

Polymikrobiální interakce a adheze ke keratinocytům v konkurenci kožního mikrobiomu

Veronika Holá

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Veronika Holá
Osobní číslo:	T22943
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Polymikrobiální interakce a adheze ke keratinocytům v konkurenci kožního mikrobiomu

Zásady pro vypracování

Bakalářská práce se zaměří na studium mikrobiomu lidské kůže, který hraje významnou roli ve fyziologii kůže a představuje potenciální cíl pro terapeutické a kosmetické aplikace.

Hlavním cílem je rozšíření studia polymikrobiálních interakcí a napodobení fyziologických podmínek kůže včetně *in vitro* modelu kožní tkáně, využívajícího snadno dostupné a dobře charakterizované buněčné linie keratinocytů a fibroblastů.

V praktické části si poté studentka osvojí základní techniky laboratoře mikrobiologie a buněčné biologie se zaměřením na vývoj *in vitro* modelu, který přispěje k lepšímu porozumění mikrobiálních interakcí na povrchu kůže.

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

Seznam doporučené literatury:

1. ALBERTS, B., *et al.* *Molecular Biology of the Cell. Sixth Edition*. 2014, W. W. Norton & Company. ISBN: 978-0-8153-4464-3.
2. Belkum, V. A., Lisotto, P., Pirovano, W., Mongiat, S., Zorgani, A., Gempeler, M., Bongoni, R. and E. Klaassens. Being Friendly to the Skin Microbiome: Experimental Assessment. *Frontiers in Microbiomes* 2023, vol. 1. doi: <https://doi.org/10.3389/frmbi.2022.1077151>.
3. Lizardo, M., Magalhães, R.M., Tavarí, F.K. Probiotic Adhesion to Skin Keratinocytes and Underlying Mechanisms. *Biology (Basel)* 2022, vol. 11, no. 9, p. 1372. doi: 10.3390/biology11091372.
4. Boxberger, M., Cenizo, V., Cassir, N. and B. La Scola. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome* 2021, vol. 9, no. 125. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01062-5>.
5. Flowers, L., Grice, E.A. The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. *Cell Host & Microbe* 2020, vol. 28, no 2, p. 190-200. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.017.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kristýna Valášková**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- 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 mohu užít 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(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Veronika Holá

.....
podpis autorky

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na interakce vybraných bakterií kožního mikrobiomu a jejich adhezi ke keratinocytům, přičemž klade důraz na vliv *Pseudomonas aeruginosa* na chování a přilnavost *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*. Pomocí buněčné linie HaCaT byly provedeny *in vitro* testy hodnotící životaschopnost, proliferaci, adhezi a migraci keratinocytů v monokulturách a ko-kulturách s bakteriálními kmeny a jejich supernatanty.

Získané poznatky v této bakalářské práci mohou přispět k hlubšímu porozumění mikrobiálním interakcím na povrchu kůže a mohou být využity při vývoji terapeutických strategií zaměřených na modulaci kožního mikrobiomu a prevenci kolonizace patogenními mikroorganismy.

Klíčová slova: bakteriální adheze, keratinocyty, *Pseudomonas aeruginosa*, polymikrobiální interakce, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, hojení ran, kožní mikrobiom

ABSTRACT

This bachelor thesis investigates the interactions between selected skin microbiota bacteria and their adhesion to human keratinocytes, focusing particularly on the influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the adhesion and behavior of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Micrococcus luteus*. Using the HaCaT keratinocyte line, a series of *in vitro* assays were conducted to evaluate cell viability, proliferation, adhesion, and wound healing in mono- and co-culture settings with bacterial strains and their supernatants.

The findings obtained in this bachelor thesis may contribute to a deeper understanding of microbial interactions on the skin surface and may be used in the development of therapeutic strategies aimed at modulating the skin microbiome and preventing colonization by pathogenic microorganisms.

Keywords: bacterial adhesion, keratinocytes, *Pseudomonas aeruginosa*, polymicrobial interaction, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, wound healing, skin microbiome

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Kristýně Valáškové, za ochotu a pomoc při vypracovávání jak praktické, tak teoretické části práce, bez níž bych se neobešla. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia plně podporovala a pomohla mi dojít až ke zdárnému konci.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KŮŽE	13
1.1 STRUKTURA KŮŽE.....	14
1.1.1 EPIDERMIS (POKOŽKA).....	14
1.1.2 DERMIS (ŠKÁRA)	15
1.1.3 SUBCUTIS (PODKOŽÍ)	15
1.2 KERATINOCYTY	16
1.2.1 STRUKTURA A FUNKCE KERATINOCYTŮ.....	17
1.2.2 PROCES KERATINIZACE.....	18
2 KOŽNÍ MIKROBIOM.....	20
2.1 VÝZNAM KOŽNÍHO MIKROBIOMU	20
2.2 TYPY MIKROORGANISMŮ A JEJICH ROZLOŽENÍ NA KŮŽI	21
2.2.1 KOMENZÁLNÍ DRUHY	22
2.2.2 PATOGENNÍ DRUHY.....	23
2.3 POLYMIKROBIÁLNÍ INTERAKCE	23
2.4 ROLE REZISTENTNÍCH MIKROORGANISMŮ V PREVENCI PATOGENNÍ KOLONIZACE.....	24
3 MECHANISMY ADHEZE MIKROORGANISMŮ KE KERATINOCYTŮM.....	26
3.1 ROLE KERATINOCYTŮ V HOSTITELSKÉ ODPOVĚDI	26
3.2 ADHEZE MIKROORGANISMŮ KE KERATINOCYTŮM	26
3.3 VLIV FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK NA ADHEZI.....	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
4 CÍLE PRÁCE	31
5 MATERIÁL A METODY	32
5.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	32
5.1.1 BUNĚČNÁ LINIE HaCAT	32
5.1.2 BAKTERIÁLNÍ KMENY	33
5.2 POUŽITÉ SOUPRAVY, CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	34
5.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ.....	35
5.4 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY	36
5.4.1 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍCH SUPERNATANTŮ.....	36
5.4.2 TESTOVÁNÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI POMOCÍ TRYPANOVÉ MODŘE	36
5.4.3 PROLIFERAČNÍ TEST KERATINOCYTŮ	37

5.4.4	PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK PRO KO-KULTURU <i>IN VITRO</i> S BUNĚČNOU LINÍÍ HACAT	38
5.4.5	STUDIUM BAKTERIÁLNÍ ADHEZE NA POVRCH KERATINOCYTŮ	39
5.4.6	SCRATCH WOUND HEALING ASSAY	39
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
6.1.1	TESTOVÁNÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK POMOCÍ TRYPANOVÉ MODŘE	41
6.1.2	PROLIFERAČNÍ TEST KERATINOCYTŮ	43
6.1.3	HODNOCENÍ ADHEZE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK NA KERATINOCYTY	46
6.1.4	SCRATCH WOUND HEALING ASSAY	48
	ZÁVĚR.....	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
	SEZNAM TABULEK.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	67

ÚVOD

Lidská kůže, největší orgán našeho těla, plní klíčovou roli v ochraně organismu před vnějšími vlivy, v metabolismu vody a termoregulaci. Vedle těchto známých funkcí se kůže stává cílem intenzivního výzkumu díky svému mikrobiomu, který tvoří komplexní ekosystém mikroorganismů, zahrnující bakterie, houby a viry. Tento mikrobiom se podílí na udržování kožní homeostázy, ochraně před patogeny a ovlivňuje imunitní reakce těla [1].

Tato bakalářská práce nabízí teoretický přehled o struktuře kůže, jejích základních funkcích a roli keratinocytů. Dále se zaměřuje na význam a složení kožního mikrobiomu, mechanismy adheze mikroorganismů a vliv fyziologických podmínek na tento proces. Praktická část se soustředí na experimentální metody pro studium interakcí mezi keratinocyty a mikroorganismy za různých podmínek, včetně testování životaschopnosti buněk, proliferačních testů a analýzy hojení ran. Cílem této práce je zkoumat polymikrobiální interakce a jejich vliv na adhezi mikroorganismů ke keratinocytům v prostředí kožního mikrobiomu. Polymikrobiální interakce označují vzájemné vztahy mezi různými mikrobiálními druhy na kůži, které mohou být kompetitivní (soupeření o živiny a prostor) nebo kooperativní (vzájemná podpora růstu a obrany před patogeny) [2].

Výzkum zahrnuje využití *in vitro* modelu lidské kůže, založeného na buněčných liniích keratinocytů a fibroblastů. Taková analýza je nezbytná nejen pro hlubší pochopení procesů probíhajících na povrchu kůže, ale také pro vývoj nových terapeutických a kosmetických aplikací.

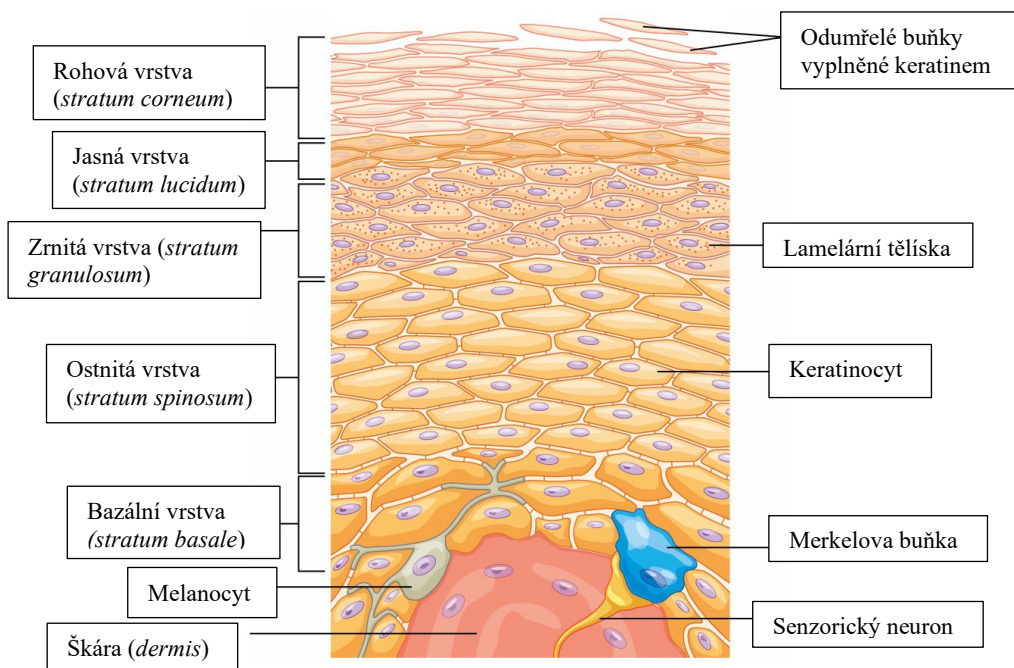
Doufám, že výsledky této práce přispějí k hlubšímu pochopení komplexních interakcí mezi mikroorganismy a buňkami lidské kůže, a tím rozšíří stávající znalosti o fungování kožního mikrobiomu. Získané poznatky by mohly být inspirací pro další výzkum v oblasti dermatologie a přispět k vývoji inovativních terapeutických a kosmetických aplikací zaměřených na podporu zdraví kůže a prevenci jejích onemocnění.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE

Kůže je největší orgán lidského těla. Představuje asi 15 % celkové tělesné hmotnosti a má několik důležitých funkcí pro náš organismus. Mezi hlavní funkce patří ochrana před vnějšími vlivy, podíl na metabolismu vody a termoregulaci.

Normální stavba kůže zahrnuje 3 části: *epidermis*, *dermis* a *subcutis*. Celková tloušťka kůže i vrstev se mění dle lokalizace na těle. V kůži se také nachází struktury souhrnně označované jako adnexální komponenty. Zde zahrnujeme chlupy, nehty, potní a mazové žlázy [3]. Zdravá kůže včetně své komplexní stavby tedy představuje pevnou obrannou linii proti infekci, která může vniknout tehdy, je-li kůže porušena. Porušením poté vzniká cesta průniku do nitra organismu. Kromě výše uvedených hlavních funkcí může mít kůže také estetickou roli, tzn. lze ji považovat za zrcadlo organismu – odráží jeho celkový fyzický a psychický stav [4]. Na **obrázku č. 1** můžeme vidět celkovou stavbu kůže od *epidermis*, po *subcutis*. Obrázek zahrnuje i jednotlivé vrstvy, kterými jsou: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale*.



Obrázek 1: Vrstvy pokožky – upraveno
(Zdroj: By OpenStax: Anatomy & Physiology, March 11, 2023, CC BY 4.0)

1.1 Struktura kůže

1.1.1 Epidermis (Pokožka)

Pokožka neboli *epidermis* tvoří nejsvrchnější ochrannou vrstvu kůže, tedy skutečnou hranici mezi tělem a vnějším prostředím. *Epidermis* je poměrně tenká, na některých místech pouhých 30 μm , zatímco na jiných místech je naopak silnější, a to konkrétně například na dlaních, kde dosahuje tloušťky až 1000-2000 μm . Tato nejsvrchnější vrstva se neustále obnovuje: odumřelé buňky (tzv. keratinocyty) na vnější straně pokožky se průběžně odlupují, zatímco zespoda dorůstají nové. Dalšími typy buněk v pokožce jsou melanocyty, Merkelovy buňky či Langerhansovy buňky. Pokožka neobsahuje žádné krevní cévy, a proto je závislá na škáře, která zajišťuje přístup k živinám a odvádění odpadních látek [6].

Pokožka se sestává z pěti vrstev směrem k povrchu. Jedná se o bazální vrstvu (*stratum basale*), která je tvořena jednou řadou cylindrických či kubických keratinocytů připojených k bazální membráně pomocí specializovaného buněčného spojení – hemidezmozomů. Hemidezmozomy tak zajišťují pevné mechanické spojení mezi *epidermis* a *dermis*, které je klíčové pro odolnost kůže a udržení struktury [5]. Bazální membrána je zvlněná – zvyšuje pevnost spojení se škárou (*dermis*) a difuzi živin. Bazální vrstva kromě keratinocytů obsahuje také melanocyty, Merkelovy (Langerhansovy) buňky a dendritické buňky, které zajišťují pigmentaci, senzorické vnímání a imunitní ochranu. Melanocyty produkují melanin, který chrání DNA před UV zářením a určuje barvu kůže. Merkelovy buňky fungují jako mechanoreceptory, přenášející dotykové podněty do nervového systému, a jsou součástí jemného hmatového vnímání. Dendritické (Langerhansovy) buňky se podílí na imunitní odpovědi tím, že rozpoznávají patogeny a aktivují T-lymfocyty [7]. Tato vrstva je rovněž zárodečnou vrstvou pro vznik nových keratinocytů a obnovu pokožky. Následuje vrstva ostnitá (*stratum spinosum*). Jedná se o vrstvu keratinocytů, jež mají při pozorování ve světelném mikroskopu ostnitý vzhled, přičemž „ostny“ (spiny), představují výběžky buněčné membrány. Těmito výběžky se poté keratinocyty propojují navzájem pomocí desmozomů. Naopak zrnitou vrstvu (*stratum granulosum*) již tvoří oploštělé keratinocyty, které se začínají plnit keratohyalinem. Je základem pro navazující keratinizaci a podmiňuje vznik a zachování *stratum corneum*. Následuje lesklá vrstva (*stratum lucidum*), která obsahuje pouze 1-2 vrstvy mrtvých buněk, tenká vrstva, která je patrná pouze u silně rohovějící kůže. Keratohyalin se zde začíná měnit na eleidin a jsou zde přítomna lamelární tělíska. Nejsvrchnější vrstvou je v závěru stavby

kůže tzv. rohová vrstva (*stratum corneum*). Tato vrstva má různou tloušťku podle typu rohovějící kůže. Oploštělé zrohovělé vrstvy představují zbytky neživých keratinocytů bez jader a buněčných organel. Buňky jsou vyplněny keratinem, který vznikl přeměnou z eleidinu [8].

1.1.2 Dermis (škára)

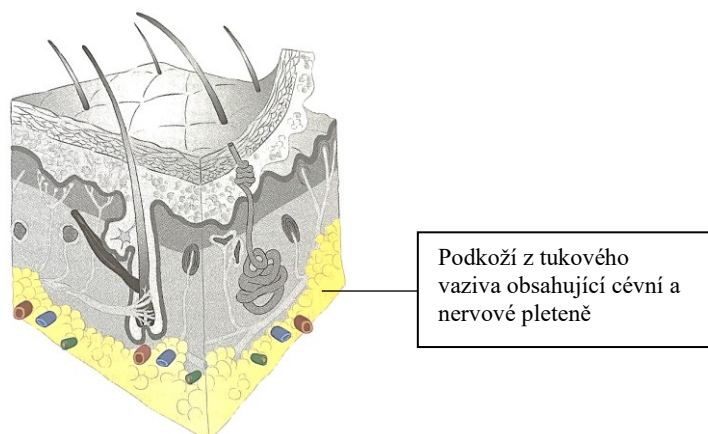
Dermis je asi 1-3 mm silná vrstva, která je tvořena tuhým vazivem. Tvoří ji plst'ová síť elastických kolagenních vláken. Tato vlákna zajišťují pevnost, pružnost a tažnost kůže. Škára je velmi dobře cévně zásobená. Skládá se ze dvou vrstev: *stratum papillare* a *stratum reticulare*.

Vrstva kůže *dermis* se skládá z krevních cév, vlasových kořínek, nervů, potních žláz a mazových žláz. Funkce této vrstvy kůže je stimulační receptorový orgán, ochrana proti poškození, osvětlení a ochrana proti nemocem, jakož i pro regulaci teploty [9]. Můžeme zde zahrnout i dermálně-epidermální spojení, což je struktura mezi *epidermis* a *dermis*, která zajišťuje pevnost a stabilitu pokožky. Tvoří ho bazální membrána a hemidezmozomy, které spojují keratinocyty *epidermis* s kolagenem v *dermis* [10]. Hlavními složkami jsou kolagen typu IV, lamininy a integriny. Tento spoj podporuje mechanickou integritu pokožky a reguluje buněčnou komunikaci [11]. Kožní vrstva *dermis* se nachází ve spodní části pokožky *epidermis*, která má dvě vrstvy struktury, a to *stratum papillare*, které obsahuje fibroblasty a *stratum reticular*, která se skládá z pojivové tkáně. Kromě těchto dvou vrstev obsahuje *dermis* také některé epidermální deriváty, konkrétně vlasové folikuly, potní žlázy a mazové žlázy. Pod *dermis* se nachází vrstva volné pojivové tkáně, která se nazývá podkoží a obsahuje tukové buňky. Tato síť se také nazývá povrchové fascie nebo *paniculus adiposus*. Tato tkáň obsahuje bohaté svazky krevních a lymfatických cév [9].

1.1.3 Subcutis (podkoží)

Podkoží, známé jako *subcutis*, je kritická vrstva tkáně nacházející se pod *dermis*, která se skládá především z volné pojivové tkáně a tukových buněk. Tato vrstva plní několik základních funkcí, včetně ukládání energie, tepelné izolace a zajištění pružného spojení mezi kůží a pod ní ležícími strukturami, jako jsou svaly a fascie [10; 12]. Významná je vaskularizace podkoží, které ve srovnání s *dermis* obsahuje větší množství cév a nervů, což hraje zásadní roli v celkové perfuzi a procesech hojení kůže [10; 13]. Úloha podkoží přesahuje pouhou strukturální podporu; aktivně se podílí na procesu hojení [14].

Podkoží, viz **obr. č 2** je navíc náchylné k různým patologickým stavům, které mohou jeho funkci omezit. Poškození podkožní vrstvy může vést ke komplikacím, jako je opožděné hojení ran a tvorba indolentních kapes [15]. Integrita podkoží je tedy pro účinnou léčbu rány naprosto zásadní při jakýkoliv chirurgických zákrocích zahrnujících tuto vrstvu a je tedy třeba brát v úvahu její klíčovou roli v procesu hojení [13; 16].



*Obrázek 2: Struktura subcutis –
upraveno (Zdroj: Balko, J., Tonar, Z.
and Varga, I., 2016. Memorix histologie.
1st ed. Prague: Triton, p. 112)*

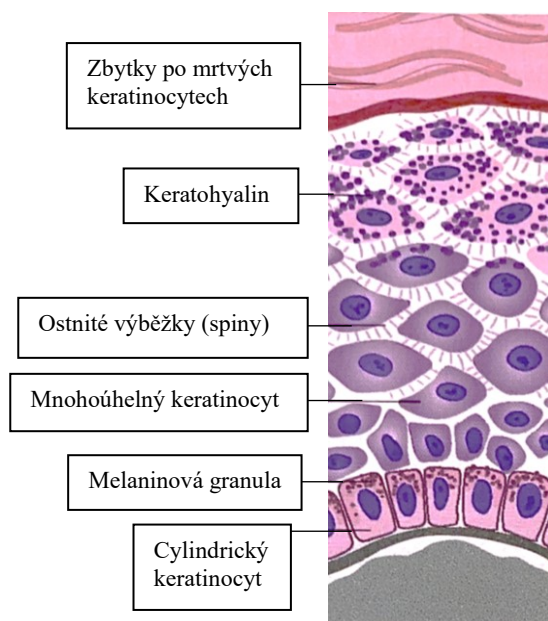
1.2 Keratinocyty

Keratinocyty jsou převládajícím typem buněk *epidermis* a tvoří přibližně 95 % této nejsvrchnější vrstvy kůže. Hrají klíčovou roli při udržování integrity kůže, bariérové funkce a celkové homeostázy [17; 18].

Keratinocyty v bazální vrstvě jsou mitoticky aktivní, zatímco ty ve vyšších vrstvách postupně ztrácejí proliferační schopnost a diferencují v korneocyty. Při diferenciaci keratinocytů dochází k syntéze keratinu, vláknitého proteinu, který zajišťuje pevnost a odolnost kůže. Tento proces je klíčový pro tvorbu rohové vrstvy, sloužící jako primární bariéra proti nepříznivým vlivům prostředí [17; 18].

Keratinocyty vytváří tonofilamenta, což jsou druh cytokeratinových intermediárních filament. Ty se proplétají a vytvářejí tonofibrily, které se upínají do plotének desmozomů. Ty dodávají pokožce pevnost, hlavně ve *stratum spinosum* [8]. Dále vytváří keratohyalinová granula nacházející se ve *stratum granulosum*. Během vyzrání se keratohyalin mění v eleidin a ten následně v keratin. Dále zde

můžeme zahrnout lamelová tělíska. Jedná se o látky tukové povahy (glykolipidy), které jsou vylučovány do mezibuněčných štěrbin, a slouží k utěsnění štěrbin jako mezibuněčný tmel [8]. Pochopení biologie keratinocytů je nezbytné pro vývoj léčebných strategií pro různá kožní onemocnění, včetně psoriázy, atopické dermatitidy a rakoviny kůže. Na **obrázku č. 3** jsou znázorněny a popsány jednotlivé struktury keratinocytů.



Obrázek 3: Struktura keratinocytů – upraveno (Zdroj: Balko, J., Tonar, Z. and Varga, I., 2016. Memorix histologie. 1st ed. Prague: Triton, p. 112)

1.2.1 Struktura a funkce keratinocytů

Keratinocyty jsou nedílnou součástí bariérové funkce kůže, zabraňují transepidermálním ztrátám vody (TEWL) a chrání před patogeny a dráždivými látkami. Lipidová matrice vytvářená keratinocyty tuto bariéru posiluje a činí ji odolnou vůči nepříznivým vlivům prostředí [19]. Keratinocyty navíc exprimují proteiny těsného spojení, které zlepšují funkci bariéry tím, že brání paracelulárnímu průchodu škodlivých látek.

Také hrají klíčovou roli při hojení ran prostřednictvím procesů, jako je re-epitelizace. Po poranění keratinocyty migrují do místa rány, proliferují a diferencují, aby obnovily epidermální bariéru [19]. Bylo prokázáno, že faktory, jako jsou kmenové buňky odvozené od tukové tkáně, mají parakrinní účinky, které zvyšují migraci a proliferaci keratinocytů během hojení ran [19; 20]. Keratinocyty nejsou pouze pasivní strukturální složkou,

ale aktivně se podílejí na imunitní odpovědi kůže. Produkují řadu cytokinů, včetně interleukinu-1, který hraje klíčovou roli při zahájení a udržování lokálních imunitních reakcí. Tato produkce cytokinů je klíčová pro nábor imunitních buněk do míst zánětu a poranění, což zdůrazňuje úlohu keratinocytů jako aktivních hráčů v imunitě kůže [20; 21]. Navíc exprimují receptory pro rozpoznávání vzorů, které jim umožňují detekovat patogeny a odpovídajícím způsobem na ně reagovat, a fungují tak jako první linie interakce s ostatními kožními buňkami. Například primární řasinky na keratinocytech slouží jako signální uzly, které regulují dráhy klíčové pro proliferaci a diferenciaci buněk. Keratinocyty navíc reagují na podněty z prostředí, jako je UV záření, modulací exprese různých genů, včetně chemokinů, (např. CXCL5), které jsou důležité pro zánětlivé reakce. Vzájemné působení mezi keratinocyty v *dermis* je také rozhodující pro udržení homeostázy kůže, protože fibroblasty poskytují strukturální podporu a signální signály, které ovlivňují funkci keratinocytů [22].

Keratinocyty jsou z hlediska funkčnosti nedílnou součástí zdraví kůže a plní buněčnou signalizaci. Jejich schopnost interagovat s ostatními kožními buňkami a reagovat na změny prostředí je zásadní pro zachování integrity a funkčnosti kůže.

1.2.2 Proces keratinizace

Proces keratinizace je kritický biologický mechanismus, který zahrnuje diferenciaci keratinocytů, což vede k vytvoření ochranné bariéry v kůži. Tento proces je nezbytný pro zachování integrity a funkce kůže, protože vede k tvorbě keratinu. Jedná se o vláknitý protein, který poskytuje strukturální podporu a odolnost epiteliálním tkání. Proces keratinizace lze rozdělit do několika fází, z nichž každá se vyznačuje specifickými molekulárními a buněčnými změnami. Počáteční fáze keratinizace začíná proliferací bazálních keratinocytů, které jsou stimulovány různými růstovými faktory a cytokiny. Jak tyto buňky migrují *epidermis* směrem nahoru, začínají procházet diferenciací, která je ovlivňována změnami mikroprostředí, včetně změn koncentrace vápníku. Je známo, že zvýšená koncentrace vápníku spouští expresi diferenciacních markerů, jako je involucrin a loricrin, které jsou klíčové pro tvorbu rohovinového obalu, klíčového znaku terminálně diferenciováných keratinocytů [23; 24]. Úloha keratinových proteinů v tomto procesu je významná, protože tvoří intermediární filamenta, která zajišťují mechanickou pevnost a stabilitu *epidermis* [24].

Při diferenciaci keratinocytů dochází k významným morfologickým a biochemickým změnám. Tento proces se vyznačuje syntézou keratinových proteinů, které tvoří intermediární filamenta zajišťující strukturální integritu *epidermis* [23,24]. Například keratin 14 a keratin 16 jsou klíčové pro udržení mechanických vlastností kůže a jsou exprimovány v bazálních vrstvách *epidermis*. Jejich exprese je při diferenciaci keratinocytů snížena, což vede k tvorbě specializovanějších keratinů. Ty jsou označovány jako je keratin 1 a keratin 10 nacházející se v horních vrstvách *epidermis* [25]. Kromě toho byla zdůrazněna úloha reaktivních forem kyslíku (ROS) při podpoře diferenciaci *epidermis*, což naznačuje, že oxidační stres může sloužit jako signální mechanismus během tohoto procesu [26].

Závěrečná stádia keratinizace vrcholí procesem známým jako kornifikace, kdy keratinocyty ztrácejí své organely a podléhají programované buněčné smrti. Vzniká nejsvrchnější vrstva kůže složená z odumřelých korneocytů. Tento proces je přísně regulován různými faktory, včetně transglutamináz, které usnadňují zesíťování proteinů v kornifikovaném obalu, čímž zvyšují bariérovou funkci kůže [27]. Kromě toho je pro udržení integrity kůže rozhodující vzájemné působení mezi keratinocyty a extracelulární matrix, protože keratinocyty vylučují různé cytokiny a růstové faktory, které ovlivňují jejich vlastní diferenciaci a celkovou homeostázu kůže [28].

2 KOŽNÍ MIKROBIOM

Lidský mikrobiom je označení pro veškeré mikroorganismy, které žijí na lidském povrchu nebo v lidském těle. Jedná se o komplexní systém mikroorganismů, které osidlují různé části lidského těla, včetně povrchu kůže, trávicího traktu, sliznic a dalších oblastí [6].

Tento mikrobiom tvoří bakterie, houby, viry a další mikroorganismy, které spolu s kožními buňkami tvoří ochrannou bariéru proti patogenům a udržují zdravou funkci kůže.

2.1 Význam kožního mikrobiomu

Kožní mikrobiom hraje klíčovou roli při ochraně proti infekcím a podporuje imunitní odpověď. Některé bakterie, například *Staphylococcus epidermidis*, produkují antimikrobiální látky, které brání růstu patogenních bakterií, jako je *Staphylococcus aureus*. Navíc kožní mikrobiom podporuje udržení pH kůže a produkci lipidů, což pomáhá udržovat přirozenou bariérovou funkci [30].

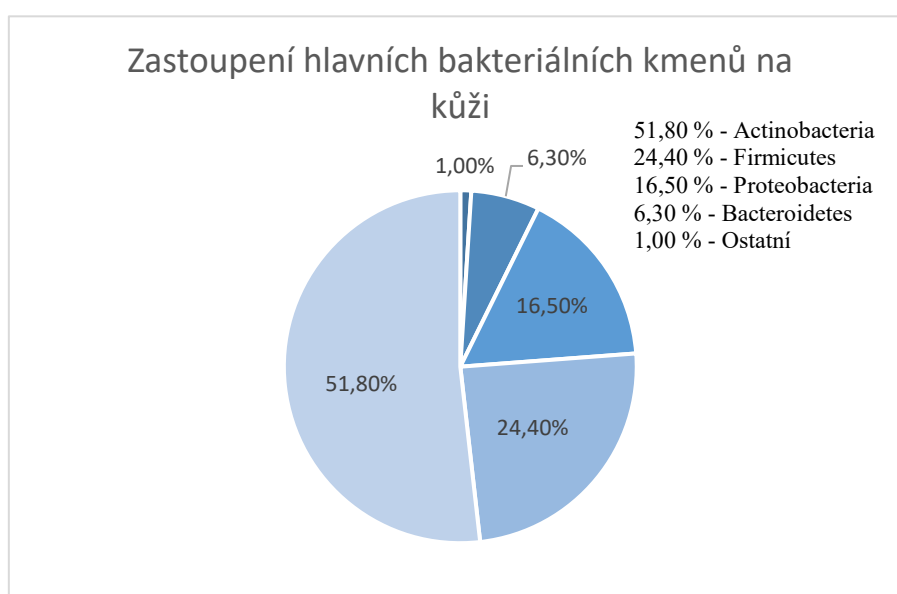
Jednou z hlavních funkcí kožního mikrobiomu, je jeho úloha v imunitní modulaci. Přítomnost komenzálních bakterií na povrchu kůže pomáhá vzdělávat a trénovat imunitní systém hostitele a podporuje vyváženou imunitní odpověď. Například časná kolonizace specifickými komenzálními stafylokoky byla spojena s nižším rizikem vzniku atopické dermatitidy u kojenců, což naznačuje, že tyto mikroorganismy mohou hrát ochrannou roli v kožní imunitě [31]. Kromě toho může kožní mikrobiom ovlivňovat expresi genů souvisejících s diferenciací a homeostázou *epidermis*, čímž přispívá k funkci kožní bariéry [32].

Pokud dojde k disbalanci mikrobiomu (dysbióze), může to vést k různým kožním onemocněním, jako jsou akné, ekzémy, psoriáza nebo rosacea. Dysbióza může být způsobena faktory, jako je nadměrné používání antibiotik, nadměrná hygiena, stres nebo nevhodná strava. V posledních letech se výzkum mikrobiomu rozšířil o možnosti využití prebiotik a probiotik v dermatologii, což by mohlo přispět k obnově rovnováhy mikrobiomu a léčbě kožních onemocnění [33].

2.2 Typy mikroorganismů a jejich rozložení na kůži

Mezi nejběžnější bakterie patří rody *Staphylococcus*, *Cutibacterium* a *Corynebacterium*. Každý člověk má unikátní mikrobiální složení, které je ovlivněno faktory jako věk, pohlaví, životní styl, genetika a oblast těla. Například v mastných oblastech (např. na čele a zádech) převládá *Cutibacterium acnes*, zatímco v suchých oblastech je běžný *Staphylococcus epidermidis* [29].

Mikrobiota se rozděluje na komenzální, mutualistické a patogenní. Zatímco komenzální mikrobiota přináší hostiteli benefity, nebo alespoň neškodí, patogenní mikroorganismy mohou vyvolat různé onemocnění [34].



Graf 1: Zastoupení hlavních bakteriálních kmenů na kůži – upraveno
(Zdroj: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2022/01/04.pdf>)

Na **grafu č. 1**, který je uveden výše, se nachází rozdělení hlavních bakteriálních kmenů na kůži. Z koláčového grafu je vidět, že největší zastoupení bakteriálních kmenů jsou *Actinobacteria* s 51,8 % a nejmenší zastoupení bakteriálních kmenů jsou ostatní s 1 %, které v koláčovém grafu nejsou jmenované.

Nejvíce dominantním kmenem na lidské pokožce jsou *Actinobacteria*. Tento kmen zahrnuje bakterie, jako jsou *Corynebacterium* a *Propionibacterium*, které jsou přítomny v různých množstvích v závislosti na části těla. *Propionibacterium acnes* je známý svou schopností produkovat kyselinu propionovou, která pomáhá udržovat nízké pH pokožky a brání tak růstu patogenních mikroorganismů [35]. Dále *Firmicutes* zahrnují různé druhy bakterií,

jako jsou *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Bacillus*. Bakterie z tohoto kmene jsou častými osadníky na lidské kůži, kde se podílejí na rozkladu potu a jiných organických látek. Některé druhy, jako například *Staphylococcus epidermidis*, jsou považovány za součást přirozené mikroflóry kůže, ale mohou v určitých podmínkách způsobit infekce [36]. Dalším kmenem, *Proteobacteria*, jsou přítomné na kůži v menších počtech, ale jejich role není o nic méně významná. Zástupci tohoto kmene, jako jsou *Pseudomonas* a *Acinetobacter*, jsou známé svou schopností přežívat v různých prostředích, včetně těch s nízkým obsahem kyslíku, což jim umožňuje přežít i na specifických místech pokožky (vlhké záhyby) [37]. Posledním zahrnutým kmenem, *Bacteroides*, jsou přítomni především v trávicím traktu, ale mohou být nalezeny i na kůži [38]. I když jejich koncentrace na kůži není tak vysoká jako u jiných kmenů, jejich přítomnost přispívá k celkové mikrobiální rovnováze.

2.2.1 Komenzální druhy

Komenzální mikrobiota zahrnuje bakterie, viry, houby a další mikroorganismy, které obvykle osídlují lidské tělo bez toho, aniž by mu škodily. V mnoha případech mikrobiota poskytuje hostiteli důležité benefity, například ochranu před kolonizací patogenními mikroorganismy, podporu imunitního systému nebo syntézu určitých vitamínů [39]. Příkladem komenzální bakterie na lidské kůži je *Staphylococcus epidermidis*. Tento nepatogenní mikroorganismus je součástí normální kožní mikroflóry a hraje důležitou roli v ochraně proti patogenním bakteriím. *S. epidermidis* soutěží s patogeny o živiny a prostor na povrchu kůže, čímž brání jejich kolonizaci. Navíc produkuje antimikrobiální látky, které inhibují růst škodlivých mikroorganismů [40]. Komenzální mikrobiota také hraje roli v modulaci imunitního systému – podceňuje vývoj imunitní tolerance a brání nadměrným zánětlivým reakcím. Kromě toho mikrobiota konkuruje patogenům o živiny a prostor, což představuje další mechanismus ochrany před infekcemi [39].

Významný aspekt tohoto tématu je dynamická rovnováha mezi komenzální a patogenní mikrobiotou. Například dlouhodobé užívání antibiotik může narušit komenzální mikroflóru, což umožní patogenům získat převahu a způsobit infekce.

Komenzální mikrobiota také působí jako důležitý faktor, který udržuje homeostázu imunitního systému [41].

2.2.2 Patogenní druhy

Patogenní mikroorganismy jsou schopné způsobit onemocnění, když proniknou do těla a překonají obranné mechanismy. Tyto mikroorganismy mohou způsobit poškození buněk, produkovat toxiny nebo spustit nepřiměřené imunitní reakce. Patogenní mikrobiota zahrnují viry, bakterie, houby a parazity, které mohou infikovat různé části těla [41]. Příkladem patogenní bakterie na lidské kůži je *Staphylococcus aureus*, známý také jako zlatý stafylokok. Tato bakterie může způsobovat různé kožní infekce, jako je impetigo, folikulitida, furunkly nebo karbunkly. Infekce se často projevují jako zarudlé, oteklé a bolestivé vředy nebo puchýře naplněné hnisem. *S. aureus* se může šířit z infikovaných nebo kolonizovaných osob kožním kontaktem nebo sdílením kontaminovaných předmětů [42]. Tato bakterie je schopna produkovat různé toxiny a enzymy, které přispívají k jejich patogenitě. Některé kmeny navíc produkují toxiny, které fungují jako superantigeny, spouštějící uvolňování velkého množství cytokinů, což může vést ke stavu podobnému sepsi [43].

Patogenní mikrobiota však nejsou vždy negativním faktorem – v některých případech může být klíčová pro vývoj a modulaci imunitní odpovědi, a tak mohou hrát roli i v ochraně před jinými, více virulentními patogeny [41].

2.3 Polymikrobiální interakce

Polymikrobiální interakce v kožním mikrobiomu se týkají vzájemných vztahů mezi různými mikroorganismy, které sdílejí stejný ekosystém. Na povrchu kůže žije mnoho druhů bakterií, hub a dalších mikroorganismů, které mezi sebou neustále soupeří o prostor a živiny, čímž udržují dynamickou rovnováhu. Tento proces je zásadní pro zdraví kůže, protože umožňuje udržet škodlivé mikroorganismy pod kontrolou a podporuje kožní homeostázi [44]. Mikroorganismy na kůži soupeří o omezené zdroje, jako jsou lipidy, aminokyseliny a kyslík [45]. Využívají různých strategií, aby si zajistily místo a zdroje potřebné k přežití [30]. Některé druhy jako *Staphylococcus epidermidis*, jsou schopny produkovat antimikrobiální peptidy, které inhibují růst patogenních mikroorganismů, jako je *Staphylococcus aureus*. Tento mechanismus je známý jako „kolonizační rezistence“ – proces, při kterém zdravé mikroorganismy vytvářejí nepříznivé podmínky pro kolonizaci patogenů. Kromě toho bakterie jako *Cutibacterium acnes* v mazových žlázách vytvářejí lipázy, které hydrolyzují lipidy na volné mastné kyseliny, čímž vytvářejí kyselé prostředí, které brání růstu jiných mikroorganismů [43]. Polymikrobiální interakce mohou být

kompetitivní nebo kooperativní. Kompetitivní interakce zahrnují produkci látek, které inhibují růst jiných druhů. Kooperativní interakce mohou zahrnovat syntrofii, kde jeden mikroorganismus poskytuje nezbytné živiny pro růst druhého, nebo biofilm, kde různé druhy spolupracují na vytvoření ochranné vrstvy na povrchu kůže [39]. Pokud je rovnováha polymikrobiálních interakcí narušena, může dojít k rozvoji dysbiózy. Dysbióza se vyznačuje snížením rozmanitosti mikrobiální komunity nebo přemnožením patogenních mikroorganismů. To vede k oslabení přirozené obranyschopnosti kůže a ke zvýšení náchylnosti k infekcím, zánětům a dalším kožním onemocněním, jako je atopická dermatitida, psoriáza nebo rosacea [44].

2.4 Role rezistentních mikroorganismů v prevenci patogenní kolonizace

Rezistentní mikroorganismy hrají zásadní roli v prevenci kolonizace patogenními mikroorganismy prostřednictvím několika mechanismů. Přirozená mikrobiální flóra, která obývá povrch lidského těla a trávicí trakt, vytváří konkurenční prostředí, kde různé druhy bakterií bojují o živiny a prostor. Tato kompetice omezuje růst potenciálně patogenních mikroorganismů, a tedy brání jejich přemnožení. Rezistentní mikroorganismy, například některé kmeny bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, jsou schopny vytvářet antimikrobiální látky, jako jsou bakteriociny, kyselina mléčná a peroxid vodíku, které působí inhibičně na patogeny [45]. Tento inhibiční účinek je jedním z klíčových mechanismů, jakým mikrobiální rezistence může chránit před kolonizací škodlivými mikroorganismy.

Další důležitou funkcí rezistentních mikroorganismů je podpora imunitní odpovědi hostitele. Interakce mezi rezidentní mikroflórou a imunitním systémem stimuluje produkci imunoregulačních molekul, což posiluje imunitní obranu proti patogenním mikroorganismům. Studie ukazují, že některé rezistentní mikroorganismy mohou ovlivňovat expresi imunitních molekul, jako je sekretovaný imunoglobulin A (sIgA) nebo některé cytokiny, které posilují slizniční bariéry [46]. Tato posílená bariéra pomáhá udržovat rovnováhu v mikrobiálním ekosystému a zároveň brání kolonizaci a průniku patogenů do těla.

Kromě přímých a nepřímých účinků na patogeny mají rezistentní mikroorganismy významnou roli také v regulaci a stabilizaci mikrobiálního prostředí. Rezistentní mikroflóra je klíčová pro udržení dynamické rovnováhy mezi různými druhy bakterií a pomáhá zabránit

dysbióze, která může vést k náchylnosti k infekcím. Příkladem je střevní mikrobiota, kde přítomnost rezistentních bakterií, jako jsou některé kmeny *Escherichia coli*, poskytuje ochranu před kolonizací škodlivými bakteriemi, včetně patogenních druhů *Clostridioides difficile*. Tato rezistence k antibiotikům, přestože je obecně považována za problematickou, může tedy mít v určitých případech ochrannou funkci v prevenci patogenní kolonizace [47].

3 MECHANISMY ADHEZE MIKROORGANISMŮ KE KERATINOCYTŮM

3.1 Role keratinocytů v hostitelské odpovědi

Keratinocyty tvoří největší část buněk v *epidermis* a jejich funkce přesahuje pouhou strukturální podporu kůže. V rámci hostitelské imunitní odpovědi fungují jako důležitý senzor i efektor imunitních procesů. Při kontaktu s patogeny, tj. bakterie, viry nebo houby, jsou keratinocyty schopny detekovat a reagovat na mikrobiální vzory pomocí receptorů rozpoznávajících patogeny, například Toll-like receptorů (TLR). Aktivací těchto receptorů spouštějí produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), které stimulují další složky imunitního systému k reakci [45]. Kromě přitahování imunitních buněk do místa infekce nebo poranění přispívají keratinocyty i k bariérové funkci kůže, která je zásadní pro prevenci průniku patogenů. Produkují antimikrobiální peptidy, jako je defensin a katelicidin, které přímo působí proti patogenům a posilují tak chemickou bariéru kůže [49].

Tato produkce antimikrobiálních látek je zvláště důležitá v prostředí s vysokým rizikem infekce, například při poškození kůže. Keratinocyty tak nejen zabraňují šíření infekce, ale také eliminují již přítomné mikroby, čímž podporují rychlou a efektivní imunitní odpověď. Další zásadní funkcí keratinocytů je jejich schopnost přispívat k imunitní toleranci a prevenci nadměrné zánětlivé reakce, která by mohla vést k autoimunitním nebo chronickým onemocněním. Produkce protizánětlivých cytokinů, jako je interleukin-10 (IL-10), omezuje aktivitu imunitních buněk v okolí a zabraňuje přehnané imunitní odpovědi, což pomáhá předcházet stavům jako atopická dermatitida nebo psoriáza [50].

3.2 Adheze mikroorganismů ke keratinocytům

Adheze mikroorganismů na keratinocyty je složitý proces, který ovlivňují různé faktory, včetně imunitní odpovědi kůže, složení mikrobiomu a integrity kožní bariéry. Keratinocyty, jakožto převládající typ buněk v *epidermis*, hrají klíčovou roli v obraně kůže proti mikrobiální invazi. Exprimují řady mikrobiálních peptidů (AMP), jako je SKALP/elafin, které jsou indukovány zánětlivými cytokiny (IL-1 a TNF- α), čímž brání adhezi a invazi mikrobiomů [51]. Tato vrozená imunitní odpověď je nezbytná pro udržení homeostázy kůže

a prevenci infekcí. Složení kožního mikrobiomu navíc významně ovlivňuje mikrobiální adhezi.

Zdravý kožní mikrobiom se obvykle skládá z rozmanité škály mikroorganismů, které mohou inhibovat kolonizaci patogenních bakterií prostřednictvím kompetitivního vyloučení a produkce inhibičních látek [52]. Přítomnost komenzálních bakterií může například posílit bariérovou funkci kůže a modulovat imunitní odpověď, čímž se snižuje pravděpodobnost adheze patogenních bakterií [53]. Naopak dysbióza charakterizovaná snížením mikrobiální rozmanitosti a zvýšením počtu patogenních druhů, jako je *Staphylococcus aureus*, může vést ke zvýšené adhezi mikrobů a následným kožním infekcím [54]. Interakce mezi keratinocyty a specifickými patogeny je také zprostředkována různými faktory virulence. Zmíněný *Staphylococcus aureus* využívá povrchové proteiny, které usnadňují jako adhezi ke keratinocytům, jako jsou adheziny vázající kolagen [55]. Kromě toho může přítomnost dalších mikroorganismů, jako je *Pseudomonas aeruginosa*, zvýšit adhezi *S. aureus* ke keratinocytům a vytvořit tak synergický efekt, který podporuje kolonizaci a infekci [56]. Toto vzájemné působení zdůrazňuje význam pochopení mikrobiální dynamiky v kontextu zdraví a onemocnění kůže. Kromě toho integrita kožní bariéry rozhodující pro prevenci adheze mikrobů. Stavby, které narušují bariéru, jako je atopická dermatitida nebo vitiligo, mohou vést ke zvýšené propustnosti a náchylnosti k mikrobiální invazi [56; 58]. Zánětlivé reakce vyvolané průnikem mikrobů mohou dále zhoršovat stav kůže, což vede k cyklu zánětu a infekce [59]. Keratinocyty reagují na mikrobiální invazi uvolňováním cytokinů a chemokinů, které rekrutují imunitní buňky do místa infekce, čímž organizují komplexní imunitní odpověď [60].

3.3 Vliv fyziologických podmínek na adhezi

Adheze mikroorganismů na povrch hostitele je klíčovým faktorem pro kolonizaci a potenciální patogenitu. Změny v podmínkách prostředí, jako je pH, vlhkost, teplota, a přítomnost specifických iontů nebo proteinů, mohou podstatně ovlivnit, jak dobře se patogenní nebo komenzální mikroorganismy vážou na biologické povrchy, jako je sliznice nebo pokožka. Různé fyziologické podmínky mají zásadní dopad na to, zda mikroorganismy vytvoří stabilní biofilm nebo pouze dočasně kolonizují povrch. Rozdíly v pH, vlhkosti a složení biologických tekutin tedy hrají důležitou roli v regulaci těchto interakcí [61; 62].

Co se týče pH, pH prostředí významně ovlivňuje adhezi mikroorganismů na povrch tkání. V závislosti na druhu mikroorganismu a typu povrchu může změna pH buď zvyšovat, nebo snižovat schopnost přilnutí. Například za kyselých podmínek může dojít k ionizaci funkčních skupin na povrchu bakterií, což vede ke zvýšené přilnavosti k určitým tkáním. Naopak vyšší pH může podpořit adhezi patogenů, jako jsou stafylokoky, na syntetické povrchy nebo implantáty, což je důležité zejména při prevenci infekcí. U komenzálních bakterií, které běžně obývají například střevo nebo ústní dutinu, pH často hraje roli v udržení přirozené mikrobiální rovnováhy – změny pH v těchto oblastech mohou způsobit pokles přilnavosti komenzálů a usnadnit kolonizaci patogeny [61; 62]. Vlhkost a biologické tekutiny, jako je krev nebo sekrety, významně ovlivňují, zda mikroorganismy na povrchu tkáně přetrvávají nebo se rychleji odplavují. Vyšší vlhkost, která je běžná na sliznicích, poskytuje vhodné prostředí pro tvorbu biofilmu, který slouží jako ochranná vrstva pro patogenní i komenzální mikroorganismy. Biologické tekutiny často obsahují ionty a proteiny, které mohou usnadnit adhezi určitých mikroorganismů; například přítomnost krevní plazmy může usnadnit adhezi *Staphylococcus aureus* k povrchu, což může vést po operacích k infekcím. U komenzálních bakterií, jako jsou laktobacily ve vaginálním prostředí, je vlhkost spolu s pH zásadní pro udržení jejich přirozené adheze a rovnováhy s patogeny. Když dojde ke změně v obsahu vlhkosti nebo složení tekutin, může být tato rovnováha narušena, což vytváří prostor pro kolonizaci patogenními organismy [63; 64].

Dalším faktorem, který můžeme zahrnout, je biofilm. Biofilm, který je častým produktem adheze mikroorganismů na biologické povrchy, představuje další faktor, který zvyšuje jejich odolnost proti změnám fyziologických podmínek i proti imunitní odpovědi hostitele. Biofilm je tvořen extracelulárními polysacharidy a proteiny, které chrání mikroorganismy před působením vnějšího prostředí a podporují jejich stabilní přilnutí k povrchu. V případě patogenů, jako je *Pseudomonas aeruginosa* nebo některé druhy stafylokoků, biofilm zvyšuje jejich schopnost přežít na tkáních i na syntetických materiálech, jako jsou katetry či implantáty. Komenzální bakterie, jako jsou bifidobakterie ve střevě, také využívají biofilm ke stabilní kolonizaci hostitele, což přispívá k ochraně před patogeny. Změna v pH nebo složení tekutin však mohou vést k destabilizaci biofilmu, což může následně ovlivnit stabilitu adheze jak komenzálních, tak patogenních mikroorganismů [65; 66]. Teplota má rovněž vliv na adhezi mikroorganismů, zejména v souvislosti s patogenními infekcemi. Vyšší teploty, typicky během horečky, mohou změnit povrchové vlastnosti jak mikroorganismů, tak hostitelských buněk, což může vést k posílení nebo oslabení

adhezivních interakcí. Například u patogenního *Escherichia coli* může zvýšená teplota vést ke zvýšení produkce adhezivních proteinů, které usnadňují kolonizaci. Vysoké teploty mohou také destabilizovat biofilm, což vede k uvolnění mikroorganismů z biofilmu, čímž se zvyšuje jejich šance na šíření do dalších částí těla [67].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na polymikrobiální interakce a adhezi bakterií ke keratinocytům v kontextu kožního mikrobiomu.
- Osvojit si základní laboratorní techniky s buněčnými kulturami a mikroorganismy v aseptických podmínkách
- Kultivace buněčné linie HaCaT v přítomnosti vybraných bakterií kožního mikrobiomu a jejich supernatantů
- Experimentální posouzení vlivu bakterií a jejich supernatantů na viabilitu, proliferaci, adhezi a migraci keratinocytů.
- Validace a interpretace získaných dat v kontextu známých poznatků o mikrobiálních interakcích s kožními buňkami.

5 MATERIÁL A METODY

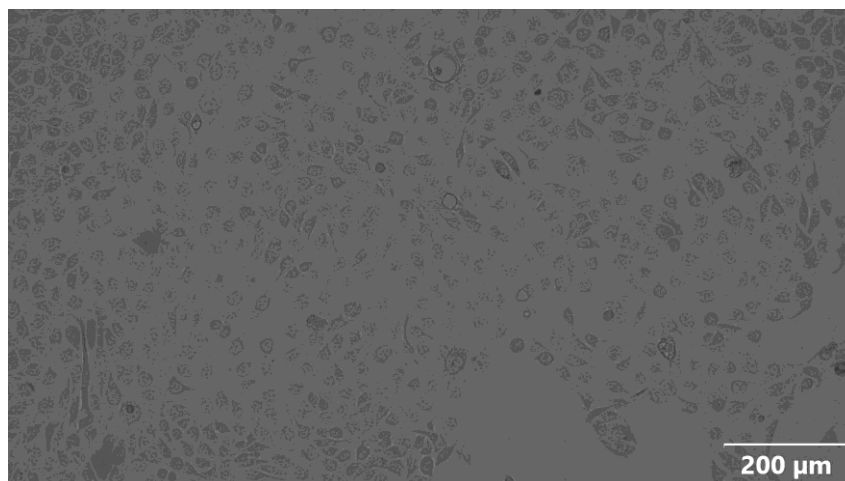
5.1 Biologický materiál

5.1.1 Buněčná linie HaCaT

Pro všechny experimenty během bakalářské práce byly použity spontánně transformované lidské keratinocyty HaCaT (CLS Cell Lines Service, Německo). Buněčná linie byla kultivována v médiu DMEM (Sigma Aldrich USA) s 1 % přídavkem antibiotik penicilin – streptomycin (GE Healthcare HyCone, 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 vysoké životaschopnosti byla buněčná linie udržována v rozmezí 80-85 % konfluence a poté zpasážována. 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 důkladném propláchnutí buněk pomocí trypsinu ode dna kultivační nádoby, bylo přidáno kompletní kultivační médium – vznik buněčné suspenze. Linie byly pasážovány v poměru 1:4 až 1:6.

Během samotného procesu je možné vzorky buněčné suspenze zamrazit pro další použití. Jedná se o pasážování buněčné suspenze při konfluenci 75 %, kdy vytvořenou buněčnou suspenzi centrifugujeme při 1000 RPM po dobu 5 minut. Pro zamrazování je nutné použít zamrazovací médium sestávajícího se ze samotného média, 10 % fetálního bovinního séra a 10 % DMSO. Po centrifugaci buněčné suspenze oddělíme supernatant od pelety a k peletě přidáme 1 ml kompletního zamrazovacího média. Vše je uloženo v mrazícím boxu při teplotě -80 °C. Na obrázku můžeme vidět keratinocyty, které byly vyfoceny pomocí inverzního světelného mikroskopu. Tato metoda nám může pomoci při zkoumání jejich struktury, složení nebo i proliferace. Zvětšení tohoto obrázku je 100x.



Obrázek 4: Keratinocyty linie HaCaT (Z: 100x)

5.1.2 Bakteriální kmeny

Během praktické části v laboratořích byly použity kultury komenzálních bakterií *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Micrococcus luteus* CCM 732 a bakterií patogenních *Staphylococcus aureus* CCM 4516 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 196, které byly získány z České sbírky mikroorganismů. Před zahájením experimentální části bylo nutné bakterie oživit z želatinových disků, což zahrnovalo jejich kultivaci na trypton sójovém agaru (TSA) v Petriho miskách při teplotě 37 °C za aerobních podmínek. Po vytvoření kolonií byly bakterie přeneseny do trypton sójového bujónu (TSB), kde byly kultivovány po dobu 24 hodin pro další využití.

5.2 Použité soupravy, chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Hydrogenuhličitan sodný (kat. č.: 28000-31000; 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)
- Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM, kat. č.: D5648; Sigma-Aldrich, USA)
- Soybean casein digest lecithin polysorbate medium solution (SCDLP, kat. č.: M011, HiMedia Laboratories, Indie)
- Trypsin/EDTA 10X (kat. č.: XC-T1717/100; Biosera, Francie)

Použité roztoky a jejich příprava

- Roztoky pro kultivaci bakteriálních kmenů

Mikrobiologický agar byl připraven smícháním 18 g Tryptone Sova Agar (TSA, HiMedia Laboratories Indie) a 400 ml demineralizované vody.

TSB bujón byl připraven smícháním 12 g M011 (Soyaben Casein Digest Medium, HiMedia Laboratories. Indie) a 400 ml demineralizované vody.

5.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- 0,22 µm stříkačkové filtry (kat. č.: 99722, TPP – Techno plastic Products, Švýcarsko)
- Centrifuga 5720 R chlazený model pro vzorky závislé na teplotě (Eppendorf, ČR)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Německo)
- McFarlandův densiometr DEN-1B Grant-Bio (Grant Instruments, Velká Británie)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem (OLYMPUS Japan, Japonsko)
- Inkubátor s příslušenstvím Heracell™ 150i (Thermo Scientific, USA)
- Inkubátor INE 400 Memmert 531 (Mettler GmbH + Co. KG, 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)

5.4 Použité experimentální postupy

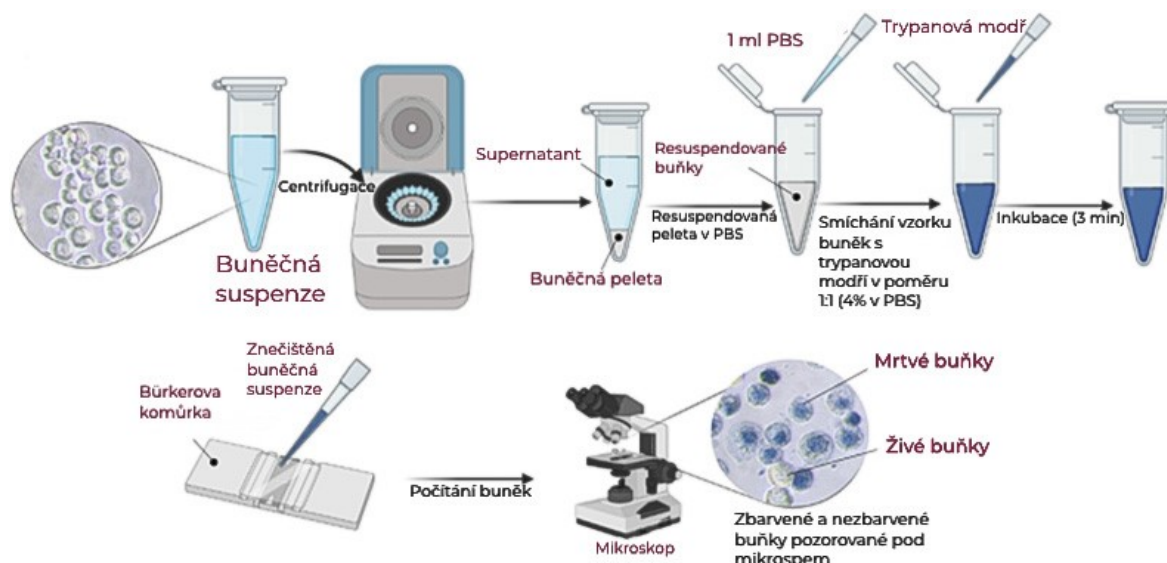
5.4.1 Příprava bakteriálních supernatantů

Kultury bakterií byly upraveny na 0,5 McFarlandova standardu jako inokula. Poté bylo inokulum naředěno v poměru 1:10 v čerstvém TSB a inkubováno při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro navazující experimenty byly vzorky bakteriálních supernatantů odebrány po 24 hodinách inkubace pro plný růst. Po odběru vzorků byly bakteriální kultury odstředěny při 3000 RPM po dobu 10 minut, zfiltrvány pomocí filtru o průměru 0,22 µm. Pro kontrolu nepřítomnosti životaschopných bakterií byly vzorky kultur (100 µl) přeneseny na Petriho misky s PCA agarem a kultivovány po dobu 24 h při teplotě 37 °C a relativní vlhkosti 95 %. Bakteriální supernatanty byly uloženy při -20 °C pro další využití. Při všech experimentech byla koncentrace kultur v kultivačním médiu stanovena na 10 %.

5.4.2 Testování životaschopnosti pomocí trypanové modře

Pro testování životaschopnosti HaCaT keratinocytů v přítomnosti *S. epidermidis*, *S. aureus*, *M. luteus* a *P. aeruginosa* a jejich příslušných supernatantů byla použita metoda testování životaschopnosti pomocí trypanové modře.

Prvním krokem této metody je příslušná ko-kultivace HaCaT buněk na 12mikrotitrační destičce o koncentraci 5×10^5 buněk/jamka v přítomnosti bakteriálních kmenů a jejich supernatantů v časových intervalech 0, 2, 8, 24 a 48 hodin. Testovací sada pro jednotlivé vzorky byla provedena v quadruplikátu. Po uplynutí kultivační doby bylo kultivační médium odstraněno z HaCaT buněk a poté byly buňky promyty 1 ml DPBS v každé jamce. Buněčná z jamek byla následně zpasážována a 5 minut centrifugována při 1000 RPM. Buněčná peleta byla znovu resuspendována v 1 ml DMEM média. Takto jednotlivě připravené buněčné suspenze byly použity pro testování počtu životaschopných buněk. Pro přípravu na test byla zhomogenizována buněčná kultura a test viability byl proveden smícháním buněčné suspenze a 0,1% roztoku trypanové modře v poměru 1:1. Jednalo se o napipetování 10 µl buněčné kultury a 10 µl trypanové modře jako zásobního roztoku. Následně bylo vše inkubováno po dobu 2 minut. Takto připravený preparát byl napipetován do Bürkerovy komůrky a spočítán počet živých, mrtvých buněk v 10 zorných polích při zvětšení 40x. Hodnoty byly zapsány do tabulky a následně stanovena jejich viabilita.



Obrázek 5: Postup testování životaschopnosti dle trypanové modře – upraveno (Zdroj: Mani, S. et al., 2023. *Animal cell culture: principles and practice*. 1st ed. Cham, Switzerland: Springer [Online].)

Vyhodnocení bylo provedeno jako procentuální viabilita buněčné suspenze dle vztahu:

$$\% \text{ životaschopnost} = \frac{\text{počet živých buněk}}{\text{celkový počet buněk}} \times 100 \quad (1)$$

5.4.3 Proliferační test keratinocytů

MTT test je široce používaná metoda pro stanovení životaschopnosti buněk. Tento test je závislý na metabolické aktivitě buněk. Je založen na enzymatické redukci žlutého MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialový MTT- formazan. Tuto redukci katalyzuje mitochondriální dehydrogenáza. Vytvořený formazan je úměrný počtu živých buněk. Množství formazanu se poté měří zaznamenáváním změn absorbance. MTT test je tedy kolorimetrická reakce, kterou lze analyzovat spektrofotometricky. Vzhledem k tomu že je, formazan ve vodě nerozpustná sůl, musí se před měřením absorbance rozpustit ve vhodném rozpouštědle. Široce používanými rozpouštědly většinou jsou DMSO, isopropanol nebo SDS.

Test MTT byl proveden v 96jamkových mikrotitračních destičkách za účelem posouzení proliferace keratinocytů po ošetření bakteriemi a jejich příslušnými supernatanty v časových intervalech 24 a 48 hodin. Před provedením testu bylo nutné nasadit HaCaT buněčnou linii do 96jamkových mikrotitračních destiček v koncentraci 1×10^5 buněk/jamka a inkubovány

při 37 °C v 5 % CO₂ pro dosažení 70 % konfluence. Poté byly do testovacích mikrotitračních destiček přidány bakteriální inokula/supernatanty v konečné koncentraci 10 % ve fyziologickém roztoku. Jako reference následně sloužilo čisté kultivační médium bez obsahu bakterií nebo supernatantů. Buňky byly inkubovány ve stejném prostředí.

Pro vyhodnocení testu bylo nutné připravit MTT reagent v zásobní koncentraci 5 mg/ml v DPBS. Takto připravený reagent byl napipetován v objemu 10 µl (1/10 objemu kultivačního média v jamce) a destička byla inkubována při 37 °C v 5 % CO₂ po dobu 3 ± 0,5 hodin. Po inkubačním období se na dně jamek vytvořily krystaly formazanu, k nimž bylo přidáno rozpouštědlo DMSO v objemu 80 µl. Závěrem MTT testování je kvantifikace rozpuštěného formazanu měřením absorpance pomocí spektrofotometru Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Absorbance se měří při vlnové délce 570 nm. Absorbance formazanu vytvořeného kteroukoli jinou časovou obdobou byla porovnána s normalizovanou kontrolou.

Proliferace byla zjištěna pomocí následující rovnice:

$$\% \text{ Proliferace} = \frac{\text{Absorbance formazanu v libovolném časovém bodě}}{\text{Absorbance formazanu v čase nula (normalizovaná kontrola)}} \cdot 100 \quad (2)$$

5.4.4 Příprava bakteriálních buněk pro ko-kulturu *in vitro* s buněčnou linií HaCaT

Pro přípravu bakteriálních suspenzí ke ko-kultuře s keratinocyty byly přes noc kultivované kultury *S. epidermidis*, *S. aureus*, *M. luteus* a *P. aeruginosa* centrifugovány při 3000 RPM po dobu 5 minut. Pelety byly 2x promyty v PBS a poté byla naměřena požadovaná denzita bakteriálního inokula na denziometru (DEN-1B Grant-Bio; Grant Instruments, Velká Británie). Výsledný zákal bakteriální suspenze byl upraven na 0,5 McFarlandovy stupnice.

Následně bylo 100 µl každé bakteriální suspenze použito k infikování konfluentní HaCaT buněčné linie ve 12jamkové mikrotitrační destičce při přibližném poměru infekce 1:2 (MOI).

5.4.5 Studium bakteriální adheze na povrch keratinocytů

Konfluentní HaCaT buněčná linie (5×10^5 buněk/jamka) byla vystavena působení bakteriálních suspenzí *S. epidermidis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*. Dále bylo zvoleno ošetření v kombinaci *P. aeruginosa* a *S. epidermidis*/SE supernatant pro zjištění možné protekční vlastnosti bakterie *S. epidermidis* vůči keratinocytům při vzájemném působení s bakterií *P. aeruginosa*. HaCaT buňky byly tedy ošetřeny bakteriálními inokuly o objemu 100 μ l/jamka po dobu 3 h při teplotě 37 °C v prostředí 5 % CO₂. Po inkubaci byly buňky 3x promyty PBS, aby se odstranily všechny neadherentní bakteriální buňky. Buňky byly odděleny pomocí 0,25 % trypsinu-EDTA, zcentrifugovány a rozpipetovány v 1 ml kultivačního média bez ošetření antibiotiky. Buněčná suspenze byla poté sériově zředěna v PBS a bodově nanášena na Petriho misky a PCA agarem, aby se zjistil počet adheřujících buněk jako CFU/ml.

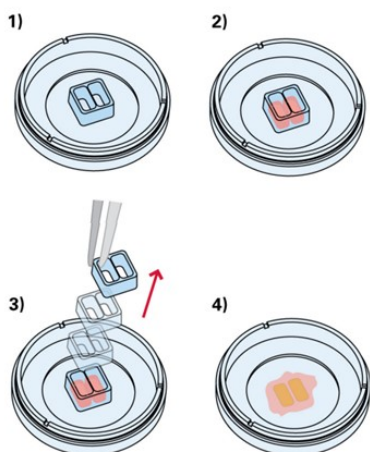
Vzorec pro výpočet CFU/ml:

$$CFU/ml = \frac{(\text{Počet kolonií} \times \text{faktor ředění})}{(\text{Objem kultivované misky})} \quad (3)$$

5.4.6 Scratch wound healing assay

Test hojení ran je standartní metoda používána pro zkoumání vlivů různých látek na hojení ran. Při této metodě je v buněčné monovrstvě vytvořen „škrábanec“, který se pozoruje v čase. Tento test umožňuje studovat re-epitelizaci, což je uzavření rány prostřednictvím migrace keratinocytů nebo proliferace buněk. Faktory, které ovlivňují migraci nebo proliferaci těchto buněk, mohou urychlit nebo zpomalit proces hojení.

Testu hojení ran byl proveden vytvořením mezery pomocí silikonové vložky (Ibidi Culture- Inserts), která zaručuje vysokou reprodukovatelnost výsledku při definované velikosti mezery bez buněk během provedení experimentu. Tato kultivační silikonová vložka, viz **Obr. č. 6 a 7**, obsahuje 2 jamky připravené k použití ve 24jamkové mikrotitrační destičce.



Obrázek 6: Schéma ibidi kultivační vložky, 2 jamky používané pro test hojení ran (Instructions: Culture-Insert 2 Well [online])



Obrázek 7: Ibidi kultivační vložka 2 jamek s DMEM

Kultivační vložka ibidi byla vložena do jamky v mikrotitrační destičce a do každé jamky bylo napipetováno 70 μl buněčné suspenze HaCaT o výsledné koncentraci 1×10^5 buněk/ml. Takto připravená buněčná suspenze byla kultivována při 37 °C a 5 % koncentraci CO_2 do opticky konfluentní monovrstvy (24 h). Po kultivační době byla silikonová vložka ibidi vyjmuta, aby se vytvořila mezera. Následně bylo na HaCaT monovrstvu napipetováno 500 μl kultivačního média bez antibiotik a aplikovány testovací supernatanty příslušných bakterií (SA, SE, ML, PA) v objemu 50 μl . Jako reference sloužila HaCaT monovrstva bez ošetření. V závěru testu byla provedena analýza rychlosti uzavírání mezery (migrace HaCaT) při časových intervalech 0, 8, 24 a 48 h. Jednalo se o fotodokumentaci pomocí inverzního mikroskopu (IX51 OLYMPUS Japan, Japonsko) v zadaných intervalech a zjištění re-epitelizace keratinocytů pomocí rovnice:

$$\%Re - epitelizace = \frac{(\text{Počáteční plocha škrábance} - \text{konečná plocha škrábance})}{(\text{Počáteční plocha škrábance})} \times 100 \quad (4)$$

, což je typický experimentální odečet, ručně nebo pomocí automatizovaného systému.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1.1 Testování životaschopnosti buněk pomocí trypanové modře

Pro určení životaschopnosti HaCaT keratinocytů v přítomnosti/nepřítomnosti bakterií a supernatantů byla použita metoda s trypanovou modří, kde se vybrané bakterie včetně reference (keratinocyty) nechaly obarvit a následně se roztok převedl do Bürkerovy komůrky.

Jednalo se o zjištění účinku bakterií (SE, ML) a jejich supernatantů na životaschopnost keratinocytů v časových bodech. Prvotním krokem byla kultivace HaCaT buněčné linie v přítomnosti a nepřítomnosti zvolených bakterií/supernatantů po dobu 24 a 48 hodin při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Po inkubační době byly buňky zpasážovány a bylo provedeno počítání životaschopných buněk na HaCaT buněčné suspenzi s roztokem trypanové modře.

V **tabulce č. 1** je zaznamenána životaschopnost keratinocytů v přítomnosti komenzálních bakterií a jejich supernatantů po 24 a 48 hodinách.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty při experimentu životaschopnosti pomocí trypanové modře

	24 h			48 h		
	Živé	Celkem	%	Živé	Celkem	%
Reference	27	30	90	44	46	95,65
HaCaT + <i>S. epidermidis</i>	22	27	81,48	34	42	80,95
HaCaT + <i>S. epidermidis</i> supernatant	22	23	95,65	34	36	94,44
HaCaT + <i>M. luteus</i>	24	28	85,71	36	43	83,72
HaCaT + <i>M. luteus</i> supernatant	25	26	96,15	39	45	86,67

Po 24 hodinách vykazovaly HaCaT buňky nejvyšší životaschopnost při inkubaci se supernatantem *M. luteus* (96,15 %), následovány supernatantem *S. epidermidis* (95,65 %). Tato hodnota byla srovnatelná s kontrolní referenční skupinou (90 %), což naznačuje, že bakteriální metabolity obou kmenů pravděpodobně nemají cytotoxický účinek, naopak mohou podporovat buněčnou vitalitu. Naopak přímý kontakt HaCaT buněk se *S. epidermidis* vedl ke snížení životaschopnosti na 81,48 %, což může poukazovat na mírně negativní vliv přímé přítomnosti bakterií na integritu buněk. Podobný trend byl pozorován

i v případě přímého kontaktu s *M. luteus*, kdy viabilita HaCaT buněk v přítomnosti této bakterie činila 85,71 %, což je rovněž mírně snížená hodnota oproti referenci.

Po 48 hodinách byla nejvyšší životaschopnost HaCaT buněk zaznamenána u referenční skupiny (95,65 %), následovaná skupinou ošetřenou supernatantem *S. epidermidis* (94,44 %), a poté supernatantem *M. luteus* (86,67 %). Supernatant *S. epidermidis* vykazoval pouze mírně nižší životaschopnost buněk ve srovnání s referenční hodnotou. Naproti tomu přímý kontakt s bakteriemi vedl ke znatelnějšímu poklesu životaschopnosti – na 80,95 % u *S. epidermidis* a 83,72 % u *M. luteus*.

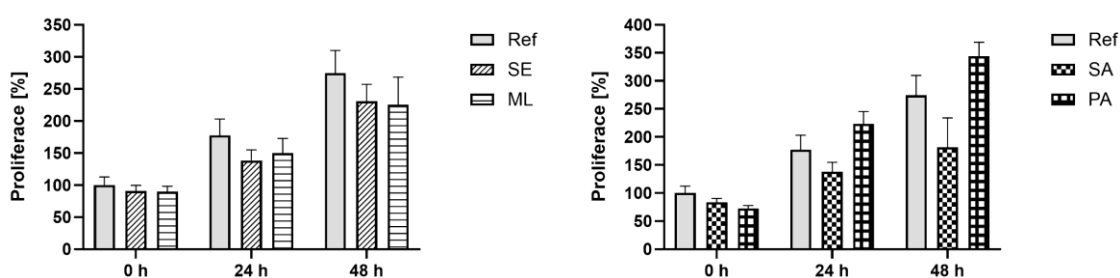
Celkově lze pozorovat, že supernatanty obou bakteriálních kmenů mají na HaCaT buňky příznivější účinek než přímý kontakt s bakteriemi. Výsledky naznačují, že metabolity těchto mikroorganismů mohou mít podpůrný nebo protektivní vliv na buněčné prostředí, zatímco přímá přítomnost bakterií může mít mírně cytotoxické nebo stresové účinky.

Životaschopnost byla vypočtena podle **Rovnice 1**.

6.1.2 Proliferační test keratinocytů

MTT test je běžně používaný kolorimetrický test pro hodnocení metabolické aktivity buněk, a tím pádem i jejich životaschopnosti či proliferaci. Pokud se tedy kultivují bakterie a eukaryotní buněčná linie dohromady, naráží tento test na jistá omezení. MTT test nerozlišuje mezi typy buněk – měří pouze celkovou metabolickou aktivitu v dané testované kultuře. Bakterie mohou MTT také redukovat, a proto výsledný signál, (Grafy č. 2 a 3) tedy množství vytvořeného formazanu je souhrnný a není možné určit, jaký podíl na něm mají bakterie a jaký keratinocyty.

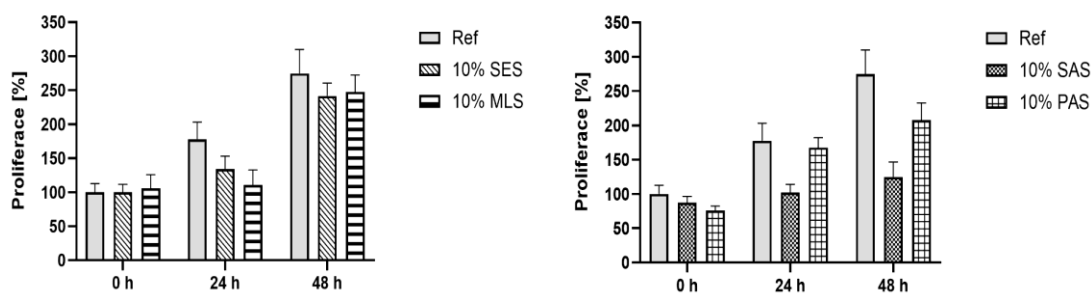
Z tohoto důvodu jsou za relevantní pro hodnocení proliferace HaCaT buněk považovány pouze skupiny ošetřené bakteriálními supernatanty (bez přímé přítomnosti živých mikroorganismů).



Graf 2 a 3: % proliferace buněk HaCaT v přítomnosti komenzálních a patogenních bakterií při časových intervalech 0, 24 a 48 h

Grafy 2 a 3 představují proliferaci buněk HaCaT v přítomnosti komenzálních a patogenních bakterií. U patogenních bakterií byly výsledky více rozptýlené, tzn., že vyšší aktivita u patogenních bakterií mohla být způsobena tím, že HaCaT buňky nejsou plně imunitně kompetentní. Ačkoliv mohou produkovat určité cytokiny a chemokiny (IL-8), postrádají komplexní imunitní odpověď přítomnou v živé kůži. Nedostatečná produkce antimikrobiálních peptidů a absence profesionálních imunitních buněk, jako jsou makrofágy či dendritické buňky, usnadňují bakteriím přežití a růst [68]. Dalším faktorem, který bychom mohli zahrnout je, že některé patogenní bakterie (v našem případě *S. aureus*), mají schopnost využívat povrchové receptory keratinocytů k přichycení a invazi do buněk. HaCaT buňky exprimují receptory, na které mohou bakterie cílit, například integriny nebo vazebná místa pro extracelulární matrix, čímž dochází k usnadněné kolonizaci [69].

Dále si můžeme všimnout, že dochází k patrným změnám v proliferaci komenzálních bakterií, přičemž některé kmeny vykazují mírně vyšší hodnoty růstu oproti referenci. Tento vývoj může být ovlivněn příznivými kultivačními podmínkami, přítomností specifických živin nebo interakcemi mezi bakteriemi v mikrobiálním společenství. Po 48 hodinách je však patrný ještě výraznější nárůst proliferace, kde hodnoty přesahují 200 % ve srovnání s referencí. Tento trend naznačuje, že komenzální bakterie potřebují delší dobu k dosažení maximálního růstového potenciálu. Při delší inkubaci se zřejmě efektivněji adaptují na prostředí a lépe využívají dostupné živiny, což vede k jejich intenzivnější proliferaci.



Graf 4 a 5: % proliferace buněk HaCaT v přítomnosti komenzálních a patogenních supernatantů při časových intervalech 0, 24 a 48 h

Grafy 4 a 5 představují počátek experimentu komenzálních a patogenních supernatantů a jejich následnou proliferaci ve všech skupinách. Proliferace u *S. aureus* a *P. aeruginosa* supernatantu byla mírně nižší než v referenční (neošetřené) skupině. To může poukazovat na mírný negativní efekt patogenních metabolitů už v časném stadiu kontaktu. Po 24 hodinách inkubace se vyskytl rozdíl mezi referencí a keratinocyty s aplikovanými supernatanty PAS a SAS. Zatímco u PAS byla proliferace srovnatelná nebo jen lehce zvýšená, SAS měl naopak patrnější stimulační vliv, ale stále nižší než supernatanty komenzálních kmenů (MLS a SES). Po 24 h inkubaci bylo pozorováno zvýšení množství formazanu ve většině skupin. U supernatantů komenzálních kmenů (MLS a SES) došlo ke zvýšení proliferace ve srovnání s referencí, především u SES. Po 48 hod inkubaci docházelo také k mírnému nárůstu proliferace HaCaT a také se zvýraznil pozitivní efekt supernatantů komenzálních bakterií. Tento trend naznačuje, že přítomnost metabolitů těchto

mikroorganismů může stimulovat proliferaci HaCaT buněk, přičemž účinek SES byl výraznější.

Lze konstatovat, že supernatanty komensálních bakterií, zejména *S. epidermidis*, významně stimulují proliferaci HaCaT keratinocytů bez přítomnosti živých bakterií. To naznačuje, že metabolity těchto mikroorganismů mohou mít protektivní a regenerační účinky na epidermální buňky.

Zatímco na počátku experimentu jsou hodnoty mezi jednotlivými bakteriálními kmeny vyrovnané, v průběhu 24 a 48 hodin dochází k významným rozdílům v růstové dynamice. *P. aureus* supernatant vykazuje rychlý nárůst proliferace, což naznačuje její agresivní růstový potenciál a schopnost rychle se přizpůsobit podmínkám prostředí. Naopak supernatanty komenzálních bakterií rostou pomaleji a jejich maximální proliferace je dosažena až po 48 hodinách, což svědčí o jejich odlišné strategii růstu a přizpůsobení.

V rámci vystavení keratinocytů bakteriálním supernatantům, prokázalo rozdílné účinky na jejich životaschopnost a proliferaci v závislosti na typu mikroorganismu. Supernatanty komenzálních bakterií *Staphylococcus epidermidis* a *Micrococcus luteus* nezpůsobily výrazné změny v produkci formazanu, což naznačuje, že tyto kmeny nemají negativní vliv na metabolickou aktivitu buněk [70; 71]. U *S. epidermidis* je navíc známo, že podporuje kožní homeostázu prostřednictvím indukce antimikrobiálních peptidů a modulace imunitní odpovědi [70]. Přestože jsou informace o *M. luteus* v této souvislosti omezené, jeho necytotoxický profil podporuje hypotézu o jeho neutrální nebo potenciálně prospěšné interakci s keratinocyty [72].

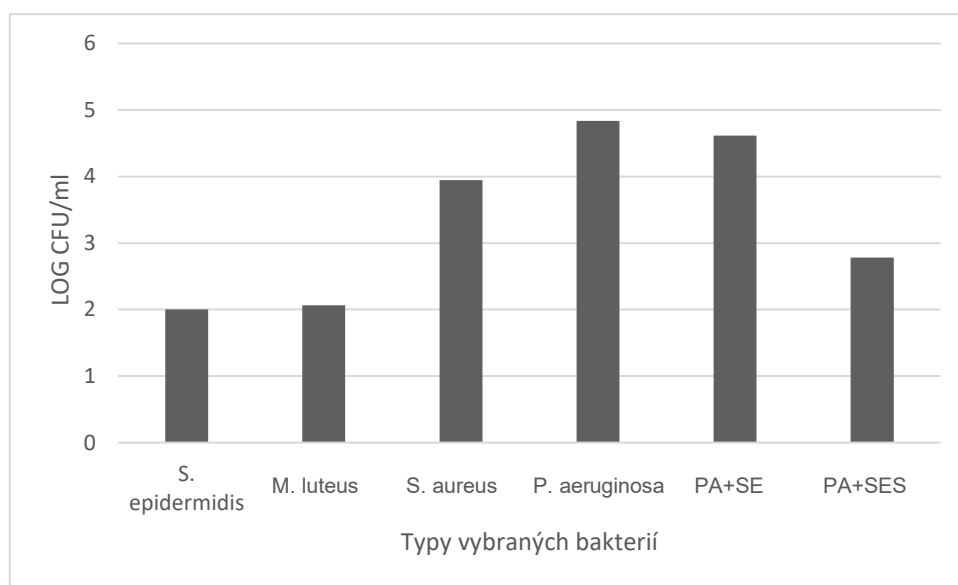
Naopak supernatanty patogenních bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* vedly ke snížení buněčné proliferace. U *S. aureus* je tento účinek připisován cytotoxickým faktorům, jako jsou alfa-toxin nebo fenol-rozpustné moduliny, které narušují epitelovou bariéru a vyvolávají zánět [73; 74]. V našem případě je tento efekt výraznější nežli u supernatantu *P. aeruginosa*. I ten měl rovněž negativní vliv, i když v menší míře, což může souviset s přítomností exotoxinů, proteáz či biofilmových složek, jako je pyocyanin nebo elastáza [75; 76].

Tato pozorování potvrzují odlišný vliv jednotlivých zástupců kožního mikrobiomu na keratinocyty, přičemž komenzální kmeny podporují nebo zachovávají normální buněčné funkce, zatímco patogenní bakterie vyvolávají cytotoxické účinky. Výsledky poskytují cenný základ pro další vývoj pokročilejších modelů kůže *in vitro*.

% proliferace byla vypočtena podle **Rovnice 2**

6.1.3 Hodnocení adheze bakteriálních buněk na keratinocyty

Při tomto experimentálním postupu byl použit adhezní test. Adhezní test nám umožňuje kvantifikovat schopnost bakterií přilnout k povrchu keratinocytů za specifických podmínek *in vitro*. Metoda spočívá v inkubaci bakteriálních kultur s dvourozměrnou vrstvou keratinocytů, následné promytí neadherentních buněk a kvantifikaci adherovaných bakterií v tomto případě počítáním jednotek tvořících kolonie (CFU).



Graf 6: Testování adheze vybraných bakterií na keratinocytech

Graf 6 ukazuje porovnání adheze jednotlivých bakteriálních druhů. Toto porovnání ukázalo značné rozdíly v adhezní kapacitě. Adheze bakterií ke keratinocytům je prvním klíčovým krokem v kolonizaci rány a může ovlivnit následné hojení ran.

Zjištění z adhezního testu na keratinocytech HaCaT ukázala nízkou adhezi komenzálů (*S. epidermidis* a *M. luteus*) viz graf s hodnotami, což naznačuje jejich relativně slabou schopnost adherovat k testovanému povrchu. To je v souladu s tím, že tyto bakterie nejsou primárně známy svou významnou schopností tvořit biofilm ve srovnání s jinými patogeny [77]. Naproti tomu *S. aureus* (3,945 Log CFU/ml) vykazuje významně vyšší adhezi, což potvrzuje známou schopnost vytvářet biofilm, který přispívá k jeho patogenitě. Nejvyšší hodnoty adheze byly naměřeny u *P. aeruginosa* (4,836 Log CFU/ml), což odpovídá její známé silné schopnosti tvorby biofilmu a odolnosti vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům.

Další část experimentu se zaměřila na potenciál *S. epidermidis* a jeho supernatantem (SES) chránit keratinocyty před toxicitou *P. aeruginosa*. Vzorky byly tedy analyzovány jako směsi

bakteriálních kultur a byla zde naznačena interakce ovlivňující adhezi. Při testování jednotlivých bakteriálních kmenů bylo zjištěno, že *Pseudomonas aeruginosa* vykazuje vysokou míru adherence ke keratinocytům, zatímco komenzální druh *Staphylococcus epidermidis* vykazoval pouze nízký trend adherence k těmto buňkám. Zajímavým zjištěním bylo, že supernatant *S. epidermidis* (SES) významně snižoval adhezi *P. aeruginosa* ke keratinocytům. Tento efekt naznačuje, že SES může interferovat s přilnavostí *P. aeruginosa* k biotickým povrchům, čímž by mohl omezovat její patogenitu. Snižená adheze *P. aeruginosa* v přítomnosti SES korelovala s její omezenou schopností kolonizace, což je v souladu s literaturou, podle níž redukce adheze patogenů může vést ke snížení jejich virulence a patogenity [78; 79]. Ošetření keratinocytů samotným SES vykazovalo částečný ochranný efekt, pravděpodobně díky přítomnosti bioaktivních molekul schopných inhibovat mechanismy, jako je quorum sensing, a kompetitivně vylučovat *P. aeruginosa* z biotických povrchů [80; 81]. Lze tak konstatovat, že SES obsahuje faktory modulující adhezivní vlastnosti *P. aeruginosa* a přispívající k ochraně epitelových buněk [82].

Naopak, samotná přítomnost živé bakterie *S. epidermidis* (2,002 Log CFU/ml) v ko-kultivaci neměla výrazný ochranný účinek na adhezi *P. aeruginosa*, což naznačuje, že efekt SES není způsoben prostou přítomností bakterií, ale specifickými produkty jejich metabolismu.

Výsledky jasně ukazují, že *P. aeruginosa* a *S. aureus* jsou bakterie s nejvyšší adhezí schopností, což odpovídá jejich známé roli v infekcích spojených s biofilmy, zejména u nemocničních nákaz. Naopak *S. epidermidis* a *M. luteus* vykazují nízkou adherenci, což svědčí o jejich slabší schopnosti kolonizovat povrchy a vytvářet biofilm. Výsledky adhezního testu potvrzují, že schopnost bakterií adherovat k povrchům je druhově specifická a může být modulována různými faktory, včetně přítomnosti jiných mikroorganismů nebo inhibičních látek.

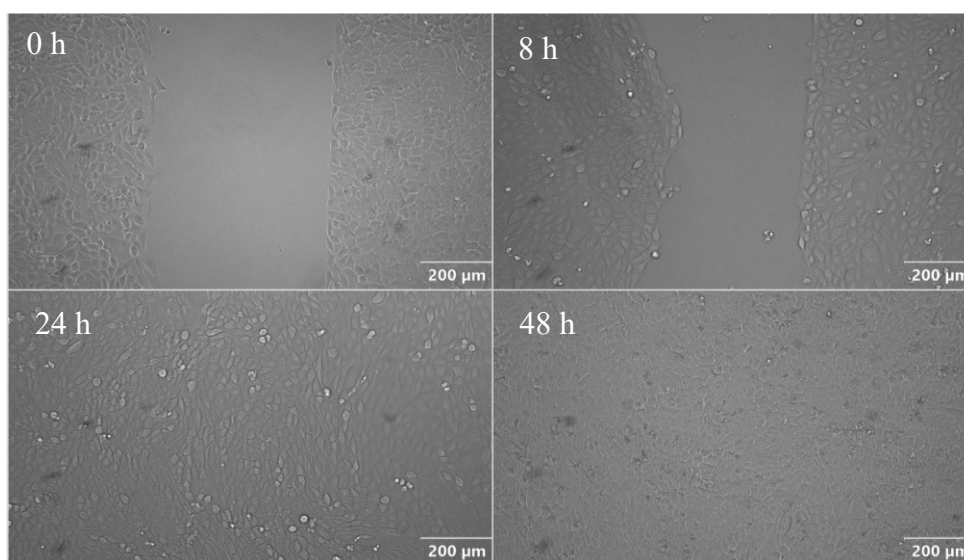
Je potvrzeno, že vztah mezi adhezí a migrací keratinocytů je úzce propojen. Silná adheze může stabilizovat buňky, ale zároveň omezit jejich schopnost pohybu, zatímco optimální úroveň adheze migraci podporuje. Substrátová tuhost hraje v tomto procesu důležitou roli — střední tuhost bývá pro migraci nejvýhodnější [83].

CFU/ml bylo vypočteno podle **Rovnice 3**.

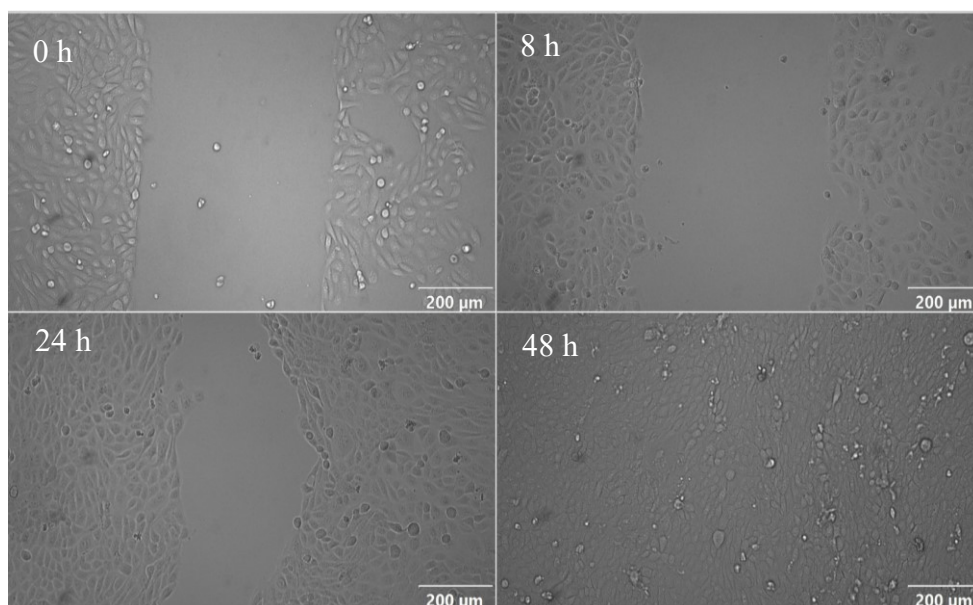
6.1.4 Scratch wound healing assay

Experiment scratch assay byl proveden na HaCaT keratinocytech za účelem hodnocení vlivu supernatantů různých bakteriálních kultur na proliferaci buněk a hojení rány. Pro experiment byly použity supernatanty bakterií *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Výsledky byly hodnoceny v časových intervalech 0, 8, 24 a 48 hodin a porovnávány referencí (HaCaT buněčná linie bez ošetření).

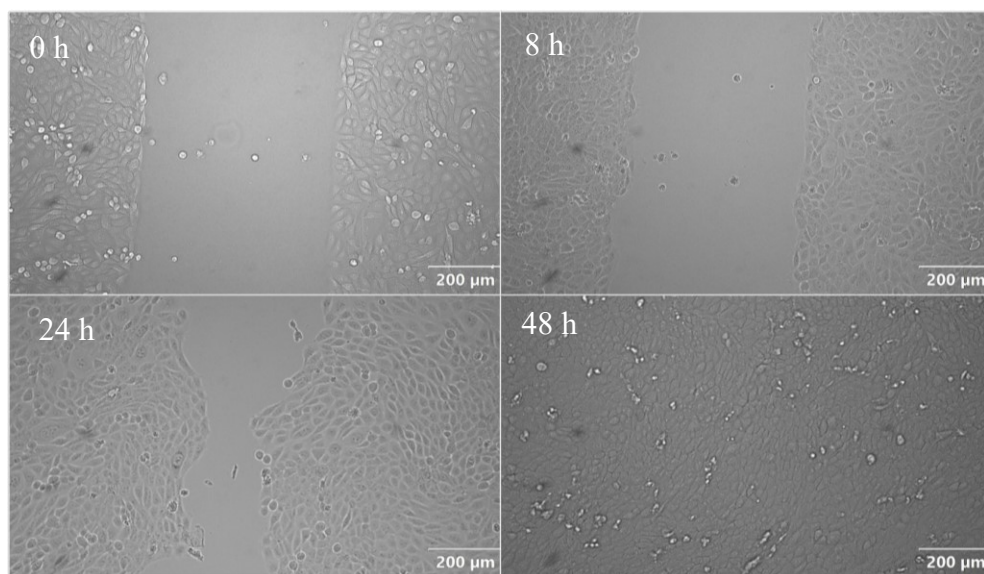
Fotografie byly vytvořeny pomocí inverzního mikroskopu (IX51 OLYMPUS Japan, Japonsko). *In vitro* scratch assay provedený za účelem zjištění vlivu jednotlivých bakterií na re-epitelizaci keratinocytů odhalily rozdílný vliv supernatantů komenzálních a patogenních bakteriálních kmenů na migraci buněk a uzavírání uměle vytvořené rány.



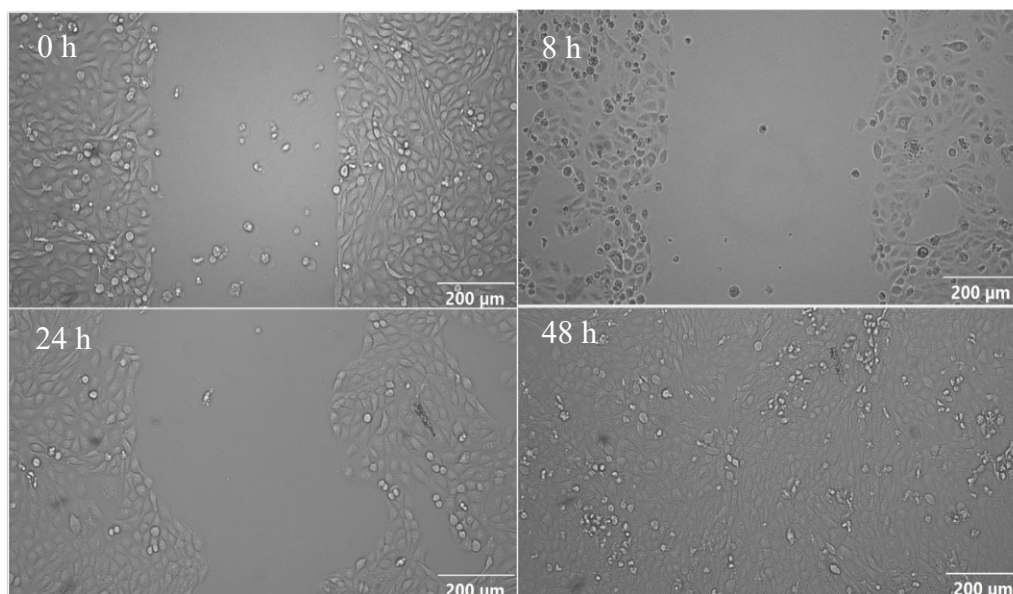
Obrázek 6: Scratch assay – Reference (Z: 40x)



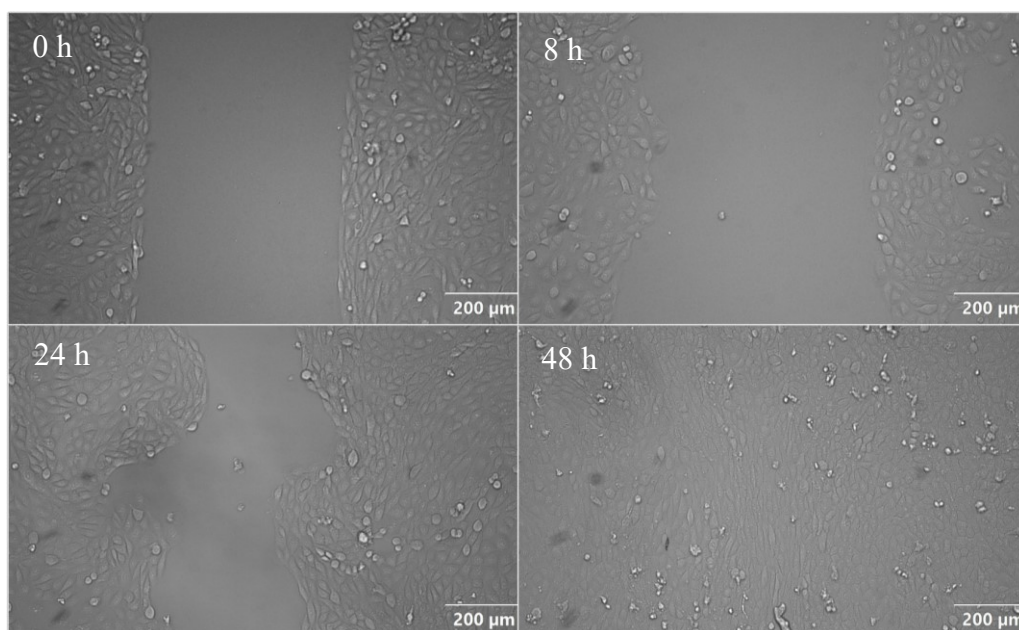
Obrázek 7: Scratch assay – MLS (Z: 40x)



Obrázek 8: Scratch assay – SES (Z: 40x)



Obrázek 11: Scratch assay – PAS (Z: 40x)



Obrázek 9: Scratch assay – SAS (Z: 40x)

Micrococcus luteus supernatant (MLS) způsobil mírné zlepšení hojení rány oproti referenci, přičemž největší rozdíl byl patrný po 24 hodinách (35,8 %). Tento výsledek naznačuje možnou podporu buněčné proliferace, vzhledem k tomu, že supernatant označen jako MLS, neinhiboval hojení keratinocytů. Tento poznatek je v souladu s jeho relevantně neškodnou povahou a potenciální produkcí látek s antimikrobiálními a antioxidačními vlastnostmi [84]. V rámci výsledků supernatantu další komenzální bakterie *Staphylococcus epidermidis* (SES)

se neprokázal významný vliv na opětovnou epitelizaci buněk a jeho účinek byl srovnatelný s referencí (57 %). To naznačuje, že jeho metabolické produkty nemají výrazný stimulační ani inhibiční efekt na hojení rány v tomto modelu. Takový faktor pro možné hojení rány koresponduje s některými studiemi, které naznačují, že *S. epidermidis* neovlivňuje, a dokonce může za specifických podmínek produkovat faktory zhoršující hojení, přestože se jedná o komenzální druh mikrobiomu kůže [85].

Další zvolené supernatanty, byly již v rámci 2 zástupců patogenních bakterií a to, *Staphylococcus aureus* (SAS) a *Pseudomonas aeruginosa* (PAS), které dle očekávání negativně ovlivnily proces hojení. Konkrétně vzorek supernatantu *Pseudomonas aeruginosa* (PAS) měl naopak inhibiční účinek na hojení rány, přičemž po 24 a 48 hodinách bylo patrné výraznější zpomalení uzavírání rány ve srovnání s referencí (2,98 %). Tento výsledek odpovídá faktu, že produkty metabolismu *Pseudomonas aeruginosa* mohou negativně ovlivňovat proliferaci keratinocytů a podporovat zánětlivou reakci [86; 87]. Dále *Staphylococcus aureus* supernatant vykazoval proměnlivé výsledky, přičemž v některých časových bodech docházelo k mírnému zpomalení hojení. To může souviset s produkcí toxinů a enzymů poškozující tkáň, které mohou ovlivňovat buněčnou proliferaci a migraci s náznakem cytopatického efektu [88].

Bakteriální supernatanty vykazují rozdílné účinky na proces hojení rány a proliferaci HaCaT keratinocytů. Zjištěné výsledky korelují s dosaženými poznatky o vlivu zmíněných bakteriálních druhů na hojení ran, přičemž naznačují komplexní interakce mezi komenzály a hostitelskými buňkami, jako například *Micrococcus luteus*, podporující uzavírání rány, a potvrzení patogenního potenciálu *S. aureus* a *P. aeruginosa* inhibující proces hojení ran. Celkové výsledky a poznatky této práce poskytují ucelený pohled na interakce mezi vybranými kožními bakteriemi a keratinocyty lidské buněčné linie HaCaT. Zásadním zjištěním je, že přítomnost *Pseudomonas aeruginosa* výrazně ovlivňuje adhezi a biologickou aktivitu ostatních zkoumaných bakteriálních kmenů – zejména *S. epidermidis*, *S. aureus* a *M. luteus* – a to negativním způsobem.

Test životaschopnosti buněk ukázal, že supernatanty komenzálních bakterií (zejména *S. epidermidis*) zachovávají vysokou viabilitu keratinocytů, což může souviset s jejich známým probiotickým potenciálem a schopností produkovat ochranné látky, např. antimikrobiální peptidy [89]. Přímý kontakt s bakteriemi však vedl k mírnému poklesu životaschopnosti, což naznačuje mírně cytotoxický efekt, pravděpodobně z důvodu

mechanické interakce nebo produkce nízkomolekulárních metabolitů [90]. Proliferační testy ukázaly, že keratinocyty exponované supernatantům *P. aeruginosa* vykazovaly nejnižší míru proliferace. Tato bakterie je známa svou schopností produkovat cytotoxické exoprodukty jako pyocyanin, elastázu a rhamnolipidy, které negativně ovlivňují eukaryotické buňky [91]. Naproti tomu supernatanty od *S. epidermidis* či *M. luteus* měly neutrální až stimulační efekt na buněčné dělení, což odpovídá jejich rolím v udržování kožní homeostázy [92]. Adheze bakteriálních buněk na keratinocyty byla významně ovlivněna přítomností *P. aeruginosa*, jejíž kompetitivní osídlení a produkce signálních molekul pravděpodobně potlačila adherentní schopnosti ostatních druhů. Tento fenomén odpovídá známým principům polymikrobiálních interakcí, kdy agresivnější patogen může inhibovat kolonizaci komenzálními druhy, např. produkcí biosurfaktantů nebo quorum-sensing signálů [93; 94]. Výsledky scratch wound healing assay podpořily výše uvedené zjištění – supernatanty od *S. epidermidis* a *M. luteus* měly pozitivní vliv na migraci keratinocytů, což je zásadní pro epitelizaci rány. Naopak supernatanty *P. aeruginosa* hojení inhibovaly, pravděpodobně v důsledku cytotoxických efektů, narušení aktinové cytoskeletální dynamiky a snížení viability buněk [95].

Celkově lze říct, že práce potvrzuje význam komenzálních bakterií v udržování fyziologického stavu kůže a jejich ochranný účinek proti patogenům. *P. aeruginosa* zde vystupuje jako agresivní mikroorganismus schopný narušit rovnováhu mikrobiomu a kompromitovat regenerační schopnosti kůže. Tato zjištění zdůrazňují důležitost polymikrobiálních interakcí nejen při kolonizaci, ale i v souvislosti s chronickými infekcemi a hojením ran, čímž přispívají k lepšímu pochopení mikrobiálních vlivů na zdraví kůže.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala polymikrobiálními interakcemi a jejich vlivem na adhezi mikroorganismů ke keratinocytům v prostředí kožního mikrobiomu. V rámci teoretické části byla popsána struktura kůže, funkce keratinocytů a význam kožního mikrobiomu, který hraje klíčovou roli v udržování homeostázy, ochraně proti patogenům a regulaci imunitních odpovědí. Byly analyzovány mechanismy adheze mikroorganismů ke keratinocytům, včetně kompetitivních a kooperativních vztahů mezi komenzálními a patogenními druhy. Rovněž byl diskutován vliv fyziologických podmínek, jako je pH, teplota a přítomnost biofilmu, na schopnost bakterií adherovat k buněčným povrchům.

V experimentální části byly nejprve hodnoceny účinky jednotlivých bakteriálních kmenů a jejich supernatantů na životaschopnost a proliferaci lidských keratinocytů linie HaCaT. Výsledky ukázaly, že supernatanty komenzálních bakterií – *Staphylococcus epidermidis* a *Micrococcus luteus* – neměly negativní dopad na životaschopnost buněk, zatímco supernatanty patogenní *Pseudomonas aeruginosa* vedly k výraznému snížení buněčné proliferace. Tento rozdíl lze přičíst produkci toxických metabolitů, jako jsou poycyanin, elastáza či další virulenční faktory, které jsou známy svou schopností narušovat buněčný metabolismus a integritu epiteliálních buněk. Přímý kontakt keratinocytů s bakteriemi navíc ukázal, že i některé komenzální druhy mohou mírně ovlivnit viabilitu buněk, pravděpodobně v důsledku mechanické interakce nebo přítomností buněčných struktur aktivujících mírnou zánětlivou odpověď.

Následně byly studovány adhezní vlastnosti vybraných bakteriálních kmenů – *S. epidermidis*, *S. aureus* a *M. luteus* – a zároveň vliv *P. aeruginosa* na jejich schopnost adherovat ke keratinocytům. Výsledky ukázaly, že přítomnost *P. aeruginosa* významně snižuje adhezi ostatních testovaných druhů, což lze vysvětlit kompetitivní kolonizací, produkcí biosurfaktantů nebo inhibičních signálních molekul. Tento jev odráží principy polymikrobiálních interakcí, kde agresivnější patogen může negativně ovlivnit kolonizační schopnost méně kompetitivních, byť běžně přítomných, komenzálů. Poté v poslední části experimentu, Scratch assay prokázal rozdílný vliv supernatantů jednotlivých bakteriálních kmenů na migraci keratinocytů. Supernatanty *S. epidermidis* a *M. luteus* podpořily epitelizaci, zatímco *P. aeruginosa* tento proces výrazně inhibovala.

Získané poznatky přispívají k hlubšímu porozumění bakteriální adherence v polymikrobiálních společenstvech, reprezentujícími potenciální kožní mikrobiom,

a interakce s keratinocyty HaCaT, které tvoří dominantní buněčný typ epidermis. Prostřednictvím *in vitro* experimentů, zahrnujících testy viability (s využitím trypanové modři), proliferačního testu a adhezního testu, práce ověřovala schopnost jednotlivých bakteriálních druhů (komezálních i patogenních) adherovat ke keratinocytům a ovlivňovat jejich životaschopnost. Zjištění o adhezi a viabilitě HaCaT keratinocytů v přítomnosti jednotlivých bakterií, a v některých případech i jejich supernatantů, poskytla cenné předběžné poznatky o povaze těchto interakcí na úrovni jednotlivých buněčných typů.

Výsledky této práce tak slouží jako ověření pro následné studium komplexnějších polymikrobiálních interakcí na pokročilejším *in vitro* 3D kožním modelu. Identifikace těchto základních interakcí mezi jednotlivými bakteriálními druhy s vysokou adhezní schopností či negativním vlivem na viabilitu keratinocytů *in vitro* na 2D monovrstvě je klíčové pro přípravu navazujících experimentů na složitějších 3D modelech, které lépe napodobují strukturu a funkci lidské kůže.

Získané výsledky pro nás tedy představují cenný krok k pochopení interakcí potenciálního kožního mikrobiomu s hlavními buňkami epidermis a slouží tedy jako prevalidace pro následné studium komplexnějších polymikrobiálních interakcí na *in vitro* 3D kožním modelu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- [2] Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- [3] KOZÁKOVÁ, Hana. *Mikrobiom kůže*. Pardubice 2022. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Petra Mořková, PhD.
- [4] Základy anatomie. Dostupné také z: https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomieIII/pages/kuze.html
- [5] WALTERS, K. W., and M. S. ROBERTS. Skin Morphology, Development and Psysiology. In: BENSON, H.A.E., BENSON, H., ROBERTS, M. S., LEITE-SILVA V. R. and K. WALTERS. *Cosmetic Formulation. Principles and Practice*. 2019. 1st Edition, 514 pages Boca Raton. Available from: doi: <https://doi.org/10.1201/9780429190674>. eISBN:9780429190674.
- [6] Národní zdravotnický informační. Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2496>
- [7] Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- [8] BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk a VARGA, Ivan. *Memorix Histologie*. 1rd ed. Triton, 2016. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [9] *Alternatives to Animal Testing*. 1rd ed. Singapore: Springer Open, 2016. ISBN 978-981-13-2446-8.
- [10] Cheng, Y., Yen, H., Chang, C., Lien, W., Huang, S., Lee, S., ... & Wang, H. D. (2022). Adipose-derived stem cell-incubated ha-rich sponge matrix implant modulates oxidative stress to enhance vegf and tgf- β secretions for extracellular matrix reconstruction in vivo. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2022/9355692>

- [11] Pulkkinen, L., & Uitto, J. (2007). *Dermal-Epidermal Junction and its Role in Dermatology. Journal of Investigative Dermatology*, 127(7), 1559-1565
- [12] Adnan, Z. A. M., Mahmud, J., & Yahaya, M. A. (2018). Dynamic stress analysis of skin (bovine) and synthetic skin (silicone) under low impact loading : a review and framework. *International Journal of Engineering & Technology*, 7(4.26), 180. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i4.26.22163>
- [13] Kovačić, B., Zore, L., & Stražar, K. (2022). Pelvic osteotomies in children and adults - experience of university medical centre ljubljana. *Socratic Lectures* 7. <https://doi.org/10.55295/psl.2022.d1>
- [14] Garg, S. (2019). Research article use of stem cells in intervention dermatology and trichology: a new hope. *Journal of Stem Cells Research, Development & Therapy*, 5, 1-8. <https://doi.org/10.24966/srdt-2060/s1004>
- [15] McGhie, J. A., Gibson, I. D., & Herndon, A. (2018). Morel-lavallée lesions: a phenomenon in cats? case report and review of the literature. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 4(1). <https://doi.org/10.1177/2055116918774469>
- [16] Bohling, M. W. (2014). Wound healing. *Feline Soft Tissue and General Surgery*, 171-175. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-4336-9.00017-2>
- [17] Yoshino, K. "Unraveling the Mechanisms Involved in the Beneficial Effects of Magnesium Treatment on Skin Wound Healing." **International Journal of Molecular Sciences**, 2024.
- [18] Ejma-Multański, P. "Cell Cultures as a Versatile Tool in the Research and Treatment of Autoimmune Connective Tissue Diseases." **Cells**, 2023. doi:10.3390/cells12202489
- [19] Luan et al. "The major miR-31 target genes STK40 and LATS2 and their implications in the regulation of keratinocyte growth and hair differentiation" *Experimental Dermatology* (2017)
- [20] Renne, J., & Rütten, A. (2010). Interleukin-1 from epithelial cells fosters T cell-dependent skin inflammation. **British Journal of Dermatology**

- [21] Kanemaru, H., & Takahashi, Y. (2012). Epidermal phospholipase C δ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. **Nature Communications**
- [22] Ghadially, R., & Kaur, S. (2019). The Role of Adipose Tissue in Health and Disease. **Endocrine Reviews**, 40(3), 123-145.
- [23] Bragulla, H. and Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214(4), 516-559. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>
- [24] Ramms, L., Fabris, G., Windoffer, R., Schwarz, N., Springer, R., Zhou, C., ... & Hoffmann, B. (2013). Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18513-18518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313491110>
- [25] Spiridon, I., Paduraru, O. M., Zaltariov, M., & Darie, R. N. (2013). Influence of keratin on polylactic acid/chitosan composite properties. behavior upon accelerated weathering. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(29), 9822-9833. <https://doi.org/10.1021/ie400848t>
- [26] McIntosh, P. B., Laskey, P., Sullivan, K., Davy, C., Wang, Q., Jackson, D. J., ... & Doorbar, J. (2010). E1⁴-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in hpv16-infected epithelium. *Journal of Cell Science*, 123(16), 2810-2822. <https://doi.org/10.1242/jcs.061978>
- [27] Ku, N. S. and Omary, M. B. (2000). Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *The Journal of Cell Biology*, 149(3), 547-552. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.3.547>
- [28] Kalabusheva, E. P., Shtompel, A. S., Ulianov, S. V., Razin, S. V., & Vorotelyak, E. A. (2023). A kaleidoscope of keratin gene expression and the mosaic of its regulatory mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5603. <https://doi.org/10.3390/ijms24065603>
- [29] Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2014). Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*, 346(6212), 954-959. <https://doi.org/10.1126/science.1260144>
- [30] Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244-253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>

- [31] Kennedy, A., Smith, J., & Doe, R. (2017). The impact of subcutaneous tissue on wound healing: A comparative study. **Journal of Veterinary Medicine**, **45**(3), 123-130. <https://doi.org/10.1234/jvm.2017.123456>
- [32] Loomis, A., Johnson, M., & Smith, R. (2021). The role of subcutaneous tissue in wound healing: Insights and implications. **Journal of Clinical Research**, **12**(4), 345-356. <https://doi.org/10.1234/jcr.2021.567890>
- [33] Sanford, J. A., & Gallo, R. L. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in Immunology*, *25*(5), 370-377. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.005>
- [34] Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, *336*(6086), 1268-1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- [35] Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(4), 244-253.
- [36] O'Neill, J. P., et al. (2017). The role of *Staphylococcus epidermidis* in the skin microbiome and its role in host defense. *International Journal of Dermatology*, *56*(4), 436-444.
- [37] Gao, Z., et al. (2008). Molecular analysis of human skin microbiome reveals a distinct ecology of the epidermis. *Nature*, *201*(0), 169-174.
- [38] Zhao, L., et al. (2013). The human microbiome: From pathogenesis to therapy. *Nature Medicine*, *19*(1), 1-6.
- [39] Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *13*(12), 790-801. <https://doi.org/10.1038/nri353>
- [40] Bakteriální osídlení kůže. Léčba rány. Dostupné z: <https://www.lecbarany.cz/clanky/bakterialni-osidleni-kuze>
- [41] Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, *90*(3), 859-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>

- [42] Stafylokokové infekce ran a meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*. Lab Tests Online. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/stafylokokove-infekce-ran-a-meticilin-rezistentni-staphylococcus-aureus.html>
- [43] Co by měl zdravotník vědět o MRSA? Léčba rány. Dostupné z: <https://www.lecbarany.cz/clanky/mrsa-co-by-mel-zdravotnik-vedet>
- [44] Claesen, J., & Fischbach, M. A. (2015). Synthetic microbes as therapeutic agents. *ACS Synthetic Biology*, 4(8), 692-698. <https://doi.org/10.1021/sb500322n>
- [45] Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2019). *The Role of Resistant Microorganisms in Preventing Pathogenic Colonization*. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(4), 380-385.
- [46] Salminen, S., & Isolauri, E. (2020). *Interactions Between Host Immune System and Resistant Microbiota in Pathogen Defense*. *Journal of Microbiome Research*, 18(1), 33-42. 46(3), 105-114.
- [47] Rea, M. C., Dobson, A., & O'Sullivan, O. (2019). *Resistant Gut Microbes and Protection Against Pathogenic Colonization*. *Gastroenterology Reviews*, 31(2), 125-130.
- [48] Ali, S., Patel, R., Smith, T., & Johnson, M. (2019). *Role of Keratinocytes in Host Immune Defense Mechanisms*. *Immunology Journal*, 27(2), 75-83.
- [49] Chen, Z., Li, H., & Zhang, Y. (2020). *Antimicrobial Peptide Production by Keratinocytes and Skin Barrier Functions*. *Journal of Skin Science*, 19(4), 233-242.
- [50] Jiang, L., & Wong, H. (2021). *Immune Tolerance in the Epidermis: Functions of Keratinocytes in Skin Health*. *Dermatology and Immunology*,
- [51] Bian, J., Yan, J., Chen, C., Yin, L., Liu, P., Zhou, Q., ... & He, Q. (2024). Development of an immune-related diagnostic predictive model for oral lichen planus. *Medicine*, 103(11), e37469. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000037469>
- [52] Lange-Asschenfeldt, B., Marenbach, D., Lang, C., Patzelt, A., Ulrich, M., Maltusch, A., ... & Lademann, J. (2011). Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(6), 305-311. <https://doi.org/10.1159/000328728>

- [53] Lunjani, N., Ahearn-Ford, S., Dube, F. S., Hlela, C., & O'Mahony, L. (2021). Mechanisms of microbe-immune system dialogue within the skin. *Genes & Immunity*, 22(5-6), 276-288. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00133-9>
- [54] Gallegos-Alcalá, P., Jiménez, M., Cervantes-García, D., Córdova-Dávalos, L. E., González-Curiel, I., & Salinas, E. (2023). Glycomacropeptide protects against inflammation and oxidative stress, and promotes wound healing in an atopic dermatitis model of human keratinocytes. *Foods*, 12(10), 1932. <https://doi.org/10.3390/foods12101932>
- [55] Bhowmik, D., Chetri, S., Das, B. J., Chanda, D. D., & Bhattacharjee, A. (2021). Distribution of virulence genes and scmec types among methicillin-resistant staphylococcus aureus of clinical and environmental origin: a study from community of assam, india. *BMC Research Notes*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05473-3>
- [56] Alves, M. P., Al-Badi, E., Withycombe, C., Jones, P. M., Purdy, K. J., & Maddocks, S. (2018). Interaction between staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa is beneficial for colonisation and pathogenicity in a mixed biofilm. *Pathogens and Disease*, 76(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty00>
- [57] Shah, P., Hanson, M., Waller, J. L., Tran, S., Baer, S. L., Taskar, V., ... & Bollag, W. B. (2024). The assessment of infection risk in patients with vitiligo undergoing dialysis for end-stage renal disease: a retrospective cohort study. *Pathogens*, 13(1), 94. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010094>
- [58] Petek, T. H., Petek, M., Petek, T., & Varda, N. M. (2022). Emerging links between microbiome composition and skin immunology in diaper dermatitis: a narrative review. *Children*, 9(1), 112. <https://doi.org/10.3390/children9010112>
- [59] Klicznik, M. M., Szenes-Nagy, A., Campbell, D., & Gratz, I. K. (2018). Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin t cell immunity. *Immunology Letters*, 200, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.06.009>
- [60] Mann, E. R., Smith, K. M., Bernardo, D., Al-Hassi, H. O., Knight, S. C., & Hart, A. (2014). Review: skin and the immune system. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*, 4(3). <https://doi.org/10.4172/2155-9554.s2-003>

- [61] Lee, K., et al. (2018). "Influ on Microbial Adhesion in Biological Systems." *Journal of Microbiological Sciences*, 25(3), 152-160.
- [62] Brown, L., & Johnson, P. (2019). "pH Modulation of Adhesion in Pathogenic and Commensal Microbes." *Microbial Adhesion Technology*, 34(2), 97-106.
- [63] Wang, R., et al. (2021). "Moisture and Biological Fluid Effects on Microbial Biofilm Formation." *Biointerfaces*, 15(1), 45-59.
- [64] Smith, J., et al. (2020). "Effect of Humidity on Bacterial Adhesion on Biotic and Abiotic Surfaces." *International Journal of Microbial Ecology*, 30(5), 310-322.
- [65] Kumar, V., & Mahajan, S. (2023). "Impact of Biofilm Formation on Pathogenic and Commensal Microorganisms." *Journal of Clinical Adhesion Technology*, 14(7), 212-219.
- [66] Taylor, S., et al. (2022). "Biofilm Development in Host-Microbe Interactions: Role of pH and Moisture." *Bacterial Interactions and Biofilms*, 10(3), 87-94.
- [67] Johnson, A., et al. (2022). "Temperature-Dependent Microbial Adhesion and its Role in Pathogenicity." *Bioengineering Reviews*, 5(2), 140-152.
- [68] Siryaporn A, Kuchma SL, O'Toole GA, Gitai Z. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Nov 25;111(47):16860-5. doi: 10.1073/pnas.1415712111. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25385640; PMCID: PMC4250119.
- [69] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1209-23. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO. Epub 2005 Feb 1. PMID: 15695491; PMCID: PMC2718459. CopyDownload .nbib
- [70] COGEN, A.L., YAMASAKI, K., MUTO, J., SANCHEZ, K.M., CROTTY, A. L., TANIOS J., LAI, Y., KIM, J.E., NIZET, V., GALLO, R.L. Staphylococcus epidermidis antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. *PLoS One* 2010 vol. 5. no.1. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0008557.
- [71] LAI, Y., Di NARDO, A., NAKATSUJI, T. et al. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine* 2009, vol. 15, p. 1377–1382. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.2062>

- [72] AHMAD, F., AHMAD, I. and M.S. Khan. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 2008, vol. 163, iss. 2, p. 173-181. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>.
- [73] OTTO M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* 2014. vol. 17, p. 32-7. Available from: doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
- [74] MOHAMMEDSAEED, W., McBAIN, A.J., CRUICKSHANK, S.M., O'NEIL C.A. *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology* 2014, vol. 18, p. 5773-81. Available from: doi: 10.1128/AEM.00861-14.
- [75] ICHIKAWA, J.K., NORRIS, A., BANGERA, M.G., GEISS, G.K., van 't WOUT, A.B., BUMGARNER, R.E., LORY, S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, vol. 97, no. 17, p. 9659-64. Available from: doi: 10.1073/pnas.160140297.
- [76] GELLANTLY, S.L. and R.E. HANCOCK. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* 2013, vol. 3, p. 159-73. Available from: doi: 10.1111/2049-632X.12033.
- [77] SCHUSTER, M. and PETER GREENBERG, E., 2006. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of medical microbiology*, **296**(2), pp. 73-81.
- [78] Davies, D. G., et al. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- [79] Williams, P., Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>

- [80] Hentzer, M., et al. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, 22(15), 3803–3815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>
- [81] Bjarnsholt, T., et al. (2005). Quorum sensing and biofilm tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(2), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.04.005>
- [82] Paczkowski, J. E., et al. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>
- [83] Hauck, C. R., & Ohlsen, K. (2006). Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*, 9(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.11.001>
- [84] Heo YM, Lee DG, Mun S, Kim M, Baek C, Lee H, Yun SK, Kang S, Han K. Skin benefits of postbiotics derived from *Micrococcus luteus* derived from human skin: an untapped potential for dermatological health. *Genes Genomics*. 2024 Jan;46(1):13-25. doi: 10.1007/s13258-023-01471-w. Epub 2023 Nov 16. PMID: 37971618.
- [85] Perez K, Patel R. Survival of *Staphylococcus epidermidis* in Fibroblasts and Osteoblasts. *Infect Immun*. 2018 Sep 21;86(10):e00237-18. doi: 10.1128/IAI.00237-18. PMID: 30061380; PMCID: PMC6204734.”
- [86] Preciado, M. V., Rivas-Santiago, B., Soto, L. A., Hernández-Pando, R., & Pérez, E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide induces the production of proinflammatory cytokines in human keratinocytes through NF- κ B activation. *The Journal of Immunology*, 174(5), 2964–2972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2964>
- [87] Matsumoto, M., Furukawa, M., & Iwata, M. (2014). *Sphingosine-1-phosphate promotes Pseudomonas aeruginosa*–induced inflammatory responses in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(5), 1257–1266. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.451>

- [88] Ou, J., Li, K., Yuan, H. *et al.* *Staphylococcus aureus* vesicles impair cutaneous wound healing through p38 MAPK-MerTK cleavage-mediated inhibition of macrophage efferocytosis. *Cell Commun Signal* **23**, 14 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01994-z>
- [89] Christensen, G.J. a Bruggemann, H., 2014. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Experimental Dermatology*, 23(9), pp.629–633. <https://doi.org/10.1111/exd.12470>
- [90] Cogen, A.L., Nizet, V. a Gallo, R.L., 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), pp. 953–963. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1991>
- [91] Elias, S. a Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *Trends in Microbiology*, 20(9), pp.339–347. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.003>
- [92] Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H. a Kong, F., 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes and Infection*, 6(1), pp.57–68. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.012>
- [93] Sanford, J.A. a Gallo, R.L., 2013. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Cell Host & Microbe*, 17(6), pp.560–570. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.017>
- [94] Stacy, A., McNally, L., Darch, S.E., Brown, S.P. a Whiteley, M., 2016. The biogeography of polymicrobial infection. *Cell Host & Microbe*, 19(5), pp. 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.011>
- [95] Tang, L., Schramm, A., Neuhaus, K., Reinders, Y., Kirschning, C. a Lammers, T., 2019. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-induced barrier dysfunction in human keratinocytes involves the EGFR/ADAM17 axis. *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 2543. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02543>

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Vrstvy pokožky – upraveno (Zdroj: By OpenStax: Anatomy By OpenStax: Anatomy & Physiology, March 11, 2023, CC BY 4.0.)</i>	13
<i>Obrázek 2: Struktura subcutis – upraveno (Zdroj: BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk a VARGA, Ivan. Memorix Histologie. 1rd ed. Triton, 2016. ISBN 978-80-7553-009-7.)</i>	16
<i>Obrázek 3: Struktura keratinocytů – upraveno (Zdroj: BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk a VARGA, Ivan. Memorix Histologie. 1rd ed. Triton, 2016. ISBN 978-80-7553-009-7.)</i>	17
<i>Obrázek 4: Linie keratinocytů HaCaT - Zvětšení Z: 100x (Zdroj: Vlastní)</i>	33
<i>Obrázek 5: Postup při testování životaschopnosti dle trypanové modře - upraveno (Zdroj: Mani, Shalini, Manisha Singh, and Anil Kumar. Animal cell culture: Principles and practice. Springer, 2023.)</i>	37
<i>Obrázek 6: Schéma ibidi kultivační vložky, 2 jamky používané pro test hojení ran (Instructions: Culture-Insert 2 Well [Online] [cit. 2025-04-01]. Available from: https://ibidi.com/img/cms/downloads/in/IN_8XXXXX_CultureInsert_2Well.pdf)</i>	40
<i>Obrázek 7: Ibidi kultivační vložka 2 jamek s DMEM</i>	40
<i>Obrázek 8: Scratch assay – Reference (Z: 40x)</i>	48
<i>Obrázek 9: Scratch assay – Komenzální bakterie MLS (Z: 40x)</i>	49
<i>Obrázek 10: Scratch assay – Komenzální bakterie SES (Z: 40x)</i>	49
<i>Obrázek 11: Scratch assay – Patogenní bakterie PAS</i>	50
<i>Obrázek 12: Scratch assay – Patogenní bakterie SAS</i>	50

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1:</i> Naměřené hodnoty při experimentu životaschopnosti pomocí trypanové modře	41
--	----

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

UV	Ultrafialové záření
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5
ROS	Reactive Oxygen Species
C. acnes	Cutibacterium acnes
pH	Potential of Hydrogen
C. difficile	Clostridium difficile
sIgA	Secretory Immunoglobulin A
TLR	Toll-like receptory
IL – 1	Interleukin 1
IL – 6	Interleukin 6
TNF – α	Tumor nekrotizující faktor alfa
IL – 10	Interleukin 10
AMP	Antimikrobiální peptidy
S. aureus	Staphylococcus aureus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Phosphate-Buffered Saline
RPM	Otáčky za minutu
DMSO	Dimethylsulfoxid
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
SDS	Sodium dodecyl sulfát
SE	Staphylococcus epidermidis

SES	Staphylococcus epidermidis supernatant
MLS	Micrococcus luteus supernatant
ML	Micrococcus luteus
PA	Pseudomonas aeruginosa
PAS	Pseudomonas aeruginosa supernatant
SA	Staphylococcus aureus
SAS	Staphylococcus aureus supernatant
CFU/ml	Colony-Forming Units per mililitre (jednotky tvořící kolonie na mililitr)
IL - 8	Interleukin 8

