

Topická probiotika v péči o pokožku jako stabilizátory emulzí

Bc. Valeriia Usynina

Diplomová 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 DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Valeriia Usynina
Osobní číslo: T23480
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Topická probiotika v péči o pokožku jako stabilizátory emulzí

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Zpracujte literární rešerši na zadané téma.

Věnujte se především probiotikům a jejich účinku na pokožku.

Zaměřte se na kožní mikrobiom a možnosti jeho ovlivnění.

Diskutujte využití probiotických mikroorganismů jako stabilizátorů emulzí.

Praktická část:

V praktické části práce charakterizujte probiotické mikroorganismy jako stabilizátory.

Vhodnými metodami stanovte fyzikálně-chemické vlastnosti probiotik.

Probiotické mikroorganismy použijte pro stabilizaci emulzí a jejich vlastnosti srovnajte.

Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] De Almeida, C.V.; Antiga, E.; Lulli, M. Oral and Topical Probiotics and Postbiotics in Skincare and Dermatological Therapy: A Concise Review. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1420.
- [2] Nejadmansouri, M., Eskandari, M.H., Yousefi, G.H. *et al.* Promising application of probiotic microorganisms as Pickering emulsions stabilizers. *Sci Rep* **2023**, *13*, 15915.
- [3] Zhang, L., Hu, Y., Jiang, L., & Huang, H. Microbial Encapsulation and Targeted Delivery Mechanisms of Double Emulsion Loaded with Probiotics — A State-of-Art Review. *Food Reviews International* **2023**, 1–25.
- [4] Abdi, A.; Oroojzadeh, P.; Valivand, N.; Sambrani, R.; Lotfi, H. Immunological aspects of probiotics for improving skin diseases: Influence on the Gut-Brain-Skin Axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2024**, *702*, 149632.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2025**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji diplomovou 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 – diplomovou 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 diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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 diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Topická probiotika se v současné době stále častěji používají v péči o pokožku. Mikroorganismy jsou využívány nejen pro své bioaktivní účinky, ale také jako funkční složky kosmetických přípravků. Tato práce měla za cíl posoudit schopnost buněk vybraných kmenů *Lactobacillus fermentum* 154, *Lactobacillus plantarum* 181, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 198, *Lactobacillus casei* 422, *Lactobacillus rhamnosus* 963A a *Saccharomyces cerevisiae* stabilizovat emulze Pickeringova typu. V této práci se zkoumá vliv typu mikroorganismů, jejich životaschopnosti a poměru fází O/V na vlastnosti výsledných emulzních systémů. V úvahu se berou fyzikálně-chemické parametry jak částic, tak i emulzních systémů. V posledním kroku byl testován vliv emulze na kožní mikrobiom zastoupený modelovým mikroorganismem *Staphylococcus epidermidis*.

Klíčová slova: Pickeringovy emulze, mikroorganismy, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* spp., kožní mikrobiom

ABSTRACT

Topical probiotics are now increasingly used in skin care. Microorganisms are used not only for their bioactive effects but also as functional ingredients in cosmetic products. This work aimed to assess the ability of cells of selected strains of *Lactobacillus fermentum* 154, *Lactobacillus plantarum* 181, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 198, *Lactobacillus casei* 422, *Lactobacillus rhamnosus* 963A and *Saccharomyces cerevisiae* to stabilize Pickering emulsions. In this work, the effect of microorganism type, their viability and O/V phase ratio on the properties of the resulting emulsion systems is investigated. Physicochemical parameters of both particles and emulsion systems are considered. In the last step, the effect of the emulsion on the skin microbiome represented by the model microorganism *Staphylococcus epidermidis* was tested.

Keywords: Pickering emulsions, microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* spp., skin microbiome

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své upřímné poděkování **Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D.**, vedoucí mé diplomové práce, za její odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a cenné rady, které mi poskytovala po celou dobu zpracování dané práce. Její konstruktivní zpětná vazba byly pro mě velkou inspirací a významnou oporou. Ráda bych také poděkovala **Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D.** za poskytnutí mikrobiálních kmenů a odborné konzultace týkající se práce s bakteriálními kulturami. Mé poděkování patří také **Mgr. Markétě Havlišťové** za praktickou pomoc při práci v laboratoři. Zvláštní poděkování patří **Ing. Kristýně Valáškové**, která prováděla testování na 3D modelu kůže a významně mi pomohla se zpracováním výsledků této části práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala **své rodině a blízkým** za stálou podporu a trpělivost po celou dobu studia.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KŮŽE A JEJÍ FUNKCE.....	13
1.1 ANATOMIE KŮŽE	13
1.2 FUNKCE KŮŽE.....	16
2 KOŽNÍ MIKROBIOM	18
2.1 STRUKTURA A SLOŽENÍ KOŽNÍHO MIKROBIOMU	18
2.2 FUNKCE MIKROBIOMU	20
2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ROVNOVÁHU MIKROBIOMU	22
2.4 VLIV KOSMETIKY NA KOŽNÍ MIKROBIOM.....	25
2.4.1 Vliv konzervačních látek na mikrobiom	25
2.4.2 Vliv antiseptických prostředků na mikrobiom	27
2.4.3 Vliv aktivních látek na mikrobiom	27
2.4.4 Vliv čistících prostředků na mikrobiom.....	28
2.5 DYSBIÓZA	28
2.5.1 Atopická dermatitida	28
2.5.2 Psoriáza	30
2.5.3 Akné vulgaris	31
2.5.4 Seborrhoická dermatitida	31
2.5.5 Růžovka.....	32
3 MOŽNOSTI MODULACE MIKROBIOMU	33
3.1 TRANSPLANTACE FEKÁLNÍ MIKROBIOTY	33
3.2 TRANSPLANTACE KOŽNÍHO MIKROBIOMU	34
3.3 PROBIOTIKA	35
3.3.1 Účinek na atopickou dermatitidu	36
3.3.2 Účinek na akné	37
3.3.3 Účinek na vzhled pokožky	37
3.4 POSTBIOTIKA.....	37
3.5 PREBIOTIKA A SYNBIOTIKA	38
4 PICKERINGOVY EMULZE.....	39
5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	43
6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	45
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	46
7 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	47
7.1 MATERIÁLY	47
7.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	48

8	POUŽITÉ METODY	50
8.1	PŘÍPRAVA DISPERZÍ	50
8.1.1	<i>Příprava disperzí bakterií Lactobacillus</i>	50
8.1.2	<i>Příprava disperze Saccharomyces cerevisiae</i>	50
8.2	PŘÍPRAVA EMULZÍ	51
8.3	CHARAKTERIZACE STABILIZÁTORŮ A EMULZÍ	51
8.3.1	Velikost částic	52
8.3.2	Povrchové napětí	52
8.3.3	Zeta-potenciál	52
8.3.4	Optická mikroskopie	53
8.3.5	Velikost a distribuční křivky emulzních kapek	53
8.3.6	Index krémování	54
8.3.7	Vizuální pozorování	54
8.4	TESTY NA 3D MODELU KŮŽE <i>IN VITRO</i>	54
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
9.1	CHARAKTERIZACE STABILIZUJÍCÍCH ČÁSTIC	57
9.2	CHARAKTERIZACE EMULZÍ	67
9.3	TESTOVÁNÍ EMULZÍ NA 3D MODELECH KŮŽE	79
	ZÁVĚR.....	83
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	100
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	102

ÚVOD

Za poslední roky vzrostl zájem o využití probiotických mikroorganismů nejen v oblasti výživy, ale také v kosmetickém průmyslu. Topická probiotika včetně živých nebo inaktivovaných mikroorganismů aplikovaných přímo na kůži nacházejí uplatnění v přípravcích zaměřených na obnovu a udržení kožního mikrobiomu, ochranu bariérové funkce kůže a snížení zánětu. V současné době se kromě jejich bioaktivních účinků zkoumá i jejich potenciál v oblasti stabilizace emulzních systémů.

Pickeringovy emulze patří do skupiny emulzních systémů, u kterých má stabilita zásadní význam pro účinnost, senzorické vlastnosti a trvanlivost výrobku. Ve srovnání s běžnými emulzemi přispívají Pickeringovy emulze ke stabilizaci systému pomocí pevných částic. V této souvislosti mohou být využity i různé mikroorganismy.

Proto je v této práci zkoumána schopnost buněk probiotických kmenů stabilizovat emulzní systémy s následným topickým využitím, konkrétně bakterie rodu *Lactobacillus* spp. a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Porovnání účinnosti bude provedeno se zohledněním vlivu typu mikroorganismu, jeho buněčného stavu (aktivní a inaktivované) a poměru olejové a vodné fáze na vlastnosti emulzí.

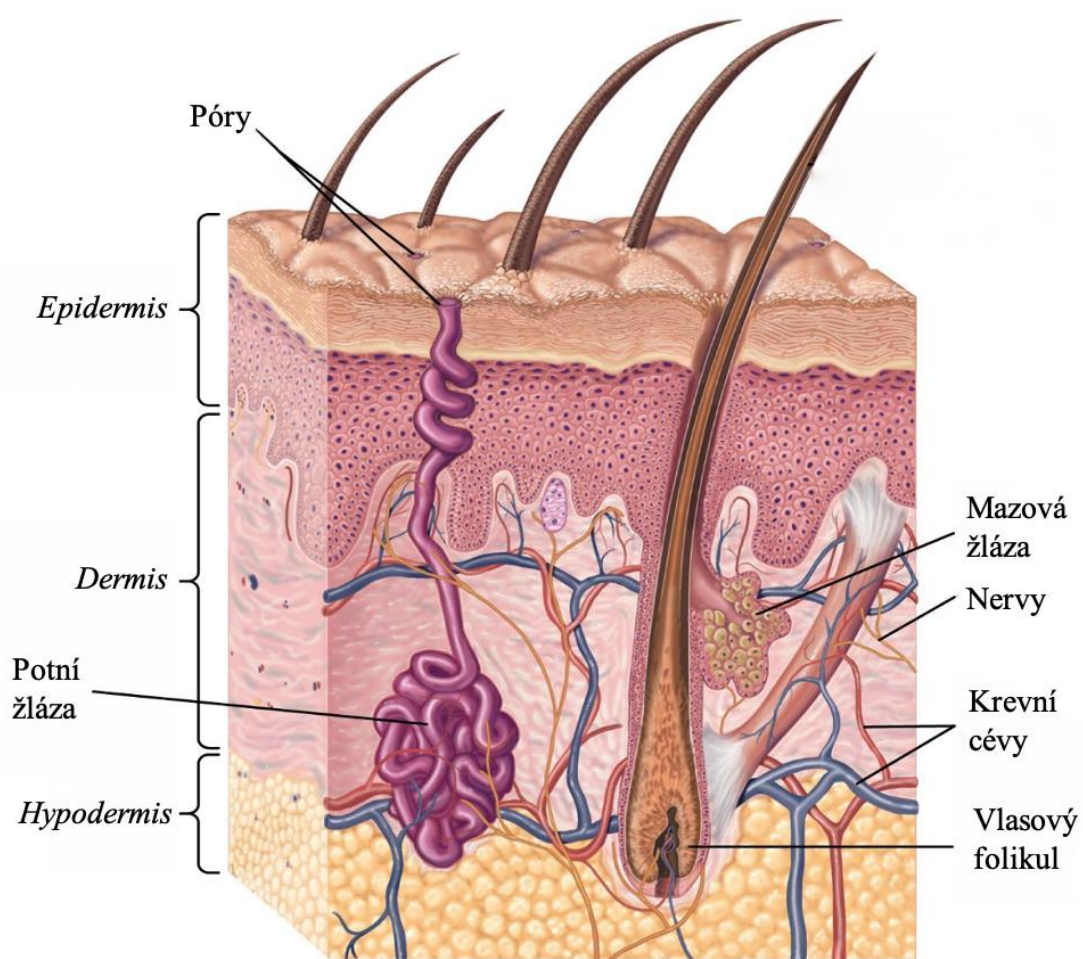
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE A JEJÍ FUNKCE

Kůže patří mezi vysoce komplexní a dynamické orgány lidského těla a hraje zásadní úlohu při jeho ochraně. Nejedná se jenom o vnější ochrannou bariéru, ale o aktivní systém, který se neustále adaptuje na měnící se podmínky vnějšího prostředí. Kůže představuje primární bariéru pro širokou řadu externích faktorů, jako jsou patogeny, chemické látky a mechanické porušení. [1]

1.1 Anatomie kůže

Kůže se sestává ze tří základních strukturních vrstev: *epidermis* (pokožka), *dermis* (škára) a *hypodermis* (podkožní vazivo) (viz. Obrázek 1). Tyto vrstvy se odlišují jedinečným složením a vlastnostmi, které dohromady tvoří soudržný a adaptabilní systém, a zaručují tak celistvost a odolnost celého povrchu kůže. [1] [2] [3]



Obrázek 1: Základní vrstvy kůže [4]

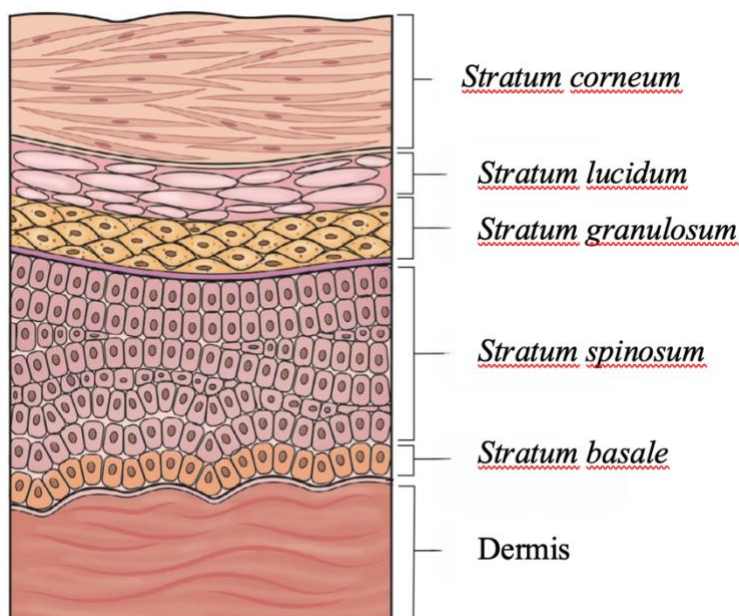
Epidermis, tedy svrchní vrstva kůže, představuje klíčovou fyzikální a biologickou ochranu před průnikem patogenů a dráždivých látek do těla. Její struktura se skládá z několika vrstev buněk. Převládajícími buňkami *epidermis* jsou keratinocyty, které tvoří přibližně 80 % buněk této vrstvy. Během procesu keratinizace tyto buňky postupně migrují z hlubších vrstev na povrch kůže, přičemž zde dochází k syntéze keratinových proteinů a lipidů nezbytných pro bariérovou funkci kůže. Po dosažení povrchu se tyto složky postupně rozkládají, což umožňuje přirozené odlupování korneocytů v procesu deskvamace. Tento proces trvá obvykle 30 až 40 dní a umožňuje průběžnou obnovu epidermální vrstvy. [2]

Spolu s keratinocyty, které produkují keratin a zajišťují pevnost *epidermis*, jsou součástí *epidermis* i další buňky, jako například melanocyty, což jsou buňky tvořící melanin chránící kůži před UV zářením, dále Langerhansovy buňky, které hrají významnou roli v imunitní ochraně kůže, a také Merkelovy buňky působící jako receptory pro jemnou mechanorecepci. [3]

Pokožka se skládá z pěti histologických vrstev: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (viz. Obrázek 2). [2] [3]

- *Stratum basale* je nejhlubší vrstvou *epidermis* a slouží jako základ pro regeneraci kůže. Obsahuje kmenové buňky, které se dělí a diferencují v keratinocyty a melanocyty. Kromě toho tato vrstva produkuje antimikrobiální proteiny a podílí se na ochraně kůže. Nacházejí se zde také Merkelovy buňky. [2] [3] [5]
- *Stratum spinosum* je vrstva, kde keratinocyty začínají syntetizovat keratinová filamenta a propojují se prostřednictvím desmosomů, což zajišťuje mechanickou pevnost kůže. Současně zde začíná proces keratinizace, při kterém keratinocyty produkují taky involucrin, který má zásadní význam pro tvorbu buněčného obalu v pozdějších fázích keratinizace a přispívá k bariérové funkci kůže. Imunitní ochranu v této vrstvě poskytují Langerhansovy buňky, které pohlcují antigeny a aktivují T-lymfocyty. [1] [3] [5]
- *Stratum granulosum*, neboli granulární vrstva, se skládá ze 3 až 5 vrstev postupně se zplošťujících buněk, které obsahují keratohyalinová granula s prekurzory filaggrinu a lamelární granula s glykosfingolipidy, které přispívají k soudržnosti buněk. [2] [3]
- *Stratum lucidum* je dobře patrná na tlusté kůži a tvořena 2 až 3 vrstvami buněk, obsahujících eleidin, který slouží jako přechodný produkt mezi keratohyalinem a keratinem. [2] [3] [6]

- *Stratum corneum*, tedy rohová vrstva, je tvořena 20 až 30 vrstvami korneocytů, což má za důsledek variabilní tloušťku této vrstvy. Odumřelé keratinocyty uvolňují defensiny, což jsou antimikrobiální peptidy, které slouží jako první obranná linie proti mikroorganismům. [1] [3]



Obrázek 2: Struktura *epidermis* [2]

Střední vrstvou kůže je *dermis*, která zajišťuje mechanickou pevnost, pružnost, výživu a ochranu kůže. Je složená ze dvou vrstev pojivové tkáně – papilární a retikulární *dermis*. Papilární vrstva, která je umístěná na povrchu *dermis* a bezprostředně navazuje na *epidermis*, je slabší a tvořena volnými kolagenními a elastickými vlákny, krevními cévami. Vrstva retikulární nacházející se hlouběji je silnější a skládá se z husté pojivové tkáně se svazky kolagenních vláken. [1] [2] [8]

Hlavními buňkami *dermis* jsou fibroblasty, jež produkují kolagen, elastin a další složky extracelulární matrix a přispívají tím k udržení pevnosti a pružnosti pokožky. *Dermis* také obsahuje makrofágy a další imunitní buňky, které mají důležitou roli při zánětlivých reakcích a hojení ran. [5] [7]

Škára je bohatě prokrvená a zahrnuje cévní síť včetně povrchové a hluboké dermální vaskulární pleteně poskytující kyslík a živiny a zajišťující klíčovou roli v termoregulaci. Tato vrstva taky obsahuje nervová zakončení, která umožňují vnímání doteku, teplotních změn, tlaku a bolesti prostřednictvím specializovaných receptorů, jako jsou Meissnerova a Vater-Paciniho tělíska. Kolagenová a elastinová vlákna zajišťují strukturní pevnost a

pružnost dermis, zatímco mukopolysacharidová součást extracelulární matrix plní zásadní úlohu při udržování hydratace kůže. [5] [7]

Nedílnou součástí *dermis* jsou kožní adnexa, mezi které patří potní žlázy, které se podílejí na regulaci tělesné teploty, a mazové žlázy vylučující kožní maz, který zvlhčuje pokožku a vlasy. V *dermis* se také nacházejí vlasové folikuly. Papilární výběžky mezi *dermis* a *epidermis* zesilují spojení těchto vrstev a přispívají k celkové pevnosti kůže. [1] [5] [7]

Pod *dermis* se nachází *hypodermis*, ve které jsou převážně tukové buňky a jejich množství se v této vrstvě individuálně liší. Podkoží hraje velkou roli v termoregulaci a adsorpci nárazů. [2] [3]

1.2 Funkce kůže

Mezi hlavní funkce lidské kůže se řadí ochranná neboli bariérová funkce, které chrání tělo před fyzikálními, chemickými a biologickými hrozbami. Korneocyty a lipidy v *epidermis* zabránuje transepidermální ztrátě vody a vnikání mikroorganismů a zajišťuje taky mechanickou pevnost a odolnost vůči traumatům. Produkce melaninových pigmentů melanocyty rovněž chrání kůži před škodlivým účinkem UV záření. [8]

Kůže je taky klíčovou složkou imunitního systému. Prostřednictvím antimikrobiálních peptidů a Langerhansových buněk, které jsou v *epidermis*, poskytují vrozenou a adaptivní imunitu. Kyselé povrch pokožky podporuje její zdravou mikroflóru a omezuje růst patogenů. [1]

Regulace tělesné teploty je další významnou funkcí kůže, kterou zajišťuje především řízený průtok krve v dermálních cévách a aktivita potních žláz. [9]

Smyslové receptory uložené v kůži umožňují vnímání teploty, tlaku a bolesti a tímto poskytují reflexní reakce. [10]

V kůži je důležitý obsah vody, která zajišťuje hydrataci, brání tvorbě prasklin a tímto podporuje ochrannou funkci pokožky. [10]

Kromě toho je právě kůže hlavním místem syntézy vitamínu D, jenž vzniká v *epidermis* přeměnou 7-dehydrocholesterolu na cholekalciferol, známý jako vitamin D₃, působením UV záření. Jedná se o proces, který je podstatný pro zdraví kostí a celkovou metabolickou rovnováhu. [9] [10]

Schopnost regenerace je jednou z klíčových funkcí kůže, jehož cílem je obnova integrity a funkčnosti poškozené tkáně. Tento proces zahrnuje čtyři fáze: hemostázu, zánětlivou reakci, proliferaci buněk a remodelaci tkáně. [10]

2 KOŽNÍ MIKROBIOM

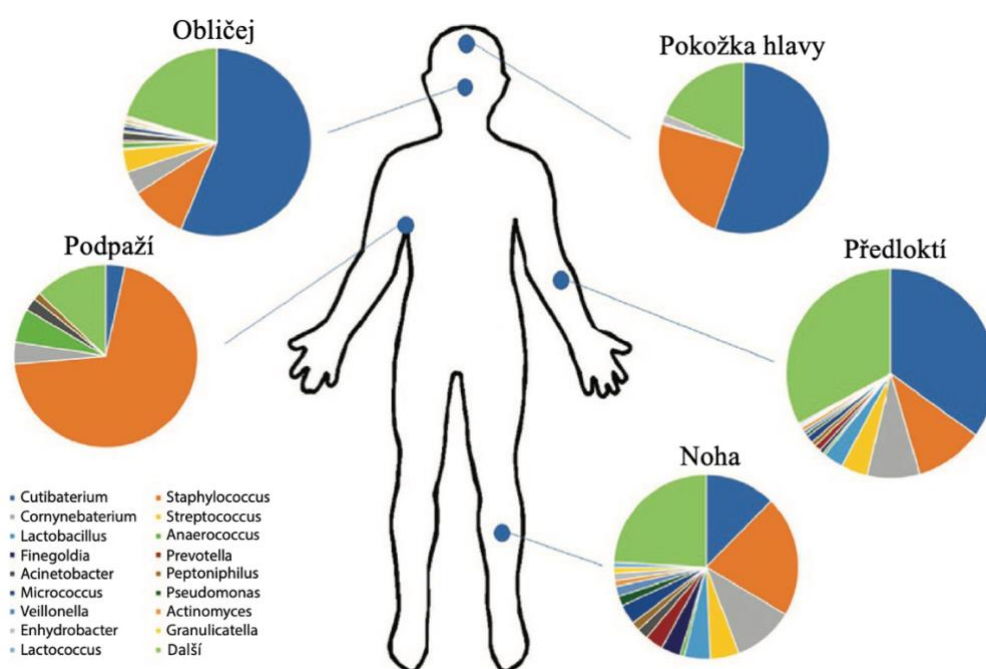
Po zohlednění základních vlastností a funkcí kůže je zapotřebí věnovat pozornost jejímu mikrobiomu, složitému ekosystému mikroorganismů, který hraje klíčovou roli při udržování bariérové funkce kůže a homeostázy imunitního systému. [11]

2.1 Struktura a složení kožního mikrobiomu

Kožní mikrobiom lze definovat jako soubor mikroorganismů, včetně bakterií, hub, virů, archeí, roztočů a jejich genů, které kolonizují epitelové povrchy lidského těla. Mikrobiální ekosystém kůže je z hlediska hmotnosti druhou největší mikrobiální komunitou v těle člověka, protože kůže poskytuje spoustu nezbytných živin pro rozvoj mikrobioty prostřednictvím sekrece potu a složek *stratum corneum*. Mezi tyto složky řadíme především proteiny, jako jsou keratin a membránové proteiny, dále lipidy, převážně ceramidy a cholesterol, a také vodu. Složení kožního mikrobiomu je proměnlivé a velmi rozmanité, přičemž jeho pestrost převyšuje mikrobiální rozmanitost trávicího traktu nebo dutiny ústní. Je třeba také zmínit, že každý jedinec je nositelem unikátního společenství mikroorganismů. Kůže interaguje buď přímo s živými mikroby na svém povrchu nebo s proteiny a metabolity získanými z mikrobů. [11] [12]

Hlavní bakteriální kmeny zahrnují čtyři skupiny, mezi které patří Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria a Bacteroidetes. Rody jako *Micrococcus*, *Propionibacteria* a *Corynebacteria* spadají do Actinobacteria. Firmicutes, nově označované jako Bacilota, jsou tvořeny například rody *Staphylococcus*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Proteobacteria se skládají z rodů *Paracoccus*, *Haematobacter* a *Sphingomonas*, zatímco Bacteroidetes jsou zastoupeny rody *Porphyromonas*, *Prevotella* a *Flavobacterium*. [11] [12] [13]

Kožní mikrobiom na různých částech těla je typicky tvořen rody *Cutibacterium*, *Staphylococcus* a *Corynebacterium*, které představují 45 až 80 % celkového mikrobiomu, a téměř ve všech oblastech dominuje rod *Malassezia*, basidiomycetní kvasinka, která tvoří více než 90 % houbového mikrobiomu. Tyto rody lze označit jako “základní složky” kožního mikrobiomu, ale existují i specifické rozdíly v mikrobiální kolonizaci v závislosti na lokalitě těla (viz. Obrázek 3). [11] [13]



Obrázek 3: Druhové složení bakterií na různých místech těla [12]

V mastných oblastech převažují lipofilní bakterie, zejména rod *Cutibacterium*, konkrétně druh *C. acnes*, který zde dominuje a jeho obsah tvoří více než 50 % mikrobiomu. Pokud jde o mykobiom, v těchto oblastech se vyskytují především druhy *Malassezia restricta* a *Malassezia globosa*, kterým prospívá prostředí bohaté na lipidy. [11] [13]

Suché oblasti mají vyšší mikrobiální diverzitu. Mezi nejčastěji přítomné bakterie patří *Corynebacterium* a také *Staphylococcus epidermidis*. Z hub se zde vyskytují druhy *Malassezia slooffiae* a *Malassezia sympodialis*, které vykazují nižší nároky na lipidy. [11] [13]

Vlhká místa obývá především rod *Staphylococcus*, konkrétně *S. epidermidis* a *S. hominis*, tvořících více než 70 % mikrobiomu. Druhy rodu *Corynebacterium* jsou v těchto oblastech také běžné a přispívají k odbourávání potu, a tím ke vzniku tělesného pachu. [11] [13]

Kromě těchto dominantních mikroorganismů se v různých částech pokožky vyskytují i další druhy hub, jako *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum* a *Phoma*. Houby *Cryptococcus* a *Rhodotorula* se nacházejí na kůži spolu s dermatofyty, jako například *Microsporum*, *Trichophyton* a *Epidermophyton*, které jsou známy schopností způsobovat vznik kožních infekcí. *Saccharomyces* a *Candida* patří mezi houby, které přispívají k biodiverzitě kožního mikrobiomu. [12] [13]

Virologická složka mikrobiomu zahrnuje různé viry a fágy, mezi něž patří především Molluscum contagiosum virus, který vyvolává kožní infekce, a polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV), který je spojován se vzácnými druhy rakoviny kůže. Dále se můžeme také setkat s Alphapapillomavirus, který je součástí lidských papilomavirů, Simian virus anebo s méně známým virem, jako je například densovirus Acheta domestica (AdDNV). Kromě virů jsou přítomné různé fágy, což jsou viry, které napadají bakterie. Hlavními zástupci dané skupiny jsou fág *Actinomyces*, fág *Propionibacterium*, který působí na bakterie spojené s akné, fág *Streptococcus*, fág *Stenotrophomonas* a fág *Enterobacteria*. [12]

Součástí lidského kožního mikrobiomu, zejména na obličeji, jsou roztoči *Demodex*. Nejrozšířenější druhy jsou *Demodex folliculorum* a *Demodex brevis* kolonizující vlasové folikuly a mazové žlázy. Patří mezi běžné komenzální mikroby přinášející prospěch hostiteli, aniž by mu škodily, ale při přemnožení mohou způsobovat zánětlivá kožní a oční onemocnění, jako je růžovka, akné nebo blefaritida. S věkem se jejich populace přirozeně zvyšuje. [14]

2.2 Funkce mikrobiomu

Kožní mikrobiom je zásadní pro udržení zdravé pokožky a nefunguje pouze jako pasivní součást kůže, ale aktivně se podílí na řadě biologických procesů. Rovnováha mikrobiomu pomáhá předcházet kožním onemocněním, zatímco jeho narušení může vést k dysbióze a zánětlivým reakcím. Následující kapitola se proto zaměřuje na klíčové role, které mikrobiom hraje, a jejich význam v kontextu homeostázy kůže. [12]

Nejdůležitější funkce mikrobiomu je ochrana hostitele před invazí patogenních mikroorganismů prostřednictvím různých mechanismů, jako je produkce antimikrobiálních látek a interakce s imunitním systémem. Příkladem mohou být koaguláza-negativní stafylokoky, jako jsou *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* a *Staphylococcus capitis*, které jsou komenzálními bakterií. Tento druh bakterií produkuje bakteriociny, které jsou specifickými antimikrobiálními peptidy (AMP), inhibující růst patogenního *Staphylococcus aureus*, včetně meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA). Kromě toho *Staphylococcus epidermidis* produkuje fenol-rozpustné látky, které fungují podobně jako antibiotika, protože narušují buněčné membrány patogenů, a také selektivně zabíjejí *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Produktem *Staphylococcus epidermidis* může být i kyselina jantarová, která inhibuje růst *Cutibacterium*

acnes. Přemnožení této bakterie vede k zánětlivým reakcím a vzniku komedonů, papul a pustul. [11] [15] [16]

Jiné komenzální bakterie, jako je *Staphylococcus lugdunensis*, produkují peptidové antibiotikum lugdunin, který pomáhá zabránit kolonizaci kůže škodlivým *Staphylococcus aureus* (včetně MRSA) a také posiluje přirozenou imunitní odpověď kůže tím, že zvyšuje produkci antimikrobiálních peptidů a chemokinů, které přitahují imunitní buňky (monocyty a neutrofilů). [17]

Houby rovněž přispívají k ochraně kůže. *Malassezia globosa* produkuje aspartyl proteázu, která rozkládá protein bakterie *Staphylococcus aureus*, čímž zabráňuje tvorbě jeho biofilmu. Biofilmy napomáhají *S. aureus* přežít a vyhnout se imunitnímu systému, takže jejich narušení může snížit počet infekcí. [18]

Kožní mikrobiom se na chemické bariéře dále podílí tím, že ovlivňuje kyselost povrchu kůže a moduluje lipidy v rohové vrstvě. Příkladem je bakterie *C. acnes*, která produkuje lipázy, které hydrolyzují triacylglyceroly z mazových žláz na volné mastné kyseliny (FFA), včetně kyseliny sapienové a butyrátu. Právě tyto kyseliny vykazují přímý antimikrobiální účinek proti specifickým grampozitivním bakteriím. Tak například krátké mastné kyseliny produkované *C. acnes* mohou selektivně inhibovat tvorbu biofilmu *S. epidermidis* a také vyvolávat expresi antimikrobiálních peptidů v kožních buňkách. Kromě toho *C. acnes* fermentuje glycerol na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, hlavně propionovou a octovou kyselinu, což snižuje pH prostředí a pomáhá chránit folikuly před růstem patogenů, jako je *Staphylococcus aureus*. Snížení pH rovněž vede k inhibici růstu patogenů. [11] [13] [19]

Mikrobiom taky hraje důležitou roli v udržení ochranné bariéry kůže prostřednictvím interakcí se *Stratum corneum*, kde jeho uspořádání tvoří ochrannou bariéru, která brání průniku patogenů a minimalizuje ztrátu vody. Metabolity produkované kožním mikrobiomem aktivují aryl-hydrokarbonový receptor (AHR), který se nachází v keratinocytech, a tím podporují epidermální diferenciaci a regeneraci kůže. Mezi dané metabolity můžeme zařadit například indolové deriváty, které jsou metabolity tryptofanu produkované *Staphylococcus epidermidis*. Absence mikrobioty může vést k narušení této rovnováhy, zvýšené propustnosti kůže a vyšší náchylnosti k infekcím vyvolaných například *Staphylococcus aureus*. [20]

Další klíčovou funkcí kožního mikrobiomu je regulace vrozené a adaptivní imunity. Na vrozené imunitě se podílejí receptory pro rozpoznávání patogenů (PRR), jako jsou toll-like

receptory (TLR), které reagují na patogenem asociované molekulární vzory (PAMPs) produkované mikroby kožního mikrobiomu. Aktivace těchto receptorů vede k uvolňování cytokinů a antimikrobiálních molekul, čímž se posiluje obranná bariéra kůže. [21]

Podpora adaptivní imunity spočívá v tom, že kožní mikrobiom pomáhá imunitnímu systému rozlišovat mezi přátelskými mikroby a patogeny. Regulační T-buňky se podílejí na udržení tolerance vůči přátelským mikrobům, čímž zabraňují nadměrné zánětlivé reakci. Naopak efektorové T-buňky podporují antimikrobiální odpověď při kontaktu s patogeny. Rovnováha mezi těmito buňkami je klíčová – její narušení může vést k zánětlivým onemocněním nebo oslabení imunity. [22]

Mezi další významné funkce patří zásadní role mikrobiomu v procesu hojení ran, a to regulací imunitní odpovědi, produkcí antimikrobiálních látek a podporou regenerace tkání. Výzkumy na myších ukázaly, že absence mikrobiomu vede ke zpomalení hojení, což naznačuje jeho klíčovou roli v tomto procesu. Tak například *Staphylococcus epidermidis* podporuje hojení ran aktivací interferonu typu I (IFN-I), který usnadňuje nábor imunitních buněk do místa rány a urychluje proces reepitelizace. Bylo také prokázáno, že exprese receptoru NOD2, což je receptor pro rozpoznávání bakteriálních fragmentů, konkrétně muramyl dipeptidu (složka peptidoglykanu buněčné stěny bakterií), podporuje hojení ran regulací zánětlivé reakce a remodelace tkání. Dalším důležitým mechanismem je aktivace aryl-hydrokarbonového receptoru (AHR) mikrobiálními metabolity, která podporuje diferenciaci keratinocytů a obnovu integrity epitelu. V souvislosti s chronickými ranami, jako jsou diabetické vředy, může mikrobiom řídit hojení prostřednictvím produkce protizánětlivých a antimikrobiálních sloučenin, čímž pomáhá udržovat mikrobiální rovnováhu a předcházet infekcím. [23] [24] [25]

2.3 Faktory ovlivňující rovnováhu mikrobiomu

Faktory ovlivňující kožní mikrobiom lze rozdělit na vnitřní a vnější. Mezi vnitřní faktory patří především genetika, pohlavní dospělost a stav imunitního systému hostitele.

Počáteční složení kožního mikrobiomu závisí na způsobu porodu (vaginální vs. císařský řez), avšak již v šesti týdnech života je struktura mikrobiomu primárně určena lokalitou na těle. Puberta představuje klíčové období, během něhož dochází k hormonálním a fyziologickým změnám ovlivňujícím kožní mikrobiom. Složení mikrobiálních společenstev se za toto období blíží složení mikrobiomu dospělého člověka, kdy jsou tyto změny závislé na pohlaví a místě těla. Pro bakteriální mikrobiom je typický pokles

mikrobiální diverzity u ženského pohlaví a nárůst lipofilních bakterií (*Cutibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp.), jež využívají zvýšenou produkci kožního mazu. Mikrobiální diverzita je u chlapců vyšší, převažují stafylokoky a streptokoky. Co se týká houbové mikrobioty, tak ta vykazuje v oblastech s vyšší produkcí kožního mazu zvýšenou prevalenci *Malassezia*, zejména *M. restricta*. Tato změna je výraznější u dívek, což pravděpodobně souvisí s hormonálními změnami. [11] [26]

Věk může také ovlivňovat mikrobiální rozmanitost, přičemž s věkem se obvykle zastoupení některých bakteriálních druhů, jako *Cutibacterium* a *Lactobacillus*, klesá, zatímco jiné, jako *Corynebacterium* a *Enhydrobacter*, se stávají dominantnějšími. Podle složení kožního mikrobiomu lze odhadnout věk jedince s přesností na čtyři roky. Změny kožních lipidů a přirozených hydratačních faktorů dále způsobují změny výživy mikrobiálního společenstva a jeho složení. [27] [28]

Vliv na kožní mikrobiom mají genetické faktory hostitele, které regulují imunitní reakci, vnímání prostředí a buněčné funkce. Důkazem může být studie Moitinho-Silva a kol., která analyzovala dvě německé kohorty a identifikovala 23 genetických lokusů spojených se složením mikrobiomu kůže. Bylo zjištěno, že genetické varianty představují vliv na přítomnost určitých bakteriálních druhů, a tím ovlivňují zdraví a onemocnění kůže. Tak byl například u lidí s určitými genetickými variantami zjištěn vyšší výskyt bakterií *Staphylococcus* hrající důležitou roli v ochraně a patogenezi kožních onemocnění. Další genetická varianta byla spojena s vyšším výskytem *Acinetobacteria*, bakterie, která se podílí na udržování homeostázy kůže a regulaci imunity. [29]

Dalším rozhodujícím faktorem je stav imunitního systému. Imunitní poruchy mohou zásadně změnit složení kožního mikrobiomu. Například u pacientů s primárními imunodeficity, jako je hyper-IgE syndrom (zvýšená hladina imunoglobulinů E v séru), se projevuje snížená stabilita mikrobiomu a přítomnost netypických mikroorganismů, jako je zvýšený výskyt *Aspergillus* a *Candida*, a to i v nepřítomnosti aktivní plísňové infekce. [11]

Do vnějších faktorů je možné zařadit životní a pracovní prostředí, interakce s jinými organismy, enviromentální podmínky a používání kosmetických produktů.

Odlišnosti v kožním mikrobiomu mezi venkovskou a městskou populací jsou spojeny s rozdílnou expozicí mikroorganismů z půdy, vody a biomasy. Při kontaktu s přírodním prostředím, jako je půda a rostlinné materiály, se mikrobiom rukou obohacuje o Acidobakterie a Bakteroidety, naproti tomu městský životní styl spojený s bydlením v

místnostech vede k nižší mikrobiální diverzitě. V uzavřených prostorech většina mikroorganismů pochází z lidského mikrobiomu, přičemž urbanizace podporuje vyšší výskyt plísní, včetně *Aspergillus*, *Malassezia*, *Candida* a *Eurotiales*, a současně omezuje výskyt přirozených kožních symbiotů, jako je *Staphylococcus epidermidis* nebo *Lactobacillus* spp. Když naopak zemědělské prostředí se vyznačují vyšší mikrobiální rozmanitostí. Tak například *Cutibacterium* se častěji objevuje na kůži venkovských obyvatel, zatímco u městské populace převažuje *Trabulsiella*. [30] [31]

Dobytěk je ve venkovských oblastech důležitým zdrojem mikroorganismů, takže kontakt s ním může vést ke změnám mikrobiomu. Zejména u farmářů dochází především k poklesu množství bakterií rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus* a nárůstu *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Změny mikrobiomu jsou také pozorovány u lidí žijících s domácími mazlíčky, například se psy. Mikrobiom domácích psů a jejich majitelů vykazuje značnou podobnost, což naznačuje vzájemné sdílení bakteriálních populací. [32]

Kožní mikrobiom taky podléhá vlivu teploty, vlhkosti a slunečního záření, přitom UV záření má jak antibakteriální, tak destruktivní účinky. Intenzita vystavení může zvyšovat náchylnost k infekcím, jako je virus herpes simplex (HSV), zatímco některé bakterie, jako jsou *Cyanobacteria* a *Lactobacillus*, mohou kůži chránit před fotostárnutím. Rezistence mikrobiomu vůči UV záření se liší. Příkladem může být *Malassezia furfur*, která je citlivá, i když produkuje ochranný pityriacitrin. UV záření rovněž omezuje výskyt *Lactobacillaceae* a *Pseudomonadaceae*, ale také inhibuje růst *Staphylococcus aureus* a *Cutibacterium acnes* snížením produkce porfyrinu. [30]

Antibiotika používající se především k léčbě kožních onemocnění mají taky vliv na stav kožního mikrobiomu. Tyto látky pomáhají regulovat mikrobiom a eliminovat patogeny. Příkladem může být minocyklin, který snižuje počet *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Lactobacillus* a *Porphyromonas* a může narušit mikrobiom. Zatímco doxycyklin značně potlačuje *C. acnes*, ale zároveň působí jako podpora růstu bakterie *Cutibacterium granulosum*. Makrolidy, tetracykliny a klindamycin se běžně používají k léčbě akné. Dalším příkladem antibiotik je lymecyklin, který redukuje *Cutibacterium*, avšak zvyšuje výskyt *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Corynebacterium*. Prodloužené užívání antibiotik vede k rozvoji rezistence, zejména u *C. acnes* a *S. epidermidis*. [30]

Významnou roli ve složení a stabilitě kožního mikrobiomu hrají i kosmetické přípravky. Různé druhy kosmetických produktů, jako jsou sprchové gely, pleťová mléka, hydratační přípravky a opalovací krémy, mohou vést ke změně mikrobiální diverzity a

dynamiky mikrobiomu jak v místě aplikace, tak na jiných částech těla. Některé kosmetické složky jsou schopny podpořit přirozenou rovnováhu mikrobioty, zatímco jiné ji mohou narušit a způsobit přemnožení oportunních patogenních mikroorganismů. I některé fyzikálně-chemické vlastnosti kosmetických prostředků dokážou vytvořit příznivé podmínky pro růst mikroorganismů, které pak mohou vést ke vzniku infekcí nebo kožních onemocnění. [12]

2.4 Vliv kosmetiky na kožní mikrobiom

Jak již bylo zmíněno v předchozí podkapitole, vliv na mikrobiom a jeho složení mají i kosmetické přípravky, přičemž některé jejich složky mohou v pokožce zůstat i po opakovaném mytí a z dlouhodobého hlediska ovlivňovat mikrobiální rovnováhu. Už během prvního týdne používání kosmetických prostředků lze pozorovat změny ve složení mikrobiomu. [33]

Ze studie Bouslimani a kol. vyplynulo, že některé složky kosmetických přípravků přetrvávají na pokožce až 13 dní po aplikaci. Tak například hydrofilní sloučeniny polyethylenglykolu se smývají z pokožky rychleji, a to po cca 3,5 dnech, zatímco hydrofobnější molekuly polypropylenglykolu a mastné kyseliny na pokožce zůstávají déle, a to po dobu 13 a 8 dní. Zároveň bylo zaznamenáno, že používání deodorantu a pudru na nohy se projevilo snížením množství běžných kožních bakterií rodů *Staphylococcus* a *Corynebacterium*, naopak se zvýšil výskyt *Micrococcus*, *Anaerococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Moraxellaceae* a *Acinetobacter*, což vedlo k vyšší mikrobiální diverzitě kůže. Uvedené výsledky naznačují, že kosmetické přípravky mohou ovlivňovat složení mikrobiomu. [33]

2.4.1 Vliv konzervačních látek na mikrobiom

Kosmetické výrobky jsou často tvořeny látkami, které mohou představovat ideální podmínky pro růst mikroorganismů. Do této skupiny látek nejčastěji spadají voda, oleje, peptidy a sacharidy. Z tohoto důvodu se do kosmetiky běžně přidávají konzervační látky, které i po aplikaci na pokožku zůstávají aktivní a přispívají k prevenci kontaminace. Pokud jsou však tyto látky používány nekontrolovaně nebo ve vysokých koncentracích, mohou vést k narušení přirozené rovnováhy kožního mikrobiomu a k ovlivnění jeho složení. [12]

Studie Wang a kol. analyzovala, jak běžně používané kosmetické konzervační látky účinkují na místní mikroflóru zdravé pokožky obličeje. Do studie autoři izolovali devět

druhů bakterií přirozeně osídlujících pokožku obličeje, včetně *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria*, druhů rodu *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas oleovorans* a *Roseomonas cervicalis*. Kromě toho byly v experimentu testovány i *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Testováním minimální inhibiční koncentrace (MIC), která zcela inhibovala růst bakteriálního kmene, bylo zjištěno, že se účinnost konzervačních látek vůči různým mikroorganismům liší. Methylišthiazolinon (MTI) a jodopropynylbutylkarbamát (IPBC) vykazovaly nejsilnější inhibiční účinek na všechny testované bakterie, včetně patogenních. Zvláště citlivá byla *S. epidermidis* na MTI, zatímco vysokou citlivost na IPBC vykazovaly *S. capitis* a *M. luteus*. Méně účinný byl ethylhexylglycerin a methylparaben a bakterie *Bacillus* a *Kocuria* byly k těmto konzervačním látkám středně citlivé. Nejnižší inhibiční účinek prokázal fenoxylethanol a *Acinetobacter* a *Pseudomonas* spp. na něj byly nejméně citlivé. Ze studie vyplývá, že kosmetické konzervační látky mohou významně narušit rovnováhu kožního mikrobiomu, což se může projevit na zdraví pokožky. [34]

V rámci studie Zhanga a kol. se ukázalo, že konzervační látky 2-bromo-2-nitro-1,3-propandiol, ethyl 4-hydroxybenzoát, hexadecyltrimethylamonium bromid a imidazolidinyl urea mohou výrazně narušit *Staphylococcus epidermidis*, která patří mezi klíčové bakterie kožního mikrobiomu. Tak například hexadecyltrimethylamonium bromid a ethyl 4-hydroxybenzoát při maximálně povolených koncentracích eliminovaly *S. epidermidis* do jedné hodiny. Fenoxylethanol a salicylát sodný prokázaly nejslabší schopnost inhibovat růst, zatímco benzoan sodný a draselná sůl kyseliny hexadienové měly střední antibakteriální účinnost. Antimikrobiální účinek benzylalkoholu byl pouze mírný. [35] Fenoxylethanol je však ve srovnání s jinými konzervačními látkami, jako jsou parabeny nebo formaldehydové donory, považován za mírnější alternativu.

Podle výsledků studie Nasrollahi a kol. parabeny vykazují silné antimykotické účinky proti vláknitým houbám a kvasinkám, včetně *Candida* spp. a *Malassezia* spp. Výsledky ukázaly, že methylparaben, propylparaben a butylparaben zcela inhibovaly růst těchto kvasinek při nejnižší testované koncentraci (MIC = 0,3 mg/ml). [36]

Konzervanty musí působit proti široké škále mikroorganismů, aby kosmetické výrobky splňovaly požadavky právních předpisů. Proto se do složení často začleňuje kombinace různých konzervačních látek. [37]

Výzkum Pinto a kol. zjistil, že různá kombinace konzervačních látek běžně používaných v kosmetice může významně ovlivnit složení kožního mikrobiomu. Kombinací

benzoanu sodného, fenoxxyethanolu a ethylhexylglycerinu; anisátu sodného a 1,2-hexandiolu; hydroxyacetofenonu, fenylpropanolu, propandiolu, kaprylylglykolu a disodné soli EDTA; a dále kombinací benzylalkoholu, kyseliny benzoové a kyseliny dehydrooctové, byl zjištěn mírný inhibiční účinek na *C. acnes* a byla pozorována střední inhibice růstu *S. aureus*, zatímco *S. epidermidis* zůstal neovlivněn, což naznačuje jejich využití při obnově rovnováhy mikrobiomu při dysbióze. Střední inhibiční účinek na bakterii *C. acnes* a výrazný účinek na *S. aureus* vykazuje konzervační systém sestávající z hydroxyacetofenonu, fenylpropanolu, propandiolu a kaprylyl glykolu, eventuálně rozšířený o tetrasodium glutamát diacetát. Naopak kombinací látek, jako je benzoan sodný a 1,2-hexandiol nebo 1,2-hexandiol, kaprylylglykol, tropolon, kyselina levulinová, levulinát sodný a glycerin, významně inhibuje růst *S. epidermidis*, což naznačuje jejich nevhodnost pro přípravky podporující zdravý mikrobiom. [38]

2.4.2 Vliv antiseptických prostředků na mikrobiom

Podle studií SanMiguel a kol. byly při aplikaci antiseptik, jako je etanol, povidon-jód a chlorhexidin, zjištěny krátkodobé, místně specifické změny v kožním mikrobiomu. Nejvýrazněji bylo narušeno předloktí, zatímco mikrobiota na zádech zůstala stabilnější. Lépe byly eliminovány méně hojné druhy bakterií, zatímco Propionibacteriaceae vykazovaly vyšší odolnost. Z této studie je patrné, že při krátkodobém používání antiseptik může docházet k dočasnému narušení mikrobiální rovnováhy kůže. [39]

Další vliv na kožní mikrobiom byl pozorován po použití antibakteriálních mýdel, které dokážou narušit přirozený systém antimikrobiální obrany pokožky tím, že odstraňují nejen patogenní, ale i prospěšné bakterie. Jejich běžné používání může vést ke snížení počtu *Streptococcus* spp. Podobným způsobem bylo zjištěno, že používání antibakteriálních ubrousků vedlo ke snížení počtu *Staphylococcus aureus* na ruce. [12]

2.4.3 Vliv aktivních látek na mikrobiom

Ve studii Dobler a kol. bylo stanoveno, že přírodní oleje a estery mastných kyselin s dlouhým řetězcem podporují růst *Malassezia* spp., zatímco parafíny, silikony a PEGy nikoli. Růst také podporovaly emulze s olivovým a avokádovým olejem, přičemž bez těchto olejů k růstu nedocházelo. Dalším významem z této studie bylo potvrzení metabolické aktivity *Malassezia* spp. Tato houba dokázala přeměnit isopropylpalmitát na kyselinu palmitovou a oleát na oleylalkohol a kyselinu olejovou. Co se týče bakterií, kyselina kaprinová

potlačovala růst všech testovaných kmenů, zatímco stearát sacharózy a estery kyseliny olejové podporovaly růst *Corynebacterium minutissimum*. [40]

2.4.4 Vliv čisticích prostředků na mikrobiom

Obsah tenzidů v čisticích přípravcích může narušit ochrannou bariéru pokožky a změnit její pH, které je pro rovnováhu kožního mikrobiomu klíčové. Vyšší pH způsobené hydroxidem sodným v mýdlech a kosmetických přípravcích například podporuje přeměnu *Candida albicans* na patogenní formu. Kyselina citronová a mléčná mohou snížit pH příliš, což může mít za následek snížení výskytu *Cutibacterium acnes*. Zvyšování pH také podporuje růst *Staphylococcus aureus* a *C. acnes*, které mohou přispívat ke vzniku akné a dalších kožních problémů. [12]

2.5 Dysbióza

Pro zdraví kůže je charakteristická stabilní rovnováha mezi komenzálními bakteriemi podporujícími její ochrannou funkci a potenciálně patogenními mikroby, které jsou běžně kontrolovány. Dojde-li ovšem k porušení kožní bariéry vlivem například změn pH, zvýšeného úbytku vody, odlupování kůže, apoptózy keratinocytů nebo zánětlivých procesů, může docházet k selhání této rovnováhy a k dysbióze. [19]

Obecně je dysbióza definována jako nerovnováha v rozmanitosti a funkčnosti mikrobiomu. Bývá často doprovázena neobvyklým složením bakteriálních populací, jejich přemnožením nebo úbytkem. Pokud se jedná o kůži, má dysbióza úzkou souvislost s rozvojem zánětlivých kožních onemocnění, jako je akné nebo atopická dermatitida. [13]

Za jeden z hlavních mechanismů způsobujících dysbiózu lze považovat tvorbu bakteriálních filmů patogenními mikroorganismy. Tato mikrobiální společenstva sestávající hlavně z polysacharidové matrice, kterou produkují bakterie, totiž dovolují patogenům přežívat v nepříznivém prostředí a odolávat imunitním mechanismům hostitele. Vznik biofilmu ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti kůže, jako je vlhkost, pH, teplota, dostupnost živin, receptory hostitelských buněk a lokální imunitní reakce. [19] [41]

2.5.1 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida, neřídka označovaná jako atopický ekzém, představuje chronické zánětlivé onemocnění kůže, které se objevuje nejčastěji v dětském věku, ale je schopné

postihovat i značnou část dospělé populace. K typickým příznakům patří suchá, šupinatá a svědivá kůže, která se výrazně zhoršuje v obdobích vzplanutí. [42]

Mezi základní projevy atopické dermatitidy patří dysbióza kožního mikrobiomu vyznačující se dominancí *Staphylococcus aureus* a sníženou mikrobiální diverzitou. Daný druh bakterie produkuje různé virulenční faktory, které hrají klíčovou roli v patogenezi atopické dermatitidy. Mezi tyto faktory patří superantigeny ve formě stafylokokových enterotoxinů, toxinu syndromu toxického šoku, alfa-toxinu, leukocidinů, enzymatických toxinů (beta-toxin), adhezinů, proteáz a nukleáz, které narušují kožní bariéru a podporují zánět. Tvorba těchto faktorů je řízena systémem quorum sensing agr (accessory gene regulator), který reguluje expresi genů zodpovědných za virulenci *S. aureus*. Navíc *S. aureus* formuje biofilmy zajišťující ochranu bakterie před imunitní odpovědí hostitele a působením antibiotik, což znesnadňuje její eliminaci. Rozsah tvorby biofilmu *S. aureus* pozitivně koreluje se závažností AD, což z něj činí důležitý faktor přetrvávání onemocnění. [43]

Kromě přemnožení *S. aureus* byl rovněž identifikován úbytek *Cutibacterium acnes*, který souvisel se zvýšením závažnosti atopické dermatitidy, vedl ke změnám v metabolických drahách hostitele a k odlišné odpovědi na léčbu kortikosteroidy. Dále bylo také pozorováno snížené zastoupení dalších některých běžných kožních bakterií, jako jsou *Dermacoccus* a *Methylobacterium*. Při těžkých formách atopické dermatitidy bylo zjištěno zvýšené množství dalších stafylokoků, jako jsou *S. capitis*, *S. lugdunensis* a *S. epidermidis*, přičemž poslední produkuje kožní proteázu EcpA, která podporuje zánět. [43] [44]

Houby mohou také hrát důležitou roli v patogenezi atopické dermatitidy, kde pacienti s těžšími formami onemocnění mají zvýšenou diverzitu hub. Dominantní zastoupení *Malassezia*, běžného obyvatele zdravé kůže, je oslabeno a převládají jiné druhy hub, zejména *Candida* spp. Tato změna závisí na závažnosti AD a může ovlivňovat narušení kožní bariéry a dysregulaci imunitního systému. [45]

Na kožním mikrobiomu pacientů s atopickou dermatitidou jsou patrné změny v zastoupení virových částic, především bakteriofágů, které mají vliv na bakteriální složení mikrobioty. Byla pozorována zvýšená přítomnost fágů specifických pro *Staphylococcus* a *Propionibacterium*, přičemž u pacientů s těžšími formami atopické dermatitidy byl významně zvýšen výskyt fágů typických pro *S. epidermidis*. [46]

2.5.2 Psoriáza

Psoriáza neboli lupénka se vyskytuje celosvětově v 1 až 5 % případů a je chronickým opakujícím se, zánětlivým onemocněním, které postihuje kůži, klouby nebo obojí. Projevuje se nadměrnou proliferací epidermálních buněk a dysfunkcí imunitního systému. Vyskytuje se ve třech formách, a to v mírné, středně těžké a těžké. Jako středně těžká až těžká psoriáza se obvykle označuje postižení více než 5 až 10 % plochy povrchu těla, ale i menší rozsah může být považován za těžký, pokud významně ovlivňuje fyzické, psychické nebo sociální zdraví pacienta. [47] [48]

V mikrobiomu psoriatických lézí se vyskytuje zvýšená přítomnost několika bakteriálních druhů. Mezi nejvýraznější změny patří dominance *Staphylococcus aureus* a *Corynebacterium simulans*. Osídlení *S. aureus* bylo zaznamenáno až u 60 % pacientů, z nichž více než polovina těchto kmenů produkuje enterotoxiny a toxiny syndromu toxického šoku, které přispívají k aktivaci imunitní odpovědi a k nekontrolované proliferaci keratinocytů. Kromě nich vyskytují i další kmeny bakterií, jako jsou *Acinetobacter johnsonii* a *Staphylococcus caprae*. Naopak nižší zastoupení vykazuje *Propionibacterium* spp. a *Cutibacterium acnes*, přičemž poslední může vést k vyššímu pH a následně k přemnožení patogenních bakterií. Jiným patogenem v psoriatických lézích bývá *Streptococcus pyogenes*. Jeho superantigeny stimulují T-buňky a vážou molekuly lidského leukocytárního antigenu (HLA-DR) na dendritických buňkách, makrofázích a keratinocytech, a tím podporují chronický zánět. [48] [49] [50]

V mykobiomu byly také zaznamenány změny, a to v podobě nižšího zastoupení *Malassezia* spp. oproti zdravým jedincům, avšak během exacerbací se jeho množství zvyšuje. Houba *Candida albicans* souvisí s přetrváváním a zhoršováním kožních lézí, zejména u inverzní psoriázy. [48] [50] [51]

Lidský virus imunitní nedostatečnosti a lidský papilomavirus taky mají schopnost zhoršovat průběh psoriázy, protože podporují sekreci substance P, který pomáhá zrychlovat množení keratinocytů. Navíc pacienti s psoriázou prokázali snížené složení fágů, konkrétně *Acinetobacter* phage Presley a *Pseudomonas* phage O4, které potlačují množství bakterií *Acinetobacter* a *Pseudomonas* přispívajících k zánětlivým procesům. [51] [52]

Změny byly rovněž pozorovány i ve střevním mikrobiomu, a to v podobě snížené populace prospěšných bakterií, jako jsou *Parabacteroides*, *Coprobacillus*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. a *Faecalibacterium prausnitzii*. [53]

2.5.3 Akné vulgaris

Akné vulgaris je chronické zánětlivé onemocnění pilosebaceózního folikulu s charakteristickými příznaky, jako je zvýšená produkce kožního mazu, folikulární hyperkeratinizace a zánětlivá reakce. Více než 85 % dospívajících a dospělých trpí tímto problémem. [51]

Akné je dlouhodobě spojováno s přítomností *Cutibacterium acnes*. Hlavním faktorem přítom není samotné množství daného kmenu, ale nerovnováha mezi jeho kmeny. U lidí trpících akné vulgaris převažují virulentní kmeny *C. acnes*, jako jsou IA1 a IA2, produkující porfyriny, které přispívají k podpoře oxidativního stresu a vyvolávají zánětlivé reakce prostřednictvím receptoru TLR-2. Kromě toho *Cutibacterium acnes* je schopné vytvářet biofilmy, které zvyšují jeho virulenci a rezistenci vůči antibiotikům. [51] [54] [55]

Dále se do zánětlivého procesu zapojují další bakterie, jako jsou *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter* a *Klebsiella pneumoniae*, které mají vliv na expresi enzymů, jako jsou lipázy a delta-hemolyziny. [56]

2.5.4 Seborrhoická dermatitida

Seborrhoická dermatitida je všeobecné chronické zánětlivé onemocnění kůže trpící u dětí i dospělých. Mezi hlavní projevy této choroby patří mírné šupinatění pokožky hlavy a u těžších forem lze pozorovat těžké erytematózní plaky na pokožce hlavy, obličeji a trupu. [51]

Zásadním faktorem v patogenezi dané nemoci je nerovnováha mikrobiomu, zejména nadměrné množení houby *Malassezia*, která preferenčně kolonizuje seborrhoické oblasti pokožky. Přemnožení *Malassezia restricta* ve srovnání s *Malassezia globosa* nejvíce ovlivňuje vznik seborrhoické dermatitidy. *Malassezia* využívá nasycené mastné kyseliny, které narušují kožní bariéru a aktivací TLR a receptorů podobných NOD vyvolávají zánětlivou reakci. [51] [54]

Změny v bakteriální mikrobiotě jsou také přítomny v postižené kůži, kde převládají *Staphylococcus*, *Acinetobacter* a *Streptococcus*, zatímco *Cutibacterium* je častější v nepostižených oblastech pokožky. *S. aureus* a *S. epidermidis* mohou zhoršovat zánět a poškození bariéry. [51]

2.5.5 Růžovka

Rosacea neboli růžovka patří mezi chronická zánětlivá kožní onemocnění způsobená genetickými faktory, deregulací vrozené i adaptivní imunity, nerovnováhou kožního mikrobiomu a neuro-imunitními mechanismy. Rozlišují se čtyři hlavní podtypy: erytematotelangiektatická, papulopustulární, fymatózní a oční růžovka. Celkový projev růžovky zahrnují náhlé zarudnutí, přechodný nebo přetrvávající erytém, teleangiektázie, papuly, pustuly, ztlustění kůže a (mikro)edém. Často se také objevují zprávy, že pacienti udávají pocit pálení nebo štípání na kůži a jen zřídka svědění. [57]

Nadměrný růst roztočů *Demodex folliculorum*, kteří jsou nositeli *Bacillus oleronius*, hraje klíčovou roli při podpoře zánětu. Vazodilatace, angiogeneze a tvorba pustul jsou způsobeny zesílenou aktivací TLR-2 receptoru, která následně vede k nadprodukci katelicidinu (LL-37) a aktivaci inflammasomu NLRP3. K onemocnění přispívá také zvýšený výskyt *Staphylococcus epidermidis*, *Helicobacter pylori* a *Bartonella quintana*. [57]

3 MOŽNOSTI MODULACE MIKROBIOMU

Během posledních let vzrostl zájem o terapeutické přístupy směřující k modulaci mikrobiomu při prevenci i léčbě různých onemocnění. Nejběžněji studované strategie zahrnují transplantaci fekální mikrobioty a také nové bioterapeutické přístupy, jako je cílená aplikace komenzálních kožních bakterií s ochrannými účinky.

3.1 Transplantace fekální mikrobioty

S ohledem na rostoucí počet důkazů o souvislosti mezi činností střevního mikrobiomu a vznikem kožních onemocnění, jakým je například atopická dermatitida, dochází k novým způsobům terapie zaměřeným na modulaci mikrobioty. K těmto možnostem patří transplantace fekální mikrobioty (FMT), která se dostala v průběhu posledních let do popředí výzkumu a představuje metodu obnovení střevní rovnováhy. [54]

Při FMT se do střevního traktu pacienta přenese mikrobiota od zdravého dárce a předtím se dárce pečlivě otestuje na nepřítomnost patogenů. Tento zákrok má za cíl odstranit střevní dysbiózu a pozitivně tak ovlivnit celkový zdravotní stav pacienta. [54] [58]

Prostřednictvím modulace imunitní odpovědi a integrity střevní bariéry hraje střevní mikrobiom klíčovou roli ve vývoji a progresi atopické dermatitidy. V případě pacientů s atopickou dermatitidou byla zjištěna nerovnováha střevního mikrobiomu vyznačující se nižší diverzitou střevních bakterií. Byl pozorován pokles prospěšných mikroorganismů, zejména u *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. a zároveň byl sledován nárůst potenciálně škodlivých bakterií, jako jsou *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. [59] [60]

Z výsledků studie Mashiah a kol. lze usuzovat na využití fekální mikrobiální transplantace jako slibné možnosti léčby středně těžké až těžké atopické dermatitidy. Po provedení čtyř aplikací fekální mikrobiální transplantace ve dvoutýdenních intervalech zaznamenala většina pacientů výrazné zmírnění příznaků atopické dermatitidy. U 77 % se závažnost onemocnění snížila na polovinu a o tři čtvrtiny se příznaky zmenšily u 67 % pacientů. [61]

Další změny ve složení střevního mikrobiomu byly pozorovány u lidí trpících psoriázou. Toto onemocnění je charakterizováno zvýšeným zastoupením kmenů *Actinobacteria* a *Firmicutes* a rodů *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a

Megamonas. Počet kmenů *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota* a *Proteobacteria* a rodů *Prevotella*, *Alistipes* a *Eubacterium* se naopak snížil. [62]

V jedné klinické studii se uvádí případ 36letého muže, který trpěl těžkou plakovou psoriázou a měl také zánětlivé střevní onemocnění. U tohoto pacienta byla dvakrát provedena transplantace fekální mikrobioty, přičemž interval mezi jednotlivými podáními byl pět týdnů. Po ukončení léčby docházelo k výraznému zlepšení kožních projevů, snížení indexu závažnosti lupénky, zmírnění střevních příznaků a taky k poklesu hladiny zánětlivého markeru TNF- α v krvi. Současně se zlepšila histologie střevní sliznice, čímž se naznačuje pozitivní vliv fekální mikrobiální transplantace na střevní mikrobiom a celkový zdravotní stav pacienta. [63]

3.2 Transplantace kožního mikrobiomu

Dalším způsobem, který může sloužit jako jedna z možných metod modulace mikrobiomu, je transplantace kožního mikrobiomu. Daná metoda spočívá v přenosu mikrobiálních společenstev ze zdravé dárcovské kůže, na již vyčištěnou nebo desinfikovanou pokožku příjemce. Tento postup se podobá fekální transplantaci mikrobioty, která se používá k léčbě infekcí způsobených bakterií *Clostridium difficile*. Největší výhodou tohoto přístupu je zachování mikrobiomu pacienta v jeho přirozeném ekosystému, což může pomoci obnovit rovnováhu kožní flóry u příjemce. [64]

Nicméně transplantace kožního mikrobiomu naráží na několik výzev. Je obtížné získat dostatečné množství bakterií z kůže dárce, které často vyžaduje jejich předchozí kultivaci v laboratorních podmínkách. Celý tento proces vyžaduje značné množství času a je technicky náročný a není snadno škálovatelný z hlediska širšího klinického nebo průmyslového využití. Omezujícím faktorem je také možný přenos neidentifikovaných bakterií, plísň nebo virů, které mohou pro příjemce představovat riziko kontaminace nebo infekce. [64]

Ze studií zaměřených na přenášení mikrobiomu mezi různými oblastmi pokožky vyplývá, že na složení kožní mikrobioty se podílí především původní prostředí dané oblasti. Během jednoho experimentu došlo k přenosu bakteriálních společenstev z jazyka na čelo nebo předloktí, a naopak. Po 2, 4 a 8 hodinách sledování byla prokázána schopnost přenesených bakterií dočasně kolonizovat nové místo, ale celkové složení mikrobiomu cílové oblasti zůstalo stabilní. [65]

Transplantace mikrobiomu podpaží představuje inovativní metodu, která má za cíl vyměnit bakterie zodpovědné za tělesný zápach za prospěšnější mikroflóru. V rámci tohoto přístupu se využívá princip preemptivní kolonizace, při kterém nově aplikované bakterie kolonizují kůži a potní žlázy, čímž potlačují růst mikroorganismů způsobujících zápach. Celý proces je zahájen antibakteriálním ošetřením a následnou aplikací bakterií od vhodného dárce. Tyto bakterie se nanesou na čistou pokožku podpaží, kde se nechají přirozeně usadit a rozmnožit. Podle výsledků studií dokáže metoda snížit tělesný zápach nejen dočasně (po dobu jednoho měsíce), ale i dlouhodobě (3 měsíce) nebo trvale. [66]

Výsledky některých výzkumů nasvědčují tomu, že transplantace kožního mikrobiomu představuje perspektivní přístup k léčbě infekcí způsobených *Malassezia furfur*. Tento druh kvasinky je významnou součástí kožní mykobioty a její přemnožení je spojeno s onemocněními, jako je seborrhoická dermatitida, pityriasis versicolor a folikulitidy. Daná metoda může pomoci k obnovení přirozené rovnováhy mikrobiomu, a snížit tak nadměrné přemnožení této kvasinky a související kožní onemocnění. [58]

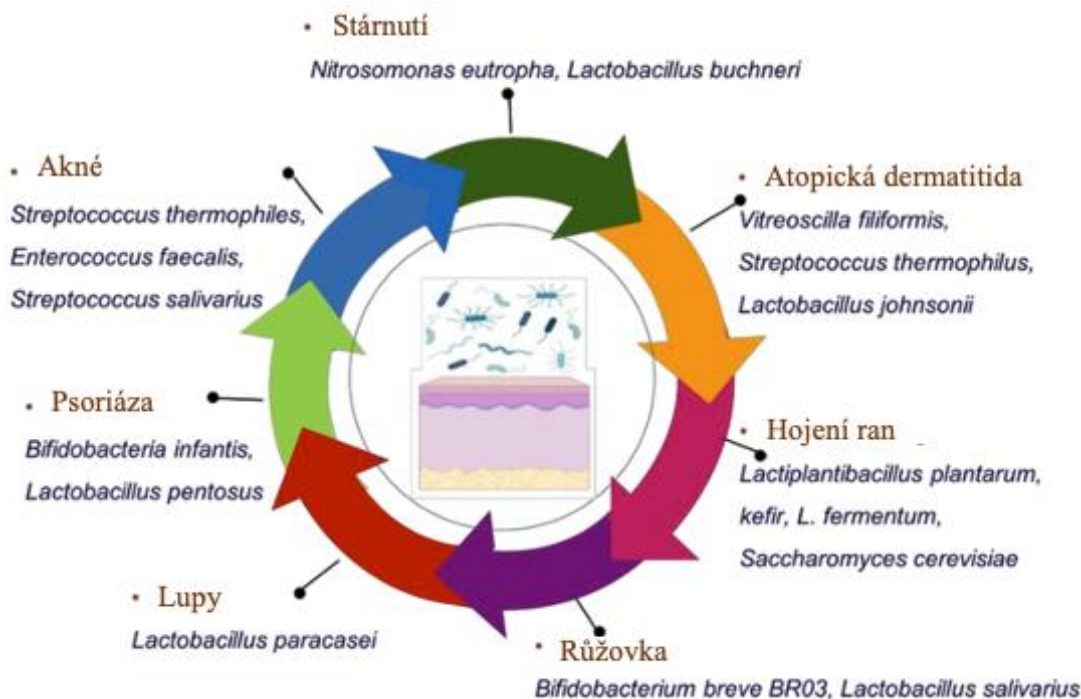
3.3 Probiotika

Další možností modulace je použití probiotik, což jsou živé mikroorganismy, které při podání v dostatečném množství poskytují zdraví prospěšné látky. Pokud jde o péči o pokožku, probiotika pomáhají udržovat rovnováhu mikrobiomu, posilují ochrannou funkci kůže a modulují imunitní reakci. Probiotika působí tak, že regulují imunitní systém, potlačují zánětlivé procesy a podporují funkci kožní bariéry. Díky probiotikům dochází ke stimulaci produkce protizánětlivých cytokinů, jako jsou TGF- β a IL-10, a tím přispívají ke snížení zánětu. [67] [68]

Během posledních let jsou probiotika stále častěji aplikována v dermatologii a péči o pleť, o čemž svědčí řada patentů na jejich použití v kosmetických a terapeutických přípravcích. K jednomu z hlavních účelů patří regulace kožního mikrobiomu, ve kterém probiotické bakterie jako *Propionibacterium*, *Paenibacillus* nebo *Staphylococcus* přispívají k udržení mikrobiální rovnováhy kůže a chrání ji před přemnožením patogenů. Co se týká posílení kožní bariéry, tak toho lze dosáhnout prostřednictvím lyzátu bakterií *Lactobacillus*. Vedle léčebných aplikací mají bakterie *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. pseudolongum* také využití v kosmetických přípravcích určených na zlepšení hydratace a prevence známek stárnutí. V dermatologii se úspěšně aplikují *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* a *L. sakei* při léčbě dysbiózy pokožky. Dále se probiotika uplatňují

v prevenci infekcí při hojení ran. Jejich účinek spočívá ve zmírnění zánětu, omezení kolonizace patogeny a přispění k hydrataci pokožky. [53]

Na obrázku 4 jsou uvedeny jednotlivé probiotické mikroorganismy, u nichž byly zjištěny příznivé účinky při léčbě běžných kožních onemocnění.



Obrázek 4: Probiotické kmeny napomáhající léčbě různých kožních dysbióz [53]

3.3.1 Účinek na atopickou dermatitidu

Ve studii Nakatsuji a kol. byl sledován vliv *Staphylococcus hominis*, který byl izolován ze zdravé kůže, na atopickou dermatitidu, která je spojená s přemnožením *S. aureus*. Zmíněný komenzální kmen prokázal inhibiční účinky na růst *S. aureus* prostřednictvím produkce lantibiotik, které snižují expresi zánětlivých toxinů. Preklinické studie na myším modelu s AD demonstrovaly po aplikaci *S. hominis* snížení kolonizace *Staphylococcus aureus*, zmírnění zánětlivé reakce a posílení kožní bariéry. V klinické studii za účasti 54 pacientů s AD bylo zjištěno snížení množství patogenního kmenu a snížení nežádoucích účinků spojených s AD. Taký bylo pozorováno zlepšení závažnosti ekzému. [69]

Probiotická bakterie *Roseomonas musoca* byla v klinické studii Myles a kol. lokálně aplikována na postižená místa kůže pacientů s atopickou dermatitidou. Po dobu tří měsíců byla aplikace prováděna dvakrát týdně, poté po dobu jednoho měsíce každý druhý den. Z výsledků studie vyplynulo, že ošetření mělo za následek zmírnění příznaků AD, a to po dobu až osm měsíců po ukončení léčby. K mechanismu účinku *R. mucosa* patří modifikace

kožního mikrobiomu, zlepšení bariérové funkce kůže a snížení množství *S. aureus* na pokožce. [70]

3.3.2 Účinek na akné

Výzkum Lebeer a kol. vyhodnocoval efektivitu probiotických kmenů *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, *Lactiplantibacillus plantarum* WSFS1 a *Lactiplantibacillus pentosus* KCA1 z hlediska léčby akné. Tyto bakterie dokázaly inhibovat růst patogenních bakterií, jako je *Cutibacterium acnes* a *Staphylococcus aureus* spojených s rozvojem akné. Nejvyšší antibakteriální účinnost byla prokázána u bakterií *L. plantarum* WSFS1 a *L. pentosus* KCA1. Současně zvolené kmeny snižovaly lipázovou aktivitu *C. acnes*, která je zodpovědná za přeměnu kožního mazu na volné mastné kyseliny odpovídající za vznik podráždění pokožky. Výsledky rovněž potvrzují, že se při použití krému s probiotiky významně zlepšilo akné s poklesem zánětlivých lézí a komedonů již po 4 týdnech léčby. Příznivé účinky byly pozorovány i po skončení léčby, což může naznačovat imunomodulační efekt zahrnující adaptivní imunitní systém. [71]

3.3.3 Účinek na vzhled pokožky

Vliv probiotických bakterií byl nalezen i v oblasti kosmetické dermatologii. Bylo prokázáno, že amoniak-oxidující bakterie *Nitrosomonas eutropha* má významnou úlohu při zachování dobrého vzhledu pokožky. V této studii účastníci aplikovali aerosol s probiotickým kmenem o různé koncentraci buněk dvakrát denně po dobu sedmi dní. Bylo zaznamenáno výrazné zlepšení závažnosti a hloubky vrásek, zejména v oblasti čela, mezi obočím a na celém obličeji, přičemž k tomuto efektu došlo pouze u skupiny, která používala sprej s vyšší koncentrací bakterií. U stejné skupiny byly statisticky zjištěny změny v pigmentaci na čele a glabele, ale intenzita pigmentace obličeje se celkově nezměnila. Kromě toho bylo možné pozorovat zvýšení jasu pleti na stejných místech obličeje. [72]

3.4 Postbiotika

V současnosti se postbiotika stále více uplatňují ve zdravotnictví, potravinářství a kosmetickém průmyslu. Představují neživé metabolity nebo složky produkované činností probiotických mikroorganismů, jako je kyselina mléčná, krátké mastné kyseliny, bakteriociny, biosurfaktanty nebo inaktivované mikroby a jejich extrakty. Ve srovnání s probiotiky, u postbiotik nehrozí riziko infekce a nepřenášejí antibiotickou rezistenci, jsou stabilnější a mají definované složení a delší trvanlivost. Taky postbiotika mají schopnost

zachovávat si řadu příznivých biologických účinků, včetně imunomodulačních, protizánětlivých a antimikrobiálních účinků. Jejich protinádorová aktivita je rovněž značná, protože postbiotika dokáží podporovat apoptózu nádorových buněk a modulovat imunitní odpověď. K uplatnění postbiotik v kosmetice patří například lokální přípravky obsahující kyselinu mléčnou nebo výtažky z mikroorganismů, které pomáhají obnovit kožní mikrobiom a zmírnit zánětlivé projevy, jako je akné nebo ekzém. [43] [73]

Z několika provedených studií vyplývá, že například tyndalizovaný extrakt z *Lactobacillus acidophilus* prostřednictvím antimikrobiálních peptidů přispívá k regulaci zdraví pokožky. Zároveň je daný extrakt schopen neutralizovat reaktivní formy kyslíku vyvolané UVB zářením, které mohou vést k anti-aging efektu na keratinocytech. Dalším příkladem mohou být lyzáty *L. plantarum* a *L. salivarius*, které podporují proliferaci a migraci keratinocytů, a tím urychlují reepitelizaci. Ukázalo se také, že lokální aplikace extraktů *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* nebo *L. plantarum* má vliv na zlepšení stavu pokožky náchylné k akné. Extrakty *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus acidophilus* se vyznačují antimikrobiálními vlastnostmi, které mohou napomoci hojení kožní tkáně. [74]

Pozitivní vliv na seborrhoickou dermatitidu byl rovněž pozorován během použití lyzátu *Vitreoscilla filiformis*, který může ovlivňovat imunitní odpověď a to tak, že povzbuzuje dendritické buňky ke tvorbě protizánětlivého cytokinu IL-10. Tento cytokin je schopen regulovat zánětlivé procesy. Kromě toho dochází ke zvýšení aktivity regulačních T-buněk schopných tlumit přehnané imunitní reakce a podílet se na udržování homeostázy kůže. [53]

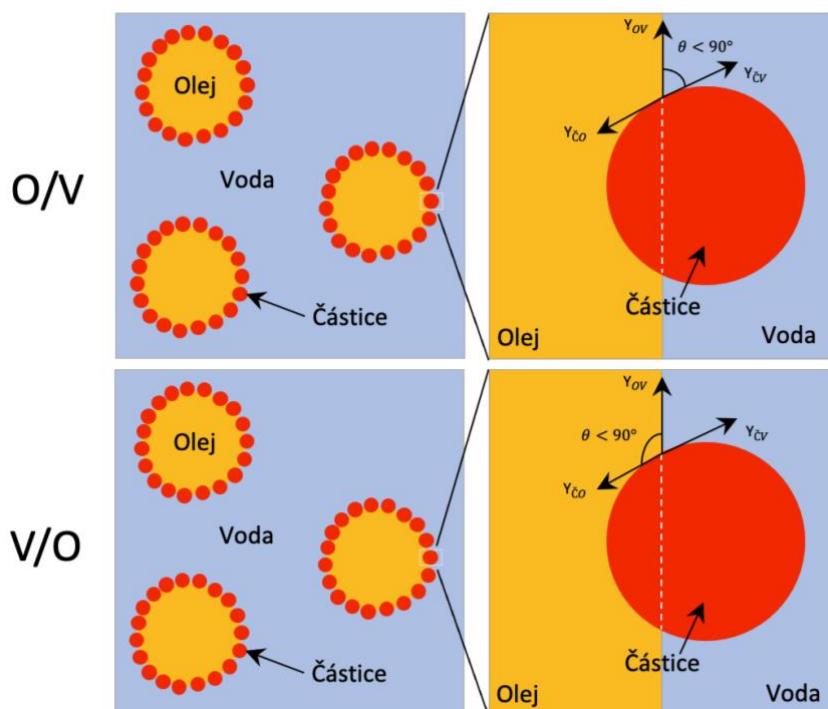
3.5 Prebiotika a synbiotika

Za prebiotika se považují nestravitelné složky potravy, často klasifikované jako dietní vláknina, jejichž působením dochází k podpoře růstu prospěšných mikroorganismů ve střevním a kožním mikrobiomu. Bylo prokázáno, že perorální podávání prebiotik, jako jsou fruktooligosacharidy, je příznivé z hlediska zlepšení funkce kožní bariéry a v důsledku stimulace množení symbiotických bakterií může být přínosem pro předcházení některým dermatologickým poruchám. Nejčastěji se prebiotika používají v kombinaci s probiotiky za vzniku takzvaných synbiotik. Poslední jsou schopné zajišťovat lepší přežívání a osídlení živými prospěšnými mikroorganismy, a tím mohou kladně působit na celkový zdravotní stav hostitele. [43]

4 PICKERINGOVY EMULZE

Pickeringovy emulze patří do skupiny emulzních systémů, které jsou stabilizovány pevnými částicemi, na rozdíl od klasických emulzí, u kterých dochází ke stabilizaci prostřednictvím běžných syntetických tenzidů. Tento způsob je pokládán za environmentálně udržitelnou a bezpečnější alternativu především v kosmetickém průmyslu, protože klasické emulze stabilizované některými typy povrchově aktivními látkami mohou vykazovat nežádoucí účinky, jako je podráždění pokožky, alergické reakce nebo cytotoxicita. Naopak jednotlivé pevné částice obsažené v Pickeringových emulzích nejen značně zvyšují kinetickou stabilitu emulze proti koalescenci a Ostwaldovu zrání, ale také dovolují přesně kontrolovat reologické vlastnosti, texturu a smyslové vnímání výrobku během aplikace. Lze tak vytvářet multifunkční kosmetické přípravky s cíleným uvolňováním účinných látek, lepší biokompatibilitou a nižší toxicitou. [75]

Na stabilitu daného druhu emulze má velký vliv fyzikálně-chemické vlastnosti jak stabilizujících částic, tak i povaha jednotlivých fází emulze. Bylo prokázáno, že nesférické částice potřebují více energii k uvolnění z rozhraní, a proto mohou být považovány za efektivnější stabilizátory Pickeringových emulzí. Klíčovým parametrem je smáčivost povrchu pevných částic určená kontaktním úhlem na fázovém rozhraní. Tak například při stabilizaci emulzí monovrstvou pevných částic, pokud je kontaktní úhel částic menší než 90° , tak dochází ke vzniku emulze typu olej ve vodě. V opačném případě se částice spíše adsorbují v olejové fázi a vytvářejí emulze typu voda v oleji, jak lze vidět na obrázku 5. Povrchový náboj částic taky ovlivňuje adsorpci na rozhraní a to tak, že částice s nízkým zeta-potenciálem vykazují tendenci agregovat a lépe se adsorbovat, což vede k vyšší stabilitě emulze. Na výsledné vlastnosti emulze, jako je stabilita a velikost emulzních kapek, má vliv i velikost částic. Menší částice obvykle vedou ke zvýšení kinetické stability a vzniku menších emulzních kapek, naopak příliš malé částice mohou podléhat Brownovu pohybu, což způsobuje snížení jejich adsorpční kapacity. V neposlední řadě hraje významnou roli také složení a správný poměr disperzní a kontinuální fáze. Zvýšením polarity olejové fáze dojde ke snížení mezifázového napětí na rozhraní, čímž se usnadní uvolňování částic z rozhraní díky snížené potřebné energie k jejich oddělení. [76]



Obrázek 5: Uspořádání kapalin a pevných částic v Pickeringových emulzích [75]

Ke stabilizaci Pickeringových emulzí se používají organické a anorganické pevné částice. Organické částice se můžou rozdělit podle chemické povahy na polysacharidy, proteiny a lipidy, a můžeme mezi ně zařadit i částice mikrobiálního původu.

Mezi anorganické pevné částice, které se používají ke stabilizaci Pickeringových emulzí, patří hydroxyapatit a oxid titaničitý. Hydroxyapatit zajišťuje stabilizaci emulzí olej ve vodě i voda v oleji v podstatě bez negativní biologické odezvy. Emulze stabilizované hydroxyapatitem mají vysokou fyzikální stabilitu, kterou je možné ovlivnit koncentrací hydroxyapatitu, poměrem fází, hodnotou pH a rychlostí emulgace. Rovněž dané emulze vykazují dobré reologické vlastnosti, které vypovídají o jejich schopnosti rovnoměrného roztírání a o možnosti použití v kosmetickém průmyslu. Stabilizaci Pickeringových emulzí může být dosaženo i za použití vysoce hydrofilního nemodifikovaného oxidu titaničitého, který vytváří vodíkové vazby s polárními složkami olejové fáze. Tyto výsledné systémy se vyznačují vysokou fyzikální stabilitou a rovněž ochranou fotocitlivých látek před UV zářením. [78] [79]

Do skupiny polysacharidů patří škrobové částice, dále mikročástice nebo nanokrystaly celulózy a chitosan. Bylo prokázáno, že přírodní škrobová zrna představují velký potenciál jako stabilizátory emulzí, ale vzhledem k jejich nízké hydrofobicitě a velké velikosti částic se na rozhraní olej-voda hůře adsorbují. Po úpravě těchto vlastností prostřednictvím kyselých

hydrolyzy, nanoprecipitace nebo esterifikace oktenylsukcinovým anhydridem bylo dosaženo menší velikosti emulzních kapek a vyšší fyzikální stability. Chitosan se používá hlavně v kombinaci s dalšími látkami vzhledem ke své kationtové povaze. Jeho nízká povrchová aktivita nemá přirozeně dobré emulgační vlastnosti, avšak jeho stabilizační účinek může být zvýšen úpravou pH, stupněm deacetylce nebo iontovým zesíťováním za použití tripolyfosforečnanu sodného. Mikročástice nebo nanokrystaly celulózy poskytují vysokou stabilitu i při nízkých koncentracích a jsou slibným stabilizátorem především pro potravinářské aplikace. [77]

Proteinové částice, jako je syrovátkový protein, zein a sójový protein, se rovněž podílejí na stabilizaci Pickeringových emulzí. Surovátková bílkovina se běžně používá v potravinářství, nicméně její citlivost na teplo může omezit stabilitu emulzí. Tento nedostatek je možné eliminovat různými modifikacemi, jako je denaturace nebo glykace, jejichž výsledkem jsou nanofibrily vykazující lepší stabilizační vlastnosti. Zein rostlinného původu získaný z kukuřice má přirozeně amfifilní vlastnosti a tvoří stabilní částice i bez chemické úpravy, avšak jeho účinek lze navíc zlepšit kombinací s polysacharidy, jako je xanthanová nebo kukuřičná vláknina. Sójová bílkovina také rostlinného původu vykazuje díky své globulární struktuře schopnost emulgovat a není třeba ji chemicky upravovat. Při kombinaci se složkami, jako je pektin nebo vláknina okara, může být dosaženo vysoké stability i za náročných podmínek, jako je nízké pH nebo opakované zmrazování. [77]

Krystaly tuků ze skupiny lipidových částic mohou být také považovány za účinné stabilizátory Pickeringových emulzí typu V/O. Na základě své povrchové aktivity dokáží emulze stabilizovat několika způsoby. Tak například triglyceridy, což jsou povrchově neaktivní krystaly, vytvářejí fyzikální síť, která mechanicky uzavírá dispergovanou fázi. V případě amfifilních a povrchově aktivních krystalů ke stabilizaci dochází vznikem krystalických monovrstev, které zabraňují agregaci kapek. [77]

Ke stabilizaci Pickeringových emulzí přispívají i pevné částice mikrobiálního původu, konkrétně probiotického původu, jako jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus thermophilus*. [80]

Stabilních emulzí je možné dosáhnout spojením mikroorganismů s pevnými částicemi organického původu. Tak například *Lactococcus lactis* spolu s přírodními biopolymery jako je chitosan nebo hydroxypropylmethylcelulosa dokáží vytvořit síť, která se adsorbuje na povrch kapek a vytváří stabilní emulzní systém. Dále například *Lactobacillus acidophilus* a

nanočástice bakteriální celulózy vykazují dobré stabilizační schopnosti pro dvojité emulze typu V/O/V. [81] [82]

Pickeringovy emulze se především využívají ve farmaceutickém průmyslu vzhledem ke své schopnosti chránit účinné látky před degradací, rovněž pomáhají zvyšovat jejich rozpustnost a biologickou dostupnost a při podání ústy jsou schopny maskovat nepříjemnou chuť. Při topické aplikaci pak umožňují zlepšit prostupnost účinné látky kůží a její ukládání v cílové oblasti. Podstatnou výhodou je schopnost společného zapouzdření několik různých léčiv, a to takovým způsobem, že jedno se nachází v olejové fázi a druhé je umístěno přímo v částicích stabilizujících emulzí. Pevný obal částic obklopující emulzní kapky navíc zajišťuje delší stabilitu systému. Existuje možnost využití Pickeringových emulzí i pro injekční aplikace, a to za předpokladu, že velikosti kapek je menší než 5 μm , dodržení podmínek izotonie a pH. [83]

V kosmetice se s Pickeringovými emulzemi můžeme setkat zejména v oblasti hydratačních přípravků, opalovacích prostředků, zesvětlujících produktů a přípravků proti stárnutí. Mezi hlavní výhody použití daného typu emulze patří zlepšení senzorických vlastností, textury konečných formulací a pronikání účinných látek do pokožky. Rovněž Pickeringovy emulze prokázaly úspěšnou enkapsulaci, například tokoferol-acetátu, který poskytoval dlouhodobou ochranu antioxidační aktivity. Po enkapsulaci další účinné látky, jako je vitamín E, se podařilo zlepšit ochranu daného vitamínu před oxidací. Nicméně k plnému pochopení použití dané technologie je potřeba důkladnějšího zkoumání toxikologických aspektů jednotlivých částic. [75]

5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Výzkum Firoozmunda a Rousseaua demonstroval možnost tepelně inaktivovaných buněk *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus thermophilus* účinně stabilizovat Pickeringovy emulze typu olej ve vodě. Emulze byly připraveny v poměru 50/50 pomocí míchání. Ke stabilizaci docházelo adsorpcí buněk na rozhraní, kde vytvářely vrstvy, a tím předcházely koalescenci. *L. acidophilus* prokázal nejvyšší účinnost. Vzniklé emulze vykazovaly stabilitu a byly vyhodnoceny jako přírodní alternativa k syntetickým emulgátorům. [80]

Další studie Nejadmansouriho a kol. posuzovala způsobilost 19 různých mikroorganismů, včetně kvasinek rodu *Saccharomyces*, koků (*Enterococcus faecium* a *Pediococcus acidilactici*), bakterií rodu *Bacillus* a *Lactobacillus*, ke stabilizaci emulzí typu olej ve vodě. K přípravě emulzí byly použity inaktivované mikroorganismy. V emulzích stabilizovaných laktobacily byla zajištěna nejvyšší stabilita, která byly vysvětlena vhodným poměrem hydrofilních a hydrofobních složek buněčné stěny. Při vyšší použité koncentraci mikroorganismů došlo k prodloužení fyzikální stability z 12 dnů na 35 dní. [84]

Přirozená hydrofilita bakterií může mít vliv na účinnost stabilizace emulzí, proto studie Jiang a kol. se zabývala modifikací buněčného povrchu buněk bakterie *Lactobacillus acidophilus*. Bylo prokázáno, že chemická úprava buněk oktenylsukcinát anhydridem výrazně zvýšila hydrofobicitu bakterie a tímto změněná bakterie přispěla k účinnější stabilizaci pěn a emulzí. Po modifikaci buněk nebyly pozorovány změny spojené s povrchovým nábojem, ale daná úprava vedla ke zvýšení adsorpce buněk na rozhraní. Připravené emulze měly menší velikost kapek, vyšší stabilitu proti koalescenci a taky ukázaly rovnoměrnější distribuci ve srovnání s emulzemi obsahujícími nativní buňky. [85]

Studie Muhammeda a kol. se zabývá kmeny rodu *Lactobacillus* a zjišťuje jejich přirozenou schopnost stabilizovat emulze typu olej ve vodě bez potřeby chemické modifikace buněk. Na základě hodnocení zeta-potenciálu a povrchové hydrofobicity bylo z 31 kmenů vybráno 12 bakterií, které následně byly promyty, resuspendovány ve fosfátovém pufru (pH 4), smíchány v poměru 50/50 s MCT olejem a emulgovány pomocí vysokorychlostního homogenizátoru při 24000 otáčkách za minutu po dobu 60 sekund. Po 1-3 týdnech byla hodnocena vizuální stabilita emulzí a rovněž byly stanoveny relativní objemy emulzí, velikosti emulzních kapek a jejich distribuce. Tak například emulze

stabilizovaná bakterií *L. acidophilus* vytvářely menší emulzní kapky ve srovnání s ostatními kmeny. [86]

Pevné částice mikrobiálního původu, jako je *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* a *Kluyveromyces marxianus*, ve studii Narsipur a kol. prokázaly, že jsou po inaktivaci schopny adsorbovat se na rozhraní oleje a vody. Tak například emulze připravená z tepelně inaktivované bakterie *S. cerevisiae* a olivového oleje vykazovala vysokou odolnost vůči koalescenci, a to po dobu až čtyř měsíců. Rovněž v této studii bylo zjištěno, že ke stabilizaci Pickeringových emulzí dochází i při výměně olejové fáze za hexadekan nebo MCT olej. Bylo také zjištěno, že emulze lze stabilizovat pomocí extraktů z buněčné stěny kvasinek, tzv. mannoproteinů. Díky svým povrchovým vlastnostem a glykanové struktuře projevují emulgační aktivitu. [87]

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Účelem diplomové práce je zkoumání potenciálu stabilizace Pickeringových emulzí za použití zvolených druhů mikroorganismů, které mohou nalézt své uplatnění v modulaci kožního mikrobiomu. Současně je práce zaměřena na studium stabilizačního účinku aktivních a inaktivovaných forem buněk a složení systému ve vztahu k fyzikálně-chemickým vlastnostem emulzí.

Součástí úvodní části diplomové práce je přehled poznatků o rovnováze kožního mikrobiomu a jejím narušení projevujícím se dermatologickými onemocněními. Více pozornosti je věnováno probiotickým mikroorganismům, zejména rodu *Lactobacillus*. Tento bakteriální druh dokáže nejen podpořit zdraví lidské pokožky, ale může mít také velký význam pro použití jako stabilizátoru v Pickeringových emulzích. Za zmínku stojí také i kvasinky z rodu *Saccharomyces cerevisiae*, které však nepatří mezi přirozené součásti kožního mikrobiomu, ale v dnešní době se jejich potenciál ve stabilizaci emulzí často zkoumá.

V rámci praktické části diplomové práce je kladen důraz především na stanovení fyzikálně-chemických vlastností vybraných mikroorganismů a rovněž emulzí připravených s použitím buněk těchto mikroorganismů jako stabilizujících částic. Byly sledovány parametry jako je velikost částic a kapek emulze, povrchové napětí bakteriálních buněk, zeta-potenciál částic/emulzí a mikroskopická struktura emulzí.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

V této kapitole je podrobně popsán detailní přehled všech použitých surovin a přístrojového vybavení nezbytného k přípravě a následné fyzikálně-chemické charakterizaci emulzí typu olej ve vodě (O/V).

7.1 Materiály

Vodná fáze byla složena z disperze bakterií/kvasinek a Dulbeccova fosfátového pufovaného solného roztoku (PBS).

Mikroorganismy, které byly použité pro přípravu disperzí bakterií a kvasinky:

- *Saccharomyces cerevisiae* (LABETA, a.s., Česká republika)

Složení: pekařské droždí, emulgátor E 491.

- *Lactobacillus fermentum* CCDM 154
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 181
- *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198
- *Lactobacillus casei* CCDM 422
- *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 963A

Ke kultivaci a kontrole bakterií byly využity následující složky:

- Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth), Granulated (ČADERSKÝ-ENVITEK, spol. s r.o., Česká republika)
- Agar Agar, Type I (ČADERSKÝ-ENVITEK, spol. s r.o., Česká republika)
- L-Cysteine hydrochloride, monohydrate (ČADERSKÝ-ENVITEK, spol. s r.o., Česká republika)
- Destilovaná voda

Pro přečištění bakterií a přípravu disperzí bakterií a kvasinek byly použity:

- Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Biosera, Francie)
- Destilovaná voda

Olejová fáze byla složena z:

- Saboderm TCC RSPO MB (Caprylic/Capric triglyceride, ACE Trade; MCT olej)

Materiály, které byly použité pro přípravu 3D modelu kůže a testování emulzí, jsou uvedeny níže.

Buněčné linie:

- HDF – lidské kožní fibroblasty (kat. č.: 102-05n, Cell Sigma-Aldrich)
- HaCaT – spontánně transformované lidské keratinocyty (Cell Sigma-Aldrich)

Kultivační média:

- DMEM/F12 (1:1; ThermoFisher Scientific, USA)
- DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Fetální hovězí sérum (FBS, BioSera, Francie)
- Penicilin/streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie)
- Pyruvát sodný (100mM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)

Bakteriální kmen:

- *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418, ČSM, Česká republika)

Kolagenový roztok:

- Corning® Kolagen I (kat. č.: 354249, Corning, USA)

7.2 Přístrojové vybavení

Tato část zahrnuje přehled přístrojů používaných při přípravě a analýze buněk a emulzí.

- Mikrobiologický inkubátor Memmert Modell 100–800 (Memmert GmbH + Co. KG, Německo)
- Laminární box tř. II – MSC Advantage 1.2 (Thermo Electron LED GmbH, Německo)
- Parní sterilizátor (autokláv) Tuttnauer 2540EL (Tuttnauer Europe B.V., Nizozemsko)
- Vortex IKA MS3 basic (IKA, Německo)
- Analytické váhy (VWR, Spojené státy americké/USA)
- Centrifugační zařízení (Hettich EBA-20, Německo)

- Vortex (V-1 plus, Biosan, Lotyšsko)
- Tensiometr Sigma 701 (Biolin Scientific, Švédsko)
- Magnetická míchadla (Heidolph Hei-Mix S, Německo; MM4 Lavat Chotutice, Česká republika)
- Digital Ultra-Turrax (IKA T25, Německo)
- Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, Velká Británie)
- Kyveta pro měření zeta-potenciálu (DTS1070)
- Kyveta pro měření velikosti částic (DTS0012)
- Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical, Velká Británie)
- Mikroskop (Olympus CX21, Japonsko)
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky (Petriho misky, jednorázové očkovací klíčky, automatické pipety, sterilní špičky, skleněné zkumavky, kádinky, odměrné baňky, Pasteurovy pipety, odměrné válce, tyčinky, magnetická míchadelka, stojany, reagenční láhve s modrým uzávěrem, centrifugační zkumavky, vialky, teploměr, baňky T75)

8 POUŽITÉ METODY

Tato kapitola obsahuje přehled použitých experimentálních postupů přípravy a následné charakterizace disperzí bakterií/kvasinek a emulzí stabilizovaných těmito pevnými částicemi.

8.1 Příprava disperzí

V prvním kroku byla provedená příprava disperzí pevných částic, které byly dále využity pro přípravu emulzních systémů.

8.1.1 Příprava disperzí bakterií *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* byly kultivovány anaerobně za použití MRS bujónu (bujón pro *Lactobacillus* podle DE MAN, ROGOSA a SHARPE). V prvním kroku bylo 100 µL zmrazené zásobní kultury *Lactobacillus* přeneseno do skleněné zkumavky, která obsahovala MRS bujón a 5% roztok cysteinu. Suspenze byla inkubována při teplotě 37 °C v anaerobních podmínkách po dobu 48 hodin. Poté byla provedena příprava média a to tak, že vypočtené množství bujónového prášku (22,06 g) bylo rozpuštěno v 400 mL destilované vody, médium bylo vysterilizováno v autoklávu a následně uchováno v anaerobním prostředí. Z narostlé kultury byl 1 mL přenesen do 400 mL čerstvě připraveného MRS bujónu, ke kterému bylo přidáno 4 mL 5% cysteinu, a inkubace probíhala v exikátoru za anaerobních podmínek po dobu 5 dní. Viabilita buněk rodu *Lactobacillus* byla sledována jejich kultivací na miskách.

Pro získání čistých buněk bakterií, které byly dále použity jako stabilizátory Pickeringových emulzí, bylo provedeno jejich odstředování při 3000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Centrifugace byla provedena celkem čtyřikrát. Po každé centrifugaci byla polovina supernatantu odstraněna a nahrazena PBS. Po poslední centrifugaci byl odebrán celý supernatant. Získané buňky byly zváženy a byla z nich připravena 10% disperze bakterií v PBS.

V posledním kroku byla u poloviny disperze bakterií provedena inaktivace ve vodní lázni při teplotě 85 °C po dobu 30 minut, čímž buňky ztratily životaschopnost, ale jejich morfologie zůstala nenarušená.

8.1.2 Příprava disperze *Saccharomyces cerevisiae*

Pro přípravu disperze *Saccharomyces cerevisiae* bylo naváženo 5 g sušeného droždí, které bylo rozdispergováno v 50 mL destilované vody. Vzniklá homogenní disperze byla

přečištěna za použití centrifugy při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Centrifugace byla opakována celkem šestkrát, přičemž při poslední centrifugaci byl všechn supernatant odstraněn. Na závěr byla připravena 10% disperze kvasinek v PBS, polovina pak byla inaktivována stejným způsobem jako bakterie rodu *Lactobacillus*.

8.2 Příprava emulzí

Pro testování potenciálu bakteriálních buněk rodu *Lactobacillus* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jako alternativy stabilizátorů byl zvolen emulzní systém olej ve vodě. Do formulací byly mikroorganismy zakomponovány ve dvou stavech, a to ve formě aktivních (životaschopných) a termálně inaktivovaných buněk, byly použity 10% disperze buněk. Dále byl posuzován především jejich vliv na stabilizaci emulzního systému a také na jejich případnou interakci s kožní mikrobiální bariérou.

Olejovou fází tvořil MCT olej, který je dobře emulgovatelný a často využívaný v kosmetických přípravcích, zatímco vodná fáze byla složena z disperze kvasinek nebo bakterií. Emulze o celkové hmotnosti 15 g byly připraveny s různými poměry olejové a vodné fáze, konkrétně v poměru 20/80, kde bylo naváženo 3 g MCT oleje a 12 g disperze bakterií a kvasinek, a 50/50, tedy 7,5 g olejové fáze a 7,5 g vodné fáze.

Poté, co byly jednotlivé složky naváženy, byly směsi míchány na magnetickém míchadle po dobu 5 minut při laboratorní teplotě pro předběžnou homogenizaci. Následně byly vzorky převedeny do plastové zkumavky o objemu 50 mL, a emulgovány pomocí vysokorychlostní homogenizace za použití přístroje Ultra-Turrax s nastavenou rychlostí 15000 otáček za minutu po dobu 10 minut.

8.3 Charakterizace stabilizátorů a emulzí

Za účelem získání komplexních představ o chování použitých stabilizačních částic byla provedena fyzikálně-chemická charakterizace jak stabilizujících buněk, tak emulzních systémů. Díky sledovaným základním parametrům, jako je velikost a zeta-potenciál částic, lze posoudit jejich účinek na stabilitu emulzních systémů. S ohledem na emulze bylo dále provedeno hodnocení kinetické stability na základě stanovení indexu krémování a mikrostruktura byla studována mikroskopickou analýzou.

8.3.1 Velikost částic

Přístroj Zetasizer Nano ZS90 pracující na principu dynamického rozptylu světla se používá k posouzení velikosti stabilizačních částic. Při této metodě jsou monitorovány náhodné pohyby částic vyvolané působením jejich tepelné energie v kapalině, tzv. Brownův pohyb. Tyto částice rozptylují dopadající laserový paprsek a jsou analyzovány výsledné změny intenzity rozptýleného světla v čase. Na základě těchto údajů je následně určena rychlost difúzního pohybu a ta je pomocí Stokesova-Einsteinovy rovnice převedena na hodnotu hydrodynamického průměru. [88]

Příprava vzorku probíhala smícháním 1 mL destilované vody s 50 μL disperze stabilizujících částic do plastové kyvety typu DTS0012 s uzávěrem, která je určena k optickým měřením. Za účelem analýzy byly v softwaru přístroje nastaveny parametry jako je index lomu s hodnotou 1,45, měření probíhalo pod detekčním úhlem 90° za konstantní teploty 25°C a všechny vzorky byly proměřeny ve dvou opakováních a každé z nich zahrnovalo nejméně tři jednotlivá měření.

8.3.2 Povrchové napětí

U disperzí částic byly studovány jejich povrchové vlastnosti. Povrchové napětí disperzí bakterií a kvasinek bylo stanoveno pomocí tenziometru Sigma 701 (Biolin) s použitím Wilhelmyho destičkové metody. Ta je postavena na principu měření síly, jež působí na tenkou platinovou destičku, která je vertikálně umístěna na senzitivní mikrováze a zčásti namočená v kapalině. [89] [90]

Před každým měřením je potřeba destičku očistit v destilované vodě a poté v acetonu, vyžít ji plamenem a pak ji volně nechat vychladnout. Pro měření povrchového napětí byly 10% disperze bakterií a kvasinek zředěny na koncentrace 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5 a 1 %. Výsledek byl stanoven jako průměrná hodnota z pěti měření.

8.3.3 Zeta-potenciál

Elektrokinetický parametr zvaný zeta-potenciál charakterizuje elektrický náboj na rozhraní mezi povrchem částice a okolním disperzním prostředím. Definuje se jako elektrický potenciál na takzvané skluzové rovině, což je pomyslná hranice mezi stabilizující částicí a difúzní vrstvou protiiontů obklopující ji. Hodnota zeta-potenciálu je mírou elektrostatického odpuzování mezi jednotlivými částicemi a napomáhá posoudit koloidní stabilitu jak jednotlivých disperzí částic, tak i disperzních systémů. Vyšší stabilita se obecně projevuje vyšší

absolutní hodnotou zeta-potenciálu, ať už kladnou nebo zápornou (± 30 mV), jelikož v důsledku elektrostatického odpuzování nedochází k agregaci nebo flokulaci částic. Principem měření je aplikace elektrického pole na suspenzi nabitých částic s elektroforetickým pohybem směrem k elektrodě s opačným nábojem, který je detekován laserovým paprskem, a vyhodnocený pomocí Dopplerova posunu rozptýleného světla a na základě získaných údajů je následně vypočten a uváděn jako zeta-potenciál. [88]

K určení zeta-potenciálu byly vzorky připraveny tak, že se smíchaly 4 mL destilované vody a 250 μ L disperze, případně emulze. Následně byla takto připravená směs řádně promíchána a poté dávkována injekční stříkačkou do měřicí kyvety typu DTS1070. Kyveta byla po naplnění těsně uzavřena a vložena do přístroje, kde předem v softwaru byly nastaveny parametry odpovídající tomuto měření. Aby byla zajištěna spolehlivost výsledků, byl každý vzorek změřen dvakrát, přičemž každé mělo tři jednotlivá měření.

8.3.4 Optická mikroskopie

Optická mikroskopie je metodou využívající viditelné světlo a soustavu čoček pro zvětšování obrazu pozorovaného objektu. Princip této metody je založen na průchodu světelného paprsku vzorkem s obrazem vytvořeným objektivem a následně zvětšeným okulárem. Při průchodu optickým prostředím o různé hustotě dochází k refrakci světelných paprsků, což vede ke vzniku optického obrazu. [91]

U disperzí částic a emulzí byla provedena mikroskopická analýza za použití světelného mikroskopu. Na podložní sklíčko bylo nanесeno 15 μ L vzorku, který byl překryt krycím sklíčkem. Pozorování bylo provedeno při zvětšeních 100x, 400x a 1000x, přičemž u posledního byl použit imerzní olej, který byl aplikován mezi objektiv a krycí sklíčko, pro zvýšení rozlišení. Získané snímky byly upraveny a vyhodnoceny pomocí softwaru ImageJ.

8.3.5 Velikost a distribuční křivky emulzních kapek

Klíčovým parametrem při charakterizaci emulzních systémů je stanovení velikosti emulzních kapek vzhledem k tomu, že významně ovlivňuje fyzikální stabilitu daných systémů. Velikost a distribuce byly změřeny pomocí přístroje Mastersizer 3000, jehož principem je laserová difrakce. Podstata této metody tkví ve zjišťování úhlového rozložení světla rozptýleného na částicích obsažených ve vzorku. Světlo se v závislosti na velikosti emulzních kapek rozptyluje pod různými úhly. Tak například kapky o větší velikosti rozptylují světlo pod menšími úhly, kdežto menší naopak. Data jsou pak zachycena

detektory a vyhodnocena na základě matematického modelu, nejběžněji Mieho teorie. Zařízení je taky schopno zaznamenat submikronové kapičky a větší shluky vznikající v důsledku nedostatečné stabilizace systému. [92]

Velikost emulzních kapek byla uskutečněna na disperzní jednotce typu Hydro naplněné demineralizovanou vodou plnící funkci disperzního média. Vzorek byl dávkován do uvedeného média tak, aby se výsledná obskurace nacházela v rozmezí 1-5 % a míchání bylo nastaveno na 2000 otáček za minutu. Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C a byly zadány následující hodnoty: index lomu 1,50, index absorpce 0,1 a hustota částic 1,039 g/cm³. U každého vzorku bylo měření provedeno třikrát, ve dvou opakování, výsledek byl vyjádřen jako objemově vážený průměr velikosti částic D(4, 3) v μm.

8.3.6 Index krémování

Index krémování vyjadřuje stupeň rozvrstvení dispergované (emulzní) fáze v emulzním systému v průběhu času. Používá se k hodnocení schopnosti emulze udržet homogenní rozložení kapek v celém objemu. Následující rovnice slouží k výpočtu indexu krémování [93]:

$$CI = \frac{H_k}{H_c} \times 100 [\%]$$

Kde:

H_k – krémová výška emulze [mm]

H_c – celková výška emulze [mm]

8.3.7 Vizuální pozorování

Mezi hlavní metody sloužící k orientačnímu vyhodnocení fyzikální stability emulzí patří makroskopické hodnocení. Díky vizuální kontrole bylo možné identifikovat známky eventuální destabilizace, jako je oddělení fází, změna barvy, popřípadě narušení homogenní struktury. Pozorování bylo prováděno za normálních světelných podmínek před černým pozadím a snímky byly pořízeny pomocí mobilního zařízení.

8.4 Testy na 3D modelu kůže *in vitro*

3D rekonstruovaný model lidské kůže (*ex-vivo*) umožňuje zkoumat interakce buňky-matrix nebo mezi různými typy buněk. Tyto modely se skládají ze dvou částí. První je ekvivalent *dermis* tvořený směsí kolagenní matrice a fibroblastů. Druhou částí je ekvivalent *epidermis*,

kteřá se vyvíjí z keratinocytů nanesených na kolagenovou strukturu s fibroblasty. Kolagen je scaffoldem pro buňky a zajišťuje přísun živin. Systém je pěstován na rozhraní vzduch-kapalina na kolagenových matricích. V prvním kroku se na porézních filtrech umístěných v systému Transwell kultivují dermální ekvivalenty obsahující lidské fibroblasty (HDF) nanesené v kolagenové matrici. Na tento základ jsou po několika dnech nasazeny lidské keratinocyty. To vede k diferenciaci keratinocytů, celý model po několika dnech tvoří umělou kůži. Celý proces trvá 3 týdny. [94]

Před kolonizací *S. epidermidis* CCM 4418 byl model inkubován 24 h s 900 μ L předem ohřátého média DMEM při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO₂. Takto předpřipravený *in vitro* 3D model kůže byl poté inokulován *S. epidermidis* a inkubován po dobu 24 hodin za účelem zajištění bakteriální adheze. Inokulum (kultura *S. epidermidis*) bylo upraveno na 0,5 McFarlandova standardu, což odpovídá 6×10^6 CFU ve 30 μ L použité suspenze. Následně byl na povrch modelu aplikován vzorek emulze v množství 30 μ L. Byla zvolena experimentální metoda podle standardu pro testování kožní iritace (SIT = skin irritation test) dle OECD Test Guideline 439. Což znamená expozici vzorku po dobu 35 ± 1 minuty a s následnou postinkubací po dobu 24 hodin. [95]

Vzorky byly poté zpracovány za účelem stanovení hodnoty laktát dehydrogenasy (LDH) a rozsahu kolonizace 3D modelu se *S. epidermidis* v nepřítomnosti a přítomnosti vzorků.

Test adheze bakterií je metoda používaná k hodnocení a kvantifikaci schopnosti bakterií přilnout k různým povrchům. Účelem testu adheze bakterií je studium interakcí mezi 3D modelem kůže a mikroby. V biologických souvislostech mohou testy adheze pomoci objasnit, jak se bakterie přichytávají k tkáním hostitele během potenciální infekce nebo hojení ran. Pro hodnocení bakteriální adheze bylo použito počítání jednotek tvořících kolonie (CFU). Po oddělení adherovaných bakterií od povrchu (0,1% Triton X-100) se bakterie kultivují na agarových plotnách a počítá se počet vytvořených kolonií. [94] [96]

Pro stanovení cytotoxicity byl použit Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, který stanovuje aktivitu laktát dehydrogenasy (LDH). Tento test zahrnuje dvojitou reakci, při níž LDH katalyzuje oxidaci laktátu, což vede k redukci NAD⁺ na NADH. Následně, NADH redukuje tetrazoliovou sůl na červený formazanový produkt v přítomnosti diaforázy. Výsledná intenzita barvy, měřená spektrofotometricky při přibližně 490 nm, je přímo úměrná množství LDH. LDH uvolňují poškozené nebo mrtvé buňky, pokud dochází k poškození

cytoplazmatické membrány v důsledku cytotoxického účinku, LDH uniká z buňky do média. Porovnáním hodnot absorbance ošetřených vzorků s hodnotami neošetřených kontrol lze určit stupeň cytotoxicity vyvolané experimentálními podmínkami. Tato metoda poskytuje kvantitativní a spolehlivé měření poškození buněk na základě extracelulární přítomnosti LDH. [96] [97]

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro posouzení stabilizační účinnosti se nejprve provádí hodnocení vlastností použitých částic.

9.1 Charakterizace stabilizujících částic

Charakterizace stabilizujících částic před samotnou přípravou emulzí je důležitá z hlediska porozumění procesu jejich chování na fázovém rozhraní a předvídání stability emulzních systémů, proto byly sledovány základní fyzikálně-chemické parametry, jako je velikost částic, zeta-potenciál, povrchové napětí a morfologie bakteriálních a kvasinkových buněk.

Jak již bylo zmíněno v kap.8.1., jednotlivé stabilizátory byly před jejich charakterizací přečištěny a polovina ze získaných buněk byla inaktivována. A proto je v této kapitole porovnání provedeno nejen mezi různými stabilizátory, ale také mezi aktivní a inaktivovanou formou použitého stabilizátoru.

Prvním parametrem, který byl stanoven během analýzy stabilizujících částic, byla velikost zvolených částic, jelikož ta dokáže výrazně ovlivnit stabilitu emulzního systému. Jak vyplývá z teorie, menší částice se rychleji absorbují na fázové rozhraní než větší částice. Platí rovněž to, že čím větší jsou částice, tím větší jsou emulzní kapky. [83]

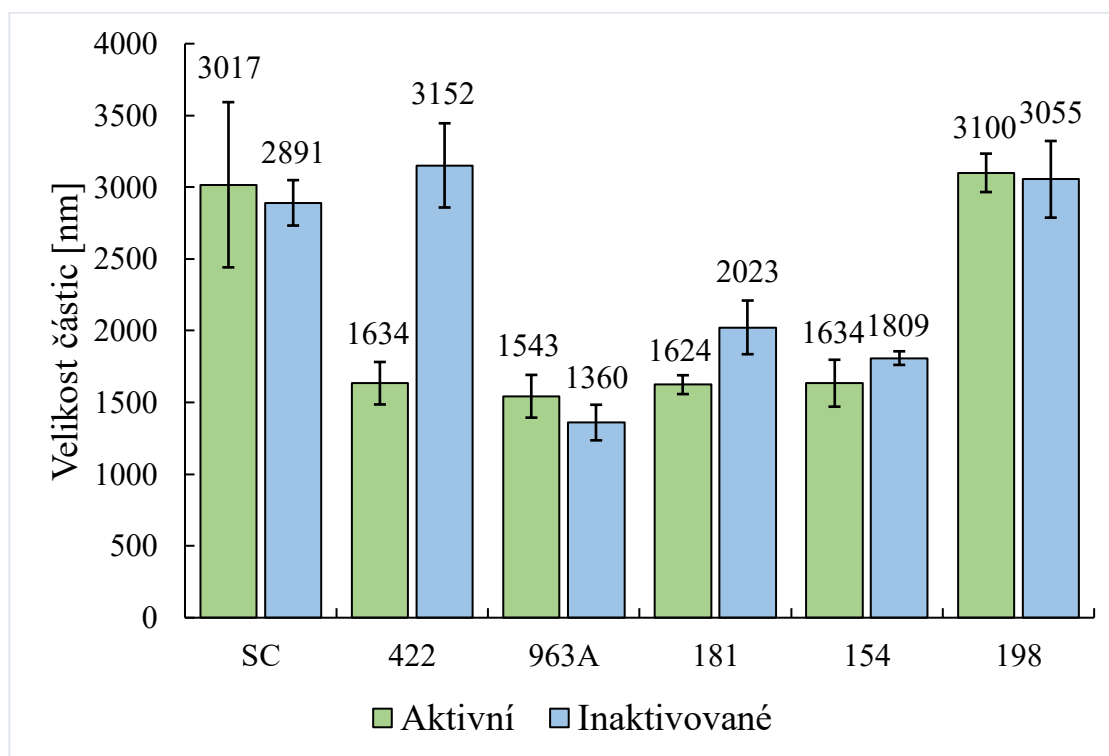
Na obrázku 6 jsou zobrazeny naměřené velikosti stabilizujících buněk. Největší velikost stabilizujících částic, a to jak aktivních, tak inaktivovaných, má bakterie rodu *Lactobacillus casei casei* 198 s velikostí 3100 a 3055 nm. Podle dostupných literárních zdrojů buňky bakterie rodu *Lactobacillus casei* dosahují velikosti přibližně 700-1100 nm na šířku a 2000-4000 nm na délku, což odpovídá naměřeným hodnotám. [98]

Další bakteriální kmeny, jako je *Lactobacillus rhamnosus* 963A, *Lactobacillus plantarum* 181 a *Lactobacillus fermentum* 154 s velikostí částic v rozmezí 1300 až 2000 nm, rovněž nevykazují významný rozdíl mezi životaschopnými a neživotaschopnými buňkami. To potvrzuje i graf distribucí částic bakterie 154, který lze vidět na obrázku 7, kde se distribuce velikostí částic aktivních a inaktivovaných buněk překrývají. Poukazuje to na to, že inaktivací nedochází ke změnám ve velikosti buněk. Publikovaná literatura udává fyzické rozměry bakterie *Lactobacillus plantarum* v rozmezí 900 až 1200 nm na šířku a 3000 až 8000 nm na délku. [99] Naměřené hydrodynamické hodnoty daného kmene se liší od hodnot uvedených v literatuře. To může být způsobeno metodou měření, která nebere v úvahu

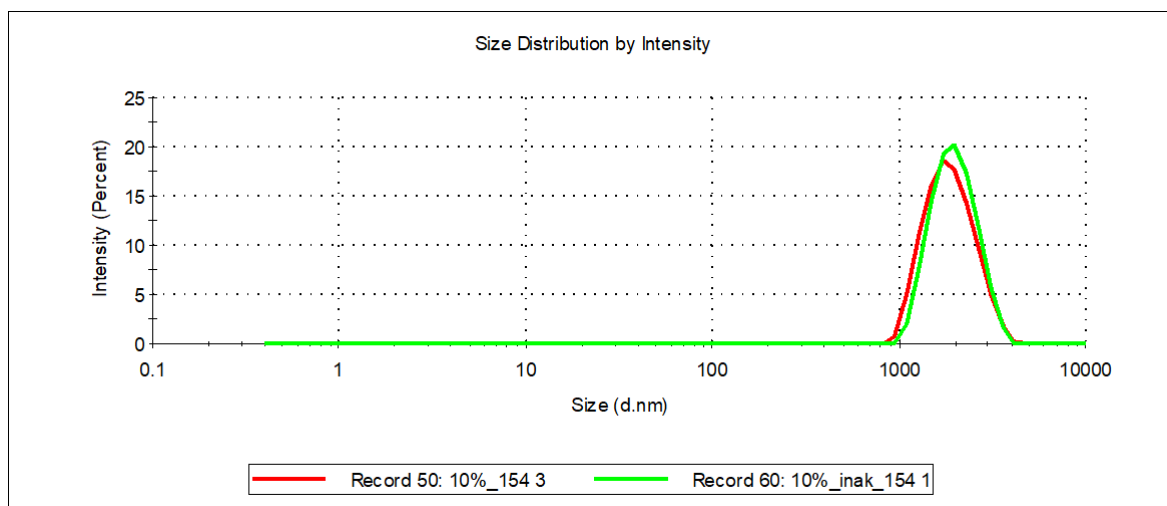
skutečný tvar částic. Z výše uvedených kmenů měly nejmenší velikost inaktivované bakterie 963A o velikosti buněk 1360 nm.

Jediným kmenem, který se liší z hlediska velikosti částic mezi aktivní a inaktivovanou podobou a zároveň má největší velikost částic, je bakterie rodu *Lactobacillus casei* 422. Její aktivní forma má velikost kolem 1600 nm a inaktivovaná dosahuje velikosti buněk až 3152 nm, což by mohlo být způsobeno shlukováním buněk po inaktivaci. Naměřené velikosti buněk jsou v rozmezí uvedeném v odborné literatuře. [98]

Saccharomyces cerevisiae reprezentují eukaryotické buňky, které ve srovnání s prokaryotickými buňkami mají větší rozměry z důvodu složitější buněčné organizace. Jejich velikost je 3017 nm u živých a 2891 nm u neživých buněk. Údaje z literatury uvádějí průměrnou velikost buněk 5500 na šířku a 7500 nm na délku, která je větší než naměřené hodnoty. [100] Tento rozdíl může být způsoben například metodou měření nebo nedostatečnou zralostí buněk.

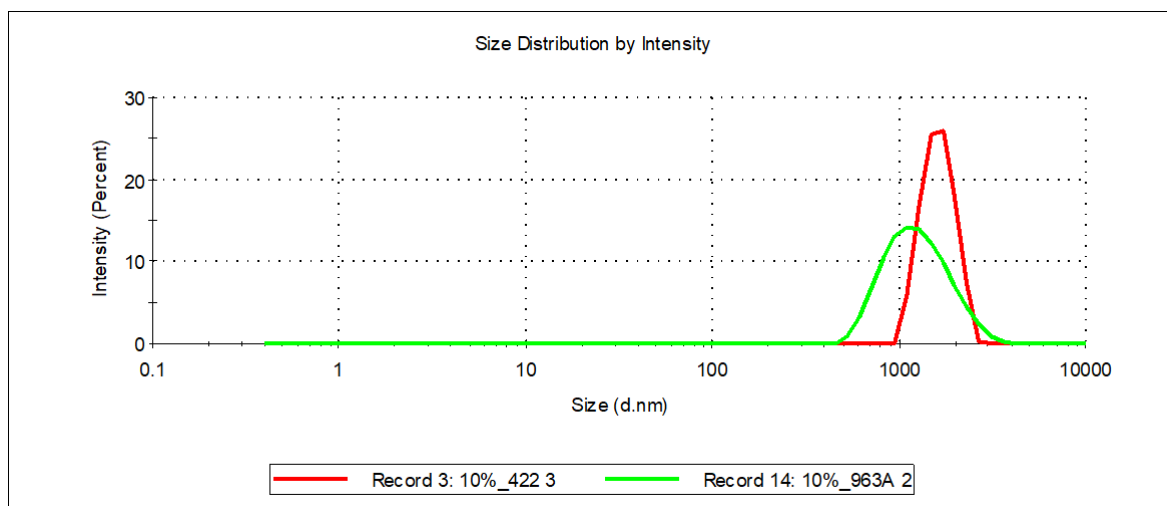


Obrázek 6: Průměrná velikost vybraných stabilizačních částic



Obrázek 7: Graf distribuce částic bakterie *Lactobacillus fermentum* 154

Porovnání distribucí velikosti bakterií 422 a 963A je znázorněno na obrázku 8. U obou křivek se jedná o monomodální distribuce, nicméně velikosti částic se liší, velikost bakterie 422 je vyšší přibližně 1400-1600 nm, s užší šířkou distribuce (PDI 0,142), oproti tomu bakterie 963A vykazuje nižší velikost částic v oblasti 1100-1300 nm, s mírně širší distribucí (PDI 0,154). Z tohoto vyplývá, že se velikost bakterií různých kmenů rodu *Lactobacillus* liší ve velikostech buněk.



Obrázek 8: Graf distribuce částic bakterií *L. casei* 422 a *L. rhamnosus* 963A

Jedním z dalších parametrů, který byl sledován, je zeta-potenciál, konkrétně absolutní hodnota zeta-potenciálu. Jeho hodnota ukazuje na elektrostatické interakce mezi částicemi v disperzním prostředí. Vzájemné elektrostatické odpuzování je tím výraznější, čím vyšší je jeho absolutní hodnota, která znemožňuje agregaci a přispívá tak ke stabilitě systému.

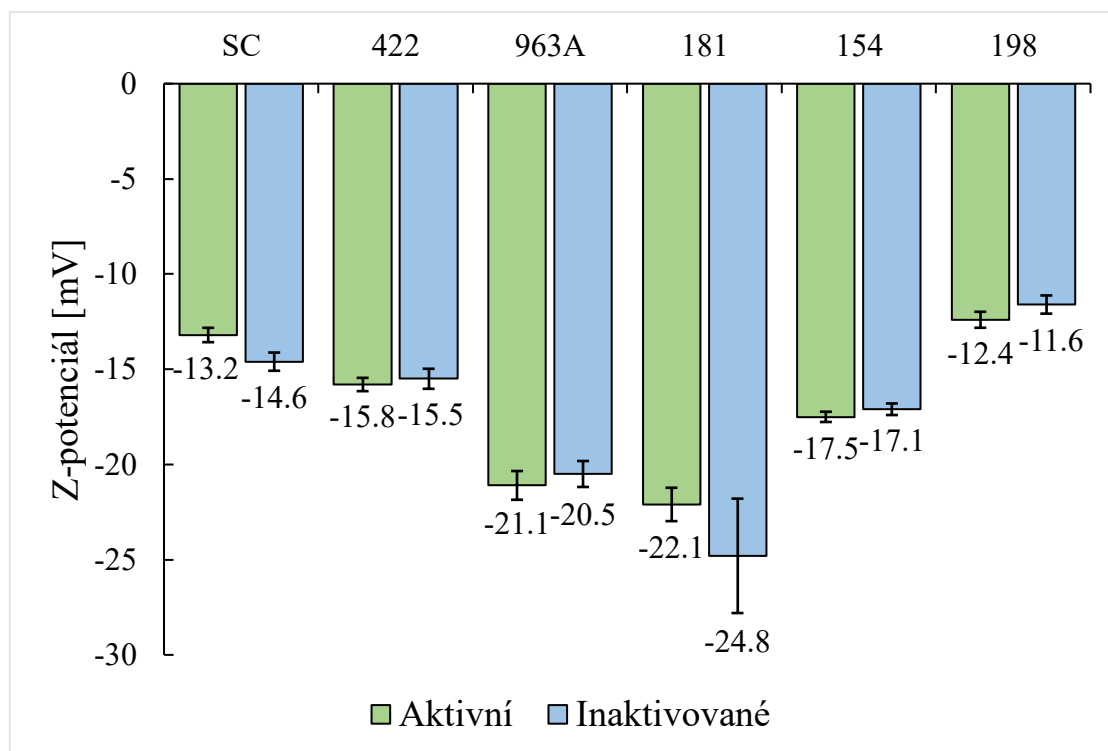
Naproti tomu v případě nízkých absolutních hodnot zeta-potenciálu se jedná o slabé odpudivé síly mezi částicemi zvyšující pravděpodobnost agregace a destabilizace disperze.

Před zahájením měření zeta-potenciálů je potřeba u disperzí stabilizujících buněk zjistit jejich pH. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou charakteristické mírně kyselým pH, nejčastěji mezi 3,5 a 5,5. Toto prostředí vyplývá z jejich metabolické činnosti zahrnující rozklad cukrů při následné produkci kyseliny mléčné jako hlavního metabolitu fermentačního procesu. [101] Disperze *Saccharomyces cerevisiae* mají hodnotu pH 5,2.

Na obrázku 9 je uveden graf srovnávající hodnoty zeta-potenciálů jednotlivých bakteriálních kmenů a *Saccharomyces cerevisiae*. Všechny naměřené hodnoty mají negativní náboj, který je pro buněčné povrchy typické.

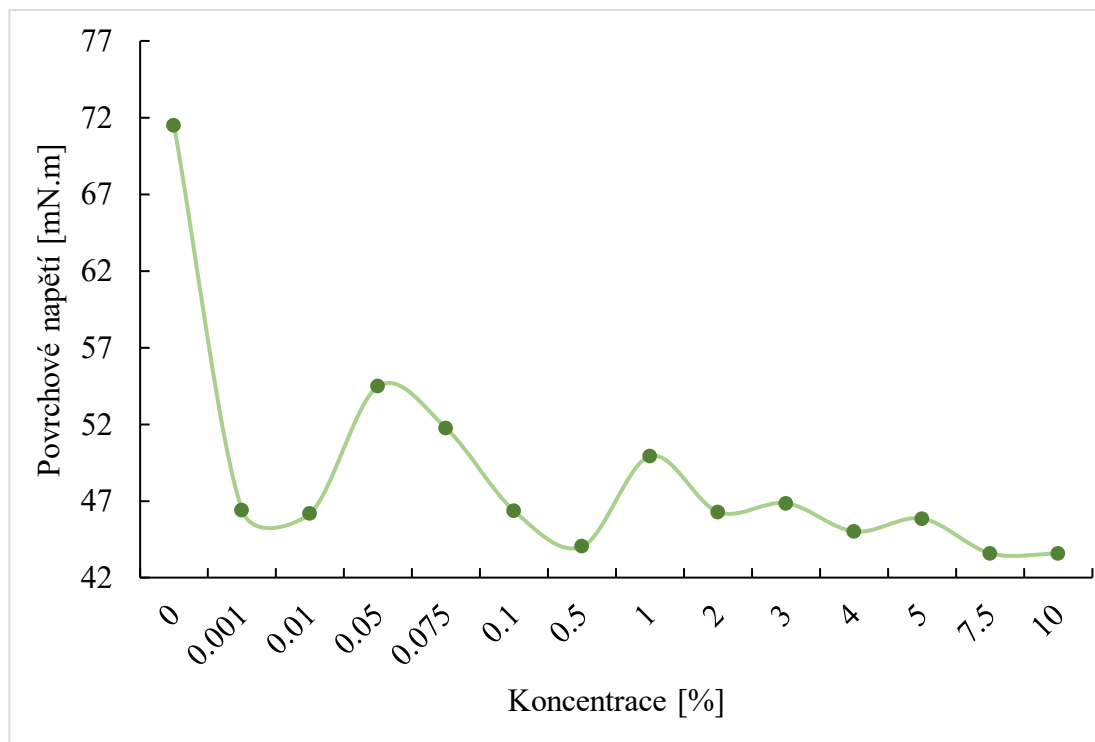
Je to z toho důvodu, že například buněčná stěna bakterie *Lactobacillus plantarum* obsahuje ve svém složení peptidoglykan typu meso-diaminopimelové kyseliny a teichoové kyseliny na bázi ribitolu nebo glycerolu. [99] Dané kyseliny obsahují fosfátové skupiny, které přispívají k zápornému zeta-potenciálu. Buněčná stěna bakterií *Lactobacillus fermentum*, skládající se z peptidoglykanu typu D-aspartyl-L-ornithinu, *Lactobacillus rhamnosus*, obsahující peptidoglykan lysin-D-aspartyl, a *Lactobacillus casei* s peptidoglykanem Lys-D-Asp vykazují taky záporný zeta-potenciál díky karboxylovým skupinám D-asparátu. [98] [102] U *Saccharomyces cerevisiae* je vnitřní vrstva buněčné stěny složena z β -(1,3)-glukanu, β -(1,6)-glukanu a chitinu, zatímco vnější vrstva je tvořena glykoproteiny s obsahem vysokého množství manózy. [103] Tato buněčná stěna nemá obecně silný záporný náboj, nicméně přítomnost kyselých modifikací může vysvětlovat mírně záporný zeta-potenciál.

Nejvyšší zeta-potenciál vykazuje disperze inaktivované bakterie rodu *Lactobacillus plantarum* 181 s absolutní hodnotou $|24,8|$ mV, která se výrazně neliší od absolutní hodnoty disperze stejné bakterie obsahující buňky aktivní s hodnotou zeta-potenciálu $|22,1|$ mV. O něco menší hodnotu zeta-potenciálu má disperze bakterie *Lactobacillus rhamnosus* 963A, a to $|21,1|$ mV u aktivních buněk a $|20,5|$ mV u inaktivovaných. V rozmezí od $|13|$ do $|18|$ mV se nacházejí buňky bakterií rodu *Lactobacillus fermentum* 154, *Lactobacillus casei* 422 a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Nejmenší absolutní hodnotou zeta-potenciálu, kolem $|12|$ mV, vykazuje disperze bakterie *Lactobacillus casei casei* 198.



Obrázek 9: Zeta-potenciál jednotlivých stabilizujících částic

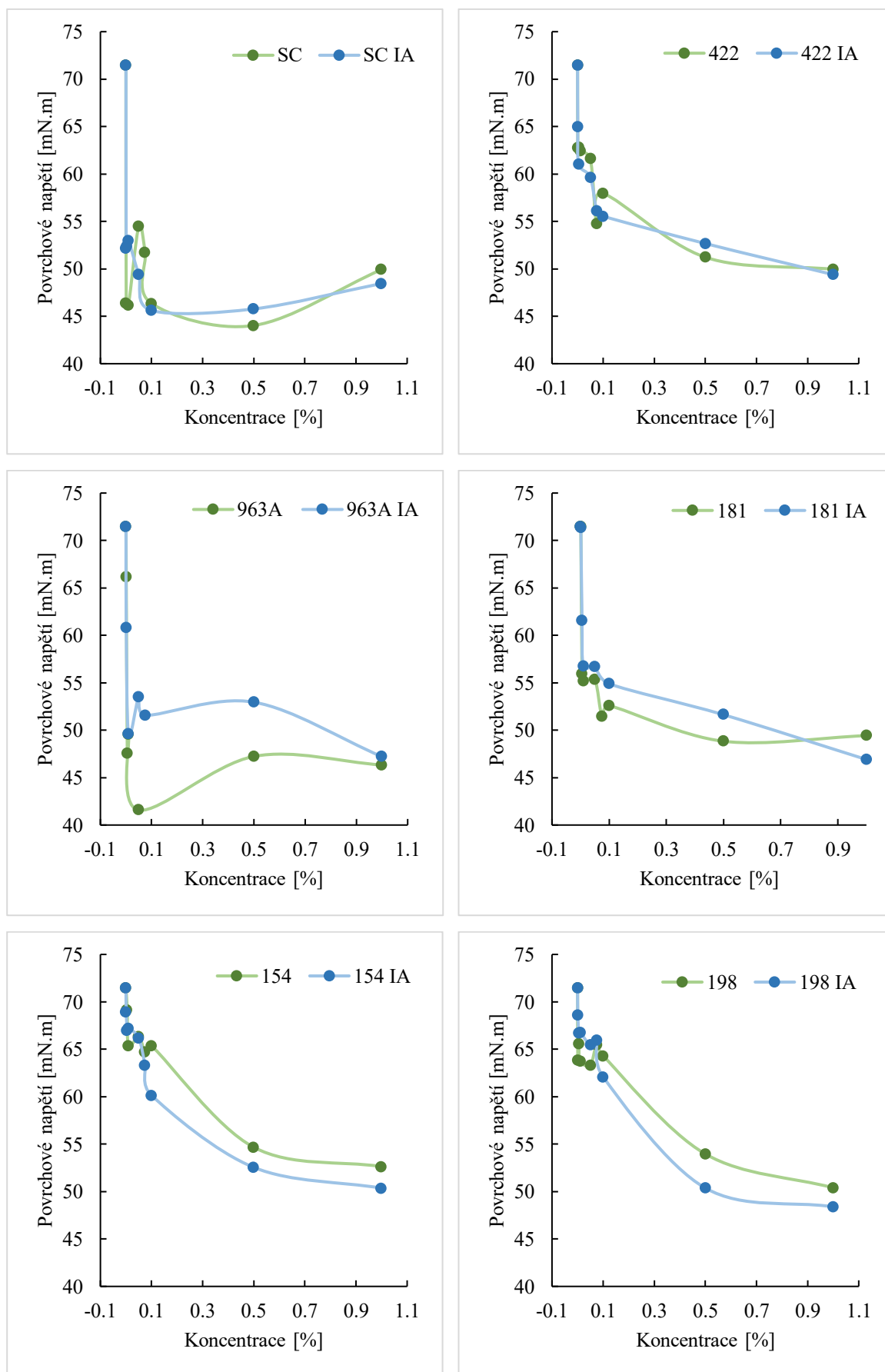
Povrchové napětí bakterií a kvasinek bylo sledováno v závislosti na koncentraci jejich disperzí. Původní 10% disperze částic byly zředěny na koncentraci 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5 a 1 %. Tyto koncentrace byly vybrány na základě měření povrchového napětí u disperze *Saccharomyces cerevisiae*, kde bylo zjištěno, že od koncentrace 1 % již nedochází k výrazným změnám, jak lze vidět na obrázku 10. S ohledem na kap. 8.1.1., kde je popsán postup přípravy disperzí, byl jako referenční vzorek zvolen čistý roztok PBS, jelikož v něm byly suspendovány čisté bakteriální a kvasinkové kultury, reference odpovídá nulové koncentraci.



Obrázek 10: Závislost povrchového napětí na koncentraci disperzí *S. cerevisiae*

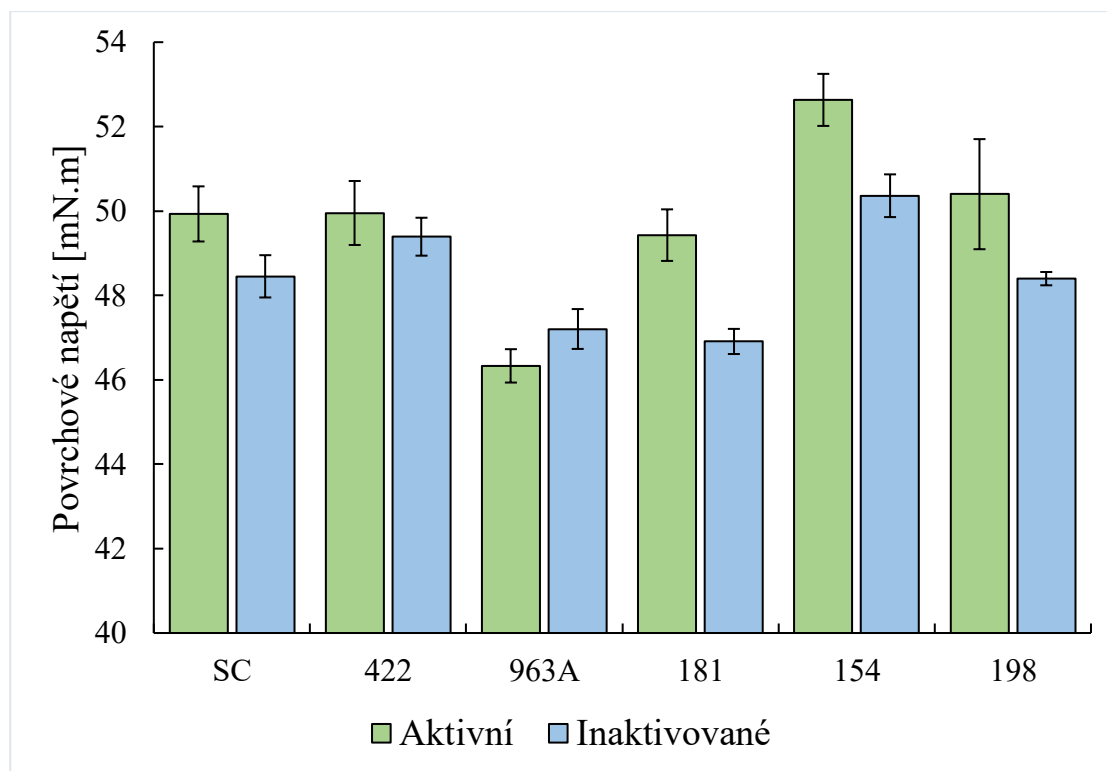
Referenční vzorek – roztok PBS měl nejvyšší povrchové napětí, a to 71,5 mN.m. Se zvyšující se koncentrací bakterií v disperzích docházelo ke snížení povrchového napětí, jak je znázorněno na obrázku 11. Byly zaznamenány rozdíly mezi kmeny i formami bakterií.

Mezi aktivními a inaktivovanými buňkami bakterie *Lactobacillus casei* 422 a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou minimální rozdíly v závislosti povrchového napětí na koncentraci ve srovnání s ostatními disperzemi. *Lactobacillus rhamnosus* 963A a *Lactobacillus plantarum* 181 ukázaly větší pokles povrchového napětí u aktivní formy buněk, zatímco u *Lactobacillus fermentum* 154 a *Lactobacillus casei casei* 198 bylo výraznější snížení povrchového napětí pozorováno u inaktivované formy buněk.



Obrázek 11: Závislost povrchového napětí na koncentraci disperzí bakterií a kvasinek

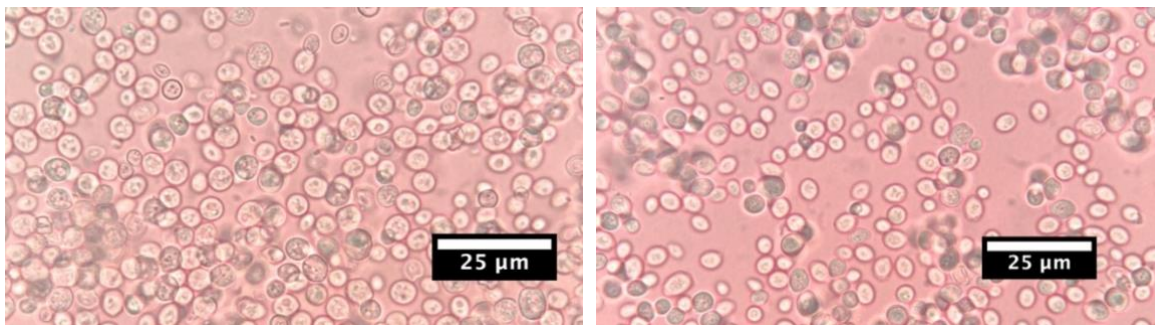
Rozdíly mezi kmeny a formou buněk jsou také pozorovány na obrázku 12, který znázorňuje povrchové napětí 1% disperzí bakterií a kvasinek. Vyšší hodnoty povrchového napětí byly většinou zaznamenány u disperzí obsahujících aktivní formy buněk s výjimkou bakterie *L. rhamnosus* 963A. Aktivní buňky této bakterie vykazují největší snížení povrchového napětí až na hodnotu 46,3 mN.m, zatímco inaktivované mají hodnotu povrchového napětí 47,2 mN.m.



Obrázek 12: Povrchové napětí u 1% disperzí bakterií a kvasinek

Disperze bakterií a kvasinek byly mikroskopicky pozorovány pro získání podrobnějších informací o jejich morfologii, uspořádání a možných změnách buněk po inaktivaci.

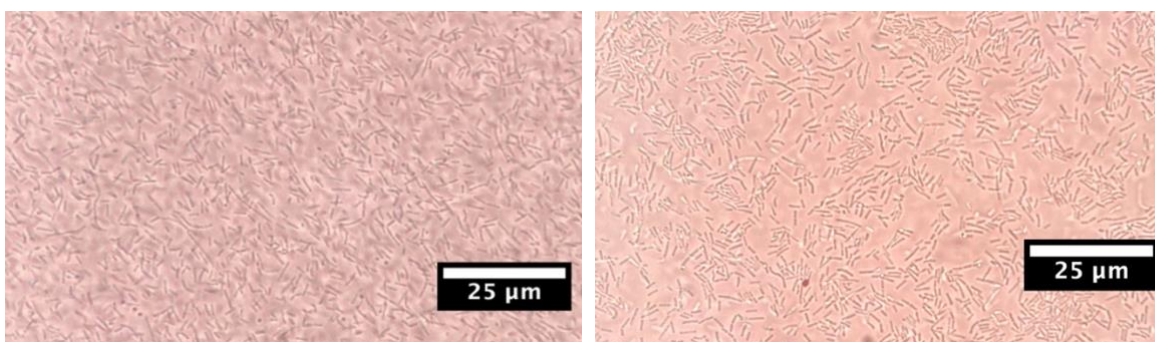
Na obrázku 13 jsou znázorněny mikroskopické snímky aktivních (zleva) a inaktivovaných (zprava) buněk kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* při celkovém zvětšení 1000x. Podle odborných zdrojů tyto buňky mají kulovitý až oválný tvar [100], což lze potvrdit pomocí pořízených snímků. Rovněž je možné pozorovat rozdíl mezi aktivními a inaktivovanými formami buněk, kde v případě inaktivovaných bylo zaznamenáno menší množství buněk ve srovnání s disperzí obsahující aktivní buňky.



Obrázek 13: Mikroskopický snímek disperze *Saccharomyces cerevisiae* při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované)

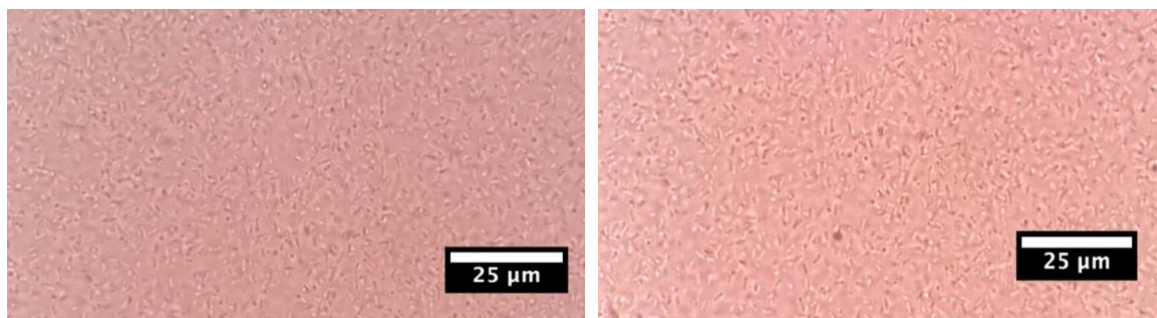
Mikroskopická struktura bakterie rodu *Lactobacillus casei* 422 je zobrazena na obrázku 14. Její buňky jsou ve tvaru tyčinek a vyskytují se jednotlivě, v párech nebo v lineárních řetězcích. Pozorované výsledky odpovídají údajům uvedeným v literatuře. [98]

Kromě toho během měření fyzikálně-chemických parametrů bakterie *L. casei* 422 byl pozorován významný rozdíl ve velikosti částic u aktivní a inaktivované formy, konkrétně poslední ukázaly větší velikost částic. Na základě pořízených snímků lze usoudit, že tento rozdíl byl způsoben shlukováním buněk dané bakterie.



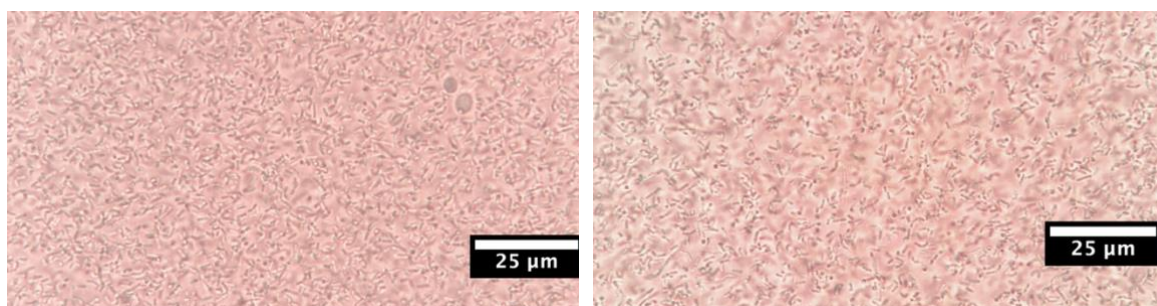
Obrázek 14: Mikroskopický snímek disperze *Lactobacillus casei* 422 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované)

Obrázek 15 ukazuje strukturu a uspořádání bakterie rodu *Lactobacillus rhamnosus* 963A při celkovém zvětšení 1000x. Na snímcích jsou patrné, že buňky dané bakterie mají tyčinkovitý tvar a vyskytují se většinou jednotlivě nebo v krátkých řetězcích, což je v souladu s informacemi uváděnými v literárních zdrojích. [102] *L. rhamnosus* 963A má nejmenší naměřenou velikost částic, což lze pozorovat i na pořízených snímcích. Počet buněk je ve srovnání s ostatními kmeny hodnocen jako jeden z nejnižších. Výrazné rozdíly mezi aktivní a inaktivovanou formou buněk během mikroskopického pozorování a stanovení velikosti částic a zeta-potenciálu nebyly zaznamenány.



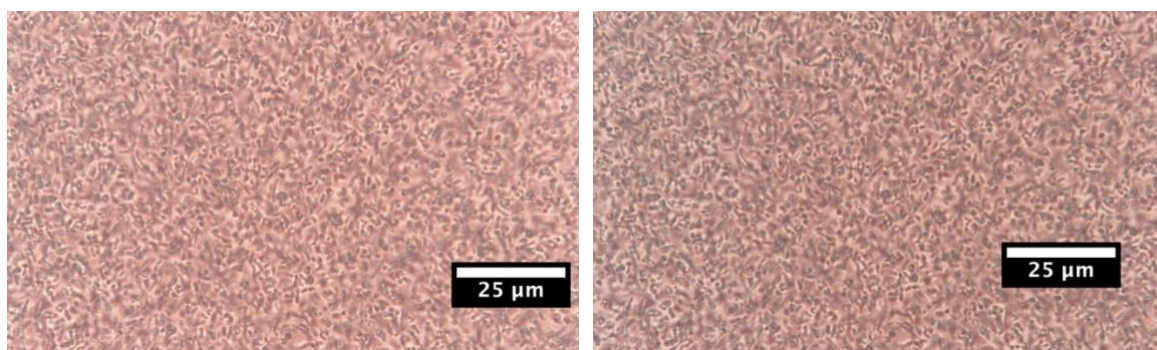
Obrázek 15: Mikroskopický snímek disperze *Lactobacillus rhamnosus* 963A při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované)

Mikroskopické snímky na obrázku 16 zobrazují bakterie *Lactobacillus plantarum* 181, která obsahuje tyčinkovité buňky se zakulacenými konci [99] a jejíž aktivní forma se uspořádává do delších řetězců. Naopak inaktivovaná forma ukazuje menší počet buněk, ale zároveň daný kmen vykazuje stejně jako v případě *L. casei* 422 shlukování buněk.



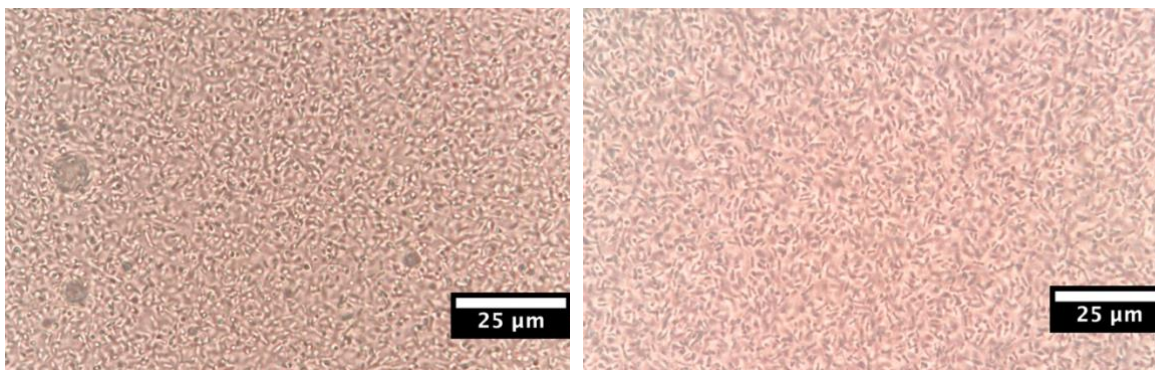
Obrázek 16: Mikroskopický snímek disperze *Lactobacillus plantarum* 181 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované)

Buňky bakterií *Lactobacillus casei casei* 198, které jsou znázorněny na obrázku 17, vykazují tyčinkovitý tvar. Mezi aktivními a inaktivovanými formami buněk není žádný viditelný rozdíl, jak z hlediska mikroskopie, tak i z hlediska fyzikálně-chemických parametrů.



Obrázek 17: Mikroskopický snímek disperze *Lactobacillus casei casei* 198 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované)

Na obrázku 18 je představena morfologie bakterie rodu *Lactobacillus fermentum* 154. Pozorované buňky mají bacilární tvar a mikroskopické záznamy ukazují, že jsou uspořádány buď jednotlivě, nebo v párech. Stejně jako u předchozí bakterie nebyl zaznamenán významný rozdíl mezi aktivní a inaktivovanou formou buněk.



Obrázek 18: Mikroskopický snímek disperze *Lactobacillus fermentum* 154 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované)

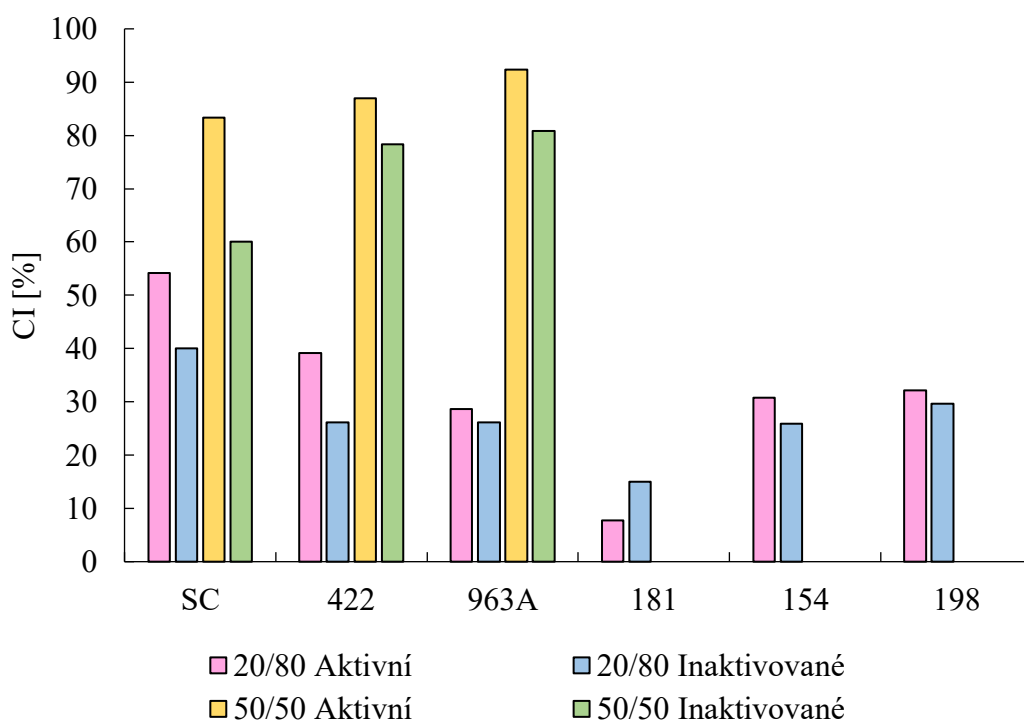
9.2 Charakterizace emulzí

Připravené emulze byly stabilizovány 10% disperzí aktivních a inaktivovaných bakterií/kvasinek, tato disperze byla vodnou fází emulze. Jako olejová fáze byl použit MCT olej. Emulze byly připraveny ve dvou poměrech olejové a vodné fáze, a to 20/80 a 50/50. Pro vyhodnocení stability výsledných emulzních systémů byly sledovány parametry, jako je velikost emulzních kapek, zeta-potenciál a jejich mikrostruktura, nicméně prvním krokem při jejich charakterizaci je vizuální pozorování a sledování kinetické stability, která může být vyjádřena indexem krémování. Index krémování (CI) je parametr, který umožňuje nepřímo sledovat, zda v systému dochází k shlukování kapek nebo ztrátě jeho stability. Pokud je emulze stabilní, hodnota CI dosahuje 100 %.

Emulze stabilizované bakteriemi *Lactobacillus rhamnosus* 963A, které jsou znázorněny na obrázku 19, vykazují rozdíly v závislosti na poměru olejové a vodné fáze. Emulze připravené v poměru 50/50 vykazují relativně dobrou odolnost vůči krémování, emulzní vrstva byla hustší s malým množstvím volného oleje. Jejich indexy krémování (viz. Obrázek 20) byly jedny z nejvyšších s hodnotami 92 % a 81 %. Naopak emulze v poměru 20/80 vykazují jiné vlastnosti. U těchto emulzí lze vidět nízkou horní krémovou vrstvu s pěnou na povrchu, s indexy krémování 29 % a 26 % značící nižší kinetickou stabilitu.



Obrázek 19: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk *Lactobacillus rhamnosus* 963A



Obrázek 20: Indexy krémování připravených emulzí

Po přípravě emulzí se *Saccharomyces cerevisiae* (viz. Obrázek 21), lze u všech vzorků pozorovat tvorbu krémové vrstvy, která je homogenní a neobsahuje žádný volný olej. Nicméně emulze připravené s aktivními buňkami vykazují celkově vyšší stabilitu než emulze s inaktivovanými buňkami se stejným poměrem fází. Kromě toho ve vzorcích s inaktivovanými formami buněk byla pozorována jejich částečná sedimentace z kontinuální fáze. Z hlediska poměru fází se jako kineticky nejstabilnější ukazují emulze s poměrem 50/50, přičemž vzorek s životaschopnou formou buněk dosahuje nejlepší stability s indexem

krémování 83 %. V případě stabilizace neživotaschopnými buňkami byl index krémování stanoven na hodnotu 60 %. Emulze v poměru 20/80 ukazují o něco nižší hodnotu indexu krémování, a to 54 % s aktivními buňkami, zatímco s inaktivovanými 40 %.



Obrázek 21: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk *Saccharomyces cerevisiae*

Stejně jako u *Saccharomyces cerevisiae* se i u emulzí stabilizovaných *Lactobacillus casei* 422 potvrzuje závislost kinetické stability na typu použitých buněk a poměru olejové a vodné fáze. Výsledky jsou zachyceny na obrázku 22. Emulze s aktivní formou 422 vykazuje vyšší kinetickou stabilitu, zejména při poměru 50/50, s hodnotou indexu krémování 87 % (viz. Obrázek 20), zatímco emulze ve stejném poměru s použitím neživých buněčných forem má mírně nižší hodnotu indexu krémování 78 %. Při poměru 20/80 je emulze obsahující životaschopné buňky považována za něco méně stabilní (39 %), ale stále překonává své inaktivované ekvivalenty (26 %).



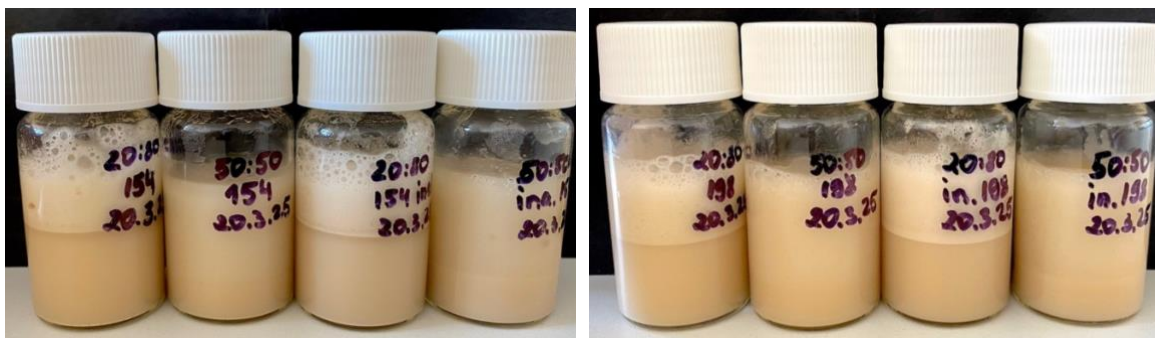
Obrázek 22: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk bakterií *Lactobacillus casei* 422

Emulze, ve kterých stabilizujícími částicemi byly buňky bakterie *Lactobacillus plantarum* 181, jsou znázorněny na obrázku 23. Vzorky s aktivními a inaktivovanými buňkami vytváří při poměru 20/80 minimální krémovou vrstvu s viditelnými velkými kapkami neemulgovaného oleje a hodnoty jejich indexů krémování se nachází v rozmezí 8 až 15 %. Oproti tomu při poměru 50/50 se krémová emulzní vrstva neobjevuje. Při detailním pohledu na emulze byly zřetelné jednotlivé olejové kapky. V tomto případě nedošlo během emulgace ke vzniku emulzí, jedná se o směs buněk, vody a oleje.



Obrázek 23: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk *Lactobacillus plantarum* 181

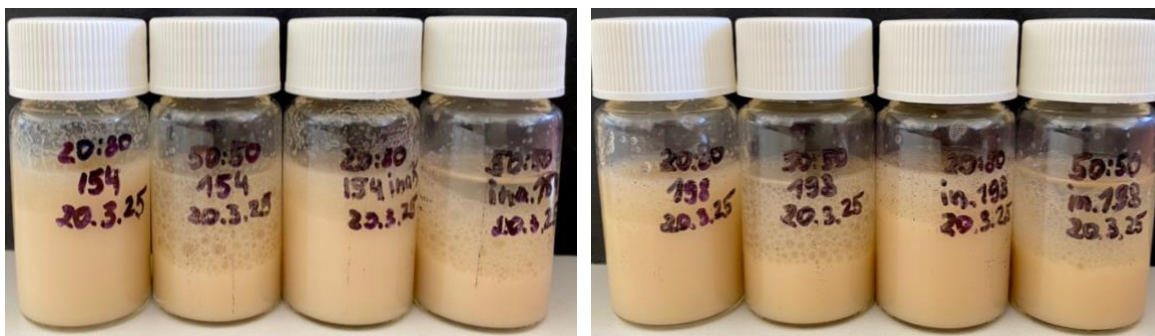
Stejné chování bylo zaznamenáno i u emulzí stabilizovaných bakteriemi *Lactobacillus fermentum* 154 a *Lactobacillus casei casei* 198. Vzhled těchto emulzí je ukázán na obrázku 24. Oba kmeny při poměru 20/80 při výpočtu indexu krémování dosahují hodnot kolem 30 %. U poměru 50/50 opět nenastala emulgace.



Obrázek 24: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk bakterií *L. fermentum* 154 a *L. casei casei* 198

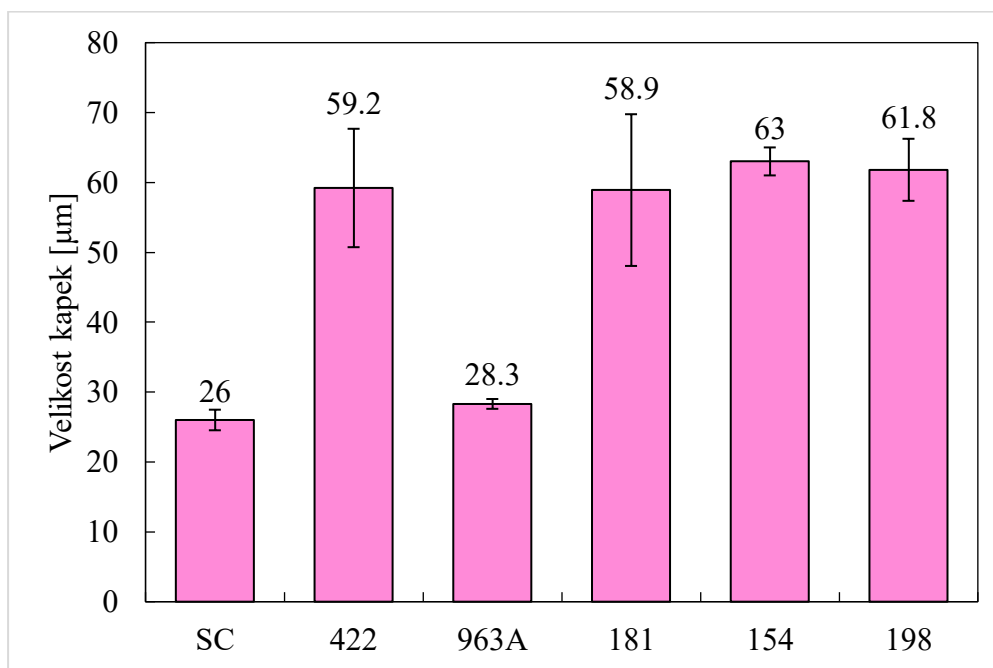
Ze získaných výsledků vyplývá, že účinnost jednotlivých stabilizátorů emulzí se výrazně liší, přičemž nejlepší emulgační vlastnosti vykazují bakterie *Lactobacillus rhamnosus* 963A, *Lactobacillus casei* 422 a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Emulze stabilizované těmito kmeny i s poměrem olejové a vodné fáze 50/50 ukazují vyšší kinetickou stabilitu, což může být dáno vyšší viskozitou emulze. [104]

Kmeny *Lactobacillus plantarum* 181, *Lactobacillus fermentum* 154 a *Lactobacillus casei casei* 198 naopak emulgují méně účinně a vykazují nižší kinetickou stabilitu. Příkladem mohou být emulze stabilizované buňkami kmenů 154 a 198. Tyto emulze druhý den po přípravě vykazovaly jasné oddělení vodné a olejové fáze, která svědčí o velmi rychlé destabilizaci systémů. Přičemž ta je nejvíce pozorována u emulzí v poměru 50/50 s použitím inaktivovaných stabilizujících částic, kde je přítomnost volného oleje viditelná pouhým okem. Tyto změny jsou názorně zobrazeny na obrázku 25.



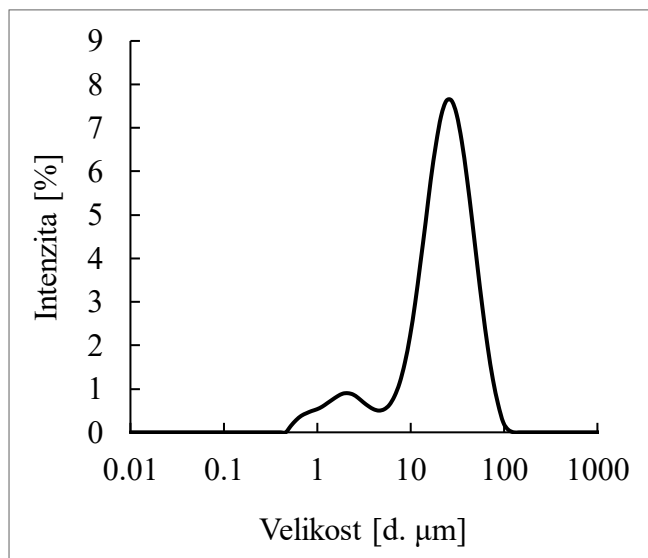
Obrázek 25: Emulze stabilizované *L. fermentum* 154 a *L. casei casei* 198 na 2. den po přípravě

Dalším důležitým parametrem při hodnocení stability emulzí je velikost emulzních kapek, která byla stanovena laserovou difrakcí pomocí přístroje Mastersizer. Velikost emulzních kapek byla vyjádřena pomocí parametru $D(4, 3)$, přičemž byly zhodnoceny i distribuční křivky. Velikost emulzních kapek ($D(4, 3)$) emulzí v poměru O/V 20/80 stabilizovaných aktivními buňkami jsou zobrazeny na obrázku 26. Nejnížší hodnoty emulzních kapek byly naměřeny pro emulze stabilizované *Saccharomyces cerevisiae* a bakterií *Lactobacillus rhamnosus* 963A. Ostatní kmeny vykazují velikost emulzních kapek kolem 60 μm .



Obrázek 26: Velikost kapek emulzí stabilizovaných aktivní formou buněk v poměru 20/80

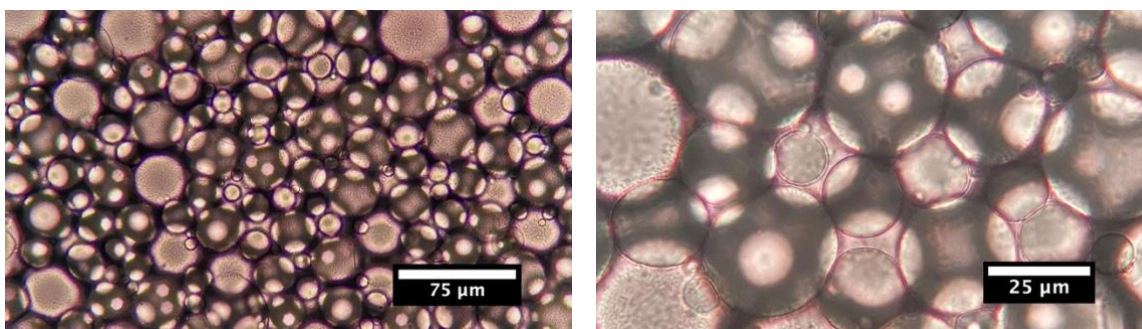
Emulze v poměru 20/80, u níž je stabilizace dosaženo s využitím aktivních buněčných forem bakterií rodu *Lactobacillus rhamnosus* 963A, má velikost emulzních kapek 28,3 μm . Velikost buněk *L. rhamnosus* 963A byla jednou z nejmenší ze všech zkoumaných stabilizátorů, s hodnotou 1543 nm. Pravděpodobně díky tomu, tato bakterie poskytla emulze s nejmenší velikostí kapek. Velikost buněk se odráží rovněž v distribuční křivce (viz. Obrázek 27), která se vyznačuje bimodálním charakterem. Hlavní pík se nachází v oblasti přibližně 20 μm a menší pík kolem 1 μm je možné přiřadit k výskytu volných mikroorganismů v kontinuální fázi.



Obrázek 27: Distribuce velikosti kapek emulze (20/80, aktivní 963A) podle intenzity

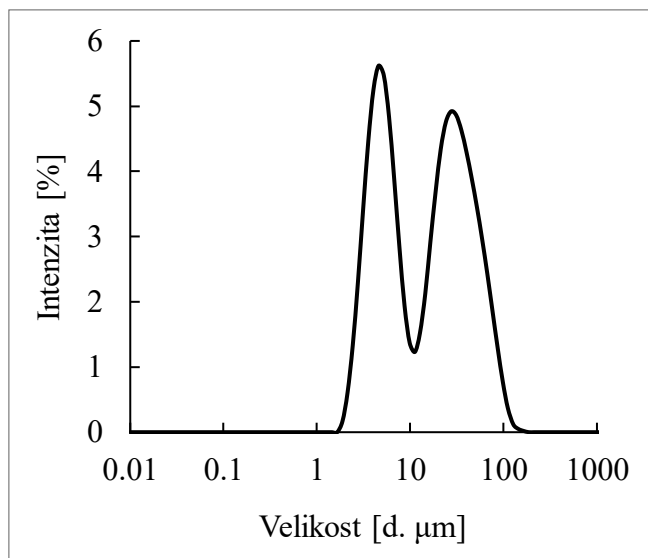
Vzhledem ke své malé velikosti jsou buňky účinně adsorbovány na fázovém rozhraní, umožňují rovnoměrné pokrytí kapiček a tím omezují možnost koalescence. Kromě toho jejich zeta-potenciál okolo 20 mV představuje dostatečné elektrostatické odpuzování, které brání agregaci kapiček a podporuje vyšší kinetickou stabilitu daného systému.

Mikroskopická struktura krémové části, kterou lze pozorovat na obrázku 28, naznačuje přítomnost homogenní emulze s jednotnou velikostí emulzních kapek. Na snímcích je patrná vysoká hustota kapek s jednotnou velikostí odpovídající $25\ \mu\text{m}$. U snímku pořízeném se zvětšením $1000\times$ je zřejmá přítomnost adsorbovaných buněk na mezifázovém rozhraní.



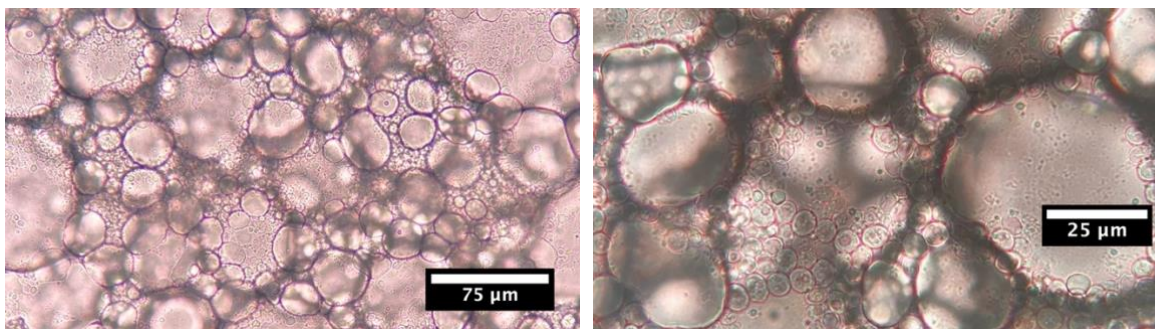
Obrázek 28: Struktura krémové části emulze v poměru 20/80 s aktivními buňkami *L. rhamnosus* 963A při zvětšení $400\times$ (zleva) a $1000\times$ (zprava)

U emulze s aktivními buňkami *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 20/80 je průměrná velikost emulzních kapiček přibližně $26\ \mu\text{m}$, přičemž průměrná velikost samotných stabilizujících buněk *S. cerevisiae* odpovídá hodnotě $3017\ \text{nm}$. Menší velikost kapek emulzí může být spojena s velkým množstvím neadsorbovaných buněk *S. cerevisiae*. Distribuce daného systému má rovněž bimodální charakter (viz. Obrázek 29).



Obrázek 29: Distribuce velikosti kapek emulze (20/80, akt. *S. cerevisiae*) podle intenzity

Mikroskopické snímky se zvětšením 400x a 1000x znázorňují nehomogenní strukturu emulze, velikost emulzních kapek je nerovnoměrná s přítomností jak velkých, tak menších kapek (viz. Obrázek 30).

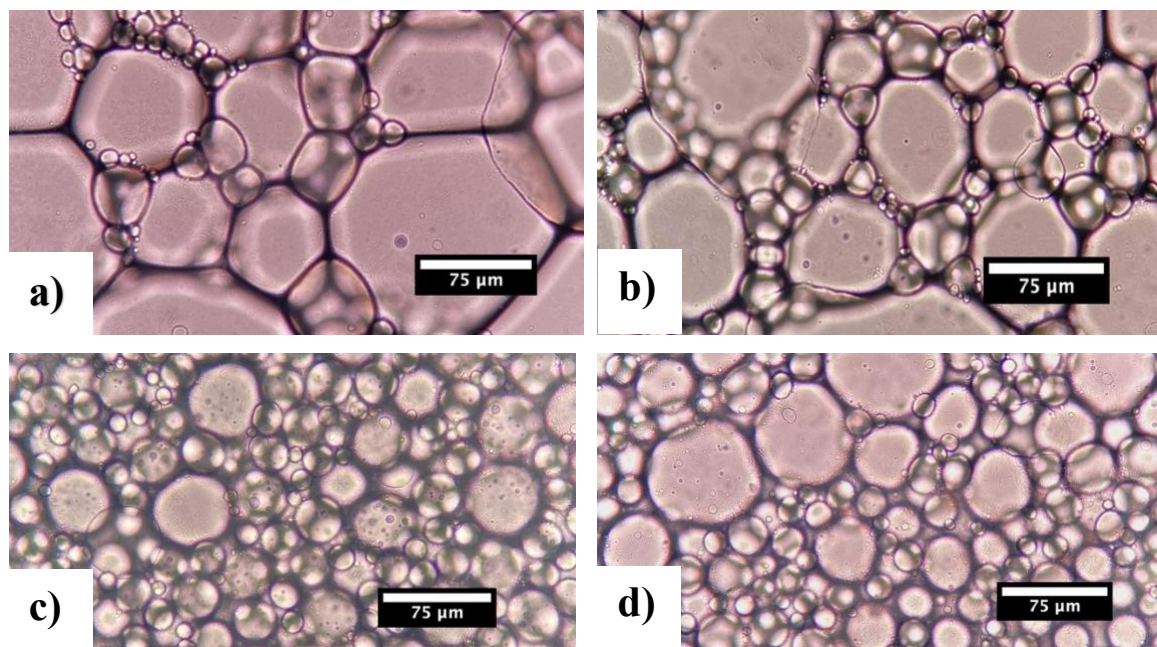


Obrázek 30: Struktura krémové části emulze v poměru 20/80 s aktivními buňkami *S. cerevisiae* při zvětšení 400x (zleva) a 1000x (zprava)

Ostatní emulze v poměru 20/80 s aktivní formou buněk připravených z disperzí kmenů 422, 181, 154 a 198 vykazují přibližně stejnou velikost kapek kolem 60 μm a velikostí stabilizujících buněk kolem 1600 nm. Výjimkou je kmen 181, který má velikost částic 3100 nm, což je podobně jako u *S. cerevisiae*.

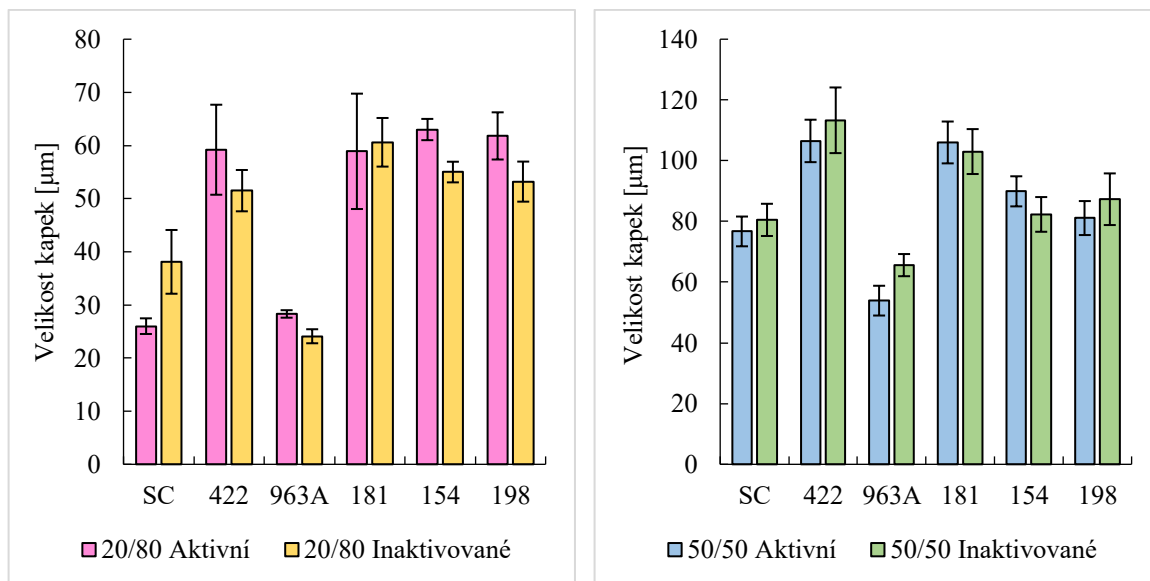
Mikrostruktury těchto emulzí při celkovém zvětšení 400x jsou zobrazeny na obrázku 31. První snímek (a) zobrazuje emulzi tvořenou *L. casei* 422 s heterogenní strukturou, která obsahuje kapky různých velikostí. Deformované a splývající kapky mohou však značit nízkou stabilitu a tendenci k postupné koalescenci. Druhý snímek (b) vykazuje o něco rovnoměrnější rozložení emulzních kapek, ale stále s deformovaným tvarem. Tato emulze je stabilizována disperzí bakterie *L. plantarum* 181. Poslední obrázky znázorňují

mikrostruktury emulzí stabilizovaných *L. fermentum* 154 (c) a *L. casei casei* 198 (d), které ukazují menší sférické kapky s rovnoměrným rozložením. Takové struktury mohou naznačovat vyšší odolnost vůči koalescenci, ale z výsledku vizuálního pozorování je patrné, že druhý den po přípravě se systémy destabilizují.



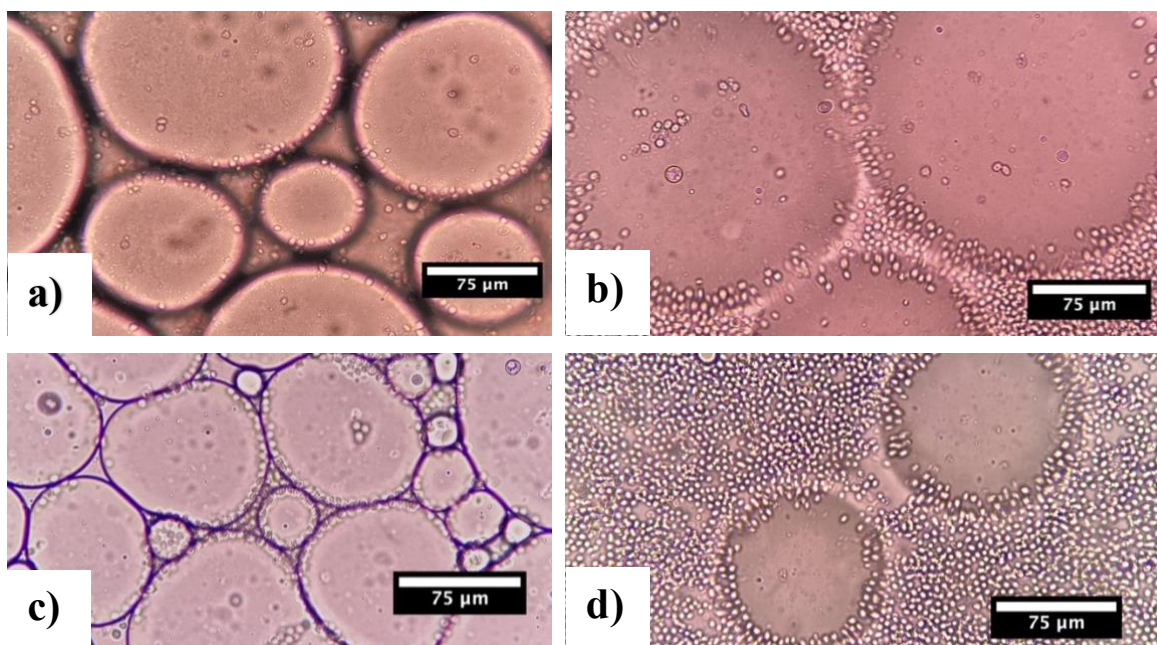
Obrázek 31: Struktura krémové části emulze (400x): a) 422, b) 181, c) 154, d) 198

Rozdíly ve velikosti částic mezi aktivními a inaktivovanými formami buněk, používaných jako stabilizátory systémů, nejsou výrazné. Tato tendence je patrná jak u emulzí v poměru 20/80, tak i 50/50, jak lze vidět na obrázku 32. Kromě toho dané porovnání ukazuje, že se emulze s poměrem olejové a vodné fáze 50/50 vyznačují větší průměrnou velikostí kapek než s poměrem 20/80. Důvodem je pravděpodobně zvýšený podíl olejové fáze, který má za následek zvětšení objemu dispergované fáze, což znesnadňuje dosažení účinné dispergace kapiček. [104] Za konstantní koncentrace stabilizujících částic zbývá zároveň méně buněk na pokrytí většího povrchu a pravděpodobnost koalescence kapek a vzniku větších emulzních kapek se zvyšuje.



Obrázek 32: Porovnání vitality buněk a poměru olejové a vodné fáze

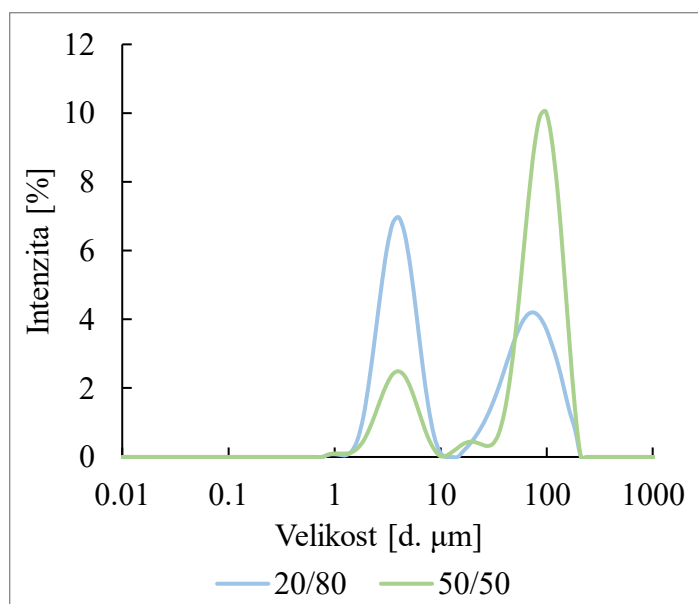
Na obrázku 33 jsou znázorněny emulze stabilizované aktivními (a, b) a inaktivovanými (c, d) formami buněk *S. cerevisiae* v poměru O/V 50/50. Z hlediska mikrostruktury vykazují oba vzorky emulzí podobné vlastnosti, kapky mají převážně kulovitý tvar, jsou rovnoměrně rozložené a nejeví výrazné známky koalescence. Na rozhraní kapek jsou absorbovány jednotlivé stabilizující buňky (snímky b a d).



Obrázek 33: Struktura krémové části emulze *S. cerevisiae* 50/50 (400x): a, b) Aktivní; c, d) Inaktivované

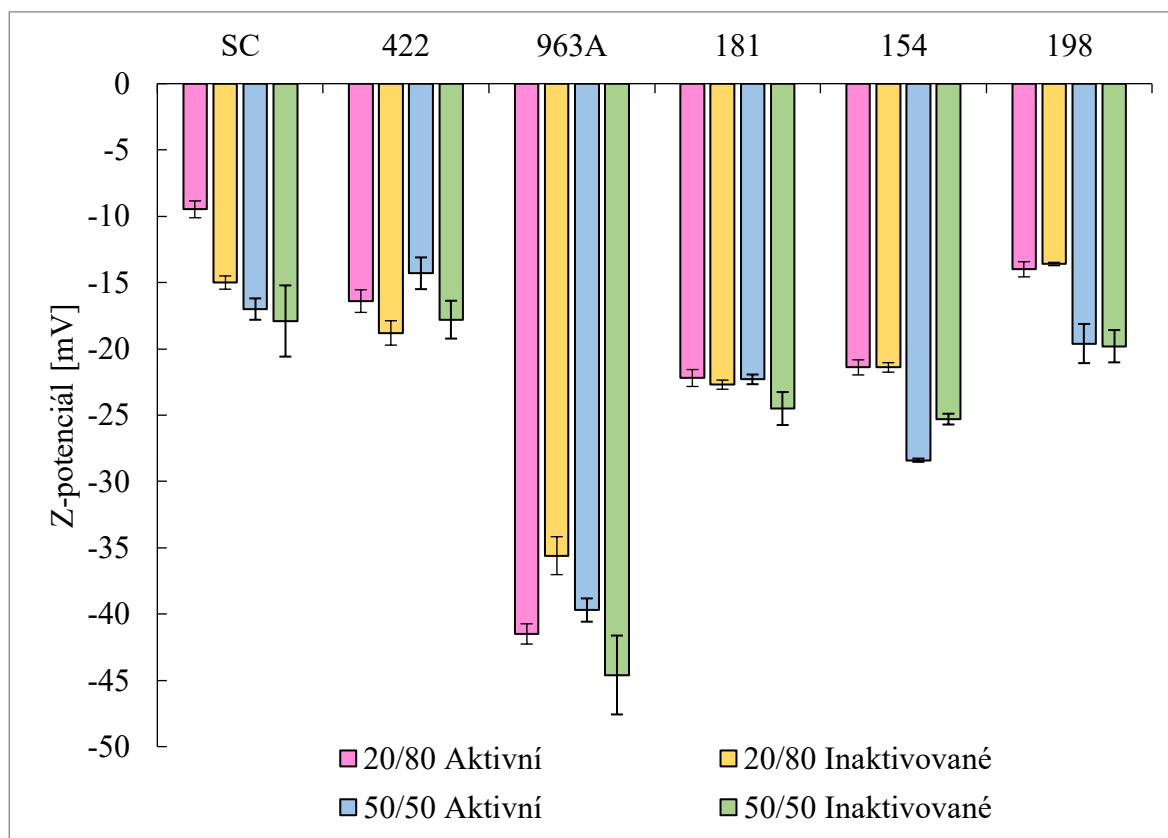
Distribuční křivky (viz. Obrázek 34) vytvořené pro emulze z inaktivovaných buněk *Saccharomyces cerevisiae* potvrzují, že poměr olejové a vodné fáze působí na stabilizaci a

strukturu emulze. Jak již bylo zmíněno, první pík odpovídá volným neadsorbovaným buňkám mikroorganismů v kontinuální fázi. U emulzí s poměrem 50/50 je tento pík méně intenzivní ve srovnání s píkem odpovídajícím poměru 20/80, z čeho vyplývá, že na pokrytí dalšího oleje zbývá méně buněk, což potvrzuje předchozí předpoklad.



Obrázek 34: Porovnání distribučních křivek inaktivovaných buněk *S. cerevisiae*

Poslední parametr, který je sledován během charakterizace emulzních systémů, je absolutní hodnota zeta-potenciálu. Z obrázku 35 je nejvyšší absolutní hodnota stanovena u emulze v poměru 50/50 stabilizované inaktivovaným *Lactobacillus rhamnosus* 963A, a to $|44,1|$ mV. Emulze s aktivními buněčnými formami kmenu 963A v poměrech 20/80 a 50/50 vykazují mírně nižší hodnoty, konkrétně $|41,5|$ a $|39,7|$ mV. U poslední emulze získané pomocí bakterií *L. rhamnosus* 963A činí absolutní hodnota zeta-potenciálu $|35,6|$ mV. Nejvyšším hodnotám zeta-potenciálu odpovídá i nejlepší stabilita emulzí. Ačkoli emulze s aktivními buňkami *Lactobacillus fermentum* 154 má relativně vysokou hodnotu zeta-potenciálu ($|25,3|$ mV), z vizuálního hodnocení již druhý den po přípravě vyplývá, že je destabilizovaná. Minimální hodnotu $|9,5|$ mV vykazuje emulze připravená z životaschopných buněk *Saccharomyces cerevisiae* v poměru O/V 20/80. Tento výsledek lze vysvětlit nižší hodnotou zeta-potenciálu samotných kvasinkových buněk. U všech ostatních emulzí se absolutní hodnoty zeta-potenciálu nacházejí v rozmezí $|14|$ až $|25|$ mV.



Obrázek 35: Naměřené hodnoty zeta-potenciálů

Získané výsledky ukazují, že bakterie *Lactobacillus rhamnosus* 963A a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mají nejlepší emulgační schopnost vzhledem ke kinetické stabilitě emulzí, dosažení nejmenších velikostí emulzních kapek a v případě *L. rhamnosus* 963A i nejvyšších hodnot zeta-potenciálu. Schopnost *L. rhamnosus* stabilizovat emulze bude dána převážně jeho nejmenší velikostí buněk a rovněž schopností snižovat povrchové napětí. To potvrzuje i studie Nejadmansouri a kol., která uvádí, že vyšší emulgační schopnost je pozorována u buněk laktobacilů než u buněk koků, což je vysvětlováno přítomností pili, které jsou vystupujícími bílkovinnými povrchovými strukturami o průměru 1 až 10 nm a délce 1 μm . Podle této studie se *Lactobacillus rhamnosus* jeví jako výrazně účinnější stabilizátor díky příznivému kontaktnímu úhlu, nižšímu mezifázovému napětí a vyšší volné energii odtržení. *Saccharomyces cerevisiae* sice vykazuje nižší hodnotu zeta-potenciálu a vysokou hydrofilitu, ale v některých podmínkách může vést ke srovnatelné nebo dokonce vyšší stabilitě emulzí. [84]

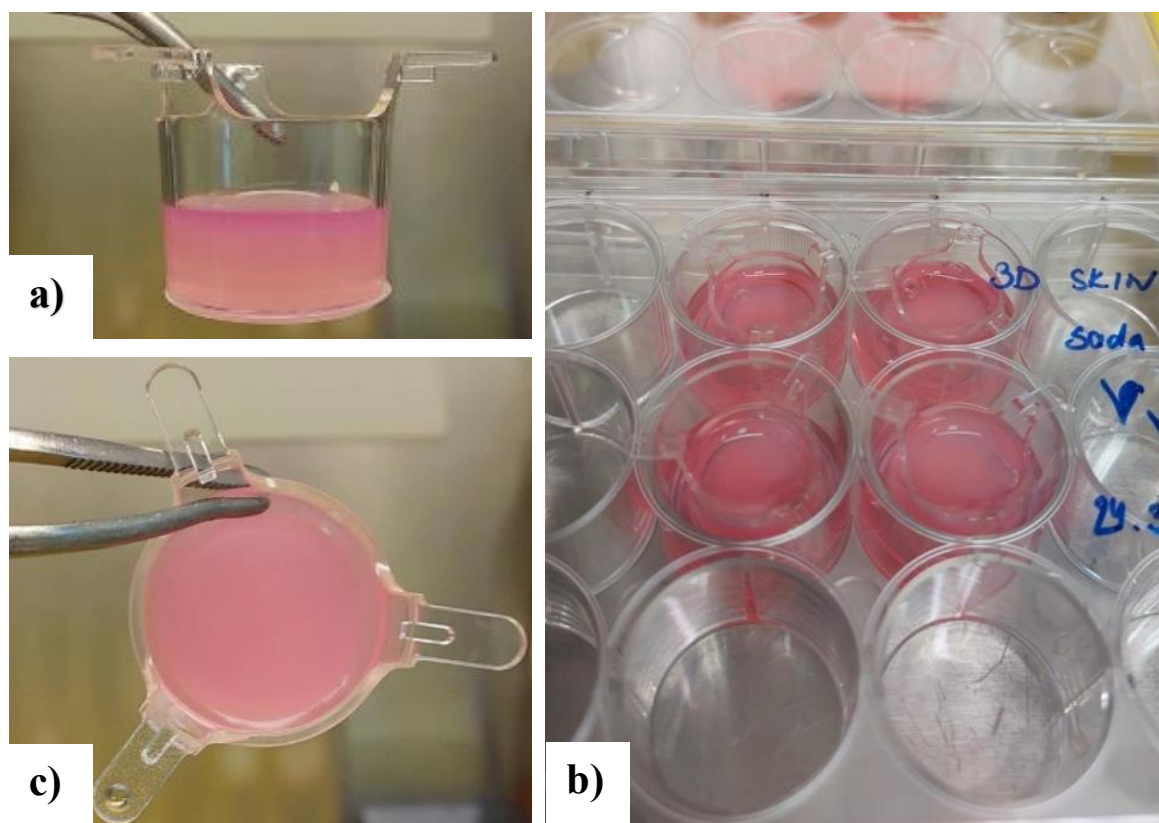
Dále se z hlediska stabilizační účinnosti umisťují buňky *Lactobacillus casei* 422, které však vykazují nižší elektrostatické interakce mezi částicemi v disperzním prostředí, a tím přispívají ke snížení celkové kinetické stability systémů. *Lactobacillus plantarum* 181

projevuje minimální stabilizační schopnosti pouze v poměru olejové a vodné fáze 20/80, a žádné emulgační schopnosti v poměru 50/50. Studie Nejadmansouri a kol. rovněž ukazuje proměnlivou stabilitu u emulzí stabilizovaných *Lactobacillus plantarum*. [84]

Emulze stabilizované pomocí bakterií *Lactobacillus fermentum* 154 a *Lactobacillus casei casei* 198 nelze považovat za stabilní systémy z důvodu destabilizace již druhý den po přípravě. Ve studii Nejadmansouri a kol. emulze připravené z *Lactobacillus casei* subsp. *casei* vykazují kinetickou stabilitu po dobu 3 dnů. [84]

9.3 Testování emulzí na 3D modelech kůže

Pro stanovení účinku vybraných emulzí na kožní mikrobiom byly vybrány emulze stabilizované 10% 963A, 10% 963A IA, 10% SC and 10% SC IA s poměrem O/V 20/80. Emulze byly testovány na 3D modelu kůže, který se skládá z lidských fibroblastů a keratinocytů kultivovaných do vícevrstvé struktury. Podobá se kožní tkáni *in vivo* (viz. Obrázek 36).



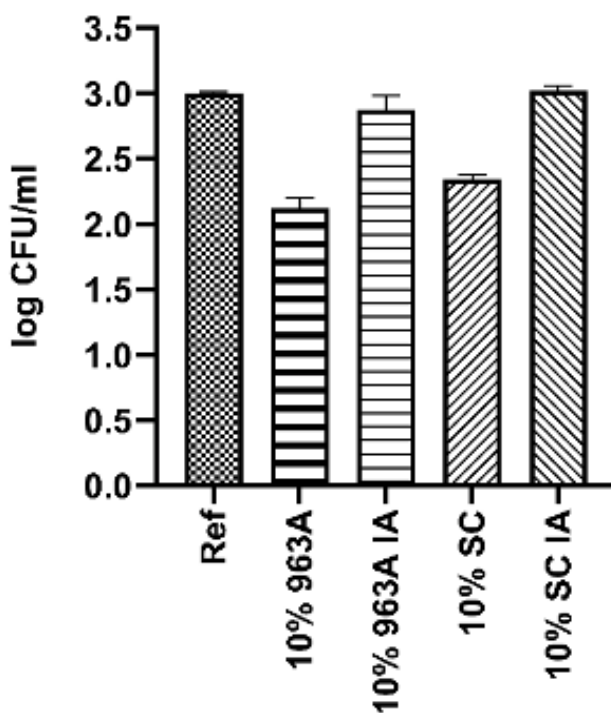
Obrázek 36: Kožní model po 7 dnech kultivace

Pro testování bakteriální kolonizace byl proveden test adheze, což je metoda používaná k hodnocení a kvantifikaci schopnosti bakterií přichytit se na různé povrchy. Obrázek 37 ukazuje měření adheze bakterie *Staphylococcus epidermidis* na 3D modelu kůže *in vitro*

v přítomnosti 4 testovaných formulací. Hodnoty na ose y představují logaritmus jednotek tvořících kolonie na mililitr (log CFU/mL), který je mírou bakteriální kolonizace.

Sloupec Ref představuje základní úroveň kolonizace *S. epidermidis* na modelu kůže bez přítomnosti testovaných vzorků. Hodnota je přibližně 3,00 log CFU/mL. V přítomnosti emulze stabilizované aktivními buňkami *L. rhamnosus* 963A se výrazně snižuje adheze *S. epidermidis* na přibližně 2,12 log CFU/mL. To naznačuje, že tato emulze může inhibovat kolonizaci *S. epidermidis*. Varianta emulze stabilizované inaktivovanými buňkami *L. rhamnosus* 963A (IA) vede k částečnému obnovení adheze *S. epidermidis* na přibližně 2,87 log CFU/mL. To by mohlo naznačovat, že za inhibiční účinek jsou odpovědné živé bakterie *Lactobacillus rhamnosus* 963A.

U jiného typu vzorku, tj. u emulzí stabilizovaných *Saccharomyces cerevisiae*, dochází rovněž ke snížení adheze *S. epidermidis* na přibližně 2,34 log CFU/mL. Aplikace emulze s inaktivovanou formou *S. cerevisiae* vede k obnovení adheze *S. epidermidis* na úroveň srovnatelnou s referenční, s hodnotou 3,02 log CFU/mL. To opět naznačuje, že aktivní forma *S. cerevisiae* je zodpovědná za snížení adheze.



Obrázek 37: Kolonizace *S. epidermidis* na 3D modelu kůže

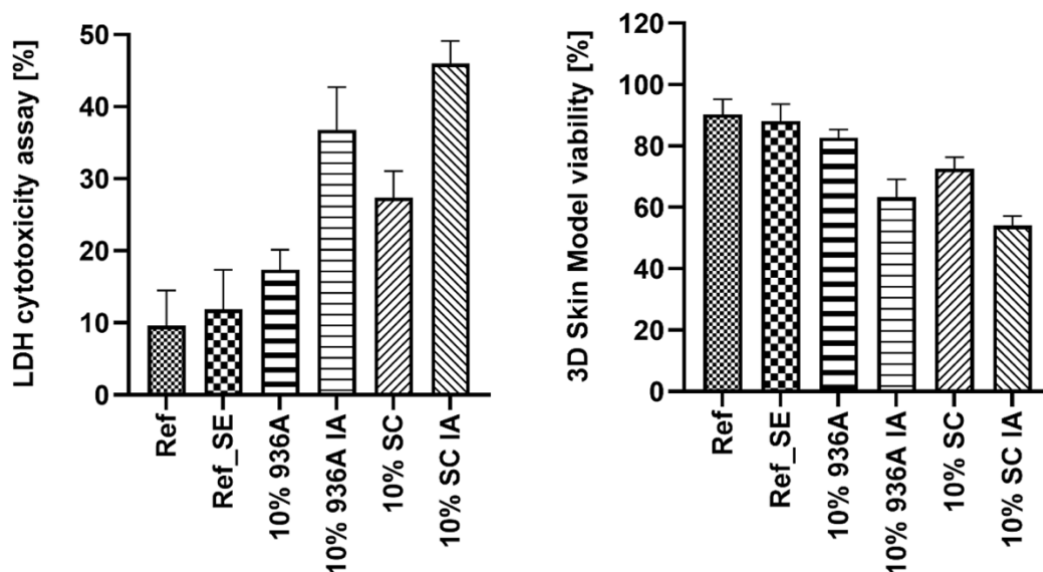
Aplikace emulze stabilizované aktivními formami buněk *L. rhamnosus* 963A by mohla potenciálně přispívat k regulaci kožního mikrobiomu tím, že inhibuje nadměrnou kolonizaci *S. epidermidis*. Ačkoli je *S. epidermidis* běžnou součástí kožního mikrobiomu, jeho

přemnožení může být spojeno s některými kožními problémy. Kmeny *Lactobacillus* mají prokázané antimikrobiální účinky a mohou ovlivňovat adhezi jiných bakterií. Mechanismus účinků může zahrnovat produkci antimikrobiálních látek, soutěžení o prostor nebo modulaci imunitní odpovědi hostitele.

Přítomnost živých kvasinek *S. cerevisiae* by mohla mít vliv na kožní mikrobiom tím, že částečně inhibuje kolonizaci *S. epidermidis*. Mechanismus tohoto účinku se pravděpodobně bude lišit od účinku bakterií *L. rhamnosus*. *S. cerevisiae* by mohla interagovat se *S. epidermidis* různými mechanismy, například soutěží o živiny nebo adhezivní místa na povrchu kůže, produkcí antimikrobiálních metabolitů nebo ovlivněním lokálního pH. *S. cerevisiae* není typickým dominantním mikroboem kožního mikrobiomu, může mít potenciál ovlivňovat jeho rovnováhu. Je však důležité poznamenat, že jeho vliv na *S. epidermidis* se v tomto experimentálním uspořádání zdá být méně výrazný, než vliv *Lactobacillus rhamnosus*.

Pro posouzení cytotoxicity byla kvantifikována aktivita laktát dehydrogenázy v médiu 3D modelu kůže *in vitro*. Hladiny LDH slouží jako přímý ukazatel lýzy buněk, přičemž vyšší koncentrace znamenají větší cytotoxicitu.

Výsledky LDH testu (viz. Obrázek 38) ukazují cytotoxicitu (levý graf) a odvozenou životaschopnost různých vzorků emulzí na 3D modelu kůže *in vitro* (pravý graf). Procenta cytotoxicity odrážejí rozsah poškození buněčné membrány, zatímco životaschopnost je odvozena jako zbývající procento pravděpodobně živých buněk. Pro posouzení potenciálního podráždění kůže byla stanovena prahová hodnota 50 % cytotoxicity, přičemž vzorky překračující tuto hodnotu byly považovány za cytotoxické. Zatímco referenční vzorky vykazovaly nízkou cytotoxicitu – s hodnotou 9,62 % bez *S. epidermidis* a s hodnotou 11,82 % se *S. epidermidis*, některé vzorky Pickeringových emulzí vykazovaly vyšší cytotoxicitu, avšak pod hranicí 50 %. Nicméně to může naznačovat potenciální nepříznivé účinky na 3D model kůže *in vitro*. Konkrétně se jednalo o vzorky emulze stabilizované inaktivovaným *L. rhamnosus* 963A a emulze připravené z inaktivovaných *S. cerevisiae* s hodnotami cytotoxicity 36,77 % a 45,98 %. Vzorky emulze stabilizované aktivními formami buněk *L. rhamnosus* 963A měly hodnotu cytotoxicity 17,37 % a s aktivními buněčnými formami *S. cerevisiae* 27,35 %.



Obrázek 38: Cytotoxicita a životaschopnost vzorků v 3D modelu kožního mikrobiomu stanovená pomocí LDH assay kitu

Pro komplexnější posouzení životaschopnosti buněk se doporučují nezávislé testy měřící metabolickou aktivitu nebo integritu membrán, protože životaschopnost odvozená pouze z cytotoxicity LDH předpokládá přímou inverzní závislost, která nemusí vždy platit ve složitých biologických systémech.

ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo porovnat stabilizační účinek vybraných druhů mikroorganismů. Jako stabilizující částice byly zvoleny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie rodu *Lactobacillus*, konkrétně *L. rhamnosus* 963A, *L. casei* 422, *L. plantarum* 181, *L. fermentum* 154 a *L. casei* subsp. *casei* 198. Emulze byly smíchány v poměru olejové a vodné fáze 20/80 a 50/50, přičemž jako olejová fáze byl použit MCT olej a jako vodná fáze 10% disperze vybraných mikroorganismů. Současně byla tato práce zaměřena na studium vlivu životaschopnosti buněk na vlastnosti emulzí.

Jako nejúčinnější stabilizátor byla vybrána bakterie *Lactobacillus rhamnosus* 963A, jejíž emulze prokázala nejvyšší kinetickou stabilitu s nejvyšším indexem krémování. U těchto buněk bylo naměřeno nejnižší povrchové napětí, které může být spojeno s přítomností pili, což naznačuje snazší tvorbu kapek při emulgaci. Struktura emulze byla homogenní, emulzní kapky měly stejnou velikost a podíl volných buněk v kontinuální fázi byl nízký. Rozdíly byly pozorovány ve velikosti emulzních kapek, přičemž poměr 50/50 vykazoval vyšší velikost než poměr 20/80, ale tyto velikosti byly stále považovány za jedny z nejmenších ze všech zvolených stabilizátorů. Navzdory rozdílům v životaschopnosti buněk a poměru fází byly u všech emulzí zaznamenány nejvyšší absolutní hodnoty zeta-potenciálu značící dobrou koloidní stabilitu emulzních kapek.

Emulze stabilizované *Saccharomyces cerevisiae* byly v některých případech schopny vytvářet relativně stabilní emulzní systémy s vysokými hodnotami indexu krémování, zejména v aktivní formě a při poměru fází 50/50, přestože má tento kmen velmi hydrofilní povrch a nízký zeta-potenciál. Velikost emulzních kapek byla vyšší při poměru 50/50 než při poměru 20/80. Podobné chování bylo pozorováno u bakterie *Lactobacillus casei* 422.

Velmi špatný stabilizační účinek prokázaly bakterie *Lactobacillus plantarum* 181, *Lactobacillus fermentum* 154 a *Lactobacillus casei casei* 198, kde buď emulgace neproběhla vůbec nebo nastala separace fází, a to druhý den po přípravě. Tyto bakterie byly vyhodnoceny jako nejméně účinné stabilizátory Pickeringových emulzí, zejména ve formě inaktivovaných buněk.

U emulzí s živými a neživými formami buněk *Lactobacillus rhamnosus* 963A a *Saccharomyces cerevisiae* byl proveden test adheze, který se používá k posouzení schopnosti bakterií přilnout k povrchu. Kolonizace *Staphylococcus epidermidis* na 3D modelu lidské kůže byla úspěšná ve všech testovaných podmínkách. Z naměřených hodnot

je zřejmé, že emulze s aktivními buněčnými formami *Lactobacillus rhamnosus* 963A a *Saccharomyces cerevisiae* vykazují mírně nižší množství kolonizujících bakterií *S. epidermidis*. Jinými slovy, Pickeringovy emulze s aktivními formami buněk přispívají k inhibici růstu prospěšné bakterie *S. epidermidis*, jejíž přemnožení může vést k dysbióze kůže. Naopak inaktivované formy zvolených mikroorganismů nenarušují růst přirozené kožní mikroflóry.

V případě cytotoxicity a životaschopnosti modelu lidské kůže žádná z testovaných emulzí nepřekročila kritickou hranici stanovenou na 50 % pro cytotoxický účinek. Výsledky testu LDH ukazují, že k nejvyššími cytotoxickému účinku došlo ve skupině s inaktivovanou formou *Saccharomyces cerevisiae*, ale stále zůstal pod limitem. Podobný trend byl potvrzen i při testu životaschopnosti, kdy byla v této skupině zaznamenána nejnižší hodnota. Naopak emulze s *Lactobacillus rhamnosus* 963A (živé a neživé) dosáhly vyšších hodnot životaschopnosti a nižší míry uvolňování LDH, což svědčí o jejich lepší snášenlivosti s pokožkou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] YOUSEF, Hani; ALHAJJ, Mandy; FAKOYA, Adegbenro O.; SHARMA, Sandeep. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29262154/>. [cit. 2024-11-08].
- [2] MCKENNA, Matthew; ALLMAN, Megan a HARGEST, Rachel. *Surgical anatomy of the skin*. Online. Surgery (Oxford). 2024. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2024.08.008>. [cit. 2024-11-08].
- [3] RÖCKEN, Martin; SCHALLER, Martin; SATTLER, Elke a BURGDORF, Walter H. *C. Kapesní atlas dermatologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=hn1iDwAAQBAJ&printsec=frontcover&key=AlzaSyDIPfI89JdFhWBVsMVsavVo6aNh057xITc#v=onepage&q&f=false>. [cit. 2024-11-08].
- [4] EBLING, F. John G. and MONTAGNA, William (21 Jan. 2025). "human skin". *Encyclopedia Britannica*. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/human-skin>. Accessed 2 February 2025. [cit. 2025-02-02].
- [5] ALBANNA, Mohammad a James H. HOLMES IV, eds. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elektronická kniha. Amsterdam: Academic Press, 2016. ISBN 9780128017975. Dostupné z: https://www.google.cz/books/edition/Skin_Tissue_Engineering_and_Regenerative/S7d0BgAAQBAJ?hl=cs&gbpv=1. [cit. 2025-02-02].
- [6] MAYNARD, Robert Lewis a DOWNES, Noel. The Skin or the Integument. Online. In: *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. Elsevier, 2019, s. 303-315. ISBN 9780128118375. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811837-5.00024-1>. [cit. 2025-02-16].
- [7] SUNDBERG, John P.; BOOTH, Carmen J.; NANNEY, Lillian B.; FLECKMAN, Philip a KING, Lloyd E. Skin and Adnexa. Online. In: *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier, 2018, s. 511-542. ISBN 9780128029008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00024-5>. [cit. 2025-02-02].

- [8] WAUGH, Anne a GRANT, Allison. *Ross & Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illnes*. 13. Elsevier Health Sciences, 2018. ISBN 0702072842. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=9w5kDwAAQBAJ&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. [cit. 2024-11-14].
- [9] LOPEZ-OJEDA, Wilfredo; PANDLEY, Amarendra; ALHAJJ, Mandy; OAKLEY, Amanda M. *Anatomy, Skin (Integument)*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/#article-29085.s2>. [cit. 2024-11-14].
- [10] SHAH, Jasmine; MCKNIGHT, Gerard a HARGEST, Rachel. *Physiology of the skin*. Online. Surgery (Oxford). 2024. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2024.09.008>. [cit. 2024-11-18].
- [11] MACGIBENY, Margaret A.; ADJEI, Susuana; PYLE, Hunter; BUNICK, Christopher G.; GHANNOUM, Mahmoud et al. *The Human Skin Microbiome in Health: CME Part 1*. Online. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2024. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2024.07.1498>. [cit. 2024-11-18].
- [12] MIM, Mahjabin Ferdaous; SIKDER, Mahmudul Hasan; CHOWDHURY, Md. Zahid Hasan; BHUIYAN, Ashkar-Ul-Alam; ZINAN, Nayeematul et al. *The dynamic relationship between skin microbiomes and personal care products: A comprehensive review*. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 14. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34549>. [cit. 2024-11-18].
- [13] DAYAN, Nava (ed.). *Skin Microbiome Handbook*. Online. Wiley, 2020. ISBN 9781119592235. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119593058>. [cit. 2024-11-18].
- [14] GUO, Shujia; WANG, Yuqian; LI, Jiani; LIU, Yuwen; HAN, Yi et al. In vitro killing effect of berberine and niclosamide on ocular *Demodex folliculorum*. Online. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2024. ISSN 13670484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clae.2024.102336>. [cit. 2025-02-09].
- [15] O'SULLIVAN, Julie N; REA, Mary C; O'CONNOR, Paula M; HILL, Colin a ROSS, R Paul. Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. Online. *FEMS Microbiology Ecology*. 2018, roč. 95, č. 2. ISSN 1574-6941. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy241>. [cit. 2025-02-09].

- [16] GERVASON, Sandie; METTON, Isabelle; GEMROT, Elodie; RANOUILLE, Edwige; SKORSKI, Gilbert et al. Rhodomyrtus tomentosa Fruit Extract and Skin Microbiota: A Focus on *C. acnes* Phylotypes in Acne Subjects. Online. *Cosmetics*. 2020, roč. 7, č. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics7030053>. [cit. 2025-02-09].
- [17] BITSCHAR, Katharina; SAUER, Birgit; FOCKEN, Jule; DEHMER, Hanna; MOOS, Sonja et al. Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. Online. *Nature Communications*. 2019, roč. 10, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10646-7>. [cit. 2025-02-09].
- [18] LI, Hao; GOH, Bee Na; TEH, Wooi Keong; JIANG, Zhenze; GOH, Joleen Pei Zhen et al. Skin Commensal *Malassezia globosa* Secreted Protease Attenuates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018, roč. 138, č. 5, s. 1137-1145. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.034>. [cit. 2025-02-09].
- [19] FOURNIÈRE, Mathilde; LATIRE, Thomas; SOUAK, Djouhar; FEUILLOLEY, Marc G. J. a BEDOUX, Gilles. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. Online. *Microorganisms*. 2020, roč. 8, č. 11. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111752>. [cit. 2025-02-09].
- [20] UBEROI, Aayushi; BARTOW-MCKENNEY, Casey; ZHENG, Qi; FLOWERS, Laurice; CAMPBELL, Amy et al. Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. Online. *Cell Host & Microbe*. 2021, roč. 29, č. 8, s. 1235-1248.e8. ISSN 19313128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.011>. [cit. 2025-02-09].
- [21] HARRIS, Tamia A.; GATTU, Sureka; PROPHETER, Daniel C.; KUANG, Zheng; BEL, Shai et al. Resistin-like Molecule α Provides Vitamin-A-Dependent Antimicrobial Protection in the Skin. Online. *Cell Host & Microbe*. 2019, roč. 25, č. 6, s. 777-788.e8. ISSN 19313128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.004>. [cit. 2025-02-09].
- [22] MERANA, Geil R.; DWYER, Laura R.; DHARIWALA, Miqdad O.; WECKEL, Antonin; GONZALEZ, Jeanmarie R. et al. Intestinal inflammation alters the antigen-

- specific immune response to a skin commensal. Online. *Cell Reports*. 2022, roč. 39, č. 9. ISSN 22111247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110891>. [cit. 2025-02-09].
- [23] MUKHARYA, Anoushka; POKALE, Rahul; ROY, Amrita Arup; SOMAN, Soji; KULKARNI, Sanjay et al. Targeting diabetic and chronic wounds using topical nano-formulations impregnated with modern microbiome-driven peptides and probiotics. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2025, roč. 105. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106590>. [cit. 2025-02-16].
- [24] LIN, Zhen; CHEN, Lu; QI, Caiyu a WANG, Gaofeng. Skin microecology and skin barrier repair, wound healing and appendage regeneration. Online. *Regenesi Repair Rehabilitation*. 2025, roč. 1, č. 1, s. 1-5. ISSN 29505755. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rerere.2024.07.001>. [cit. 2025-02-16].
- [25] PASHENKOV, Mikhail V.; DAGIL, Yulia A. a PINEGIN, Boris V. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. Online. *International Immunopharmacology*. 2018, roč. 54, s. 385-400. ISSN 15675769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.036>. [cit. 2025-02-16].
- [26] PARK, Jin; SCHWARDT, Nicole H.; JO, Jay-Hyun; ZHANG, Zhiwei; PILLAI, Valentina et al. Shifts in the Skin Bacterial and Fungal Communities of Healthy Children Transitioning through Puberty. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2022, roč. 142, č. 1, s. 212-219. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.04.034>. [cit. 2025-02-09].
- [27] SMYTHE, Paisleigh a WILKINSON, Holly N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 4. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24043950>. [cit. 2025-02-09].
- [28] HUANG, Shi; HAIMINEN, Niina; CARRIERI, Anna-Paola; HU, Rebecca; JIANG, Lingjing et al. Human Skin, Oral, and Gut Microbiomes Predict Chronological Age. Online. *MSystems*. 2020, roč. 5, č. 1, s. 10.1128/msystems.00630-19. ISSN 2379-5077. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/msystems.00630-19>. [cit. 2025-02-09].
- [29] MOITINHO-SILVA, Lucas; DEGENHARDT, Frauke; RODRIGUEZ, Elke; EMMERT, Hila; JUZENAS, Simonas et al. Host genetic factors related to innate immunity, environmental sensing and cellular functions are associated with human skin

- microbiota. Online. *Nature Communications*. 2022, roč. 13, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33906-5>. [cit. 2025-02-09].
- [30] SKOWRON, Krzysztof; BAUZA-KASZEWSKA, Justyna; KRASZEWSKA, Zuzanna; WIKTORCZYK-KAPISCHKE, Natalia; GRUDLEWSKA-BUDA, Katarzyna et al. Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. Online. *Microorganisms*. 2021, roč. 9, č. 3. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030543>. [cit. 2025-02-16].
- [31] CALLEWAERT, Chris; RAVARD HELFFER, Katia a LEBARON, Philippe. Skin Microbiome and its Interplay with the Environment. Online. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2020, roč. 21, č. S1, s. 4-11. ISSN 1175-0561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00551-x>. [cit. 2025-02-16].
- [32] KRAEMER, Julia G.; RAMETTE, Alban; AEBI, Suzanne; OPPLIGER, Anne; HILTY, Markus et al. Influence of Pig Farming on the Human Nasal Microbiota: Key Role of Airborne Microbial Communities. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018, roč. 84, č. 6, s. e02470-17. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.02470-17>. [cit. 2025-02-16].
- [33] BOUSLIMANI, Amina; DA SILVA, Ricardo; KOSCIOLEK, Tomasz; JANSSEN, Stefan; CALLEWAERT, Chris et al. The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics. Online. *BMC Biology*. 2019, roč. 17, č. 1. ISSN 1741-7007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0660-6>. [cit. 2025-02-19].
- [34] WANG, Qian; CUI, Shumei; ZHOU, Li; HE, Keke; SONG, Liya et al. Effect of cosmetic chemical preservatives on resident flora isolated from healthy facial skin. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019, roč. 18, č. 2, s. 652-658. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12822>. [cit. 2025-02-19].
- [35] ZHANG, Wei; WANG, Xueshuo; ZHAO, Linna; GU, Yihai; CHEN, Yiwen et al. Effect of leave-on cosmetic antimicrobial preservatives on healthy skin resident *Staphylococcus epidermidis*. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2023, roč. 22, č. 7, s. 2115-2121. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.15690>. [cit. 2025-02-19].
- [36] NASROLLAHI, Saman Ahmad; FATTAHI, Masha; KHAMESIPOOR, Ali; AMIRI, Fatemeh; AHMADI, Maryam et al. Effects of cosmetic preservatives on healthy facial skin microflora. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* [online]. 2022, vol. 15,

no. 8, pp. 34-37. ISSN 1941-2789. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9436228/>

- [37] WAGNER, Nicole; VALERIANO, Valerie Diane; DIOU-HIRTZ, Samuel; BJÖRNINEN, Evelina; ÅKERSTRÖM, Ulf et al. Microbial Dynamics: Assessing Skincare Regimens' Impact on the Facial Skin Microbiome and Skin Health Parameters. Online. *Microorganisms*. 2024, roč. 12, č. 12. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122655>. [cit. 2025-02-19].
- [38] PINTO, Daniela; CIARDIELLO, Tiziana; FRANZONI, Matteo; PASINI, Francesca; GIULIANI, Giammaria et al. Effect of commonly used cosmetic preservatives on skin resident microflora dynamics. Online. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88072-3>. [cit. 2025-02-19].
- [39] SANMIGUEL, Adam J.; MEISEL, Jacquelyn S.; HORWINSKI, Joseph; ZHENG, Qi; BRADLEY, Charles W. et al. Antiseptic Agents Elicit Short-Term, Personalized, and Body Site-Specific Shifts in Resident Skin Bacterial Communities. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018, roč. 138, č. 10, s. 2234-2243. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.04.022>. [cit. 2025-02-19].
- [40] DOBLER, Dorota; SCHMIDTS, Thomas; WILDENHAIN, Sören; SEEWALD, Ilona; MERZHÄUSER, Michael et al. Impact of Selected Cosmetic Ingredients on Common Microorganisms of Healthy Human Skin. Online. *Cosmetics*. 2019, roč. 6, č. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics6030045>. [cit. 2025-02-19].
- [41] SIVORI, Francesca; CAVALLO, Ilaria; TRUGLIO, Mauro; DE MAIO, Flavio; SANGUINETTI, Maurizio et al. Staphylococcus aureus colonizing the skin microbiota of adults with severe atopic dermatitis exhibits genomic diversity and convergence in biofilm traits. Online. *Biofilm*. 2024, roč. 8. ISSN 25902075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2024.100222>. [cit. 2025-02-28].
- [42] GEOGHEGAN, Joan A.; IRVINE, Alan D. a FOSTER, Timothy J. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. Online. *Trends in Microbiology*. 2018, roč. 26, č. 6, s. 484-497. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008>. [cit. 2025-02-28].
- [43] HÜLPÜSCH, Claudia; ROHAYEM, Robin; REIGER, Matthias a TRAILDHOFFMANN, Claudia. Exploring the skin microbiome in atopic dermatitis pathogenesis and disease modification. Online. *Journal of Allergy and Clinical*

- Immunology*. 2024, roč. 154, č. 1, s. 31-41. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.04.029>. [cit. 2025-02-28].
- [44] TAY, Angeline S.L.; LI, Chenhao; NANDI, Tannistha; CHNG, Kern Rei; ANDIAPPAN, Anand Kumar et al. Atopic dermatitis microbiomes stratify into ecologic dermatotypes enabling microbial virulence and disease severity. Online. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021, roč. 147, č. 4, s. 1329-1340. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.09.031>. [cit. 2025-02-28].
- [45] SCHMID, B.; KÜNSTNER, A.; FÄHNRIK, A.; BERSUCH, E.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. et al. Dysbiosis of skin microbiota with increased fungal diversity is associated with severity of disease in atopic dermatitis. Online. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2022, roč. 36, č. 10, s. 1811-1819. ISSN 0926-9959. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jdv.18347>. [cit. 2025-02-28].
- [46] BJERRE, Rie Dybboe; HOLM, Jacob Bak; PALLEJA, Albert; SØLBERG, Julie; SKOV, Lone et al. Skin dysbiosis in the microbiome in atopic dermatitis is site-specific and involves bacteria, fungus and virus. Online. *BMC Microbiology*. 2021, roč. 21, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02302-2>. [cit. 2025-02-28].
- [47] POIZEAU, F.; LEDUCQ, S.; FARDET, L.; BEYLOT-BARRY, M.; CHABY, Guillaume et al. Treatment of moderate-to-severe psoriasis in adults: An expert consensus statement using a Delphi method to produce a decision-making algorithm. Online. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. 2024, roč. 151, č. 3. ISSN 01519638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.annder.2024.103287>. [cit. 2025-02-28].
- [48] MAZUR, Małgorzata; TOMCZAK, Hanna; LODYGA, Martha; CZAJKOWSKI, Rafał; ŻABA, Ryszard et al. The microbiome of the human skin and its variability in psoriasis and atopic dermatitis. Online. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2021, roč. 38, č. 2, s. 205-209. ISSN 1642-395X. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/ada.2021.106197>. [cit. 2025-03-01].
- [49] CHAN, Alfred A.; TRAN, Patrick T. a LEE, Delphine J. Quantitative Aggregation of Microbiome Sequencing Data Provides Insights into the Associations between the Skin

Microbiome and Psoriasis. Online. *JID Innovations*. 2024, roč. 4, č. 1. ISSN 26670267. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2023.100249>. [cit. 2025-02-28].

[50] LEWIS, Daniel J.; CHAN, Warren H.; HINOJOSA, Tiffany; HSU, Sylvia a FELDMAN, Steven R. Mechanisms of microbial pathogenesis and the role of the skin microbiome in psoriasis: A review. Online. *Clinics in Dermatology*. 2019, roč. 37, č. 2, s. 160-166. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.01.011>. [cit. 2025-03-19].

[51] CARMONA-CRUZ, Silvia; OROZCO-COVARRUBIAS, Luz a SÁEZ-DE-OCARIZ, Marimar. The Human Skin Microbiome in Selected Cutaneous Diseases. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022, roč. 12. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.834135>. [cit. 2025-02-28].

[52] WANG, Hailun; CHAN, Henry H.; NI, Michael Y.; LAM, Wendy W.; CHAN, W.M. Mandy et al. Bacteriophage of the Skin Microbiome in Patients with Psoriasis and Healthy Family Controls. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2020, roč. 140, č. 1, s. 182-190.e5. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.05.023>. [cit. 2025-03-01].

[53] HABEEBUDDIN, Mohammed; KARNATI, Ranjith Kumar; SHIROORKAR, Predeepkumar Narayanappa; NAGARAJA, Sreeharsha; ASDAQ, Syed Mohammed Basheeruddin et al. Topical Probiotics: More Than a Skin Deep. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 3. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030557>. [cit. 2025-03-10].

[54] MACGIBENY, Margaret A.; ADJEI, Susuana; PYLE, Hunter; BUNICK, Christopher G.; GHANNOUM, Mahmoud et al. Alterations in the Skin Microbiome in Dermatologic Diseases and with External Exposures: CME Part 2. Online. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2024. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2024.07.1499>. [cit. 2025-03-01].

[55] SCHNEIDER, Andrea M.; NOLAN, Zachary T.; BANERJEE, Kalins; PAINE, Allison R.; CONG, Zhaoyuan et al. Evolution of the facial skin microbiome during puberty in normal and acne skin. Online. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2023, roč. 37, č. 1, s. 166-175. ISSN 0926-9959. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jdv.18616>. [cit. 2025-03-01].

- [56] ROCHA, M. A. a BAGATIN, E. Skin barrier and microbiome in acne. Online. *Archives of Dermatological Research*. 2018, roč. 310, č. 3, s. 181-185. ISSN 0340-3696. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00403-017-1795-3>. [cit. 2025-03-10].
- [57] BUDDENKOTTE, Joerg a STEINHOFF, Martin. Recent advances in understanding and managing rosacea. Online. *F1000Research*. 2018, roč. 7. ISSN 2046-1402. Dostupné z: <https://doi.org/10.12688/f1000research.16537.1>. [cit. 2025-03-01].
- [58] NEZHADI, Javad; FADAEI, Manouchehr; AHMADI, Somayeh a KAFIL, Hossein Samadi. Microbiota transplantation. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 20. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39047>. [cit. 2025-03-05].
- [59] LEE, So-Yeon; LEE, Eun; PARK, Yoon Mee a HONG, Soo-Jong. Microbiome in the Gut-Skin Axis in Atopic Dermatitis. Online. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2018, roč. 10, č. 4. ISSN 2092-7355. Dostupné z: <https://doi.org/10.4168/aair.2018.10.4.354>. [cit. 2025-03-06].
- [60] FANG, Zhifeng; LI, Lingzhi; ZHANG, Hao; ZHAO, Jianxin; LU, Wenwei et al. Gut Microbiota, Probiotics, and Their Interactions in Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis: A Review. Online. *Frontiers in Immunology*. 2021, roč. 12. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.720393>. [cit. 2025-03-06].
- [61] MASHIAH, Jacob; KARADY, Tal; FLISS-ISAKOV, Naomi; SPRECHER, Eli; SLODOWNIK, Dan et al. Clinical efficacy of fecal microbial transplantation treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. Online. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2022, roč. 10, č. 3. ISSN 2050-4527. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/iid3.570>. [cit. 2025-03-06].
- [62] XIAO, Shiju; ZHANG, Guangzhong; JIANG, Chunyan; LIU, Xin; WANG, Xiaoxu et al. Deciphering Gut Microbiota Dysbiosis and Corresponding Genetic and Metabolic Dysregulation in Psoriasis Patients Using Metagenomics Sequencing. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, roč. 11. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.605825>. [cit. 2025-03-06].
- [63] MEMARIANI, Mojtaba a MEMARIANI, Hamed. New horizons in the treatment of psoriasis: Modulation of gut microbiome. Online. *Heliyon*. 2025, roč. 11, č. 1. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41672>. [cit. 2025-03-06].

- [64] CALLEWAERT, Chris; KNÖDLSEDER, Nastassia; KAROGLAN, Ante; GÜELL, Marc a PAETZOLD, Bernhard. Skin microbiome transplantation and manipulation: Current state of the art. Online. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021, roč. 19, s. 624-631. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.001>. [cit. 2025-03-11].
- [65] ZHU, Yibin; YU, Xi a CHENG, Gong. Human skin bacterial microbiota homeostasis: A delicate balance between health and disease. Online. *MLife*. 2023, roč. 2, č. 2, s. 107-120. ISSN 2770-100X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mlf2.12064>. [cit. 2025-03-11].
- [66] CALLEWAERT, Chris; LAMBERT, Jo a VAN DE WIELE, Tom. Towards a bacterial treatment for armpit malodour. Online. *Experimental Dermatology*. 2017, roč. 26, č. 5, s. 388-391. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/exd.13259>. [cit. 2025-03-11].
- [67] CHEN, Yi-Hsing; WU, Chieh-Shan; CHAO, Ya-Husan; LIN, Chi-Chen; TSAI, Hui-Yun et al. Lactobacillus pentosus GMNL-77 inhibits skin lesions in imiquimod-induced psoriasis-like mice. Online. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017, roč. 25, č. 3, s. 559-566. ISSN 10219498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.003>. [cit. 2025-03-13].
- [68] MAZUR, Małgorzata; TOMCZAK, Hanna; ŁODYGA, Martha; PLAGENS-ROTMAN, Katarzyna; MERKS, Piotr et al. The Intestinal and Skin Microbiome in Patients with Atopic Dermatitis and Their Influence on the Course of the Disease: A Literature Review. Online. *Healthcare*. 2023, roč. 11, č. 5. ISSN 2227-9032. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/healthcare11050766>. [cit. 2025-03-13].
- [69] NAKATSUJI, Teruaki; HATA, Tissa R.; TONG, Yun; CHENG, Joyce Y.; SHAFIQ, Faiza et al. Development of a human skin commensal microbe for bacteriotherapy of atopic dermatitis and use in a phase 1 randomized clinical trial. Online. *Nature Medicine*. 2021, roč. 27, č. 4, s. 700-709. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01256-2>. [cit. 2025-03-17].
- [70] MYLES, Ian A.; CASTILLO, Carlo R.; BARBIAN, Kent D.; KANAKABANDI, Kishore; VIRTANEVA, Kimmo et al. Therapeutic responses to *Roseomonas mucosa* in atopic dermatitis may involve lipid-mediated TNF-related epithelial repair.

- Online. *Science Translational Medicine*. 2020, roč. 12, č. 560. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz8631>. [cit. 2025-03-17].
- [71]LEBEER, Sarah; OERLEMANS, Eline F.M.; CLAES, Ingmar; HENKENS, Tim; DELANGHE, Lize et al. Selective targeting of skin pathobionts and inflammation with topically applied lactobacilli. Online. *Cell Reports Medicine*. 2022, roč. 3, č. 2. ISSN 26663791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100521>. [cit. 2025-03-19].
- [72]NOTAY, Manisha; SARIC-BOSANAC, Suzana; VAUGHN, Alexandra R.; DHALIWAL, Simran; TRIVEDI, Megha et al. The use of topical *Nitrosomonas eutropha* for cosmetic improvement of facial wrinkles. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2020, roč. 19, č. 3, s. 689-693. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.13060>. [cit. 2025-03-20].
- [73]HENIEDY, Amira M.; MAHDY, Dina M.; ABO ELENIN, Wesam.I.; MOURAD, Sohaila a EL-KADI, Rana A. Postbiotics as a health-promoting technique: A review article on scientific and commercial interest. Online. *Process Biochemistry*. 2024, roč. 144, s. 6-19. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.05.010>. [cit. 2025-03-25].
- [74]GUENICHE, A.; VALOIS, A.; KEROB, D.; RASMONT, V. a NIELSEN, M. A combination of *Vitreoscilla filiformis* extract and Vichy volcanic mineralizing water strengthens the skin defenses and skin barrier. Online. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2022, roč. 36, č. S2, s. 16-25. ISSN 0926-9959. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jdv.17786>. [cit. 2025-03-26].
- [75]GUZMÁN, Eduardo; ORTEGA, Francisco a RUBIO, Ramón G. Pickering Emulsions: A Novel Tool for Cosmetic Formulators. Online. *Cosmetics*. 2022, roč. 9, č. 4. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics9040068>. [cit. 2025-03-27].
- [76]LOW, Liang Ee; SIVA, Sangeetapriya P.; HO, Yong Kuen; CHAN, Eng Seng a TEY, Beng Ti. Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020, roč. 277. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102117>. [cit. 2025-03-28].
- [77]CHEN, Lijuan; AO, Fen; GE, Xuemei a SHEN, Wen. Food-Grade Pickering Emulsions: Preparation, Stabilization and Applications. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 14.

ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25143202>. [cit. 2025-04-15].

- [78]ZHANG, Ming; WANG, Ai-juan; LI, Jun-ming; SONG, Na; SONG, Yang et al. Factors influencing the stability and type of hydroxyapatite stabilized Pickering emulsion. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, roč. 70, s. 396-404. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.007>. [cit. 2025-04-21].
- [79]BARILYUK, Danil V.; KOROL, Artem A.; CHIKANOVA, Ekaterina S.; LOMAKINA, Maria A.; SHTANSKY, Dmitry V. Highly hydrophilic TiO₂ nanoparticles as Pickering emulsion stabilizers: synthesis and application. Online. SSRN. 2024. Dostupné z: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4811172 . [cit. 2025-04-21].
- [80]FIROOZMAND, Hassan a ROUSSEAU, Dérick. Microbial cells as colloidal particles: Pickering oil-in-water emulsions stabilized by bacteria and yeast. Online. *Food Research International*. 2016, roč. 81, s. 66-73. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.018>. [cit. 2025-03-30].
- [81]RATTANABURI, Pitchapa; CHAROENRAT, Nattapat; PONGTHARANGKUL, Thunyarat; SUPHANTHARIKA, Manop a WONGKONGKATEP, Jirarut. Hydroxypropyl methylcellulose enhances the stability of o/w Pickering emulsions stabilized with chitosan and the whole cells of *Lactococcus lactis* IO-1. Online. *Food Research International*. 2019, roč. 116, s. 559-565. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.074>. [cit. 2025-04-21].
- [82]WANG, Ling; SONG, Mingyue; ZHAO, Zijun; CHEN, Xia; CAI, Jiyang et al. *Lactobacillus acidophilus* loaded pickering double emulsion with enhanced viability and colon-adhesion efficiency. Online. *LWT*. 2020, roč. 121. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108928>. [cit. 2025-04-21].
- [83]ALBERT, Claire; BELADJINE, Mohamed; TSAPIS, Nicolas; FATTAL, Elias; AGNELY, Florence et al. Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. Online. *Journal of Controlled Release*. 2019, roč. 309, s. 302-332. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.003>. [cit. 2025-03-28].
- [84]NEJADMANSOURI, Maryam; ESKANDARI, Mohammad Hadi; YOUSEFI, Gholam Hossein; RIAZI, Masoud a HOSSEINI, Seyed Mohammad Hashem. Promising

- application of probiotic microorganisms as Pickering emulsions stabilizers. Online. *Scientific Reports*. 2023, roč. 13, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43087-w>. [cit. 2025-03-30].
- [85] JIANG, Xiaoyi; YUCEL FALCO, Cigdem; DALBY, Kim Nicole; SIEGUMFELDT, Henrik; ARNEBORG, Nils et al. Surface engineered bacteria as Pickering stabilizers for foams and emulsions. Online. *Food Hydrocolloids*. 2019, roč. 89, s. 224-233. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.044>. [cit. 2025-03-31].
- [86] MUHAMMED, Musemma Kedir; JIANG, Xiaoyi; SHEKARFOROUSH, Elhamalsadat; WHITEHEAD, Kathryn; VOGENSEN, Finn K. a RISBO, Jens. Ex-Lactobacillus Strains with Intrinsic Propensity to Stabilize Pickering Oil-in-Water Emulsions. Online. bioRxiv, 2023. Dostupné z: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.05.13.540633v1>. [cit. 2025-04-21].
- [87] NARSIPUR, Sowmya; KEW, Ben; FERREIRA, Céla; EL-GENDY, Reem a SARKAR, Anwasha. Emulsion stabilised by yeast proteins and biomass: a mini review. Online. *Current Opinion in Food Science*. 2024, roč. 57. ISSN 22147993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101167>. [cit. 2025-04-21].
- [88] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series – User Manual*. MANO485, verze 1.1. Malvern: Malvern Instruments, 2013. Dostupné z: [Zetasizer nano series user manual](#). [cit. 2025-04-23].
- [89] BIOLIN SCIENTIFIC. *Attension Sigma – Complete Range of Force Tensiometers* [online]. Västra Frölunda (Švédsko): Biolin Scientific, 2018. Dostupné z: [Tensiometers](#). [cit. 2025-04-25].
- [90] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana, Chemie a technologie tenzidů II. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, [2012].
- [91] GRZNÁROVÁ, Petra; LIPOV, Jan; JINDŘÍŠKA, Angelini. *Optická mikroskopie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2017. Dostupné z: [Optická mikroskopie](#). [cit. 2025-04-23].
- [92] MALVERN PANALYTICAL. *Mastersizer 3000 – Smarter particle sizing* [online]. Malvern: Malvern Panalytical, 2021. Dostupné z: [Mastersizer 3000](#). [cit. 2025-04-23].

- [93] BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠIŠKOVÁ, Marie. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydatelství VŠCHT, 2010. ISBN 9788070807453. Dostupné z: [Fyzikální chemie](#). [cit. 2025-04-23].
- [94] VILLATA, Simona; BARUFFALDI, Désirée; CUE LOPEZ, Raquel; PAOLETTI, Camilla; BOSCH, Paula et al. Broadly Accessible 3D In Vitro Skin Model as a Comprehensive Platform for Antibacterial Therapy Screening. Online. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2024, roč. 16, č. 51, s. 70284-70296. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.4c16397>. [cit. 2025-05-05].
- [95] OECD (2021), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>.
- [96] KOHDA, Katsunori; LI, Xuan; SOGA, Naoki; NAGURA, Risa; DUERNA, Tie et al. An In Vitro Mixed Infection Model With Commensal and Pathogenic Staphylococci for the Exploration of Interspecific Interactions and Their Impacts on Skin Physiology. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, roč. 11. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.712360>. [cit. 2025-05-05].
- [97] Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) [online]. Dostupné z: [Cytotoxicity Detection Kit](#) [cit. 2025-05-05].
- [98] MINERVINI, Fabio a CALASSO, Maria. Lactobacillus casei Group. Online. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2022, s. 275-286. ISBN 9780128187678. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00853-2>. [cit. 2025-04-27].
- [99] MAYO, Baltasar a FLÓREZ, Ana Belén. Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus plantarum. Online. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2022, s. 206-217. ISBN 9780128187678. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00856-8>. [cit. 2025-04-27].
- [100] CHAVEZ, Christina M; GROENEWALD, Marizeth; HULFACHOR, Amanda B; KPURUBU, Gideon; HUERTA, Rene et al. The cell morphological diversity of Saccharomycotina yeasts. Online. *FEMS Yeast Research*. 2024, roč. 24. ISSN 1567-1364. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad055>. [cit. 2025-04-27].
- [101] PAU, Simone; TAN, Lea Chua; ARRIAGA, Sonia a LENS, Piet N. L. Lactic acid fermentation of food waste at acidic conditions in a semicontinuous system: effect of

- HRT and OLR changes. Online. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024, roč. 14, č. 10, s. 10979-10994. ISSN 2190-6815. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03201-w>. [cit. 2025-04-26].
- [102] IBRAHIM, Salam A. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. Online. In: *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2016. ISBN 9780081005965. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00857-X>. [cit. 2025-04-27].
- [103] GOW, Neil A. R.; LATGE, Jean-Paul; MUNRO, Carol A. a HEITMAN, Joseph. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. Online. *Microbiology Spectrum*. 2017, roč. 5, č. 3. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>. [cit. 2025-04-27].
- [104] LIANG, Xiaoping; WU, Jianqing; YANG, Xiangguan; TU, Zhongbing a WANG, Yu. Investigation of oil-in-water emulsion stability with relevant interfacial characteristics simulated by dissipative particle dynamics. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2018, roč. 546, s. 107-114. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.02.063>. [cit. 2025-05-02].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Základní vrstvy kůže [4].....	13
Obrázek 2: Struktura <i>epidermis</i> [2].....	15
Obrázek 3: Druhové složení bakterií na různých místech těla [12].....	19
Obrázek 4: Probiotické kmeny napomáhající léčbě různých kožních dysbióz [53]	36
Obrázek 5: Uspořádání kapalin a pevných částic v Pickeringových emulzích [75]	40
Obrázek 6: Průměrná velikost vybraných stabilizačních částic.....	58
Obrázek 7: Graf distribuce částic bakterie <i>Lactobacillus fermentum</i> 154	59
Obrázek 8: Graf distribuce částic bakterií <i>L. casei</i> 422 a <i>L. rhamnosus</i> 963A.....	59
Obrázek 9: Zeta-potenciál jednotlivých stabilizujících částic	61
Obrázek 10: Závislost povrchového napětí na koncentraci disperzí <i>S. cerevisiae</i>	62
Obrázek 11: Závislost povrchového napětí na koncentraci disperzí bakterií a kvasinek	63
Obrázek 12: Povrchové napětí u 1% disperzí bakterií a kvasinek	64
Obrázek 13: Mikroskopický snímek disperze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované).....	65
Obrázek 14: Mikroskopický snímek disperze <i>Lactobacillus casei</i> 422 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované).....	65
Obrázek 15: Mikroskopický snímek disperze <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 963A při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované).....	66
Obrázek 16: Mikroskopický snímek disperze <i>Lactobacillus plantarum</i> 181 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované).....	66
Obrázek 17: Mikroskopický snímek disperze <i>Lactobacillus casei casei</i> 198 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované).....	66
Obrázek 18: Mikroskopický snímek disperze <i>Lactobacillus fermentum</i> 154 při celkovém zvětšení 1000x (zleva: aktivní, zprava: inaktivované).....	67
Obrázek 19: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 963A.....	68
Obrázek 20: Indexy krémování připravených emulzí.....	68
Obrázek 21: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
Obrázek 22: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk bakterií <i>Lactobacillus casei</i> 422.....	70
Obrázek 23: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk <i>Lactobacillus plantarum</i> 181.....	70
Obrázek 24: Emulze v poměru 20/80 a 50/50 stabilizované disperzí aktivních a inaktivovaných buněk bakterií <i>L. fermentum</i> 154 a <i>L. casei casei</i> 198	71
Obrázek 25: Emulze stabilizované <i>L. fermentum</i> 154 a <i>L. casei casei</i> 198 na 2. den po přípravě	71

Obrázek 26: Velikost kapek emulzí stabilizovaných aktivní formou buněk v poměru 20/80	72
Obrázek 27: Distribuce velikosti kapek emulze (20/80, aktivní 963A) podle intenzity	73
Obrázek 28: Struktura krémové části emulze v poměru 20/80 s aktivními buňkami <i>L. rhamnosus</i> 963A při zvětšení 400x (zleva) a 1000x (zprava)	73
Obrázek 29: Distribuce velikosti kapek emulze (20/80, akt. <i>S. cerevisiae</i>) podle intenzity	74
Obrázek 30: Struktura krémové části emulze v poměru 20/80 s aktivními buňkami <i>S. cerevisiae</i> při zvětšení 400x (zleva) a 1000x (zprava)	74
Obrázek 31: Struktura krémové části emulze (400x): a) 422, b) 181, c) 154, d) 198	75
Obrázek 32: Porovnání vitality buněk a poměru olejové a vodné fáze	76
Obrázek 33: Struktura krémové části emulze <i>S. cerevisiae</i> 50/50 (400x): a, b) Aktivní; c, d) Inaktivované	76
Obrázek 34: Porovnání distribučních křivek inaktivovaných buněk <i>S. cerevisiae</i>	77
Obrázek 35: Naměřené hodnoty zeta-potenciálů	78
Obrázek 36: Kožní model po 7 dnech kultivace	79
Obrázek 37: Kolonizace <i>S. epidermidis</i> na 3D modelu kůže	80
Obrázek 38: Cytotoxicita a životaschopnost vzorků v 3D modelu kožního mikrobiomu stanovená pomocí LDH assay kitu	82

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

O/V olej ve vodě

UV ultrafialové (záření)

AMP antimikrobiální peptidy

MRSA met icilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

FFA volné mastné kyseliny

AHR aryl-hydrokarbonový receptor

PRR receptory pro rozpoznávání patogenů

TLR toll-like receptor

IFN-I interferon typu I

HSV virus herpes simplex

MIC minimální inhibiční koncentrace

MTI methylisothiazolinon

IPBC jodopropynylbutylkarbamát

AD atopická dermatitida

TLR-2 toll-like receptor 2

NOD nukleotid-vazebná oligomerizační doména

PEG polyethylenglykol

FMT transplantace fekální mikrobioty

TNF- α tumor nekrotizující faktor alfa

TGF- β transformující růstový faktor beta

IL-10 interleukin 10

UVB ultrafialové záření typu B

MCT triglyceridy se středně dlouhým řetězcem

PBS fosfátový pufovaný roztok soli

MRS kultivační médium De Man, Rogosa a Sharpe

HDF lidské kožní fibroblasty

LDH laktát dehydrogenasy

CFU jednotky tvořící kolonie

NAD⁺ nikotinamidadeninukleotid

NADH redukována forma NAD⁺

PDI index polydisperzity

CI index krémování