Information for the Dermatology Practitioner. *PubMed Central*. 2016. Dostupné také z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/translate/google/pmc/articles/PMC5608132/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=sc
- [17] PLZÁKOVÁ, Z. Vývoj kůže a její bariérové vlastnosti. *Česko-slovenská Dermatologie* [online]. Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice, Praha, (4) [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2021-4-11/vyvoj-kuze-a-jeji-barierova-funkce-128289>
- [18] *Microbiome* [online]. Durham, Severní Karolína, USA: National Institute of Environmental Health Sciences, 2020 [cit. 2023-03-25]. Dostupné z: https://www-niehs.nih.gov/translate/google/health/topics/science/microbiome/index.cfm?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=wapp
- [19] CHEN, Y., Michael FISCHBACH a Yasmine BELKAID. Skin microbiota–host interactions. *Nature* [online]. 2018, **553**(7689), 427–436 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature25177
- [20] LEE, Hyun-Ji a Miri KIM. Skin Barrier Function and the Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(21) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232113071
- [21] ČEŘOVKÝ, Václav. Antimikrobiální peptidy: staré molekuly, nové ideje. *Akademický bulletin*. 2012. Dostupné také z: <http://abicko.avcr.cz/2012/09/05/>
- [22] BARONI, Adone, Elisabetta BUOMMINO, Vincenza DE GREGORIO, Eleonora RUOCCO, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology* [online]. 2012, **30**(3), 257–262 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
- [23] AL., Gabrieel. *National Library of Medicine*. 2017. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5551541/>
- [24] *Národní zdravotnický informační*. Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2496>
- [25] EISENSTEIN, Michael. *Nature. The skin microbiome*. 2020. Dostupné také z: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-03523-7>
- [26] *NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body: Genome sequencing creates first reference data for microbes living with healthy adults*. [online]. [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-human-microbiome-project-defines-normal-bacterial-makeup-body>
- [27] GILBERT SMIT, etc. Oxford Academics. *Human Follicular Mites: Ectoparasites Becoming Symbionts*. 2022. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/mbe/article/39/6/msac125/6604544>
- [28] "commensalism" [online]. [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/commensalism>
- [29] *Patogen* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Národní zdravotnický informační portál [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/1116>

- [30] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. 1. vydání. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-808-6960-234.
- [31] PAULA, Simpson. *Užitečné bakterie pro zdravou pokožku*. Grada Publishing, a.s., 2022.
- [32] LEONA BUŇKOVÁ, Magda. *Obecná mikrobiologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010.
- [33] SKOWRON, Krzysztof, . *Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota*. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7998121/?fbclid=IwAR0bGBY1USb5m1usXIMft8ueRP7ByRJgqQKkYXqxONCD3HVtMV59hmm168Q>
- [34] ALLYSON L. BYRD, Yasmine. The Human Skin Microbiome. *Nature reviews microbiology*. 2018. Dostupné také z: https://www-nature-com.translate.goog/articles/nrmicro.2017.157?error=cookies_not_supported&code=83900e9b-0054-4ec2-88eb-344f95f5d8bd&_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=op,sc
- [35] JUSTIN SONNENBURG, Erica. *Zdravá střeva*. Jan Mevil, 2015.
- [36] KIMBERLY A CAPONE, Scot. Diversity of the Human Skin Microbiome Early in Life. In: *PMC PubMed Central*. 2011. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182836/>
- [37] *National Institute of Environmental Health Science*. Dostupné také z: https://www-niehs-nih-gov.translate.goog/health/topics/science/microbiome/index.cfm?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=wapp
- [38] LI, Zichao, Xiaozhi BAI, Tingwei PENG et al. New Insights Into the Skin Microbial Communities and Skin Aging. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, **11** [cit. 2023-03-25]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.565549
- [39] SKOWRON, Krzysztof, Justyna BAUZA-KASZEWSKA, Zuzanna KRASZEWSKA et al. Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2023-03-23]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030543
- [40] YING, Shi, Dan-Ning ZENG, Liang CHI et al. The Influence of Age and Gender on Skin-Associated Microbial Communities in Urban and Rural Human Populations. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(10) [cit. 2023-03-25]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0141842
- [41] EHLERS, C., U. IVENS, M. MØLLER, T. SENDEROVITZ a J. SERUP. Females have lower skin surface pH than men. *Skin Research and Technology* [online]. 2001, **7**(2), 90-94 [cit. 2023-03-25]. ISSN 0909752X. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0846.2001.70206.x
- [42] WALTERS, Kendra, Jennifer MARTINY a João NABOUT. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(9) [cit. 2023-03-25]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0233872
- [43] BOXBERGER, Manon, Valérie CENIZO, Nadim CASSIR a Bernard LA SCOLA. *Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome* [online]. (125) [cit. 2023-03-25]. Dostupné z: https://microbiomejournal-biomedcentral-com.translate.goog/articles/10.1186/s40168-021-01062-5?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=sc#citeas

- [44] PEREZ PEREZ, Guillermo, Zhan GAO, Roland JOURDAIN et al. Body Site Is a More Determinant Factor than Human Population Diversity in the Healthy Skin Microbiome. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(4) [cit. 2023-03-25]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0151990
- [45] LEUNG, Marcus, Xinzhao TONG, David WILKINS, Hedwig CHEUNG a Patrick LEE. Individual and household attributes influence the dynamics of the personal skin microbiota and its association network. *Microbiome* [online]. 2018, **6**(1) [cit. 2023-03-25]. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-018-0412-9
- [46] STAUDINGER, T., A. PIPAL a B. REDL. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2011, **110**(6), 1381-1389 [cit. 2023-03-25]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04991.x
- [47] WANG, Qian, Shumei CUI, Li ZHOU, Keke HE, Liya SONG, Haiyan LIANG a Congfen HE. Effect of cosmetic chemical preservatives on resident flora isolated from healthy facial skin. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2019, **18**(2), 652-658 [cit. 2023-03-25]. ISSN 1473-2130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12822
- [48] HWANG, Bo, Sado LEE, Joonoh MYOUNG, Seung HWANG, Jun LIM, Eui JEONG, Sun PARK a Sung YOUN. Effect of the skincare product on facial skin microbial structure and biophysical parameters: A pilot study. *MicrobiologyOpen* [online]. 2021, **10**(5) [cit. 2023-03-25]. ISSN 2045-8827. Dostupné z: doi:10.1002/mbo3.1236
- [49] SKOWRON, Krzysztof, Justyna BAUZA-KASZEWSKA, Zuzanna KRASZEWSKA et al. Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2023-03-25]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030543
- [50] PATRA, VijayKumar, Scott BYRNE a Peter WOLF. The Skin Microbiome: Is It Affected by UV-induced Immune Suppression?. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [cit. 2023-03-25]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01235
- [51] ZHANG, Meiling, Ziwei JIANG, Dongqing LI, Deming JIANG, Yelin WU, Hongyan REN, Hua PENG a Yuping LAI. Oral Antibiotic Treatment Induces Skin Microbiota Dysbiosis and Influences Wound Healing. *Microbial Ecology* [online]. 2015, **69**(2), 415-421 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-014-0504-4
- [52] PATIL, Ekta, Bhakti RAWTAL a Satish SAKHARWADE. *MAGICAL APPROACH OF PROBIOTICS IN COSMETIC* [online]. Department of Cosmetic Technology, LAD & Smt.R.P College for Women, Seminary Hills, Nagpur, Maharashtra, India, 2020, (11) [cit. 2023-04-23]. ISSN 2277– 7105. Dostupné z: doi:10.20959/wjpr202011-18670
- [53] DUCHOŇOVÁ, Michaela. *Mikrobiom Kůže a jeho význam při atopii* [online]. In: . [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <https://www.pravdyoatopii.cz/clanek/130-mikrobiom-kuze-a-jeho-vyznam-pri-ekzemu>
- [54] GLATZ, Martin, Philipp BOSSHARD, Wolfram HOETZENECKER a Peter SCHMID-GRENDELMEIER. The Role of *Malassezia* spp. in Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2015, **4**(6), 1217-1228 [cit. 2023-04-23]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm4061217

- [55] GRICE, Elizabeth a Julia SEGRE. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2011, **9**(4), 244-253 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2537
- [56] SOUAK, Djouhar, Magalie BARREAU, Aurélie COURTOIS, Valérie ANDRÉ, Cécile DUCLAIROIR POC, Marc FEUILLOLEY a Manon GAULT. Challenging Cosmetic Innovation: The Skin Microbiota and Probiotics Protect the Skin from UV-Induced Damage. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(5) [cit. 2023-04-23]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050936
- [57] ZHENG, Yue, Rachele HUNT, Amer VILLARUZ et al. *Commensal Staphylococcus epidermidis contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides* [online]. 2022, **30**(3), 301-3139 [cit. 2023-03-31]. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2022.01.004
- [58] TERUAKI NAKATSUJI PHD, Richard. 2018. Dostupné také z: [https://www.annallergy.org/article/S1081-1206\(18\)31503-5/fulltext](https://www.annallergy.org/article/S1081-1206(18)31503-5/fulltext)
- [59] KHAYYIRA, Amalia, Aulia ROSDINA, Marina IRIANTI a Amarila MALIK. Simultaneous profiling and cultivation of the skin microbiome of healthy young adult skin for the development of therapeutic agents. *Heliyon* [online]. 2020, **6**(4) [cit. 2023-03-31]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03700
- [60] JAIN, Rohit, Abigail VOSS, John TAGG a John HALE. Evaluation of the Preliminary Safety, Tolerability and Colonisation Efficacy of Topical Probiotic Formulations Containing *Micrococcus luteus* Q24 in Healthy Human Adults. *Cosmetics* [online]. 2022, **9**(6) [cit. 2023-03-31]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics9060121
- [61] MCLAUGHLIN, Joseph, Steven WATTERSON, Alison LAYTON, Anthony BJORSON, Emma BARNARD a Andrew MCDOWELL. Propionibacterium acnes and Acne Vulgaris: New Insights from the Integration of Population Genetic, Multi-Omic, Biochemical and Host-Microbe Studies. *Microorganisms* [online]. 2019, **7**(5) [cit. 2023-04-30]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7050128
- [62] KANWAL, Sidrah a Pradeep VAITLA. *Streptococcus Pyogenes* [online]. StatPearls Publishing LLC, 2022 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554528/>
- [63] HOWDEN, Benjamin, Stefano GIULIERI, Tania WONG FOK LUNG et al. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology* [online]. [cit. 2023-04-29]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-023-00852-y
- [64] "staphylococcus". In: *Britannica* [online]. [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Staphylococcus>
- [65] WILSON, Mina a Shivlal PANDEY. *Pseudomonas Aeruginosa* [online]. StatPearls [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>
- [66] Dostupné také z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2014/02/08.pdf>
- [67] Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2496>
- [68] ČT24. Dostupné také z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/veda/3308725-nelecitelna-kozni-nemoc-trapi-kazdeho-steho-cloveka-vedci-ted-prisli-na-ze-souvisi-se>
- [69] *Velký lékařský slovník*. Dostupné také z: <https://lekarske.slovníky.cz/pojem/etiopatogeneze>

- [70] NAKATSUJI, Teruaki a Richard GALLO. *The role of the skin microbiome in atopic dermatitis* [online]. Department of Dermatology, University of California, San Diego, La Jolla, CA, 2018 [cit. 2023-03-24]. 10.1016/j.anai.2018.12.003. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7147826/>
- [71] RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, MUDr. Lucie. *Akné a atopická dermatitida v ordinaci pediatra* [online]. [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: Akné a atopická dermatitida v ordinaci pediatra
- [72] MUDR. MICHAELA DUCHOŇOVÁ, PhD. *Bioderma*. 2020. Dostupné také z: <https://www.pravdyoatopii.cz/clanek/130-mikrobiom-kuze-a-jeho-vyznam-pri-ekzemu>
- [73] NINA N. SCHOMMER, Richard. PMC PubMed Central. *Structure and function of the human skin microbiome*. 2013. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744460/>
- [74] SANDILANDSOVÁ, Aileen. *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease*. 2009. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19386895/>
- [75] S. MARSHALL, Jean, WATSON a Richard L. KIM. *An introduction to immunology and immunopathology.: Allergy Asthma Clin Immuno* [online]. (49) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1710-1492. 1710-1492. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- [76] *Dendritická buňka v imunitě: Její role při regulaci imunitní reakce* [online]. Vesmír, 2003, [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2003/cislo-4/dendriticka-bunka-imunite.html>
- [77] SADEGHALVAD, Mona, Hamid-Reza MOHAMMADI-MOTLAGH a Nima REZAEI. *Structure and Function of the Immune System* [online]. 2022 [cit. 2023-03-27]. ISBN 9780323903035. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187319001932>
- [78] FELLNEROVÁ, I. a A. FELLNEROVÁ. *T lymfocyty a látková imunita* [online]. In: . PřF UPOL [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie_pdf/6_T_lymfocyty_a_b_unečna_imunita_2015_11_text.pdf
- [79] NICHOLSON, Lindsay B. The immune system. *Essays in Biochemistry* [online]. 2016, 60(3), 275-301 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20160017
- [80] EISENSTEIN, Michael. The skin microbiome and its relationship with the human body explained. *Nature* [online]. 2020, 588(7838), 210-211 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/d41586-020-03524-6
- [81] C. SCHARSCHMIDT, Tiffany , Kimberly S. VASQUEZ a Hong-An TRUONG. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Sciencedirect* [online]. 2016, (5) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.016>
- [82] The skin microbiome and its relationship with the human body explained. *Nature* [online]. [cit. 2023-03-27]. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/d41586-020-03524-6
- [83] EMMERT, Hila, Franziska RADEMACHER, Regine GLÄSER a Jürgen HARDER. Skin microbiota analysis in human 3D skin models—“Free your mice”.

- Experimental Dermatology* [online]. 2020, **29**(11), 1133-1139 [cit. 2023-04-27]. ISSN 0906-6705. Dostupné z: doi:10.1111/exd.14164
- [84] WANG, Hao, Anant AGRAWAL, Yi WANG et al. An ex vivo model of medical device-mediated bacterial skin translocation. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2023-05-01]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-84826-1
- [85] CHIANG, HI, SB JIANG, K ZENGLER, T NAKATSUJI, RL GALLO a H NAGARAJAN. *The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin* [online]. Nature Communications, 2013 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2441
- [86] GAO, Zhan, Chi-hong TSENG, Zhiheng PEI a Martin BLASER. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(8), 2927-2932 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0607077104
- [87] WEI, Zhengxi, Xue LIU, Masato OOKA et al. Two-Dimensional Cellular and Three-Dimensional Bio-Printed Skin Models to Screen Topical-Use Compounds for Irritation Potential. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, **8** [cit. 2023-05-01]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00109
- [88] KAPAŁCZYŃSKA, Marta, Tomasz KOLENDA, Weronika PRZYBYŁA et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* [online]. [cit. 2023-05-01]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.63743
- [89] THOMAS, Torsten, Jack GILBERT a Folker MEYER. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation* [online]. 2012, **2**(1) [cit. 2023-05-07]. ISSN 2042-5783. Dostupné z: doi:10.1186/2042-5783-2-3
- [90] SANDERSON, Michael, Ian SMITH, Ian PARKER a Martin BOOTMAN. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014, **2014**(10) [cit. 2023-05-07]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795
- [91] KARDNER, Robert. *Britanica.com*. 2022. Dostupné také z: <https://www.britannica.com/science/bacteria>
- [92] ANJALI, Singh. *Conduct Sciencec*. 2022. Dostupné také z: <https://conductscience.com/bacterial-growth/>
- [93] MGR. JANA KOPECKÁ, Ph.D., *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. Dostupné také z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html#soul
- [94] STEHLÍK, Marek. *Růstová křivka* [online]. In: . [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pics/?lang=en
- [95] STEVENSON, Keiran, Alexander MCVEY, Ivan CLARK, Peter SWAIN a Teuta PILIZOTA. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2023-05-07]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep38828
- [96] *Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation* [online]. [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>

- [97] GHASEMI, Mahshid, Tyron TURNBULL, Sonia SEBASTIAN a Ivan KEMPSON. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(23) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312827
- [98] SHRESTHA, Ashma. *McFarland Densitometer: Parts, Principle, and Operation* [online]. Lab Equipment [cit. 2023-04-24]. Dostupné z: https://microbeonline.com/mcfarland-densitometer-parts-principle-and-operation/?utm_content=cmp-true
- [99] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Kompendium statistického zpracování dat*. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-802-4621-968.
- [100] KIRMUSAOĞLU, Sahra. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* [online]. IntechOpen, 2019 [cit. 2023-03-30]. ISBN 978-1-78985-789-4. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.84411
- [101] BROWN, Morgan, Alexander HORSWILL a Kimberly KLINE. Staphylococcus epidermidis—Skin friend or foe?. *PLOS Pathogens* [online]. 2020, **16**(11) [cit. 2023-04-22]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1009026
- [102] WILSON, Van G. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. *Epidermal Cells* [online]. New York, NY: Springer New York, 2014, 33-41 [cit. 2023-04-22]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-1223-0. Dostupné z: doi:10.1007/7651_2013_42
- [103] BRANDWEIN, Michael, Doron STEINBERG a Shiri MESHNER. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *Npj Biofilms and Microbiomes* [online]. 2016, **2**(1) [cit. 2023-05-07]. ISSN 2055-5008. Dostupné z: doi:10.1038/s41522-016-0004-z
- [104] PERCIVAL, Steven, Charlotte EMANUEL, Keith CUTTING a David WILLIAMS. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International Wound Journal* [online]. 2012, **9**(1), 14-32 [cit. 2023-05-07]. ISSN 17424801. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-481X.2011.00836.x
- [105] YUNG, Deborah, Kathleen SIRCOMBE a Daniel PLETZER. Friends or enemies? The complicated relationship between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* [online]. 2021, **116**(1), 1-15 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.14699
- [106] TAYLOR, Tracey a Chandrashekhar UNAKAL. *Staphylococcus aureus* [online]. Oaklandská univerzita [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov.translate.google/books/NBK441868/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=sc

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMP	antimikrobiální peptidy
DMSO	dimethylsulfoxid
MTT	(3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
NMF	přírodní zvlhčující faktor kůže – Natural Moisturizing Factor
OD	optická densita
ODc	mezní hodnota optické density
SC	<i>stratum corneum</i>
TEWL	transepidermální ztráta vody
TSA	trypton-sójová agar
TSB	trypton-sójový bujón
UPW	ultračistá voda – Ultrapure Water

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Schéma řezu surovou kůží. Upraveno [7]</i>	10
<i>Obrázek 2 Vrstvy epidermis. Převzato [13]</i>	12
<i>Obrázek 3 Kožní bariéra a její funkce podle vrstvy. Převzato [17]</i>	13
<i>Obrázek 4 Vnitřní a vnější vlivy, které se podílejí na složení mikrobioty. Upraveno [39]</i> ..	18
<i>Obrázek 5 Rozdělení mikroorganismů kolonizující kůži. Převzato [52]</i>	18
<i>Obrázek 6 Zastoupení mikroorganismu na zdravé kůži. Převzato [53]</i>	19
<i>Obrázek 7 Souvislost mezi kožní bariérou, dysbiózou mikrobiomu a zánětlivou odpovědí</i>	21
<i>Obrázek 8 Komunikace mikrobioty a T-lymfocytů. Převzato [80]</i>	23
<i>Obrázek 9 Komunikace bakterií s imunitním systémem. Převzato [82]</i>	24
<i>Obrázek 10 Buňky HaCaT, zvětšeno 40x</i>	28
<i>Obrázek 11 Použité bakteriální kolonie – M. luteus, P. aeruginosa, E. coli, S. aureus</i>	29
<i>Obrázek 12 Růstová bakteriální křivka. Převzato [94]</i>	32
<i>Obrázek 13 Buňky HaCaT a bakteriální suspenze</i>	34
<i>Obrázek 14 Reference buněk HaCaT a mikrobiom po bezprostřední aplikaci MTT</i>	36
<i>Obrázek 15 Reference buněk HaCaT a mikrobiom po 4h inkubaci MTT</i>	36
<i>Obrázek 16 Blank a bakteriální suspenze pro vyhodnocení MTT testu</i>	37
<i>Obrázek 17 Růstové křivky bakterií</i>	39
<i>Obrázek 18 Viabilita buněk HaCaT s mikroorganismy</i>	40
<i>Obrázek 19 Reference – monovrstva buněk HaCaT</i>	41
<i>Obrázek 20 Buňky HaCaT s komenzálem M. luteus</i>	42
<i>Obrázek 21 Buňky HaCaT s patogenem S. aureus</i>	42
<i>Obrázek 22 Buňky HaCaT s patogenem P. aeruginosa</i>	43
<i>Obrázek 23 Buňky HaCaT s komenzálem M. luteus a patogenem P. aeruginosa</i>	44
<i>Obrázek 24 Buňky HaCaT s komenzálem M. luteus a patogenem S. aureus</i>	44
<i>Obrázek 25 Buňky HaCaT s komenzálem M. luteus a patogeny S. aureus a P. aeruginosa</i>	45

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 Pipetované objemy do 96jamkové destičky.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 2 Vyhodnocení biofilmu u bakterií.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 3 Testované bakterie a jejich schopnost tvořit biofilm</i>	<i>45</i>

