



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VLIV RŮZNÝCH KOSMETICKÝCH POLYSACHARIDŮ
JAKO PREBIOTIK NA MIKROBIOM KŮŽE**

INFLUENCE OF VARIOUS COSMETIC POLYSACCHARIDES AS PREBIOTICS ON SKIN MICROBIOME

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Pelánová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1564/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lenka Pelánová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv různých kosmetických polysacharidů jako prebiotik na mikrobiom kůže

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Sledování vlivu vybraných kosmetických polysacharidů na vybrané druhy mikrobiomu kůže
- 3) Určení vlivu kosmetických polysacharidů jako prebiotik na vybrané druhy mikrobiomu kůže
- 4) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Lenka Pelánová
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Předložená diplomová práce se zabývá sledováním vlivu polysacharidů, které se používají jako přísada do kosmetických výrobků, na sledované druhy bakterií, které jsou součástí mikrobiomu kůže. A také zkoumáním vlivu polysacharidů jako prebiotik na vybrané sledované druhy bakterií, které jsou součástí mikrobiomu kůže. V rámci stanovení účinků na mikrobiom kůže byly vybrány dva polysacharidy: Nano moist a PoLevan S. První část práce se zaměřuje na literární rešerši, která se zabývá anatomí kůže, kožními onemocněními a kožním mikrobiomem a jeho funkcí. Experimentální část je zaměřena na sledování změn v množstevním zastoupení vybraných mikroorganismů mikrobiomu kůže, před a po aplikaci polysacharidů na kůži, pomocí qPCR. Sledovány byly bakterie *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus*. PCR produkty byly detekovány pomocí agaróзовé gelové elektroforézy.

Bakterie *Staphylococcus epidermidis* byla na kůži detekována v největší míře a to zejména po aplikaci polysacharidů Nano moist a PoLevan S. Byl tedy zjištěn pozitivní vliv obou polysacharidů na růst této bakterie.

Klíčová slova:

mikrobiom kůže, polysacharidy používané v kosmetice, qPCR, *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

The presented master thesis deals with the monitoring of the influence of polysaccharides which are used as an additive in the cosmetic products, on the monitored types of bacteria which are part of the skin microbiome. And it also deals with the study the effect of polysaccharides as prebiotics on selected species of bacteria that are part of the skin microbiome. Two polysaccharides were selected to determine the effects on the skin microbiome: Nano moist and PoLevan S. The first part of the thesis focuses on the literature search which deals with skin anatomy, skin diseases and skin microbiome and its function. The experimental part is focused on monitoring changes in the quantity of selected microorganisms of the skin microbiome, before and after application of polysaccharides to the skin using qPCR. *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* were monitored. The PCR products were detected by agarose gel electrophoresis.

The bacterium *Staphylococcus epidermidis* was detected on the skin to the greatest extent, especially after the application of the polysaccharides Nano moist and PoLevan S. Thus, a positive effect of both polysaccharides on the growth of this bacterium was found.

Keywords:

skin microbiome, polysaccharides used in cosmetics, qPCR, *Staphylococcus epidermidis*

PELÁNOVÁ, Lenka. *Vliv různých kosmetických polysacharidů jako prebiotik na mikrobiom kůže*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131502>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Andree Němcové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Denise Langové a Bc. Adéle Alexové za pomoc nejen při řešení experimentální části. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině za finanční zázemí, projevenou podporu a trpělivost a mému příteli za veškerou podporu během celého studia.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 KŮŽE	8
2.1.1 Pokožka (<i>epidermis</i>)	8
2.1.2 Škára (<i>dermis</i>)	10
2.1.3 Podkožní vazivo (<i>subcutis</i>).....	10
2.2 MIKROBIOM KŮŽE	10
2.2.1 Funkce mikrobiomu kůže	11
2.2.2 Bakterie.....	11
2.2.3 Houby	12
2.2.4 Roztoči.....	13
2.2.5 Viry.....	13
2.2.6 Faktory ovlivňující kožní mikrobiom.....	13
2.3 KOŽNÍ DYSBIOZA	16
2.3.1 Atopická dermatitida	16
2.3.2 Psoriáza.....	16
2.3.3 Růžovka	17
2.3.4 <i>Acne vulgaris</i>	17
2.4 POLYSACHARIDY POUŽÍVANÉ V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH	17
2.4.1 Fruktan.....	17
2.4.2 Levan	18
2.4.3 Xanthanová guma	18
2.4.4 Guaranová guma.....	18
2.5 POUŽITÉ METODY	19
2.5.1 PCR.....	19
2.5.2 Difuzní agarový test.....	21
2.5.3 Diluční jamkový test.....	21
3 CÍL PRÁCE	22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	23
4.1.1 Chemikálie.....	23
4.1.2 Přístroje a pomůcky	23
4.2 POUŽITÉ MIKROORGANISMY	24
4.3 POUŽITÉ KOSMETICKÉ POLYSACHARIDY	25
4.3.1 Příprava vzorků pro antimikrobiální testy	25
4.3.2 Příprava vzorků pro aplikaci na kůži	25
4.4 STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY	26
4.4.1 Difuzní agarový test.....	26
4.4.2 Diluční jamkový test.....	26
4.5 IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA SBÍRKOVÝCH KMENŮ MIKROORGANISMŮ.....	26
4.5.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	27

4.6	IZOLACE DNA ZE STĚRŮ Z KŮŽE ČELA RESPONDENTEK.....	27
4.7	PŘÍPRAVA REAKČNÍ SMĚSI PRO PCR A PRŮBĚH REAKCE	28
4.8	PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU	29
4.9	ELEKTROFORÉZA PCR PRODUKTŮ.....	29
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
5.1	ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA	30
5.1.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
5.1.2	<i>Cutibacterium acnes</i>	32
5.1.3	<i>Micrococcus luteus</i>	34
5.1.4	<i>Escherichia coli</i>	37
5.2	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA ZE SBÍRKOVÝCH KMENŮ MIKROORGANISMŮ..	40
5.3	VÝSLEDKY QPCR PRO DNA IZOLOVANÝCH ZE SBÍRKOVÝCH KMENŮ MIKROORGANISMŮ	40
5.3.1	Ověření specifity primerů.....	42
5.4	IZOLACE DNA ZE STĚRŮ Z KŮŽE ČELA RESPONDENTEK.....	43
5.5	VÝSLEDKY QPCR PŘED POUŽÍVÁNÍM KOSMETICKÝCH POLYSACHARIDŮ.....	45
5.5.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
5.5.2	<i>Escherichia coli</i>	49
5.5.3	<i>Cutibacterium acnes</i>	50
5.5.4	Doména Bakterie	51
5.6	VÝSLEDKY QPCR PO TÝDENNÍM POUŽÍVÁNÍ POLYSACHARIDU NANOMOIST	54
5.6.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	54
5.6.2	<i>Escherichia coli</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> , doména <i>Bacteria</i>	58
5.7	VÝSLEDKY QPCR PO TÝDENNÍM POUŽÍVÁNÍ POLYSACHARIDU POLEVAN S	61
5.7.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	61
5.8	SHRnutí VÝSLEDKŮ PCR.....	65
6	ZÁVĚR.....	66
7	LITERATURA	68
8	SEZNAM ZKRATEK.....	73
9	PŘÍLOHY	74

1 ÚVOD

Každý organismus má svůj vlastní přirozený kožní mikrobiom. Tvoří ho různé mikroorganismy, zejména bakterie, ale i kvasinky, roztoči nebo viry.

Mikrobiom kůže je s naším organismem v symbióze a je pro nás prospěšný. Díky němu a bariérové funkci kůže nás chrání před nepříznivými vlivy okolí. Kůže, jakožto náš největší orgán, tvoří jakési rozhraní našeho vnitřního prostředí a okolí, vytváří naši primární bariéru organismu. Aby toto jako celek správně fungovalo, musí být zachována rovnováha v zastoupení různých mikroorganismů. Právě různorodost druhů mikrobů udržuje tuto rovnováhu.

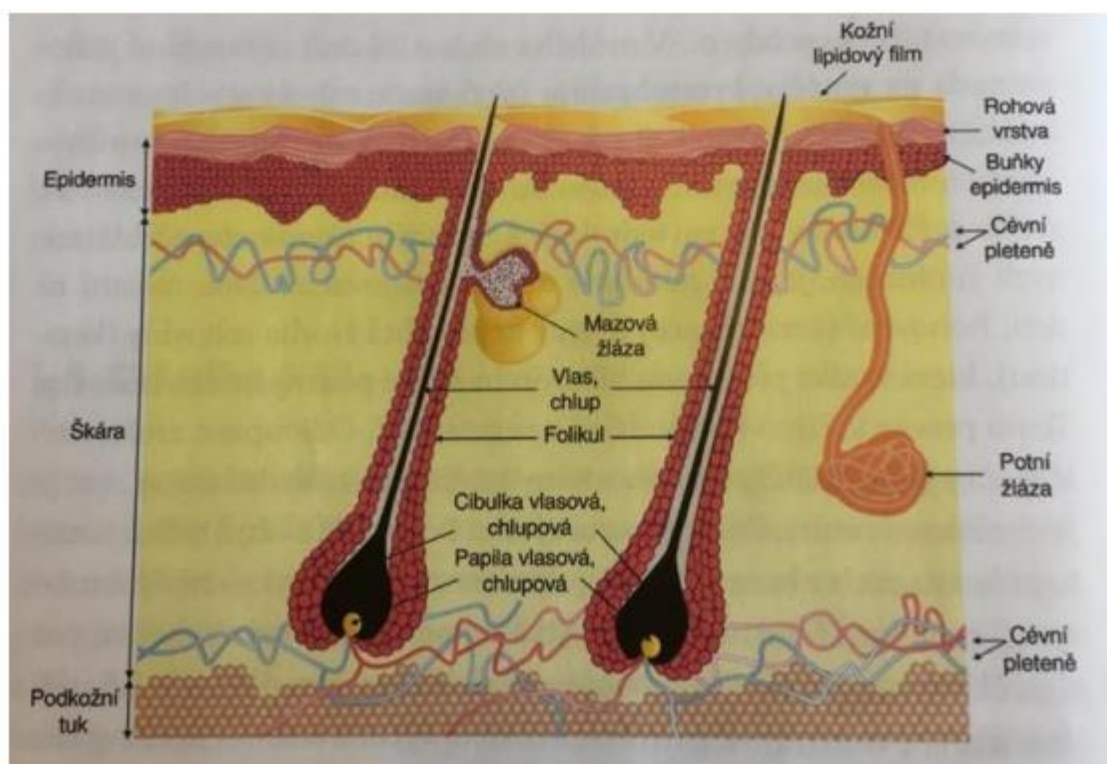
Kůže má výbornou schopnost regenerace, ale je neustále vystavována vlivům vnějšího a vnitřního prostředí. Mezi faktory způsobující narušení rovnováhy patří také přílišná či nevhodná hygiena a nevhodné kosmetické přípravky. Každé vybočení přirozeného mikrobiomu z rovnováhy může způsobit nějaké onemocnění. Proto je výrazným moderním trendem kosmetiky také péče o mikrobiom kůže, konkrétně látky, které se mohou chovat jako prebiotika a podporovat růst nutných mikroorganismů - polysacharidy.

Cílem experimentální části je sledování vlivu vybraných polysacharidů používaných v kosmetických přípravcích na sledované druhy bakterií, které jsou součástí mikrobiomu kůže.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Lidská kůže tvoří asi 15 % celkové tělesné hmotnosti dospělého člověka a její povrch zaujímá 1,5 až 2 m², což z něj činí největší orgán v lidském těle. Tloušťka kůže závisí na umístění na těle a pohybuje se od 0,4 mm na očních víčkách do 4 mm na zádech. Nejdůležitější funkcí kůže je vytvoření bariéry mezi vnitřním a vnějším prostředím, která chrání před napadením škodlivými patogeny a před ztrátou vody a rozpuštěných látek. Plní i další funkce jako je smyslová, termoregulační nebo vylučovací. Přes kůži dochází k vstřebávání látek a stejně tak k vylučování mazu, vody a solí. Kůže je důležitá pro syntézu vitamínu D, čímž ovlivňuje tvorbu kostí, metabolismus vápníku a imunitní systém. Anatomicky je možné rozlišit dvě vrstvy: *epidermis* a *dermis* (viz Obrázek 1). Pod *dermis* leží ještě *subcutis* [1],[2],[3].



Obrázek 1: Stavba kůže [3] - upraveno

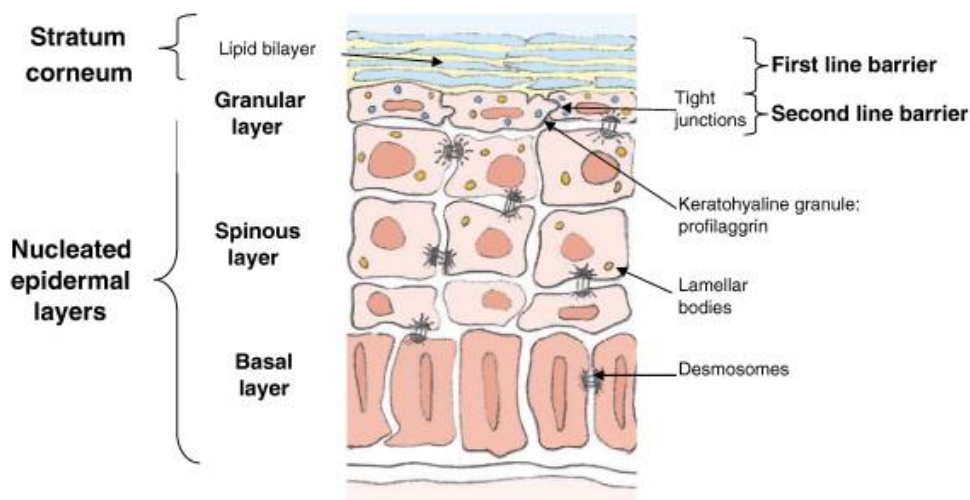
2.1.1 Pokožka (*epidermis*)

Pokožka neboli *epidermis* je nejsvrchnější část kůže, její tloušťka se pohybuje od 0,03 mm do 0,1 mm. *Epidermis* je neustále se obnovující epitel, který je rozdělený do několika vrstev, počínaje bazální vrstvou (*stratum basale*) těsně nad *dermis* a postupující nahoru přes vrstvy ostnité (*stratum spinosum*) a zrnité (*stratum granulosum*) k horní vrstvě, *stratum corneum*. Fyzickou bariéru tvoří hlavně *stratum corneum*. Chemickou a biochemickou bariéru tvoří lipidy, kyseliny, hydrolytické enzymy, antimikrobiální peptidy a makrofágy. Imunologická bariéra se skládá z humorálních a buněčných složek imunitního systému [4],[5].

Převládajícím typem buněk (až 95 %) jsou keratinocyty. Zbývajících 5 % tvoří melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. *Epidermis* je rozdělena do čtyř vrstev (viz Obrázek 2) právě v závislosti na stavu diferenciaci keratinocytů. Proces zrání buněk od *stratum basale* až po *stratum corneum* trvá přibližně 28 dní. Během této doby se buněčné jádro rozpadá, buňky se oplošťují a vznikají tak ploché, bezjaderné buňky zrohovatělé, které tvoří rohovou vrstvu. Nakonec se mrtvé buňky, korneocyty, odlupují ve formě drobných šupinek. Tyto buňky jsou neustále nahrazovány novými, čímž je zajištěn proces regenerace kůže. Povrch *stratum corneum* je pokryt ještě souvislým lipoidním filmem, který je tvořen produkty mazových a potních žláz. Společně s rohovou vrstvou tak zajišťuje nejen mechanickou odolnost kůže [2],[4].

Melanocyty jsou pigmentové buňky kůže a vlasů u všech savců. Nachází se v bazální vrstvě *epidermis*. Zde vytvářejí pigmentové granule - melanosomy - obsahující melanin. Melanosomy se přenášejí z melanocytů do epidermálních keratinocytů. Každý melanocyt dodává melanin přibližně 30 až 40 okolním keratinocytům. Poskytují určitou ochranu jádru buňky před škodlivým UV zářením a dodávají pokožce její barvu. Barva kůže je určena počtem a velikostí melanosomů. Proces syntézy melaninu probíhá nepřetržitě s obnovou pokožky, ale lze jej i urychlit při vystavení pokožky UV záření při opalování. Povrchové pH lidské kůže se pohybuje od 4,3 do 5,3 a je nižší u lidí s tmavší pokožkou, protože vedlejší produkty melaninu jsou kyselé [2],[6].

Langerhansovy buňky jsou dendritické imunitní buňky, které jsou důležité pro imunitní bariéru pokožky. Merkelovy buňky jsou hmatové buňky [2],[6].



Obrázek 2: Vrstvy epidermis [4]

Obrázek 2: Vrstvy epidermis [4]

2.1.1.1 Bazální membrána kůže

Bazální membrána fyzicky odděluje *epidermis* od *dermis*. Přestože jde o velmi tenkou vrstvu, je složena ze složité sítě makromolekul, které spojují keratinová vlákna keratinocytů s kolagenovými vlákny v *dermis*. Hlavní funkcí proteinů a glykoproteinů v bazální membráně je zajistit adhezi mezi *epidermis* a *dermis*. Vady těchto molekul vedou např. k tvorbě puchýřů [2],[4].

2.1.2 Škára (*dermis*)

Tloušťka *dermis* se pohybuje od 0,5 do 5 mm opět v závislosti na umístění. Je rozdělena do dvou hlavních vrstev - papilární a retikulární *dermis*. Papilární *dermis* je v kontaktu s bazální membránou kůže a je bohatě zásobována krevními cévami a nervovými zakončeními. Retikulární *dermis* je hlavní částí *dermis* a je v kontaktu se *subcutis*. *Dermis* je vrstva pojivové tkáně, která zahrnuje kolagen a elastická vlákna. *Dermis* obsahuje řadu buněk, včetně fibroblastů a makrofágů. Fibroblasty jsou zodpovědné za syntézu a obnovu extracelulární matrice, zatímco makrofágy přispívají k eliminaci cizorodého materiálu. Obsahuje také krevní cévy, lymfatické kanály a nervy a nervové receptory. Je hostitelem potních a mazových žláz, vlasových folikulů a poskytuje dobrou mechanickou, kompaktní a pružnou podporu. Přibližně 70 % suché hmotnosti *dermis* je tvořeno kolageny. Elastická vlákna jsou méně houževnatá než kolagenová, ale dodávají pokožce schopnosti rozšířit se [2],[4].

2.1.3 Podkožní vazivo (*subcutis*)

Subcutis je nejvnitřnější vrstva kůže a je tvořena převážně tukovou a vazivovou hmotou. Poskytuje ochranu proti mechanickým nárazům, izoluje tělo před vnějším chladem a teplem a je aktivní v obecném energetickém metabolismu a ukládání [2],[4].

2.2 Mikrobiom kůže

Lidská kůže je osídlena rozmanitou sbírkou mikrobů, která je složitě zapojena do různých molekulárních a buněčných procesů v kůži i mimo ni. Termín „mikrobiom“ představuje souhrn mikroorganismů v konkrétním prostředí. Mezi místa, která jsou obývána mikrobioty, patří ústní dutina, zažívací trakt, dýchací cesty, urogenitální systém a kůže. Na kůži můžeme najít bakterie, houby, viry i roztoče. Většina mikroorganismů kolonizující kůži žije v symbiotickém vztahu s kožními buňkami a je proto neškodná [7],[8].

Povrch kůže bývá z velké části suchý a drsný a neustále se odlupuje. Hydrolipidový film vytváří kyselé prostředí (pH 4 až 6,5) a obsahuje sloučeniny s antibakteriálními účinky. Schopnost produkovat antimikrobiální látky byla prokázána v keratinocytech i buňkách potních a mazových žláz. Na povrchu kůže bylo identifikováno více než 20 antimikrobiálních peptidů. [8].

Vztah mikroorganismů a lidské kůže může být symbiotický, komenzální nebo parazitický. Mikroorganismy zároveň mohou eliminovat potenciálně nebezpečné patogeny [9].

Mikrobiom kůže může být rozdělen do dvou skupin - rezidentní mikroorganismy a přechodné mikroorganismy. Rezidentní mikroorganismy tvoří stabilní populaci, která se na kůži nachází běžně a po narušení se zase obnovuje. Tato skupina je považována za komenzální, což znamená, že tyto mikroorganismy jsou většinou neškodné a s největší pravděpodobností poskytují hostiteli určitou výhodu. Přechodné mikroorganismy na kůži přetrvávají pouze hodiny či dny, než mizí [10].

Mikroby nejsou přítomny pouze na povrchu kůže, ale nacházejí se také v hlubších vrstvách *epidermis*, a dokonce i v *dermis* a dermální tukové tkáni. To umožňuje fyzický kontakt mezi mikroby a různými buňkami pod bazální membránou. V těchto vrstvách se

nachází specifické druhy mikroorganismů a také obsahují mnoho specializovaných typů buněk, jako jsou dendritické buňky, melanocyty a Langerhansovy buňky, které aktivně reagují na části mikroorganismů. Sebaceózní folikuly vytváří anaerobní prostředí bohaté na lipidy, které je ideální pro rod *Propionibacterium* [10],[11],[12].

2.2.1 Funkce mikrobiomu kůže

Lidská kůže je komplexním bariérovým orgánem vytvořeným ze symbiotického vztahu mezi mikrobiálními komunitami s hostitelem. Funkcí kožní bariéry a její mikroflóry je ochrana těla před vnějšími nepříznivými vlivy. Tento vzájemný vztah vede k dobře kontrolovatelné, ale citlivé rovnováze. Kůže je však neustále vystavena různým endogenním a exogenním faktorům, které potenciálně ovlivňují tento vyvážený systém. Dochází ke změně složení komunit kožních mikroorganismů. Změna této rovnováhy se nazývá dysbióza [10].

Symbiotická mikroflóra člověka se účastní metabolických procesů, má vliv na proces zrání tkáně v lidské ontogenezi a představuje základní kámen obranného systému těla před patogenními mikroorganismy. Kolonizací kůže a tím obsazení míst, které by mohly být ideálním prostředím pro růst patogenů, chrání zdravý mikrobiom před cizí mikroflórou. Tento proces se označuje jako kolonizační rezistence. Například *Staphylococcus epidermidis* inhibuje růst patogenů sekrecí antimikrobiálních peptidů a stimulací epidermálních keratinocytů k jejich produkci [8].

Kromě toho bakterie produkují peptidové toxiny a volné mastné kyseliny, které odradí ostatní potenciálně parogenní organismy, jako je např. *Staphylococcus aureus*, od osídlení kůže. *Corynebacterium jeikeium* produkuje bakteriocinové antimikrobiální látky, což brání kolonizaci jinými druhy, produkuje také superoxiddismutázu, která chrání bakterie před superoxidovými radikály a zároveň může zabránit oxidačnímu poškození okolní tkáně. Další bakteriální druhy mohou změnit funkci imunitního systému aktivací signálních drah v buňkách [16].

V poslední době je velmi diskutovaným tématem také význam probiotik a prebiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství přinášejí hostiteli zdravotní přínos, zatímco prebiotika jsou neživotaschopné složky, které přinášejí hostiteli zdravotní přínos spojený s modulací mikrobioty. Ukazuje se, že lokální dodání specifických živých mikroorganismů a / nebo prebiotických substrátů může selektivně podpořit růst požadovaných mikroorganismů. Přestože výzkum podporující takové aplikace zůstává omezený, existují důkazy, že lokální aplikace probiotik může zlepšit bariérovou funkci kůže a imunitní odpověď v místě aplikace. Výzkum in vitro naznačuje, že prebiotika mohou selektivně inhibovat patogenní bakterie [10],[17].

2.2.2 Bakterie

Lidskou kůži obývají především čtyři kmeny bakterií: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* (Obrázek 3). Bakterie patří k symbiotickým druhům a představují nejstabilnější prvek kožního mikrobiomu. Hrají zásadní roli při udržení rovnováhy v kvalitativním i kvantitativním složení mikrobiomu ovlivněním růstu dalších mikroorganismů. *Actinobacteria* jsou nejhojnějšími obyvateli mnoha míst na kůži. Zejména tři rody - *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium* tvoří více než 60 % přítomných druhů bakterií [8],[13],[14].

<i>Actinobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Serratia</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus</i>		<i>Halomonas</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Enterococcus</i>		<i>Delftia</i>

Obrázek 3: Hlavní druhy bakterií [8]-upraveno

Mezi nejčastěji se vyskytujícími zástupci bakterií žijící na povrchu kůže patří *Staphylococcus epidermidis*. U tohoto druhu se odhaduje, že tvoří 50 % všech bakterií rezidentních na kůži a obývá také horní část vlasového folikulu. Mezi další bakteriální druhy patří *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* a *S. capitis*. Převažujícími bakteriálními druhy rodů *Corynebacterium* a *Propionibacterium* jsou *C. jeikeium* a *P. acnes*. Mezi členy rodu *Micrococcus* se řadí *M. luteus*, *M. varians*, *M. lylae*, *M. sedentarius*, *M. roseus*, *M. kristinae* a *M. nishinomiyaensis* [8],[13].

2.2.3 Houby

Nejčastěji identifikovanými organismy z řady hub jsou druhy *Malassezia*, které představují až 80 % přítomných hub. Jedná se o lipofilní houby a z celkového lidského mikrobiomu tvoří 1 až 22 %. Rod *Malassezia* zahrnuje 14 druhů, z nichž 9 je schopno kolonizovat lidskou kůži. Konkrétně to jsou druhy *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. yamatoensis*, *M. obtusa*, *M. dermatis* a *M. japonica* [8],[13].

Dominantními druhy jsou *M. restricta* a *M. globosa*. Ostatní druhy se nacházejí už v menším množství. Za příznivých podmínek mají houby *M. globosa* a *M. sympodialis* sklon vyvolávat kožní onemocnění, při výrazné imunodeficienci mohou (podobně jako bakterie) hrát roli při systémových infekcích. Nejběžnějšími onemocněními způsobenými houbami rodu *Malassezia* patří *pityriasis versicolor* a folikulitida, ovlivňují také průběh dermatitidy seborrhoica, psoriázy a atopické dermatitidy [8].

Bylo prokázáno, že houby rodu *Malassezia* a jejich produkty stimulují produkci cytokinů, adhezních molekul a antimikrobiálních sloučenin v keratinocytech. Kromě ovlivnění kožních buněk, houby *Malassezia* spp. uvolňují řadu metabolitů, které mají vliv nejen na počet a druhy v jeho rodu, ale i na jiné mikroorganismy tvořící kožní mikrobiom. Je známo, že *Malassezia furfur* je nejúčinnějším inhibitorem růstu jiných hub a zároveň je rezistentní vůči látkám vylučovaným jinými druhy *Malassezia* [8].

Lidskou kůži osídlují také houby rodů *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. lanosum*), *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. terreus*, *A. versicolor*) a v menší míře *Alternaria*, *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*), *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* (*C. flavus*, *C. dimmenna*, *C. diffluent*), *Trichophyton* a *Rhodotorula*. Kvasinky *C. albicans* a houby rodu *Cryptococcus* jsou schopny kolonizovat pokožku za příznivých podmínek (poškozený povrch *epidermis*, zvýšená vlhkost a teplota, okluze) a způsobit kandidózu

a kryptokokózu. Patogenní houby, které mohou vyvolat kožní onemocnění, zahrnují dermatofyty (*Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*) [8].

2.2.4 Roztoči

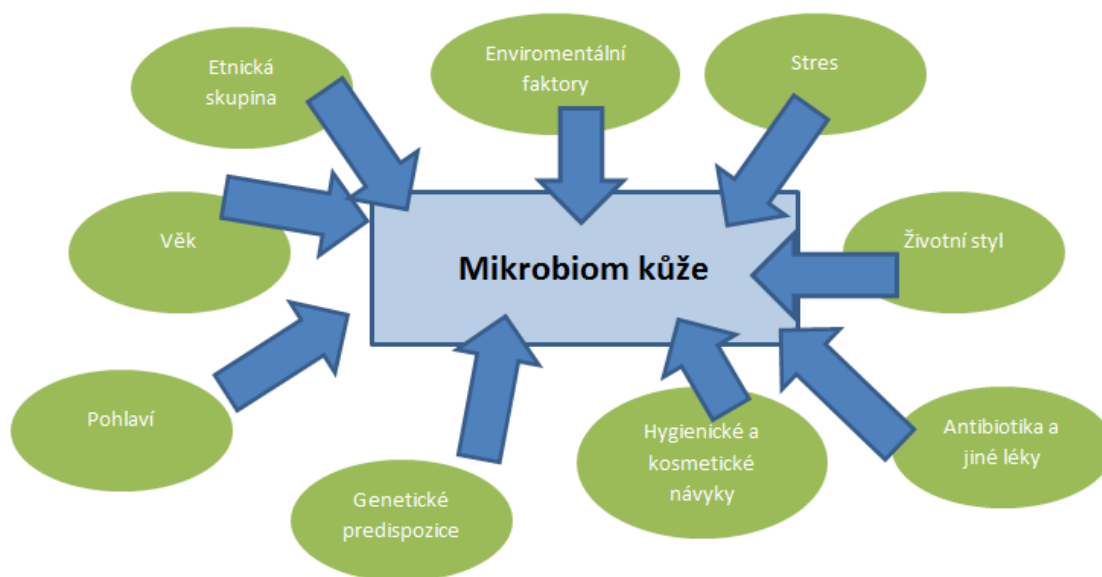
Kromě bakterií a hub obsahuje kožní mikrobiota také roztoče *Demodex*. Dosud je známo, že dva z druhů roztočů o délce 0,2 až 0,4 mm obývají lidskou kůži. Jde o parazitické pavoukovce řádu *Acari*, kteří obývají mazové žlázy a vlasové folikuly. Mezi zástupce fyziologické mikroflóry kůže patří *D. brevis* žijící v mazových a meibomových žlázách a *D. folliculorum* sídlící ve vlasových folikulech ve shlucích s jinými roztoči stejného druhu. Nadměrný růst kolonií *Demodexu* hraje roli v etiologii a průběhu růžovky a je příčinou onemocnění demodikózy [8],[13],[16],[18].

2.2.5 Viry

Viry jsou nejméně prostudovanými členy kožní mikrobioty z důvodu jejich obtížné izolace a identifikace na povrchu kůže. Viry se liší svým genetickým materiálem (DNA a RNA viry) a procházejí rychlou evolucí, což stěžuje vytváření genomových knihoven. Důvodem je také to, že viry nemají konzervované oblasti, které jsou přítomny právě v bakteriálních nebo houbových genomech (16S rRNA a ITS). Viry jsou považovány za patogenní organismy, zároveň však za faktory přispívající k udržení kožní homeostázy. Jsou nestabilní ale zároveň zásadní složkou kožního mikrobiomu, zejména viry obsahující dvouřetězcovou DNA (dsDNA), jako jsou *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae* [8],[13].

2.2.6 Faktory ovlivňující kožní mikrobiom

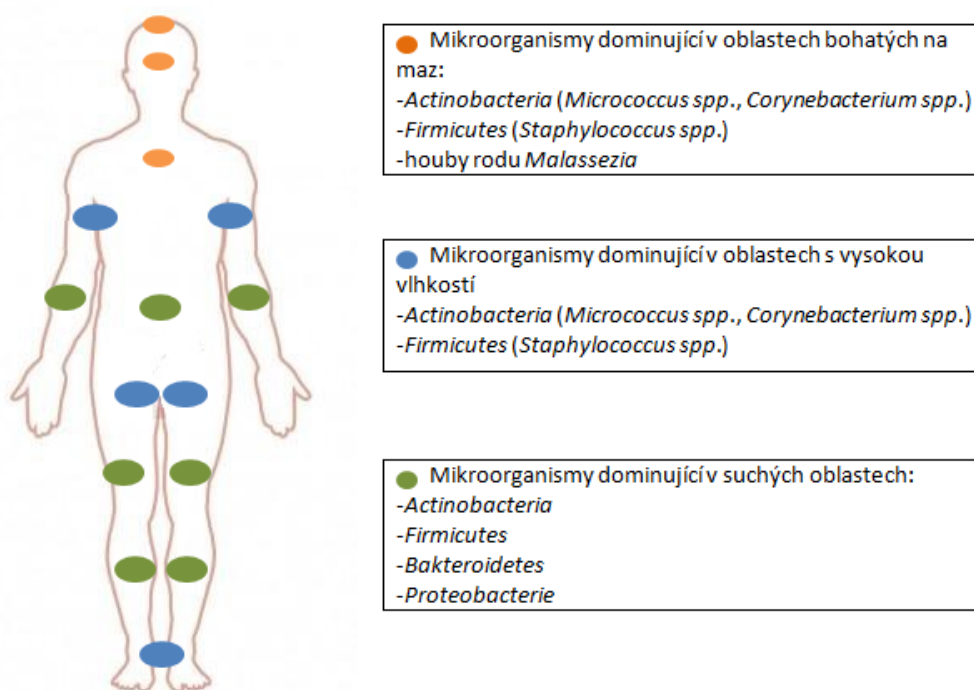
Naše kožní mikrobiota je získána při narození a její složení je velmi dynamické v raném věku. Jak se blíží dospělost, tyto komunity se stabilizují, ale stále se vyvíjejí v reakci na různé faktory hostitele a prostředí. Rozmanitost našeho kožního mikrobiomu lze rozdělit na topografickou, interpersonální a časovou. Ve srovnání s jinými místy na těle má kožní mikrobiom větší složitost na základě variací v různých topografických kožních výklencích. O mikrobiomu je v současnosti známo, že se vyvíjí a mění v reakci na věk, pohlaví, etnickou skupinu, klima, expozici UV záření, pracovní a životní prostředí, životní styl (strava, hygienické a kosmetické návyky), druh oblečení, sportovní aktivity, konzumace alkoholu a jiných stimulantů (Obrázek 4) [8],[14].



Obrázek 4: Faktory ovlivňující kožní mikrobiom [8] - upraveno

2.2.6.1 Topografická rozmanitost

Kůže má nejrozmanitější společenství kteréhokoli z dosud hlavních studovaných povrchů epitelu. Oblasti lze rozdělit do tří kategorií: vlhké, mazové a suché (viz Obrázek 5). Vlhká místa zahrnují oblasti jako pupek, podpaží, třísla, chodidla, vnitřní loket a zadní část kolena. Nejhojnějšími mikroby kolonizujícími tyto vlhké oblasti jsou druhy *Staphylococcus* a *Corynebacterium*. Mazová místa, jako je čelo a záda, ukrývají nejméně různorodou populaci mikrobů. Druhy *Propionibacterium* z kmene *Actinobacteria* jsou nejčastějšími izoláty z mazových oblastí kvůli jejich schopnosti přežít v těchto anaerobních podmínkách bohatých na lipidy. Suché oblasti kůže, včetně předloktí a hýždí, mají největší rozmanitost mikrobiálních obyvatel. Další mikroprostředí zahrnují potní žlázy, vlasové folikuly a mazové žlázy. Tato prostředí jsou spojena s vlastní jedinečnou mikrobiotou. Byly také identifikovány časové změny v mikrobiomu, i když si zachovávají menší důležitost v rozmanitosti než umístění oblasti. Bylo zjištěno, že suché prostředí má největší změnu ve složení mikrobiomu, zatímco vlhké prostředí bylo mikrobiologicky obvykle stabilní. Dalšími faktory ovlivňující mikrobiální komunitu jsou teplota a pH. Teplota člověka se pohybuje od 29,5 do 36,6°C a pH od 4,2 do 7,9 [10],[13],[16].



Obrázek 5: Topografická rozmanitost mikrobiálních druhů [10]- upraveno

2.2.6.2 Věk

Kůže je kolonizována bakteriemi počínaje narozením. Tento počáteční mikrobiom kůže má velmi nízkou diverzitu napříč tělem a je do značné míry formován způsobem porodu dětí. Děti, které se narodí vaginálním kanálem, budou kolonizovány mikroby přítomnými v pochvě matky, zatímco děti narozené císařským řezem získají kožní mikroflóru podobnější pokožce matky. Tento proces kolonizace kůže během raného novorozeneckého života je nutný k vytvoření imunitní tolerance vůči komensálním mikroorganismům. V prvních letech života člověka se mikrobiota na různých místech těla rozvíjí rozmanitěji, když děti zkoumají prostředí, mění stravu a jsou vystaveny více lidem a zvířatům. Kůže malých dětí je kolonizována primárně bakteriemi rodu *Streptococcus* a kmene *Proteobacteria* [8],[10],[13].

Houby rodu *Malassezia* jsou detekovatelné na povrchu kůže již v první den života u 89 až 100 % novorozenců. *Demodex* se také dostává na kůži novorozenců fyzickým kontaktem, avšak nedochází k žádné kolonizaci, pravděpodobně kvůli nízké hladině kožního mazu na povrchu kůže [8].

U dospělých jedinců je základní složení kožního mikrobiomu určeno většinou anatomickými a fyziologickými faktory, a proto existují rozdíly v kožním mikrobiomu mezi ženami a muži. Účinek hormonálního systému na mikrobiotu kůže je nejvýraznější během puberty, kdy dochází k nadprodukcii kožního mazu, což zesiluje nadměrnou kolonizaci *P. acnes* potenciálně vedoucí k akné. To pak vede k nevyvážené mikrobiotě kůže. Dále u žen během těhotenství a menopauzy [8],[10].

U starší populace prochází kožní mikrobiota změnami, které ovlivňují jak počet mikroorganismů na povrchu kůže, tak jejich rozmanitost. Jedním z faktorů přispívajících ke změnám v mikrobiologickém profilu u starších osob je snížená aktivita

potních žláz, která způsobuje suchou pokožku. Z důvodu snížené doby průchodu keratinocytů *epidermis*, a tedy delší perzistence keratinizované epidermální vrstvy na povrchu kůže, spolu se snížením aktivity imunitního systému kůže, je pokožka starších lidí osídlena kvasinkami a dermatofyty častěji než kůže mladých lidí [8].

2.2.6.3 Hygienické návyky a používání kosmetických přípravků

Používání kosmetiky je rozvinuto již od starověku za účelem zlepšení hygieny nebo zjemnění vrásek a suché pokožky. Kosmetika může při každodenních činnostech v našem životě také ovlivnit mikrobiom kůže. Časté mytí narušuje kožní bariéru, což vede k podráždění pokožky a ke změnám v mikrobiomu na pokožce rukou. Modifikace kožního mikrobiomu se účastní také kosmetika, hygienické výrobky, make-up a zvlhčovače. Kosmetické přípravky jako jsou krémy či tělová mléka jsou však také potenciálními faktory přispívající k nárůstu mikroflóry pokožky. Například lipidové složky přípravků mohou poskytovat živiny a podporovat růst lipofilních bakterií, jako je *Staphylococcus* a *Propionibacterium* [10],[15].

Nadužívání antibiotik, které původně bylo a stále je důležitým milníkem v léčbě všech druhů bakteriálních infekcí, se stalo obecným zdravotním problémem, který vedl k určitému počtu kmenů patogenních mikroorganismů rezistentních na antibiotika, což znemožňuje léčbu infekcí. Z těchto důvodů je třeba se vyhnout nadměrnému užívání antibiotik [10].

2.3 Kožní dysbióza

K dysbióze, což je stav, při kterém dochází k narušení normálního mikrobiálního složení, mohou vést různé faktory. Funkční dysbióza může ovlivnit vzájemné rozhovory mezi hostitelem a mikroby a může vést k onemocnění. Zásadní roli hrají hostitelské faktory, jako je věk, pohlaví, užívání léků, životní styl a hygiena. Rozdíly v mikrobiálním složení pokožky u mužů a žen by mohly být založeny na fyziologických a anatomických rozdílech, které ovlivňují vlastnosti pokožky, jako je produkce hormonů, rychlost pocení, produkce kožního mazu, povrchové pH, tloušťka kůže, růst vlasů a kosmetické použití. Ženy vykazují výrazně větší mikrobiální rozmanitost na rukou než muži, což souvisí s méně kyselým povrchem kůže a zvýšeným používáním kosmetiky u žen [18].

2.3.1 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida je chronické, recidivující, svědivé zánětlivé onemocnění kůže s nástupem v dětství, které nemá nakažlivou povahu. Je spojeno s kolonizací a infekcí *Staphylococcus aureus* a také se snížením celkové rozmanitosti mikrobiálních společenstev na kůži v důsledku rozšíření druhů *Staphylococcus* až na 90 % detekovaných mikrobů. Studie naznačují schopnost *Staphylococcus epidermidis* inhibovat růst *Staphylococcus aureus* [13],[16].

2.3.2 Psoriáza

Psoriáza postihuje 1 až 3 % populace. Je charakterizována epidermální hyperproliferačí, hyperkeratózou, dermálním zánětem a angiogenezí vedoucí k zesílení šupinatých plaků. Byly provedeny studie objasňující souvislost mezi kožním mikrobiomem a psoriázou, které uvádějí nerovnováhu z typické distribuce bakterií. Druhy *Propionibacterium*

a *Actinobacteria* měly u psoriaticů nižší zastoupení než u normální kontrolní kůže. Naopak nadměrně zastoupeny byly *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Schlegelella*, *Streptococcaeae*, *Rhodobacteraceae*, *Campylobacteraceae* a *Moraxellaceae* [16].

2.3.3 Růžovka

Růžovka je chronické zánětlivé onemocnění cév a pilosebaceózních jednotek na obličeji, které se obvykle projevuje zrudnutím, červenáním a citlivou pokožkou. Úloha mikrobiomu v patogenezi růžovky byla spojena s *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus epidermidis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus oleronius* a roztočem *Demodex* [16].

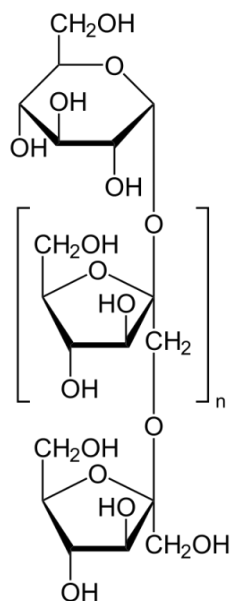
2.3.4 Acne vulgaris

Acne vulgaris je chronické zánětlivé onemocnění pilosebaceózních jednotek a vyskytuje se v mazových oblastech kůže, krku, hrudníku a zad. Akné obvykle postihuje dospívající a souvisí s nárůstem androgenů. V dospívání i dospělosti jsou mazové oblasti kolonizovány primárně lipofilním *Propionibacterium*. *Propionibacterium* hydrolyzuje triglyceridy a produkují volné mastné kyseliny, které okyselují a oslabují pokožku [16].

2.4 Polysacharidy používané v kosmetických přípravcích

2.4.1 Fruktan

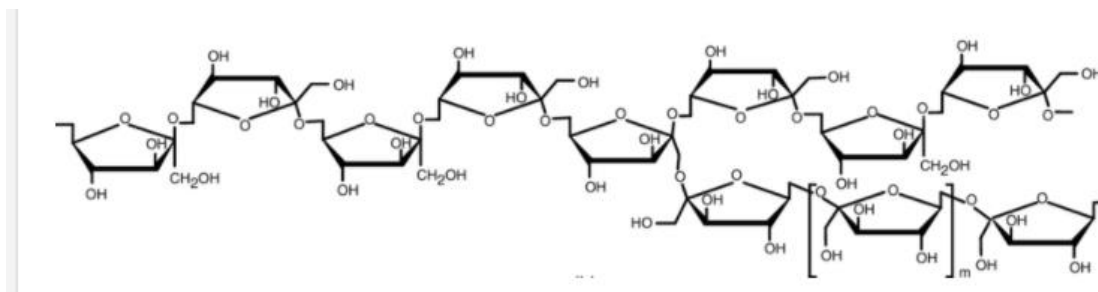
Fruktany jsou lineární polymery fruktózy používané v potravinářském průmyslu jako prebiotická živina. Struktura fruktanu je zobrazena na Obrázku 6. Tyto rezervní polysacharidy se vyskytují v rostlinách, jako jsou topinambury, chřest, yakony, pórek, česnek, cibule a čekanka. Prebiotické fruktany jsou selektivními zdroji uhlíku pro bakterie, které selektivně stimulují jejich růst na úkor patogenních mikroorganismů. Byly izolovány fruktany z kořenů *Conyza sp.* *Conyza sp.* je roční plevel z čeledi *Asteraceae*. Přítomnost polysacharidů fruktanového typu byla prokázána také v jiných rostlinách *Asteraceae* jako *Stevia rebaudiana* a *Atractylodes chinensis* [19].



Obrázek 6: Struktura fruktanu [19]

2.4.2 Levan

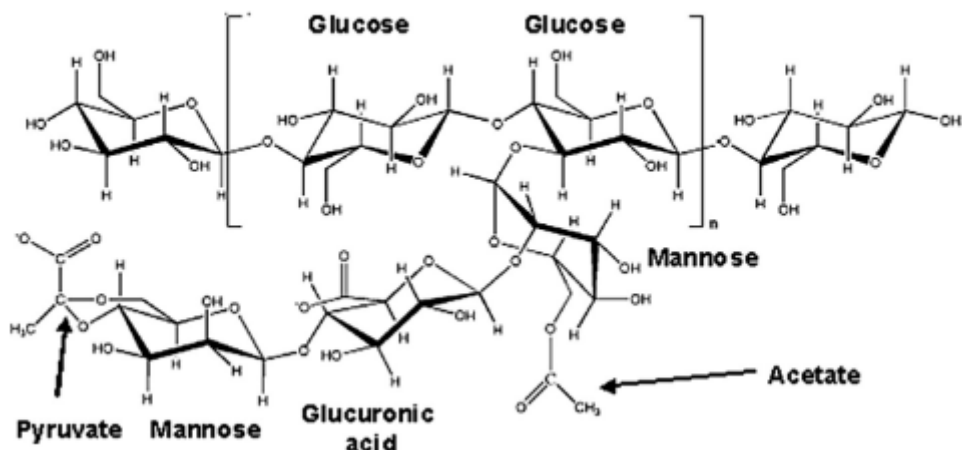
Levan je β - (2,6) vázaný fruktózový polymer (viz Obrázek 7). V přírodě je levan syntetizován ze sacharózy širokou škálou mikroorganismů a několika rostlinnými druhy. Bakteriální levany mají často molekulové hmotnosti vyšší než 500 000 Da a jsou běžně rozvětvené. Pokud je levan přítomen v biofilmu půdních druhů, jako je *Bacillus subtilis*, chrání mikroorganismy před vysycháním při změně hladiny vody [20].



Obrázek 7: Struktura levanu [20]

2.4.3 Xanthanová guma

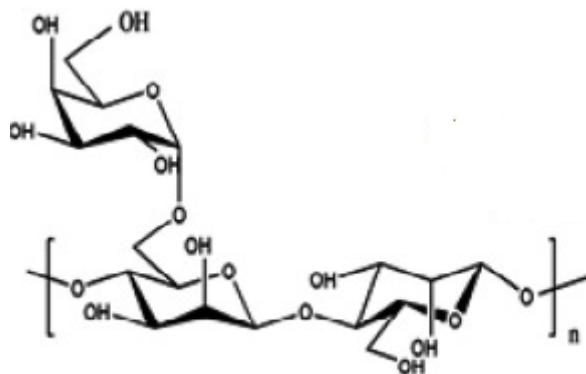
Xanthanová guma je přírodní polysacharid produkovaný bakterií *Xanthomonas campestris*. Řetězec tohoto heteropolysacharidu je tvořený pentasacharidovými jednotkami sestávajícími se z glukózy, manózy a kyseliny glukoronové (viz Obrázek 8). Tento polymer je dobře rozpustný ve vodě. Používá se jako dispergační činidlo, zahušťovadlo a stabilizátor emulzí a suspenzí ve farmaceutickém průmyslu, v kosmetice i potravinářských produktech [21],[22].



Obrázek 8: Struktura xanthanu [23]

2.4.4 Guaránová guma

Guaranová guma je polysacharid získávaný z endospermu semen rostliny *Cyamopsis tetragonolobus*. Největším výrobcem tohoto polysacharidu je Indie. Velkou výhodou guaránové gumy je schopnost tvořit vysoce viskózní roztoky i se studenou vodou. Používá se jako zahušťovadlo a emulgátor, zvyšuje stabilitu emulzí. Krémům dodává roztíratelnost. Fyziologicky se podobá vláknině a jeho struktura je zobrazena na Obrázku 9 [24],[25].



Obrázek 9: Struktura guaránové gumy [26]

2.5 Použité metody

Vliv polysacharidů na bakteriální druhy mikrobiomu kůže lze sledovat pomocí mikrobiologických metod a molekulárně diagnostických technik.

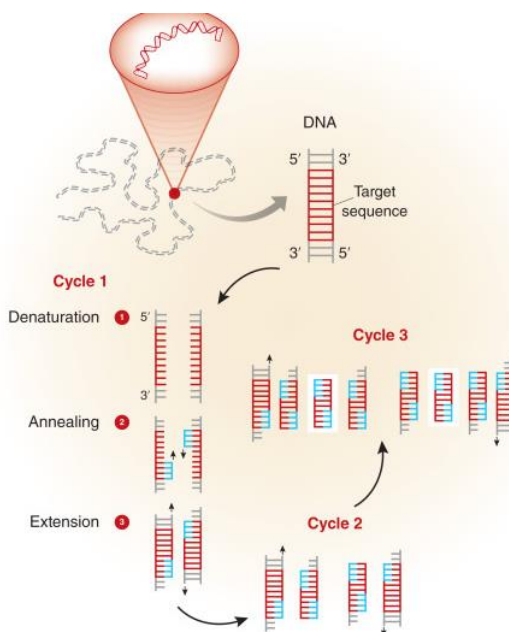
2.5.1 PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce) je výkonná amplifikační technika, která umožňuje namnožení specifického úseku DNA pouze z malého množství výchozího materiálu (DNA templátu). PCR může být prováděna za použití DNA z různých tkání a organismů, včetně kůže, krve, vlasů, slin a mikrobů. Jde o citlivý test, protože

k vytvoření dostatečného množství kopií pro analýzu je zapotřebí pouze stopových množství DNA [27],[28],[30].

Každý PCR test vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů (NTP), DNA polymerázy, pufr pro specifickou DNA polymerázu a PCR vodu. DNA polymeráza je klíčový enzym. Spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku PCR produktu. Nukleotidy jsou základní stavební jednotkou nukleové kyseliny. Ve své struktuře obsahují pětiuhlíkatý cukr - pentózu. V molekule DNA se jedná o 2- deoxyribosu, v RNA o ribosu. Pomocí N-glykosidické vazby je k pentóze připojena dusíkatá báze. V molekule DNA je to adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a thymin (T). Adenin a guanin jsou purinové báze. Cytosin a thymin pak pyrimidinové. Přes esterovou vazbu je připojen jeden nebo více zbytků kyseliny fosforečné. Nukleotidy působí jako stavební kameny, které využítá DNA polymeráza k vytvoření PCR produktu. Primery jsou krátké oligonukleotidy s definovanou sekvencí komplementární k cílové DNA, která má být amplifikována a detekována [27],[28],[30],[31].

Tyto složky jsou po smíchání umístěny do přístroje, který umožňuje opakování cyklů amplifikace DNA ve třech základních krocích. Přístroj, který je vlastně termální cyklovač, zvyšuje a snižuje teplotu. Nejprve je reakční roztok zahřát nad teplotu tání dvou komplementárních řetězců, aby došlo k jejich denaturaci a tedy separaci. Při teplotě okolo 95°C dochází k rozrušení vodíkových můstků a k rozvolnění dvoušroubice. Díky tomu vznikne jednovláknová DNA, na kterou se už mohou navázat primery. Poté dojde ke snížení teploty. Specifické primery se navážou na segmenty DNA - proces známý jako hybridizace neboli nasedání. Posledním krokem je samotná syntéza DNA. Teplota tohoto kroku závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum 75 až 80°C. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementárně k původní molekule DNA. Tyto kroky se cyklicky opakují. S každým opakováním se počet molekul DNA zdvojnásobí. Schématické znázornění principu PCR je uvedeno na Obrázku 10 [27],[28].



Obrázek 10: Schématické znázornění principu PCR [27]

Mezi dva hlavní způsoby vizualizace PCR produktů patří a) barvení amplifikovaného produktu barvivem a za b) značení PCR primerů nebo nukleotidů pomocí fluorescenčního barviva před PCR amplifikací. Mezi nejpoužívanější barvivo patří ethidiumbromid, které interkaluje mezi dvěma řetězci. Značení pomocí fluorescenčního barviva umožňuje přímé začlenění značek do produktu PCR [27],[28],[32].

Nejčastěji používanou metodou pro analýzu je elektroforéza na agarózovém gelu, která rozděluje produkty DNA na základě velikosti a náboje. Agaróza je lineární polysacharid, který se získává z mořských řas rodu *Gelidium* nebo *Gracilaria*. Základní strukturální jednotkou je agarobiosa, což je disacharid, který je složen z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy. Agarózová gelová elektroforéza je nejjednodušší metoda pro vizualizaci a analýzu PCR produktu. Umožňuje stanovení přítomnosti i velikosti produktu. Tato separační technika je založena na migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli. DNA standard o známé velikosti fragmentů DNA se používá současně s analýzou PCR produktu a umožňuje určit velikost produktu [28],[32],[33],[34],[35].

Pokud se PCR metoda používá k detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti specifického produktu DNA, mluvíme o kvalitativní PCR. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) poskytuje informace nad rámec pouhé detekce DNA. Označuje, kolik specifické DNA nebo genu je ve vzorku přítomno. Pro detekci a kvantifikaci produktu se používají dvě metody: 1) fluorescenční barviva, která nespecificky interkalují s dvouřetězcovou DNA a 2) sekvenčně značené sondy. qPCR kombinuje detekci cílového produktu s kvantifikací zaznamenáním amplifikace produktu PCR prostřednictvím odpovídajícího zvýšení fluorescenčního signálu spojeného s tvorbou produktu během každého cyklu reakce. Kvantifikace je stanovena během exponenciální fáze PCR amplifikace [27],[29],[30].

2.5.2 Difuzní agarový test

Tato metoda slouží ke stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Na Petriho misku s živným médiem, které je vhodné pro daný mikroorganismus, je zaočkována daná kultura. Do agaru jsou vytvořeny jamky, do nichž se následně nanese daná antimikrobiální látka. Následuje 24 hodin inkubace, kdy dochází k difúzi antimikrobiální látky a tím k potlačení růstu mikroorganismu kolem místa aplikace. Vzniká inhibiční zóna a citlivost mikroorganismu k dané látce se vyhodnotí změřením velikosti této zóny [36],[37].

2.5.3 Diluční jamkový test

Tento test se provádí na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Do těchto jamek se napipetuje vzorek antimikrobiální látky a vhodně zředěná daná kultura. Následuje 24 hodin inkubace. Poté se výsledek vyhodnocuje spektrofotometricky - měří se zákal v jamce se vzorkem a porovnává se s kontrolní jamkou [36],[37].

3 CÍL PRÁCE

V rámci této diplomové práce budou řešeny následující dílčí úlohy:

- Zpracování rešerše na dané téma
- Sledování vlivu vybraných kosmetických polysacharidů na vybrané druhy mikrobiomu kůže
- Určení vlivu kosmetických polysacharidů jako prebiotik na vybrané druhy mikrobiomu kůže
- Vyhodnocení výsledků a diskuze

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelber, SRN)
- Agar Powder (Himedia, IND)
- BHI médium (Himedia, IND)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard 100 bp (Nippon Genetics Europe, Německo) - obsahuje fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 a 3000 bp
- DNA standard 50 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR) - obsahuje fragmenty 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp
- EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fluorescenční barvivo GelRed™ (Top-Bio, Praha, ČR)
- Fluorescenční barvivo Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Německo)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- LB médium (Sigma, SRN)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- NB médium (Himedia, IND)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Biohazard box, Airstream II, ESCO (Německo)
- Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Detekční systém pro snímání gelů (Azure biosystems C200, Dublin, USA)
- DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- EpochMicroplate Spectrophotometer, BioTek (USA)
- Eppendorf zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117 (Sencor, ČR)
- Nanodrop 2000c UV-VIS Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- Omni Bacterial DNA Purification Kit
- Temperovaná třepačka HeidolphUnimax 1010 (Labicom, ČR)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-Rad Lab., USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd., Cambridge, United Kingdom)

Dále byly použity pipety různých objemů a běžné laboratorní sklo a vybavení.

4.2 Použité mikroorganismy

V experimentální části diplomové práce byly použity čtyři mikroorganismy získané z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM) Brno:

- *Cutibacterium acnes* CCM 3437
- *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418
- *Micrococcus luteus* CCM 1569
- *Escherichia coli* CCM 3954

Pro kultivaci bylo použito vždy 50 ml daného tekutého média v Erlenmeyerově baňce, které bylo zaočkováno příslušnou kulturou z dlouhodobě uchovávané kultury. Výjimkou byla kultura *Cutibacterium acnes*, která byla kultivována v centrifugační zkumavce naplněné téměř k uzávěru, aby byly zajištěny anaerobní podmínky. Kultivace probíhala ve všech případech na temperované třepačce při 37°C po dobu 24 hodin. Při přípravě médií i při práci s mikroorganismy probíhala práce ve sterilním boxu.

Pro gramnegativní bakterii *Escherichia coli* CCM 3954 (LB médium) a pro zbylé grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 (BHI médium), *Cutibacterium acnes* CCM 3437 (BHI médium) a *Micrococcus luteus* CCM 1569 (NB médium) byla použita komerční média (viz Tabulka 1), která byla připravena dle návodu na obalu. V případě přípravy pevného média byl přidán agar o koncentraci 20g/l.

V následující tabulce (Tabulka 1) je uvedeno složení komerčních médií.

Tabulka 1: Složení komerčních médií pro kultivaci mikroorganismů

Médium	mikroorganismus	složka	koncentrace (g/l)
BHI	<i>Cutibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	telecí mozek	200
		hovězí srdce	250
		pepton	10
		dextróza	2
		NaCl	5
		Na ₂ HPO ₄	2,5
NB	<i>Micrococcus luteus</i>	pepton	10
		hovězí extrakt	10
		NaCl	5
LB	<i>Escherichia coli</i>	trypton	10
		kvasniční extrakt	5
		NaCl	10

4.3 Použité kosmetické polysacharidy

Pro tuto diplomovou práci byly použity dva polysacharidy používané v kosmetice (viz Obrázek 11): PoLevan S (Greentech Biotechnologies, Saint-Beauzire, Francie) a Nano moist (Bioland, Korea).



Obrázek 11: Použité polysacharidy PoLevan S (vlevo) a Nano moist (vpravo)

4.3.1 Příprava vzorků pro antimikrobiální testy

Pro přípravu vzorků bylo naváženo vždy 0,1 g polysacharidu, který byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody, čímž byla získána koncentrace polysacharidu 1%. Jako druhá hodnota byla vybrána koncentrace 2%, tedy bylo naváženo 0,2 g polysacharidu a rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Koncentrace 1 až 2% odpovídají koncentraci polysacharidů v kosmetických přípravcích. Takto připravené vzorky byly použity na antimikrobiální testy.

4.3.2 Příprava vzorků pro aplikaci na kůži

Pro aplikaci vzorků na kůži čela dvou respondentek byla vybrána koncentrace polysacharidů 2%. Bylo připraveno 7 zkumavek eppendorf, do kterých bylo napipetováno vždy 100 μ l polysacharidu PoLevan S pro týdenní používání. Do dalších 7 zkumavek bylo napipetováno 100 μ l polysacharidu Nano moist (Obrázek 12).



Obrázek 12: Připravené polysacharidy pro respondentky, vlevo polysacharid Nano moist, vpravo PoLevan S

4.4 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální účinek vzorků kosmetických polysacharidů byl stanoven za použití kmenů bakterií *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*.

4.4.1 Difuzní agarový test

Nejdříve byly připraveny Petriho misky s příslušným médiem s přidavkem agaru. Tyto misky byly poté zaočkovány 24 hodinovou kulturou vybraných mikroorganismů. Poté byly do tuhého média vytlačeny jamky, do kterých se následně pipetovalo 50 μ l vzorku kosmetických polysacharidů a slepý vzorek (destilovaná voda). Následně byly Petriho misky uchovány při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Test byl vyhodnocen změřením rozsahu inhibiční zóny kolem jamek.

4.4.2 Diluční jamkový test

Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno 75 μ l vzorku kosmetických polysacharidů a slepých vzorků (destilovaná voda a čistá kultura). Poté bylo přidáno 225 μ l zředěné 24 hodinové kultury. Absorbance byla měřena v čase 0 a poté po 24 hodinové kultivaci při 37°C spektrofotometricky pomocí ELISA readeru při vlnové délce 630 nm.

4.5 Izolace bakteriální DNA sbírkových kmenů mikroorganismů

K izolaci DNA sbírkových mikroorganismů byl použit Omni Bacterial DNA Purification Kit. Postup izolace odpovídá návodu výrobce, který byl přiložen k tomuto kitu [38]. Byl napipetován 1 ml čerstvě narostlé bakteriální kultury (24 hod) do 1,5 ml zkumavky eppendorf a centrifugován při 4000 x g 1 minutu. Supernatant byl slit do odpadní nádoby. Bylo přidáno 200 μ l roztoku B a pelet byl kompletně resuspendován. Roztok byl inkubován 10 minut při teplotě 37°C. Dále bylo přidáno 25 μ l roztoku proteázy a 100 μ l DLB pufru. Po promíchání byl roztok inkubován při teplotě 55°C 1 hodinu. Poté byl centrifugován při 10 000 x g 2 minuty.

Supernatant byl odpipetován do nové sterilní zkumavky eppendorf a bylo přidáno 220 μ l BB pufru. Po promíchání bylo inkubováno 10 minut při teplotě 65°C. K roztoku bylo přidáno 220 μ l 100% ethanolu a důkladně promícháno.

Do 2 ml sběrné zkumavky byla vložena Omni DNA Mini kolonka, na kterou byl roztok přepipetován a bylo centrifugováno při 10 000 x g 1 minutu. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn supernatant a na kolonku bylo pipetováno 500 μ l CBH pufru. Opět bylo centrifugováno při 10 000 x g 1 minutu a supernatant byl odstraněn. Na kolonku bylo napipetováno 700 μ l DW pufru a centrifugováno při 10 000 x g 1 minutu. Supernatant byl odstraněn a bylo znovu centrifugováno při 10 000 x g 2 minuty pro odstranění zbytků ethanolu. Na kolonku bylo napipetováno 100 μ l EB pufru předehřátého na 65°C. Bylo inkubováno 5 minut při teplotě 65°C a centrifugováno při 10 000 x g 1 minutu. Takto získaná DNA všech sbírkových mikroorganismů byla použita jako pozitivní kontrola pro PCR.

4.5.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace a čistota izolované bakteriální DNA byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru NanoDrop 2000. Jako blank byl použit eluční pufr. Byla změřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220 až 340 nm. Absorbance byla odečtena pro vlnové délky 230 nm, kde se nachází minimum absorbance pro DNA, dále pro 260 nm, kde se nachází maximum absorbance pro DNA a pro 280 nm, kde se nachází maximum absorbance pro proteiny. Z programu Nanodrop 2000 byly zjištěny koncentrace DNA v ng/ μ l z hodnoty absorbance pro 260 nm a hodnoty poměrů absorbance A260/A280 a A260/A230, které vypovídají o čistotě izolované DNA. Hodnota poměru absorbancí A260/A280 pohybující se kolem 1,8 odpovídá čisté DNA.

4.6 Izolace DNA ze stěrů z kůže čela respondentek

DNA vybraných mikroorganismů byla ze stěrů z kůže čela respondentek izolována celkem 3x. Poprvé na začátku před samotným používáním kosmetického polysacharidu, poté po týdenní aplikaci prvního polysacharidu a nakonec po další týdenní aplikaci druhého polysacharidu. Stěr byl prováděn pomocí sterilního tamponu na plastové tyčince (viz Obrázek 13), který byla poté vložena do sterilní plastové uzavíratelné zkumavky, která obsahovala 10 ml sterilní vody. Po hodině bylo na Petriho misku s BHI médiem napipetováno 50 μ l této vody a ponecháno kultivovat 24 hodin při teplotě 37°C. Po 24 hodinách bylo z Petriho misky odebráno 20 kolonií do 20 zkumavek eppendorf, které obsahovaly 100 μ l PCR vody. Stěr byl proveden pro statistické výsledky 3x, tedy bylo vždy získáno celkem 60 kolonií. Po vložení zkumavek eppendorf do termocykleru na 20 minut při teplotě 99°C byla vzorky zmrazeny a uchovány pro další použití. Tento postup byl zvolen na základě optimalizace izolace DNA ze stěru z kůže provedené v souběžně probíhající diplomové práci Adély Alexové [39].



Obrázek 13: Sterilní tamponek na plastové tyčince pro stěr

4.7 Příprava reakční směsi pro PCR a průběh reakce

Ve sterilním boxu byla připravena PCR směs podle Tabulky 2. Všechny PCR reakce byly prováděny s MasterMix SYTO-9 obsahující interkalační barvivo. PCR směs byla připravena do speciálních 200 μ l zkumavek eppendorf určených pro qPCR a celkový objem směsi pro PCR byl 25 μ l. Ve druhém sterilním boxu byla napipetována DNA do všech mikrozkušavek obsahující PCR směs. V případě negativní kontroly byla matrice DNA nahrazena stejným množstvím PCR vody. Stejným způsobem byla připravena pozitivní kontrola, kde jako matrice DNA byla použita DNA získaná podle postupu v kapitole 4.5.

Tabulka 2: Použité komponenty a objemy pro přípravu PCR směsi

Komponenty	Objem (μ l)
PCR voda	9,5
qPCR 2x SYTO-9	12,5
primer F	1
primer R	1
matrice DNA	1

Polymerázová řetězová reakce probíhala dle teplotního programu uvedeného v Tabulce 3.

Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95°C/5 min	95°C/60 s	55°C/60 s	72°C/60 s	72°C/5 min

Pro přípravu PCR směsi byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (16Sekont_F, 16Sekont_R) a primery specifické pro *Staphylococcus epidermidis*

(femA-SE_F, femA-SE_R), pro *Cutibacterium acnes* (CA-F, CA-R), pro *Micrococcus luteus* (ML-ISR_F, ML-ISR_R) a pro *Escherichia coli* (uspA Up, uspA Down). Sekvence těchto primerů se nachází v Tabulce 4.

Tabulka 4: Sekvence jednotlivých primerů

Název	Sekvence (5'→3')	Mikroorganismus	Citace
femA-SE_F	CAACTCGATGCAAATCAGCAA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[40]
femA-SE_R	GAACCGCATAGCTCCCTGC		
CA-F	GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA	<i>Cutibacterium acnes</i>	[41]
CA-R	TTCCGACGCGATCAACCA		
ML-ISR_F	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	<i>Micrococcus luteus</i>	[42]
ML-ISR_R	GCCAAGGCATCCACC		
uspA Up	CCGATACGCTGCCAATCAGT	<i>Escherichia coli</i>	[43]
uspA Down	ACGCAGACCGTAGGCCAGAT		
16Sekont_F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	doména <i>Bacteria</i>	[44]
16Sekont_R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		

4.8 Příprava agarózového gelu

Gel pro elektroforézu byl připraven z agarózy a 0,5x TBE pufru, který vznikl zředěním 5x TBE pufru. 5x TBE pufr byl připraven smícháním 54 g Tris HCl, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA. V Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 100 ml 0,5 x TBE pufru s 1,5 g agarózy. Poté byl roztok zahříván a opakovaně přiváděn k varu v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Po zchladnutí bylo do roztoku přidání interkalační barvivo GelRed nebo Midori Green v objemu 10 µl a roztok byl nalit do předem připravené formy. Po 30 minutách byl gel dostatečně tuhý pro samotnou elektroforézu.

4.9 Elektroforéza PCR produktů

Do jamek připraveného gelu bylo nanášeno 10 µl směsi připravené smícháním 10 µl PCR produktu a 5 µl nanášecího pufru. Pro určení velikosti ampliconů bylo do jedné jamky nanášeno 5 µl standardu DNA. Agarózový gel byl následně vložen do elektroforetické vany a zalit 0,5x TBE pufrém. Připojením ke zdroji napětí byla spuštěna elektroforéza, která probíhala minimálně 2,5 hodiny při napětí 60 až 65 V.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Antimikrobiální aktivita

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.2 byla stanovena antimikrobiální aktivita obou kosmetických polysacharidů diluční jamkovou metodou a difuzním agarovým testem.

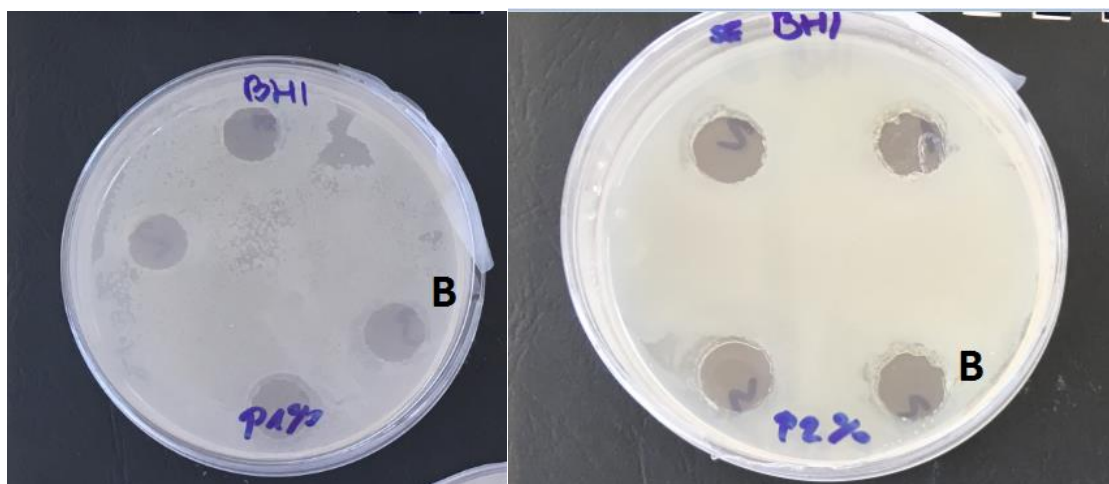
5.1.1 *Staphylococcus epidermidis*

Do tuhého média na Petriho misce byly vytlačeny 4 jamky, z nichž 3 obsahovaly danou koncentraci kosmetického polysacharidu, a poslední jamka obsahovala blank - destilovanou vodu. Velikost inhibiční zóny byla získána jako průměr 3 měření.

Tabulka 5: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Staphylococcus epidermidis*

VZOREK	VELIKOST INHIBIČNÍ ZÓNY [mm]
PoLevan S 1%	0
PoLevan S 2%	0
Nanomoist 1%	0
Nanomoist 2%	0

Z Tabulky 5 a Obrázku 14 vyplývá, že kosmetické polysacharidy nemají vůči bakterii *Staphylococcus epidermidis* žádnou antimikrobiální aktivitu, což může potvrzovat fakt, že se polysacharidy v kosmetických přípravcích mohou chovat jako prebiotika pro *Staphylococcus epidermidis*.



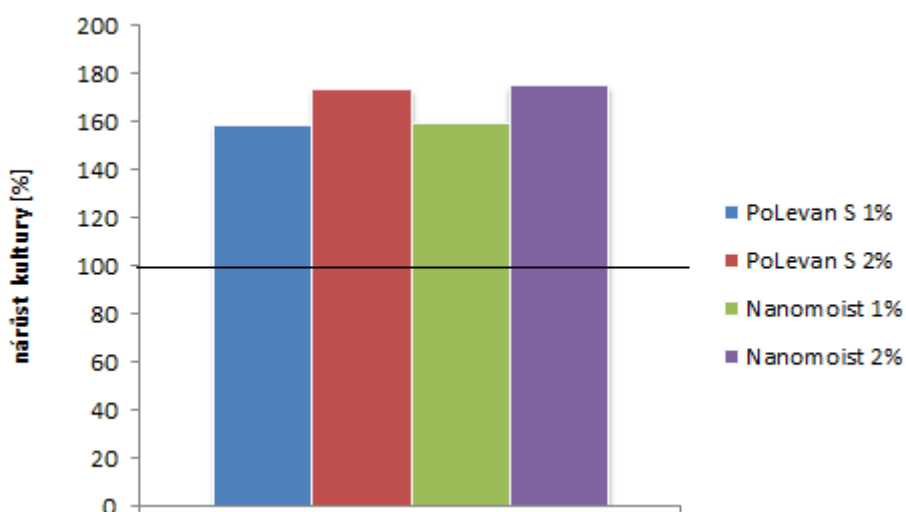
Obrázek 14: Inhibiční zóny polysacharidu Polevan S v koncentraci 1% (vlevo) a 2% (vpravo)

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2 byl měřen zákal na začátku testu a po uplynutí 24 hodin. Získané absorbance od sebe byly odečteny, čímž byl zjištěn nárůst bakterie. Od jednotlivých hodnot byl ještě odečten účinek blanku (destilovaná voda a čistá kultura). Všechny získané hodnoty byly získány jako aritmetický průměr tří měření a jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Staphylococcus epidermidis*

VZOREK	NÁRŮST KULTURY [%]
PoLevan S 1%	158,58
PoLevan S 2%	173,69
Nanomoist 1%	159,91
Nanomoist 2%	175,22

Obrázek 15 ukazuje nárůst kultury v jednotlivých vzorcích. Výsledky byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kdy 100 % značí nárůst čisté kultury.



Obrázek 15: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Staphylococcus epidermidis*

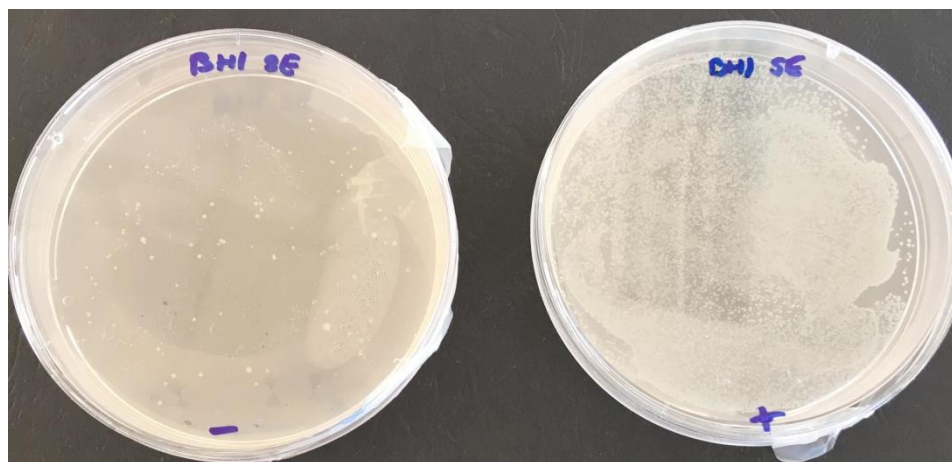
U všech vzorků kosmetických polysacharidů přesahuje nárůst kultury 100 %, tedy lze říci, že žádný ze vzorků nevykazuje antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *Staphylococcus epidermidis*. Naopak lze říci, že polysacharidy PoLevan S i Nanomoist mohou podporovat růst této bakterie.

Nakonec byly kosmetické polysacharidy přidány přímo do média před ztuhnutím a po nalití a zatuhnutí byly Petriho misky zaočkovány 24 hodinovou kulturou zředěnou na koncentraci 10^{-6} . Byly porovnány počty kolonií na miskách bez přídavku polysacharidu a s přídavkem polysacharidu.

Tabulka 7: Počty kolonií na Petriho miskách s přídavkem a bez přídavku polysacharidu

VZOREK	POČET KOLONIÍ	počet kolonií na misce bez přídavku polysacharidu
PoLevan S 1%	> 10 000	116
PoLevan S 2%	> 10 000	
Nanomoist 1%	> 10 000	
Nanomoist 2%	> 10 000	

Z Tabulky 7 lze opět vyčíst, že kosmetické polysacharidy nevykazují vůči bakterii *Staphylococcus epidermidis* antimikrobiální aktivitu, ale spíše její růst podporují. Rozdíl v počtu kolonií je viditelný na Obrázku 16.



Obrázek 16: Porovnání nárůstu bakterie *Staphylococcus epidermidis* bez přídavku polysacharidu (vlevo) a po přídavku polysacharidu PoLevan S 2% (vpravo)

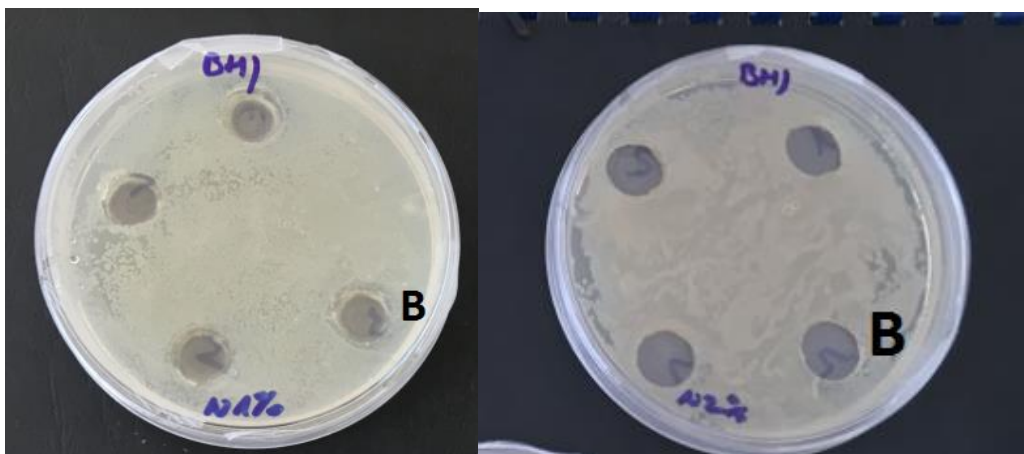
5.1.2 *Cutibacterium acnes*

Do tuhého média na Petriho misce byly vytlačeny 4 jamky, z nichž 3 obsahovaly danou koncentraci kosmetického polysacharidu, a poslední jamka obsahovala blank - destilovanou vodu. Velikost inhibiční zóny byla získána jako průměr 3 měření.

Tabulka 8: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Cutibacterium acnes*

VZOREK	VELIKOST INHIBIČNÍ ZÓNY [mm]
PoLevan S 1%	0
PoLevan S 2%	0
Nanomoist 1%	0
Nanomoist 2%	0

Z Tabulky 8 vyplývá, že kosmetické polysacharidy nevykazují ani vůči bakterii *Cutibacterium acnes* žádnou antimikrobiální aktivitu (viz Obrázek 17), což opět potvrzuje fakt, že by polysacharidy mohly v kosmetických přípravcích vystupovat jako prebiotika.



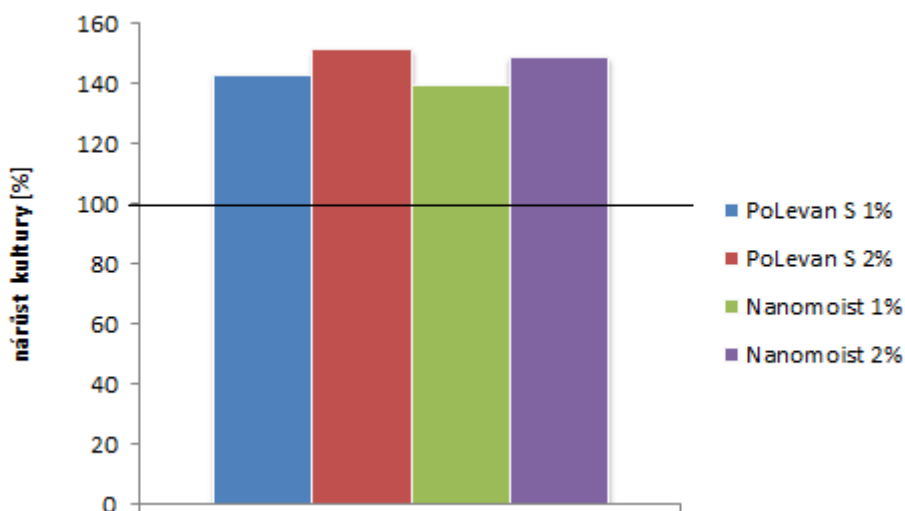
Obrázek 17: Inhibiční zóny polysacharidu Nano moist v koncentraci 1 % (vlevo) a 2% (vpravo)

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2 byl měřen zákal na začátku testu a po uplynutí 24 hodin. Získané absorbance od sebe byly odečteny, čímž byl zjištěn nárůst bakterie. Od jednotlivých hodnot byl ještě odečten účinek blanku (destilovaná voda a čistá kultura). Všechny získané hodnoty byly získány jako aritmetický průměr tří měření a jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Cutibacterium acnes*

VZOREK	NÁRŮST KULTURY [%]
PoLevan S 1%	143,26
PoLevan S 2%	151,74
Nano moist 1%	139,85
Nano moist 2%	149,22

Obrázek 18 ukazuje nárůst kultury v jednotlivých vzorcích. Výsledky byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kdy 100 % značí nárůst čisté kultury.



Obrázek 18: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Cutibacterium acnes*

Podobně jako u bakterie *Staphylococcus epidermidis*, i u bakterie *Cutibacterium acnes* můžeme vidět, že žádný ze vzorků kosmetických polysacharidů nevykazuje inhibiční účinek. Nárůst kultury u všech vzorků se pohybuje okolo 40 % ve srovnání s nárůstem čisté kultury. I u bakterie *Cutibacterium acnes* tedy mohou kosmetické polysacharidy fungovat jako jejich prebiotika a podporovat jejich růst. Při srovnání dvou polysacharidů můžeme vidět o něco výraznější nárůst kultury u polysacharidu PoLevan S.

Nakonec byly kosmetické polysacharidy přidány přímo do média před ztuhnutím a po nalití a zatuhnutí byly Petriho misky zaočkovány 24 hodinovou kulturou zředěnou na koncentraci 10^{-6} . Byly porovnány počty kolonií na miskách bez přídavku polysacharidu a s přídavkem polysacharidu.

Tabulka 10: Počty kolonií na Petriho miskách s přídavkem a bez přídavku polysacharidu

VZOREK	POČET KOLONIÍ	počet kolonií na misce bez přídavku polysacharidu
PoLevan S 1%	> 10 000	85
PoLevan S 2%	> 10 000	
Nanomoist 1%	> 10 000	
Nanomoist 2%	> 10 000	

Z Tabulky 10 můžeme vyčíst, že po přídavku polysacharidu došlo k výraznému nárůstu kolonií bakterie *Cutibacterium acnes*. Tedy lze říci, že kosmetické polysacharidy nevykazují vůči bakterii *Cutibacterium acnes* žádné antimikrobiální účinky a naopak její růst podporují.

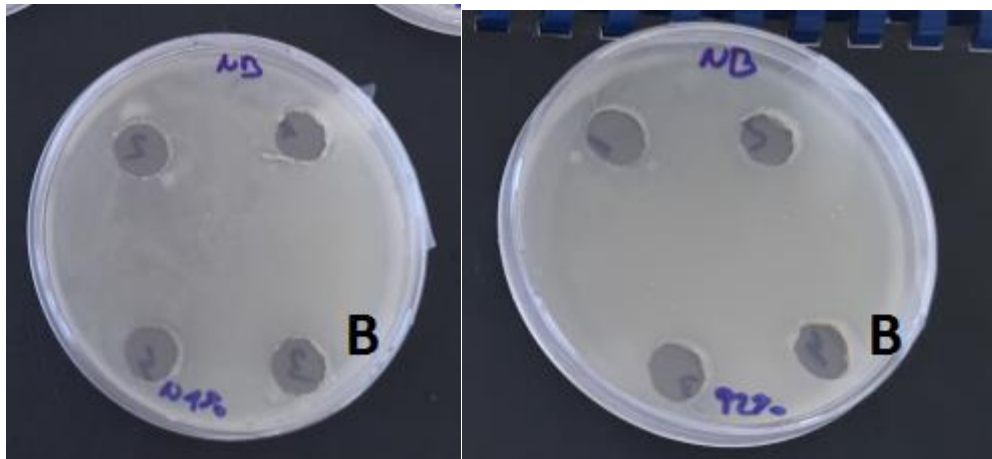
5.1.3 *Micrococcus luteus*

Stejně jako v předchozích případech byly do tuhého média na Petriho misce vytlačeny 4 jamky, z nichž 3 obsahovaly danou koncentraci kosmetického polysacharidu, a poslední jamka obsahovala blank - destilovanou vodu. Velikost inhibiční zóny byla získána jako průměr 3 měření a výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Micrococcus luteus*

VZOREK	VELIKOST INHIBIČNÍ ZÓNY [mm]
PoLevan S 1%	0
PoLevan S 2%	0
Nanomoist 1%	0
Nanomoist 2%	0

Ani vůči bakterii *Micrococcus luteus* nevykazují kosmetické polysacharidy antimikrobiální účinky (viz Obrázek 19), což znovu potvrzuje fakt, že by tyto polysacharidy mohly vystupovat jako prebiotika v kosmetických přípravcích.



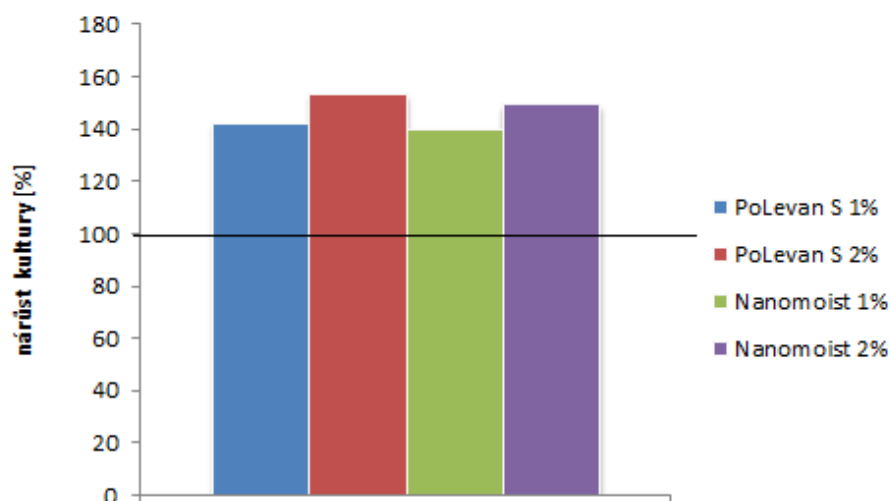
Obrázek 19: Inhibiční zóny polysacharidu Nanomoist v koncentraci 1 % (vlevo) a PoLevan S 2% (vpravo)

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2 byl měřen zákal na začátku testu a po uplynutí 24 hodin. Získané absorbance od sebe byly odečteny, čímž byl zjištěn nárůst bakterie. Od jednotlivých hodnot byl ještě odečten účinek blanku (destilovaná voda a čistá kultura). Všechny získané hodnoty byly získány jako aritmetický průměr tří měření a jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Micrococcus luteus*

VZOREK	NÁRŮST KULTURY [%]
PoLevan S 1%	141,88
PoLevan S 2%	153,41
Nanomoist 1%	139,99
Nanomoist 2%	149,29

Obrázek 20 ukazuje nárůst kultury v jednotlivých vzorcích. Výsledky byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kdy 100 % značí nárůst čisté kultury.



Obrázek 20: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Micrococcus luteus*

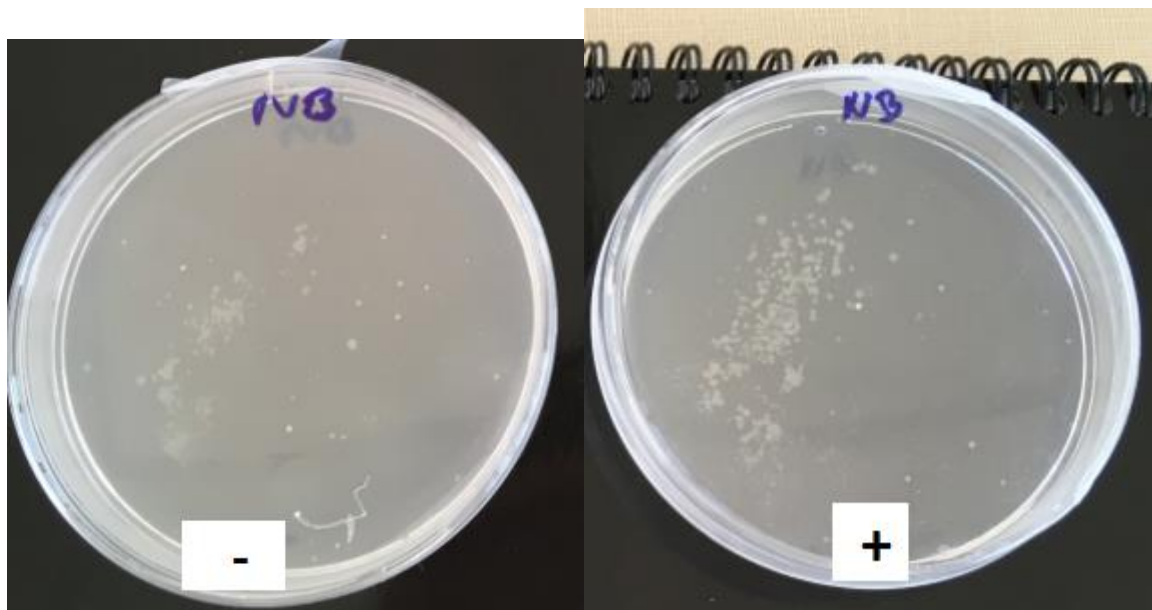
Z Obrázku 20 můžeme vidět, že žádný z polysacharidů opět nevykazuje inhibiční účinek vůči bakterii *Micrococcus luteus*. Všechny vzorky kosmetických polysacharidů podporují růst bakterie *Micrococcus luteus* a vystupují zde jako prebiotika. Podle očekávání lépe podporují růst polysacharidy s vyšší koncentrací ve vzorku a nejlépe polysacharid PoLevan S v koncentraci 2%.

Nakonec byly kosmetické polysacharidy přidány přímo do média před ztuhnutím a po nalití a zatuhnutí byly Petriho misky zaočkovány 24 hodinovou kulturou zředěnou na koncentraci 10^{-6} . Byly porovnány počty kolonií na miskách bez přídavku polysacharidu a s přídavkem polysacharidu. Rozdíl v počtu kolonií je vidět na Obrázku 21.

Tabulka 13: Počty kolonií na Petriho miskách s přídavkem a bez přídavku polysacharidu

VZOREK	POČET KOLONIÍ	počet kolonií na misce bez přídavku polysacharidu
PoLevan S 1%	> 100	53
PoLevan S 2%	> 100	
Nano moist 1%	> 100	
Nano moist 2%	> 100	

V Tabulce 13 můžeme vidět, že po přídavku polysacharidů došlo opět k nárůstu kolonií bakterie *Micrococcus luteus*.



Obrázek 21: Porovnání nárůstu bakterie *Micrococcus luteus* bez přidavku polysacharidu (vlevo) a po přidavku polysacharidu Nano moist 1% (vpravo)

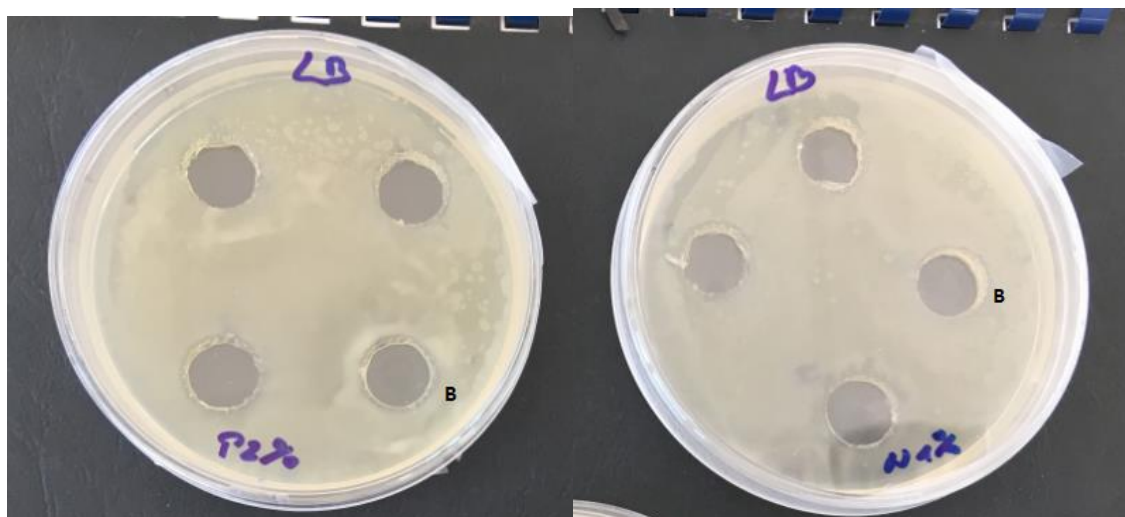
5.1.4 *Escherichia coli*

Stejně jako v předchozích případech byly do tuhého média na Petriho misce vytlačeny 4 jamky, z nichž 3 obsahovaly danou koncentraci kosmetického polysacharidu, a poslední jamka obsahovala blank - destilovanou vodu. Velikost inhibiční zóny byla získána jako průměr 3 měření (viz Tabulka 14).

Tabulka 14: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Escherichia coli*

VZOREK	VELIKOST INHIBIČNÍ ZÓNY [mm]
PoLevan S 1%	0
PoLevan S 2%	0
Nano moist 1%	0
Nano moist 2%	0

Ani vůči bakterii *Escherichia coli* nevykazují kosmetické polysacharidy antimikrobiální účinky (viz Obrázek 22), což znovu potvrzuje fakt, že by tyto polysacharidy mohly vystupovat jako prebiotika v kosmetických přípravcích.



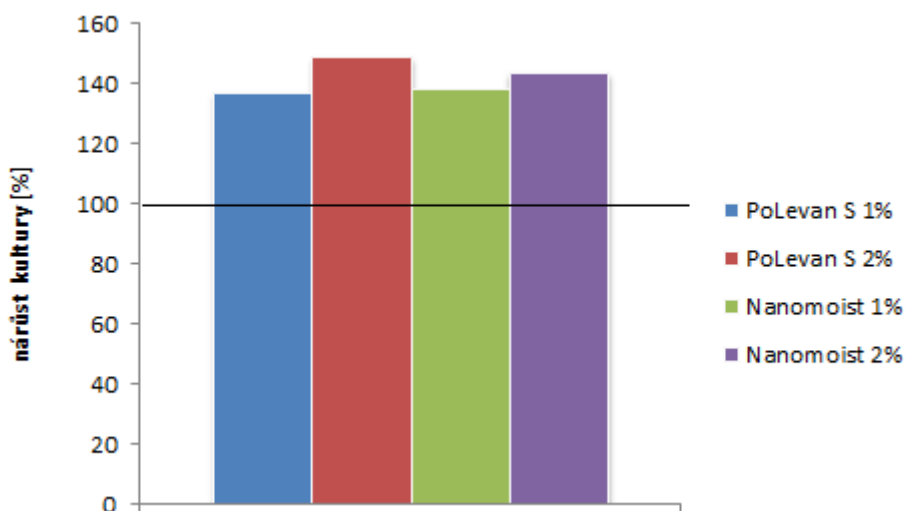
Obrázek 22: Inhibiční zóny polysacharidu PoLevan S v koncentraci 2% (vlevo) a Nano moist 1% (vpravo)

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2 byl měřen zákal na začátku testu a po uplynutí 24 hodin. Získané absorbance od sebe byly odečteny, čímž byl zjištěn nárůst bakterie. Od jednotlivých hodnot byl ještě odečten účinek blanku (destilovaná voda a čistá kultura). Všechny získané hodnoty byly získány jako aritmetický průměr tří měření a výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Escherichia coli*

VZOREK	NÁRŮST KULTURY [%]
PoLevan S 1%	137,22
PoLevan S 2%	148,91
Nano moist 1%	138,11
Nano moist 2%	143,74

Obrázek 23 ukazuje nárůst kultury v jednotlivých vzorcích. Výsledky byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kdy 100 % značí nárůst čisté kultury.



Obrázek 23: Antimikrobiální aktivita kosmetických polysacharidů proti *Escherichia coli*

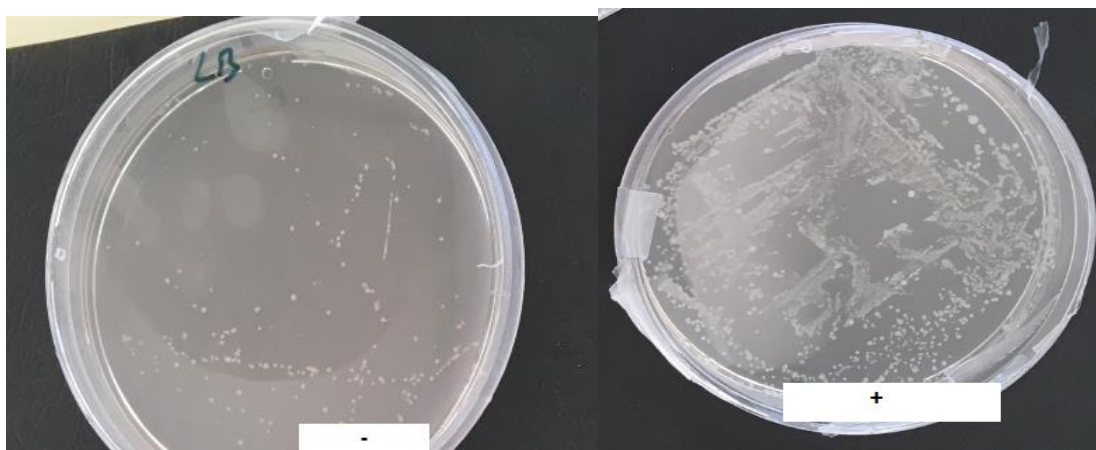
Z Obrázku 23 můžeme vidět, že žádný z polysacharidů opět nevykazuje inhibiční účinek vůči bakterii *Escherichia coli*. Všechny vzorky kosmetických polysacharidů naopak podporují růst bakterie *Escherichia coli* a vystupují zde jako prebiotika. Podle očekávání lépe podporují růst polysacharidy s vyšší koncentrací ve vzorku a nejlépe opět polysacharid PoLevan S v koncentraci 2%.

Nakonec byly kosmetické polysacharidy přidány přímo do média před ztuhnutím a po nalití a zatuhnutí byly Petriho misky zaočkovány 24 hodinovou kulturou zředěnou na koncentraci 10^{-6} . Byly porovnány počty kolonií na miskách bez přídavku polysacharidu a s přídavkem polysacharidu.

Tabulka 16: Počty kolonií na Petriho miskách s přídavkem a bez přídavku polysacharidu

VZOREK	POČET KOLONIÍ	počet kolonií na misce bez přídavku polysacharidu
PoLevan S 1%	> 1000	148
PoLevan S 2%	> 1000	
Nano moist 1%	> 1000	
Nano moist 2%	> 1000	

Z Tabulky 16 lze opět vyčíst, že kosmetické polysacharidy nevykazují vůči bakterii *Escherichia coli* antimikrobiální aktivitu, ale spíše její růst podporují. Rozdíl v počtu kolonií je viditelný na Obrázku 24.



Obrázek 24: Porovnání nárůstu bakterie *Escherichia coli* bez přidavku polysacharidu (vlevo) a po přidavku polysacharidu PoLevan S 1% (vpravo)

5.2 Izolace bakteriální DNA ze sbírkových kmenů mikroorganismů

Izolace DNA byla provedena izolačním kitem dle postupu v kapitole 4.5. Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA bylo provedeno na přístroji NanoDrop Spectrophotometer 2000. Postup je uveden v kapitole 4.5.1. V Tabulce 17 jsou uvedeny koncentrace izolované DNA sbírkových mikroorganismů. U bakterií *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes* a *Micrococcus luteus* byla získána DNA o dostatečné koncentraci. Před použitím této izolované DNA jako pozitivní kontroly v PCR, byla DNA vyředěna na koncentraci přibližně 10 ng/μl. U bakterií *Staphylococcus epidermidis* a *Cutibacterium acnes* byla izolovaná DNA mírně znečištěna proteiny, protože poměr absorbcí A_{260}/A_{280} je menší než 1,8. U *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus* je naopak poměr vyšší než 1,8, což značí znečištění RNA.

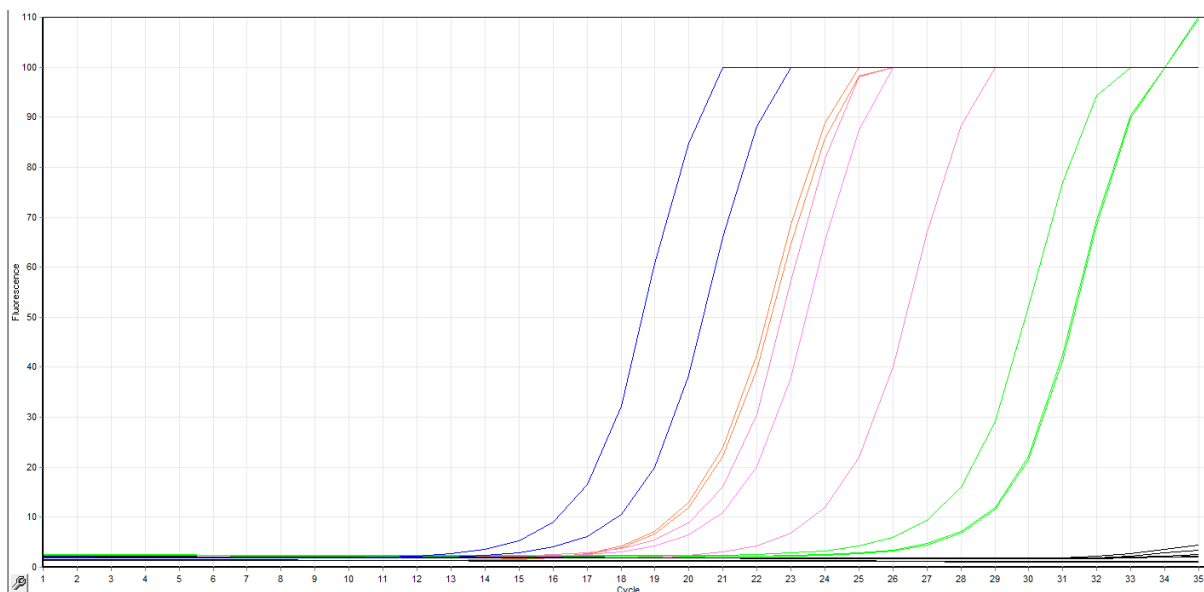
Tabulka 17: Koncentrace a čistota DNA sbírkových mikroorganismů

Mikroorganismus	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Koncentrace DNA [ng/μl]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,540	0,314	1,72	27,0
<i>Cutibacterium acnes</i>	1,248	0,693	1,73	65,5
<i>Escherichia coli</i>	1,088	0,544	2,00	54,4
<i>Micrococcus luteus</i>	0,117	0,062	1,88	5,9

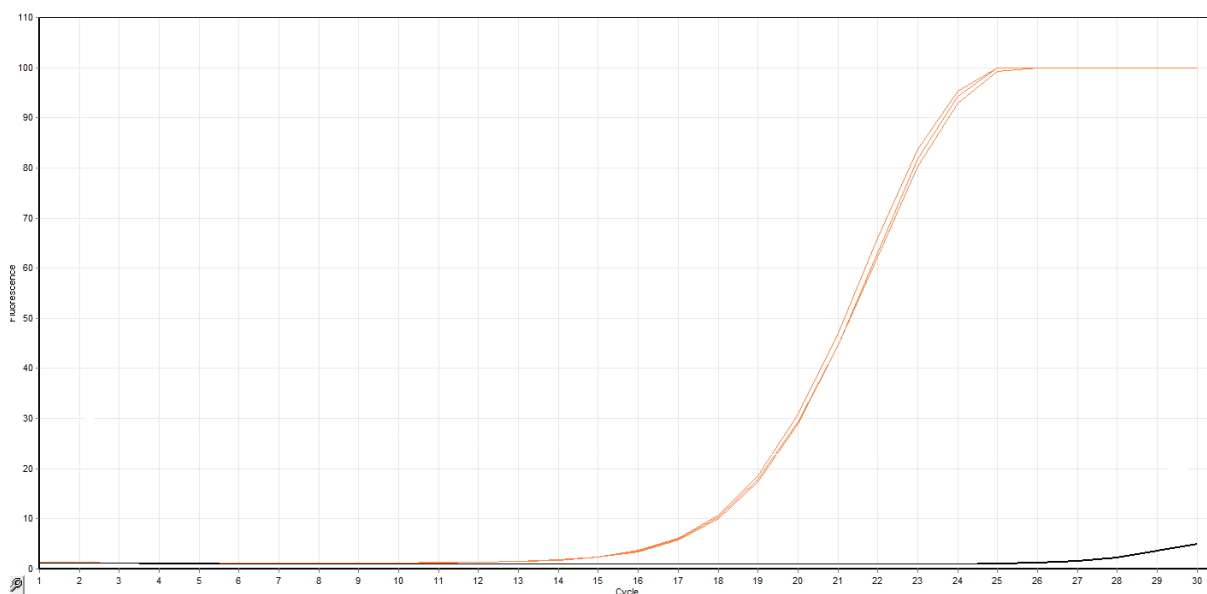
5.3 Výsledky qPCR pro DNA izolovaných ze sbírkových kmenů mikroorganismů

Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena PCR dle postupu a programu v kapitole 4.7. Na Obrázku 25 lze vidět amplifikační křivky bakteriální DNA izolované ze sbírkových kmenů mikroorganismů. Byly použity primery 16Sekont_F a 16Sekont_R specifické pro doménu *Bacteria* (modrá), primery femA-SE_R a femA-SE_F specifické pro *Staphylococcus epidermidis* (oranžová), primery ML-ISR_F a ML-ISR_R specifické pro *Micrococcus luteus* (zelená) a primery uspA Up a uspA Down specifické pro *Escherichia coli* (růžová). Na Obrázku 26 lze vidět amplifikační křivky bakteriální DNA izolované ze sbírkových kmenů mikroorganismů, kde byly použity primery CA_F a CA_R specifické pro *Cutibacterium acnes*. Výsledky qPCR ukazují, že došlo ke specifické amplifikaci a tedy byla úspěšně

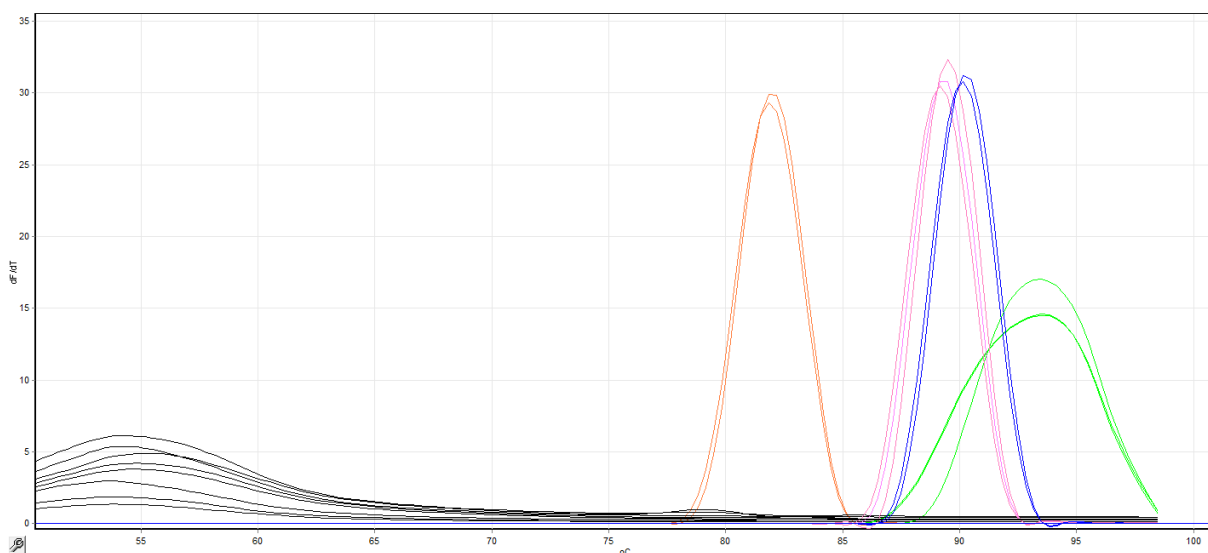
izolována DNA všech sbírkových kmenů mikroorganismů. Ta byla dále použita ve všech reakčních směsích jako pozitivní kontrola.



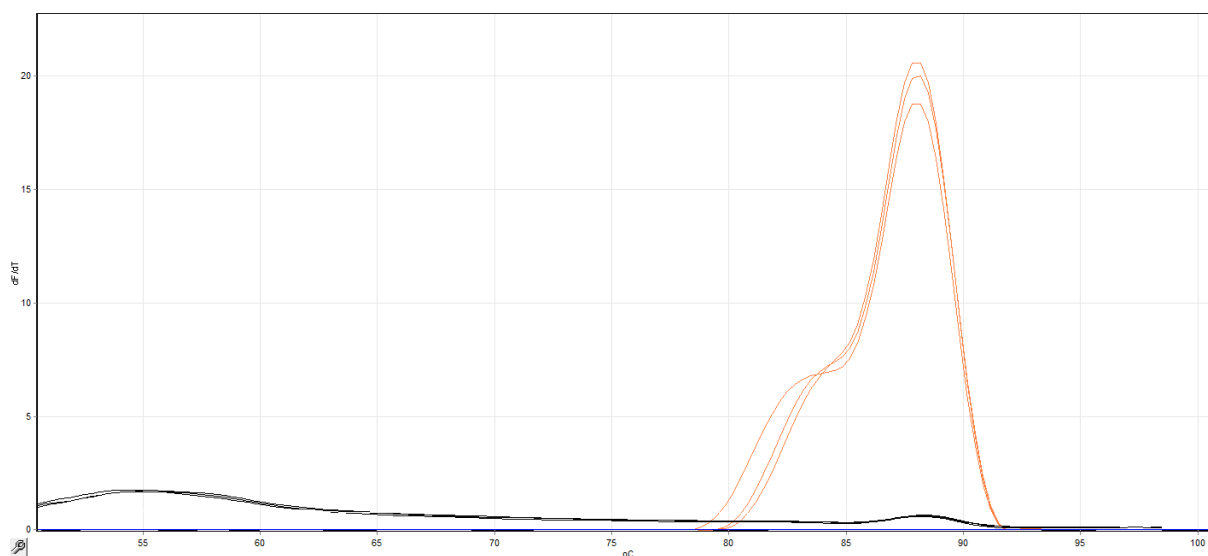
Obrázek 25: Amplifikační křivky DNA izolovaných ze sbírkových kmenů mikroorganismů, oranžová - PK *Staphylococcus epidermidis*, modrá - PK doména Bacteria, zelená PK *Micrococcus luteus*, růžová - PK *Escherichia coli*, černá - NK



Obrázek 26: Amplifikační křivka DNA izolovaných ze sbírkových kmenů mikroorganismů, oranžová - PK *Cutibacterium acnes*, černá - NK



Obrázek 27: Analýza křivek tání DNA izolovaných ze sbírkových kmenů mikroorganismů, oranžová - PK *Staphylococcus epidermidis*, modrá - PK bakterie, zelená PK *Micrococcus luteus*, růžová - PK *Escherichia coli*, černá - NK



Obrázek 28: Analýza křivky tání DNA izolovaných ze sbírkových mikroorganismů, oranžová - PK *Cutibacterium acnes*, černá - NK

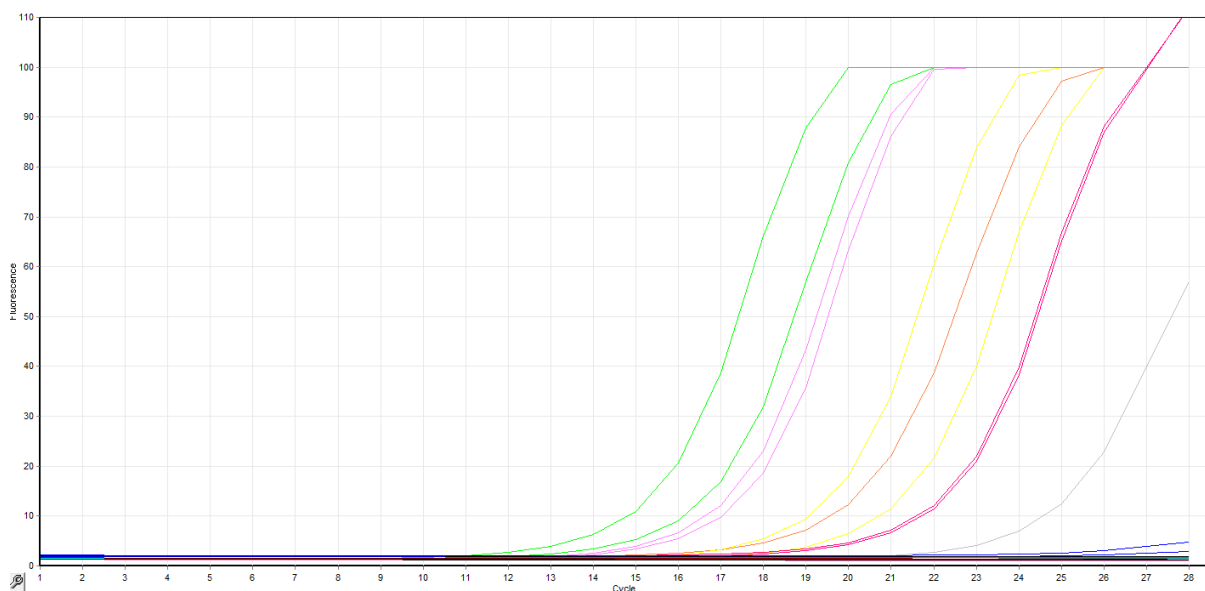
Pomocí analýzy křivek tání uvedených na Obrázku 27 a Obrázku 28 byly zjištěny teploty tání specifických produktů. Teplota tání PCR produktů pro *Staphylococcus epidermidis* s primery femA-SE_F a femA-SE_R je 82°C, pro *Micrococcus luteus* s primery ML-ISR_F a ML-ISR_R je 93°C, pro doménu *Bacteria* s primery 16Sekont_F a 16Sekont_R je 90°C, pro *Escherichia coli* s primery uspA Up a uspA Down je 89°C a pro *Cutibacterium acnes* s primery CA_F a CA_R je 88°C.

5.3.1 Ověření specifity primerů

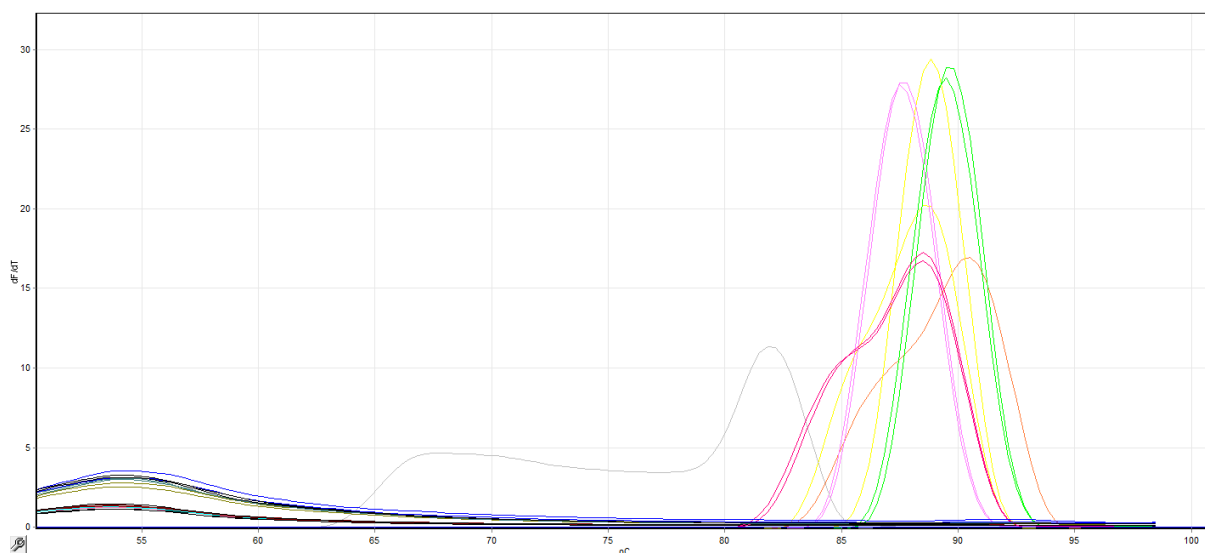
Pro ověření, že jsou primery specifické pouze pro daný mikroorganismus, byla k primerům přidána DNA ostatních vybraných kontrolních mikroorganismů, tedy *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Cutibacterium acnes* a *Escherichia coli*.

U primerů ML-ISR-f a ML-ISR-r došlo k amplifikaci při použití matrice DNA *Micrococcus luteus* - oranžová, *Escherichia coli* - žlutá, *Staphylococcus epidermidis* - fialová i *Cutibacterium acnes* - zelená. Primery pro *Micrococcus luteus* tedy nejsou specifické pouze na *Micrococcus luteus* a z dalších experimentů byly vyřazeny. Výsledky viz Obrázek 29 a Obrázek 30.

U ostatních primerů, konkrétně femA-SE_F a femA-SE_R pro *Staphylococcus epidermidis*, CA-F a CA-R pro *Cutibacterium acnes* a uspA Up a uspA Down pro *Escherichia coli*, došlo pouze ke specifické amplifikaci.



Obrázek 29: Amplifikační křivky - ověření specifity primerů

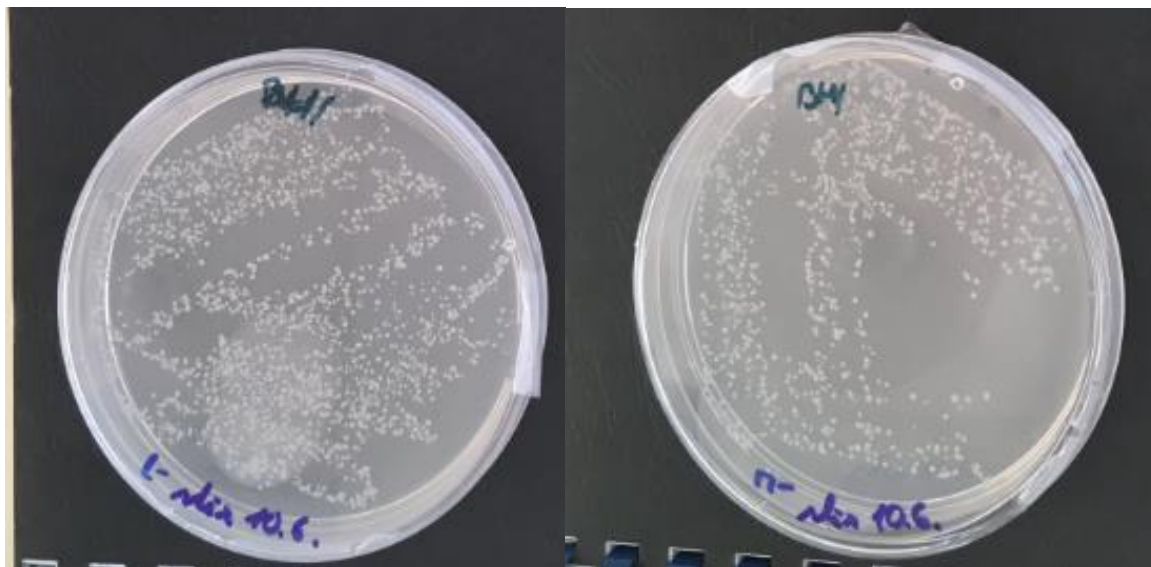


Obrázek 30: Analýza křivek tání - ověření specifity primerů

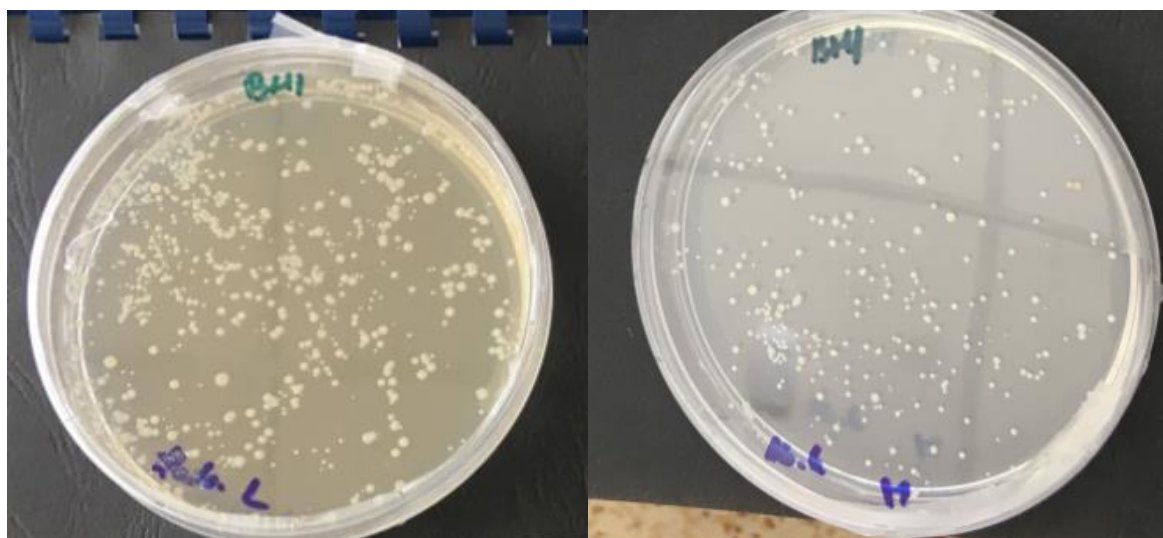
5.4 Izolace DNA ze stěrů z kůže čela respondentek

Postup izolace DNA je uveden v kapitole 4.6. Byly kultivovány vždy 3 Petriho misky se stěry od každé respondentky. Z každé Petriho misky bylo odebráno shodně 20 kolonií. Tím bylo získáno vždy 60 kolonií respondentky „L“ a „M“. Kolonie 1 až 20 byly odebrány

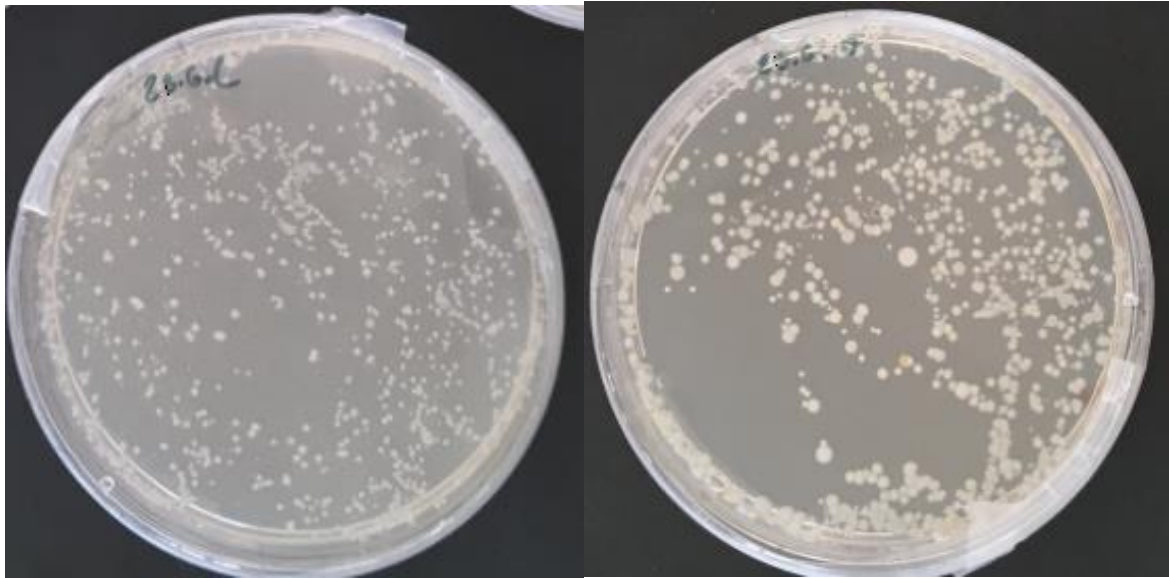
z Petriho misky č. 1, kolonie 21 až 40 z Petriho misky č. 2 a kolonie 41 až 60 z Petriho misky č. 3. Následující obrázky zobrazují narostlé kolonie po 24 hodinové kultivaci. Obrázek 31 zobrazuje narostlé kolonie získané ze stěrů z čela respondentek před používáním polysacharidů. Obrázek 32 zobrazuje narostlé kolonie získané ze stěrů z čela respondentek po týdenním používání polysacharidu Nano moist a Obrázek 33 pak zobrazuje kolonie získané ze stěrů z čela respondentek po týdenním používání polysacharidu PoLevan S.



Obrázek 31: Petriho misky porostlé koloniemi po 24 hodinové kultivaci před používáním kosmetických polysacharidů u respondentky „L“ (vlevo) a respondentky „M“ (vpravo)



Obrázek 32: Petriho misky porostlé koloniemi po 24 hodinové kultivaci po používání polysacharidu Nano moist u respondentky „L“ (vlevo) a respondentky „M“ (vpravo)



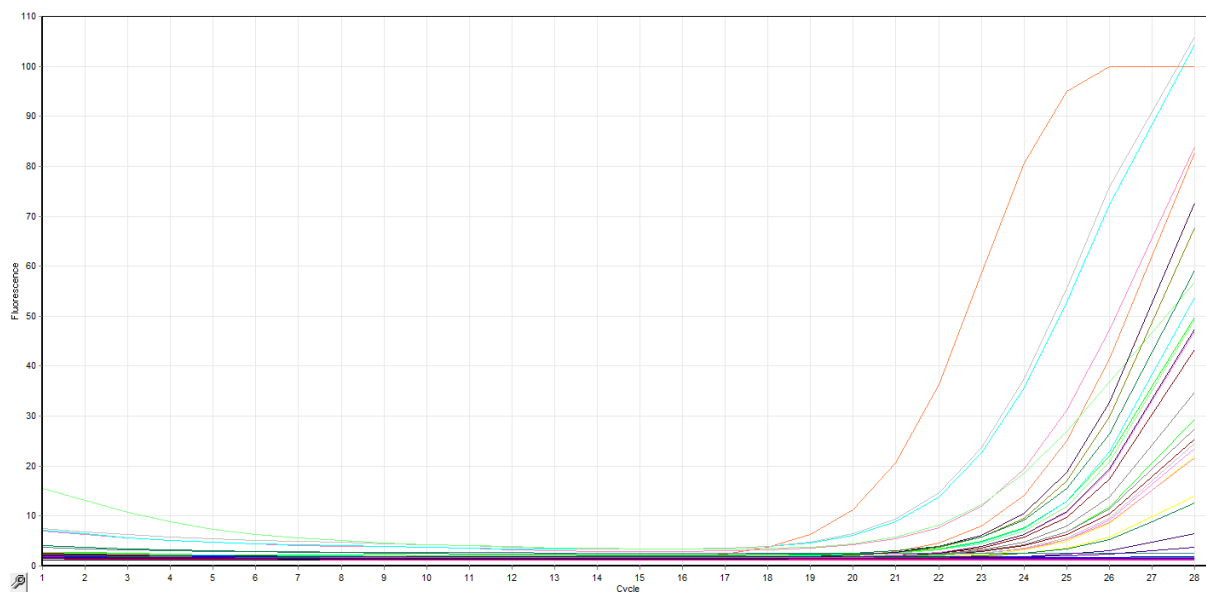
Obrázek 33: Petriho misky porostlé koloniemi po 24 hodinové kultivaci po používání polysacharidu PoLevan S u respondentky „L“ (vlevo) a respondentky „M“ (vpravo)

5.5 Výsledky qPCR před používáním kosmetických polysacharidů

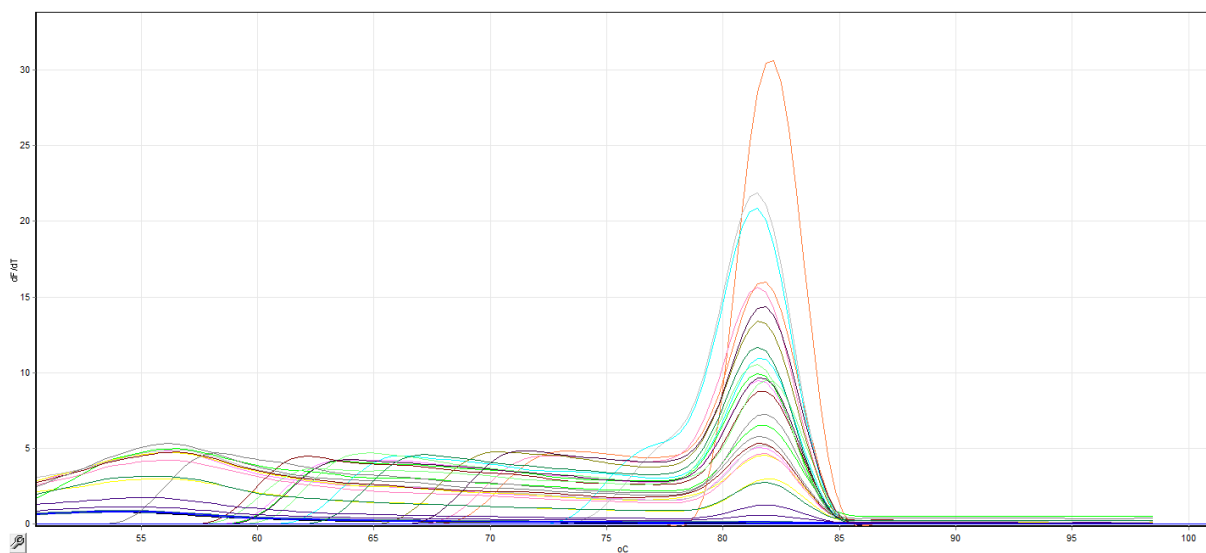
Stěry před používáním kosmetických polysacharidů sloužily ke zjištění, jaké mikroorganismy mikrobiomu jsou na kůži respondentek zastoupeny, jaká je jeho variabilita a jak se bude následně měnit s používáním kosmetických polysacharidů. Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena PCR dle postupu a programu v kapitole 4.7

5.5.1 *Staphylococcus epidermidis*

Nejprve byla provedena qPCR za použití primerů femA-SE_F a femA-SE_R, jelikož bakterie *Staphylococcus epidermidis* by měla být na kůži zastoupena v největší míře. Pro přehlednost jsou na následujících obrázcích zobrazeny pouze vybrané amplifikační křivky a analýzy křivek tání. Další jsou zobrazeny v přílohách. Obrázek 34 znázorňuje amplifikační křivku DNA kolonií 1 až 32 respondentky „L“. Obrázek 35 pak znázorňuje analýzu křivek tání těchto kolonií.



Obrázek 34: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „L“ s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R* specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



Obrázek 35: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „L“ s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R* specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá

V Tabulce 18 je uveden přehled výsledků qPCR stěrů před používáním kosmetických polysacharidů. Kolonie 1 až 20 byly odebrány z Petriho misky č. 1, kolonie 21 až 40 z Petriho misky č. 2 a kolonie 41 až 60 z Petriho misky č. 3. U respondentky „L“ nebyla detekována přítomnost DNA *Staphylococcus epidermidis* u kolonií č. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56 a 58 a tyto kolonie byly postupně otestovány na další vybrané mikroorganismy. U kolonií č. 31, 32, 54 a 55 došlo k velmi slabé amplifikaci specifických produktů, proto bylo následně gelovou elektroforézou ověřeno, zda se jedná o bakterii *Staphylococcus epidermidis* či nikoliv. U respondentky „M“ nebyla detekována přítomnost DNA *Staphylococcus epidermidis* u kolonií č. 2, 6, 7, 8, 30, 31, 32, 54, 55 a 56. Zde lze také pozorovat vyšší zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis* ještě před používáním kosmetických polysacharidů. Všechny zbylé kolonie, u kterých nebyl detekován produkt

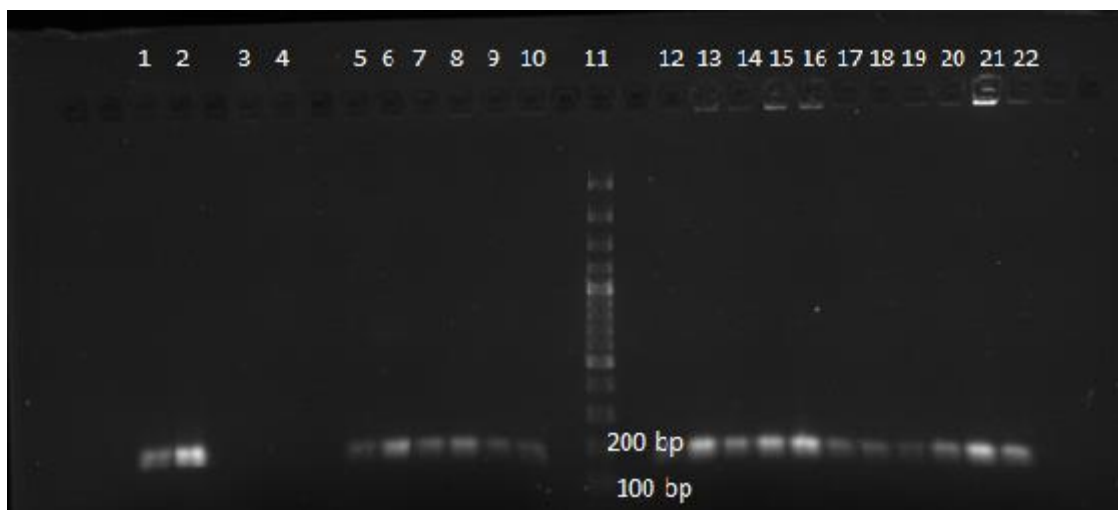
qPCR s primery femA-SE_F a femA-SE_R byly následně otestovány na další vybrané mikroorganismy.

Tabulka 18: Přehled výsledků qPCR s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE

kolonie - responden- tka „L“	amplifik- ace SE	kolonie - responden- tka „L“	amplifik- ace SE	kolonie - responden- tka „M“	amplifik- ace SE	kolonie - responden- tka „M“	amplifik- ace SE
1	+	31	+	1	+	31	-
2	+	32	+	2	-	32	-
3	+	33	+	3	+	33	+
4	+	34	+	4	+	34	+
5	+	35	+	5	+	35	+
6	+	36	+	6	-	36	+
7	+	37	+	7	-	37	+
8	+	38	+	8	-	38	+
9	+	39	+	9	+	39	+
10	+	40	+	10	+	40	+
11	+	41	+	11	+	41	+
12	+	42	-	12	+	42	+
13	+	43	-	13	+	43	+
14	+	44	-	14	+	44	+
15	+	45	-	15	+	45	+
16	+	46	-	16	+	46	+
17	+	47	-	17	+	47	+
18	-	48	-	18	+	48	+
19	-	49	+	19	+	49	+
20	-	50	+	20	+	50	+
21	-	51	+	21	+	51	+
22	-	52	+	22	+	52	+
23	-	53	+	23	+	53	+
24	-	54	-	24	+	54	-
25	+	55	-	25	+	55	-
26	+	56	-	26	+	56	-
27	+	57	+	27	+	57	+
28	+	58	-	28	+	58	+
29	+	59	+	29	+	59	+
30	+	60	+	30	-	60	+

5.5.1.1 Elektroforéza produktů qPCR s primery femA-SE_F a femA-SE_R

Po počátečním otestování všech kolonií za použití primerů femA-SE_F a femA-SE_R pro *Staphylococcus epidermidis* byly všechny produkty qPCR podrobeny agarózové gelové elektroforéze pro ověření velikosti PCR produktů. Elektroforézy produktů qPCR byly provedeny v 1,5% agarózovém gelu. Amplikony mají velikost přibližně 170 bp. Pro přehlednost je na Obrázku 36 uveden snímek elektroforézy s koloniemi 1 až 17 respondentky „L“. Všechny ostatní jsou uvedeny v přílohách.



Běh	DNA	Detekce
1	PK	++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 1	+
6	respondentka „L“ kolonie 2	++
7	respondentka „L“ kolonie 3	+
8	respondentka „L“ kolonie 4	++
9	respondentka „L“ kolonie 5	+
10	respondentka „L“ kolonie 6	+
11	DNA Standard 100 bp	-
12	respondentka „L“ kolonie 7	+
13	respondentka „L“ kolonie 8	++
14	respondentka „L“ kolonie 9	+
15	respondentka „L“ kolonie 10	++
16	respondentka „L“ kolonie 11	+++
17	respondentka „L“ kolonie 12	+
18	respondentka „L“ kolonie 13	+
19	respondentka „L“ kolonie 14	+
20	respondentka „L“ kolonie 15	+
21	respondentka „L“ kolonie 16	+++
22	respondentka „L“ kolonie 17	++

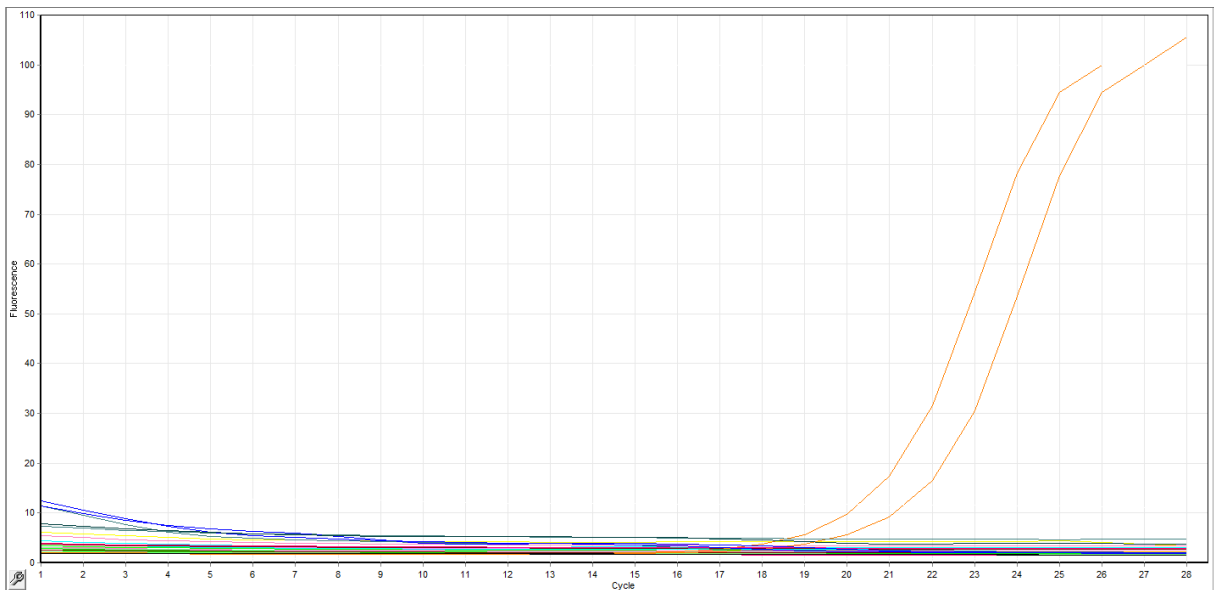
Obrázek 36: Agarózový gel s produkty PCR specifickými pro SE s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R* (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)

Výsledky elektroforézy potvrzují výsledky analýzy křivek tání, tedy že u respondentky „L“ nabyla detekována přítomnost DNA *Staphylococcus epidermidis* u kolonií č. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56 a 58. Bylo nutné ověřit přítomnost specifických amplikonů kolonií č. 31, 32, 54 a 55, jelikož amplifikační křivky těchto vzorků byly nepatrné. Elektroforézou bylo ověřeno, že se o bakterii *Staphylococcus epidermidis* jedná ve všech 4 případech. U respondentky „M“ nedošlo k amplifikaci DNA u kolonií č. 2, 6, 7, 8, 30, 31, 32, 54, 55 a 56. Bylo potvrzeno gelovou elektroforézou, že se nejedná o bakterii *Staphylococcus epidermidis*. Negativní kontroly byly čisté ve všech případech a délka specifických produktů

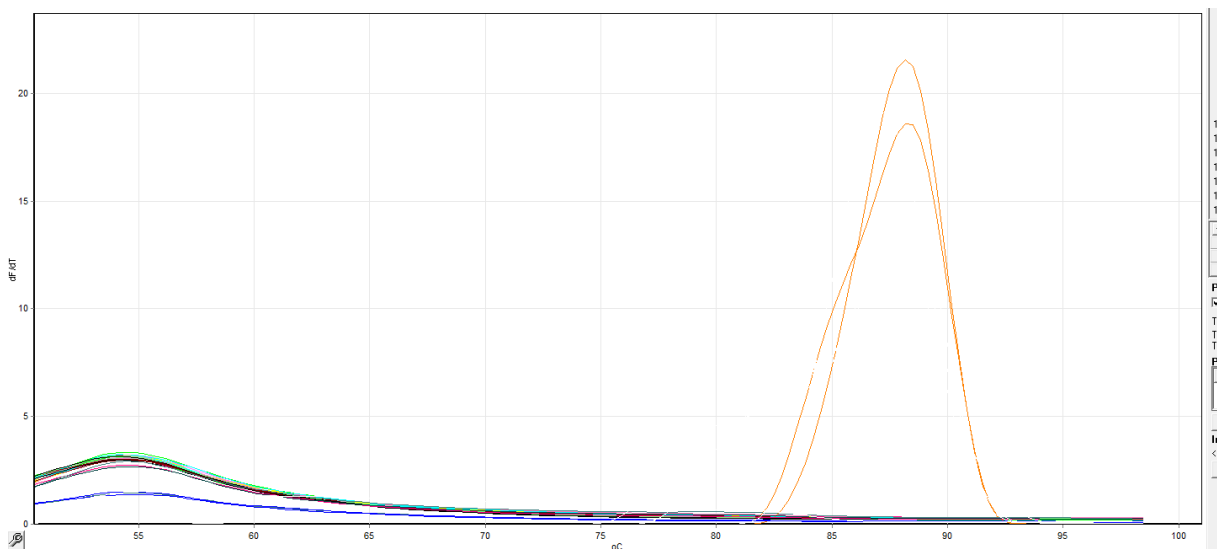
se pohybovala okolo 170 bp, což odpovídá zjištěné hodnotě délky ampliconů pomocí vyhledávače Primer-Blast.

5.5.2 *Escherichia coli*

Primery *uspA* Up a *uspA* Down byly použity pro qPCR zbylých vzorků kolonií, ve kterých nebyla detekována přítomnost DNA bakterie *Staphylococcus epidermidis*. U respondentky „L“ se jednalo o kolonie 18, 19 a 20 z Petriho misky č. 1, o kolonie 21, 22, 23 a 24 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56 a 58 z Petriho misky č. 3. U respondentky „M“ se jednalo o kolonie 2, 6, 7 a 8 z Petriho misky č. 1, o kolonie 30, 31 a 32 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 54, 55 a 56 z Petriho misky č. 3.



Obrázek 37: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií s primery *uspA* Up a *uspA* specifickými pro *EC*, *PK* - oranžová, *NK* - černá



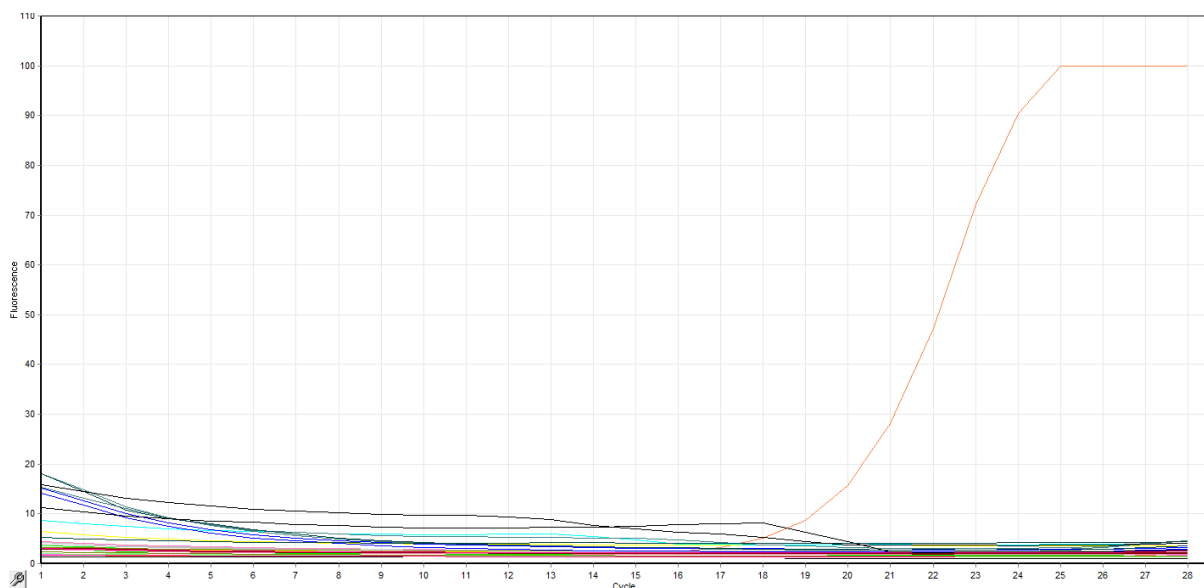
Obrázek 38: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií s primery *uspA* Up a *uspA* specifickými pro *EC*, *PK* - oranžová, *NK* - černá

Z Obrázku 37 a Obrázku 38 je patrné, že ani DNA bakterie *Escherichia coli* nebyly detekovány. *Escherichia coli* je fekální bakterie a na kůži by se neměla vyskytovat. Proto zde

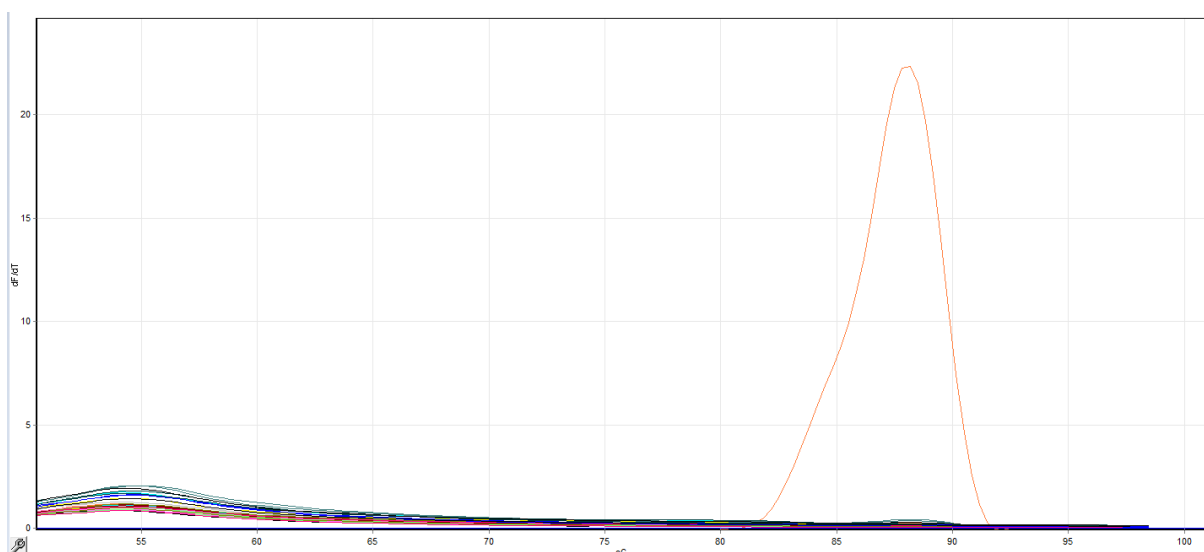
byla očekávána její minimální přítomnost. Produkt qPCR byl detekován pouze u pozitivní kontroly. Protože nebyla pozorována amplifikace cílové sekvence v žádném ze sledovaných vzorků, nebylo potřeba ověřovat velikost produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy.

5.5.3 *Cutibacterium acnes*

Primery CA-F a CA-R specifické pro *Cutibacterium acnes* byly stejně jako v případě bakterie *Escherichia Coli* použity pro zbylé vzorky, ve kterých nebyla detekována bakterie *Staphylococcus epidermidis* ani *Escherichia coli*. U respondentky „L“ se jednalo o kolonie 18, 19 a 20 z Petriho misky č. 1, o kolonie 21, 22, 23 a 24 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56 a 58 z Petriho misky č. 3. U respondentky „M“ se jednalo o kolonie 2, 6, 7 a 8 z Petriho misky č. 1, o kolonie 30, 31 a 32 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 54, 55 a 56 z Petriho misky č. 3.



Obrázek 39: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií s primery CA-F a CA-R specifickými pro *Cutibacterium acnes*, PK - oranžová, NK- černá

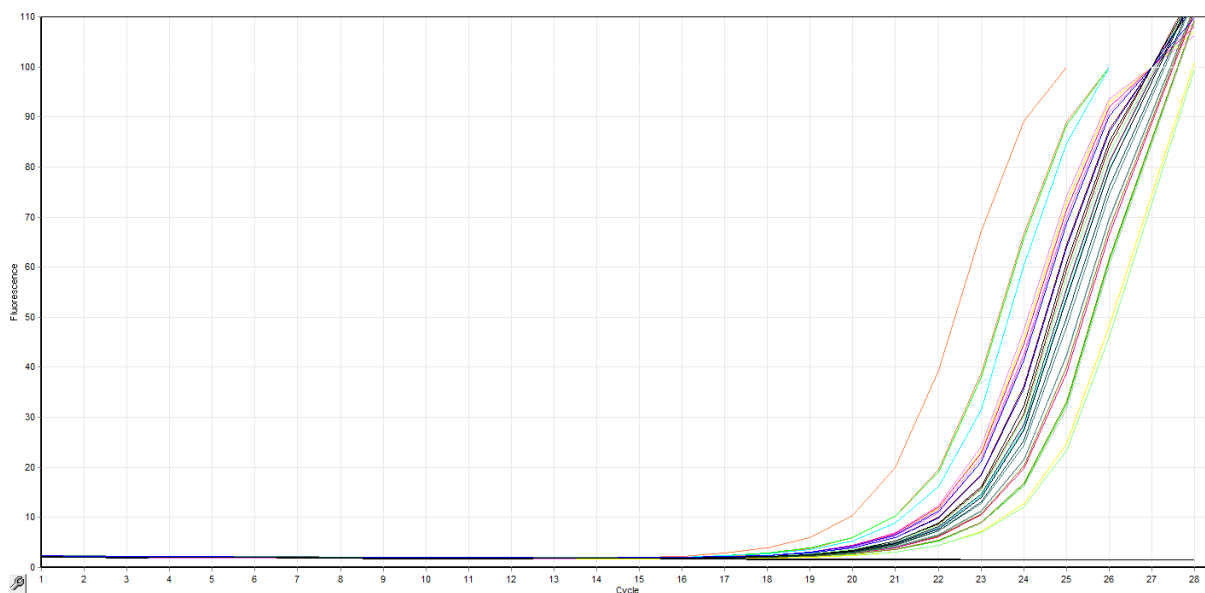


Obrázek 40: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií s primery CA-F a CA-R specifickými pro *Cutibacterium acnes*, PK - oranžová, NK- černá

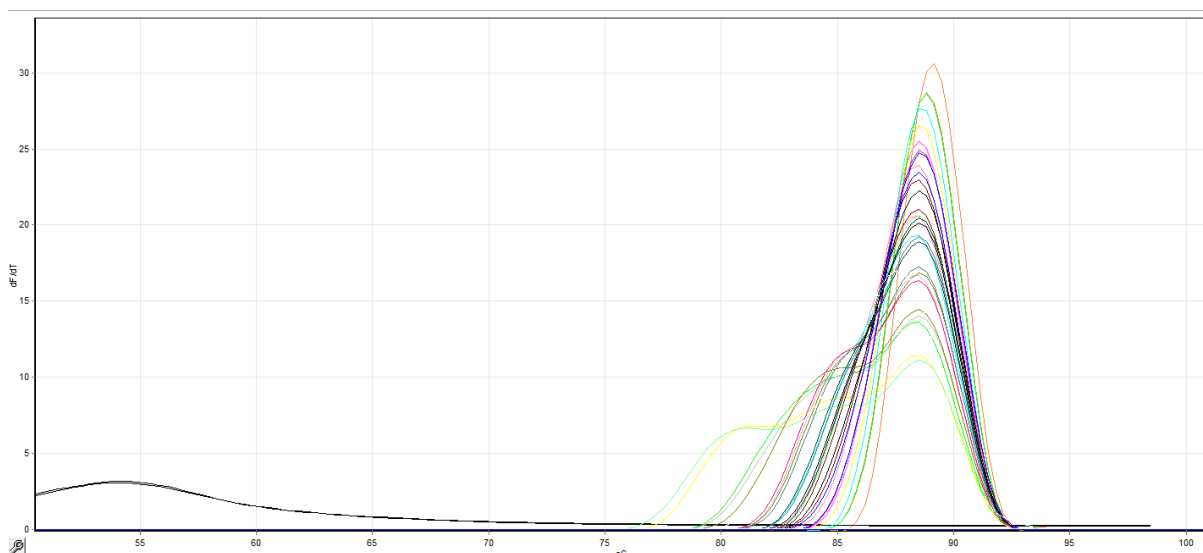
Z Obrázku 39 a Obrázku 40 je patrné, že ani DNA bakterie *Cutibacterium acnes* nebyla detekována. *Cutibacterium acnes* je bakterie, která se na kůži běžně vyskytuje. Jde ale anaerobní bakterii, proto spíše než na povrchu kůže, ji můžeme nalézt v rohové vrstvě. Z tohoto důvodu nemohla být bakterie pouhým stěrem z povrchu kůže zachycena a následně detekována. Produkt qPCR byl detekován pouze u pozitivní kontroly. Protože nebyla pozorována amplifikace cílové sekvence v žádném ze sledovaných vzorků, nebylo potřeba ověřovat velikost produktů pomocí agarozové gelové elektroforézy.

5.5.4 Doména Bakterie

Primery 16Sekont-F a 16Sekont-R jsou specifické pro doménu *Bacteria*. Lze zjistit přítomnost bakterií, ale nelze přesněji určit konkrétní kmen. Tyto primery byly opět použity na zbylé vzorky, u nichž nebyla zjištěna přítomnost DNA bakterií *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes* ani *Escherichia coli*. U respondentky „L“ se jednalo o kolonie 18, 19 a 20 z Petriho misky č. 1, o kolonie 21, 22, 23 a 24 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56 a 58 z Petriho misky č. 3. U respondentky „M“ se jednalo o kolonie 2, 6, 7 a 8 z Petriho misky č. 1, o kolonie 30, 31 a 32 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 54, 55 a 56 z Petriho misky č. 3. Amplifikační křivky DNA těchto kolonií lze vidět na Obrázku 41. Na Obrázku 42 pak analýzu křivek tání.



Obrázek 41: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií s primery 16Sekont-F a 16Sekont-R specifickými pro doménu *Bacteria*, PK - oranžová, NK- černá

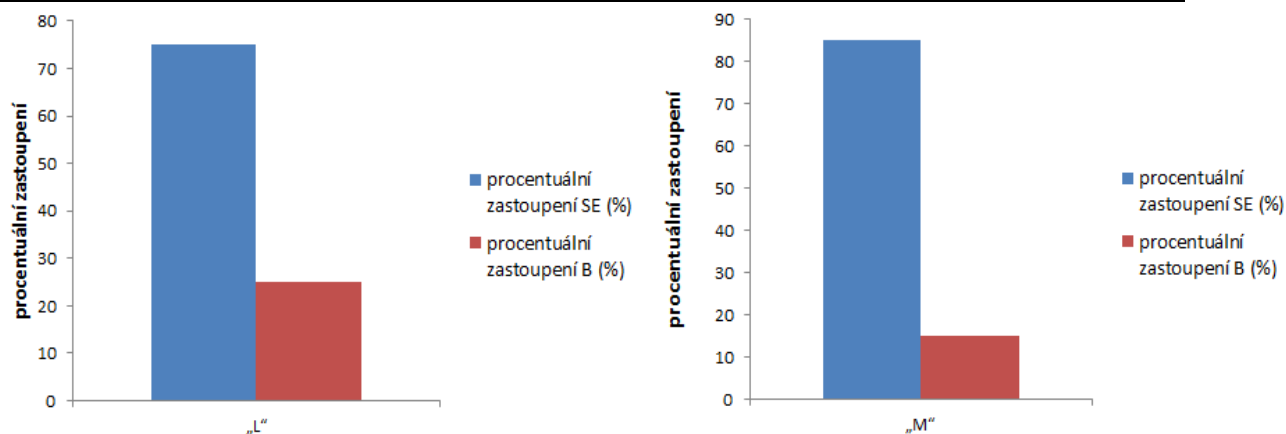


Obrázek 42: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií s primery 16Sekont-F a 16Sekont-R specifickými pro doménu Bacteria, PK - oranžová, NK- černá

V případě použití primerů 16Sekont-F a 16Sekont-R byl produkt qPCR detekován u všech zbylých vzorků. Tabulka 19 ukazuje průměrné zastoupení mikroorganismů izolovaných z jedné Petriho misky (=20 kolonií). Zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis* je u obou respondentek vysoké. U respondentky „L“ byla tato bakterie zastoupena průměrně v 75 %, u respondentky „M“ průměrně v 85 %. U respondentky „M“ je tedy vidět o něco vyšší zastoupení této bakterie. Ale naopak je zde menší variabilita mikrobiomu a bakterie *Staphylococcus epidermidis* opravdu převládá. Poměr bakterie *Staphylococcus epidermidis* k ostatním bakteriím u obou respondentek znázorňuje ještě Obrázek 43.

Tabulka 19: Průměrné zastoupení mikroorganismů vztahované na jednu Petriho misku (20 kolonií)

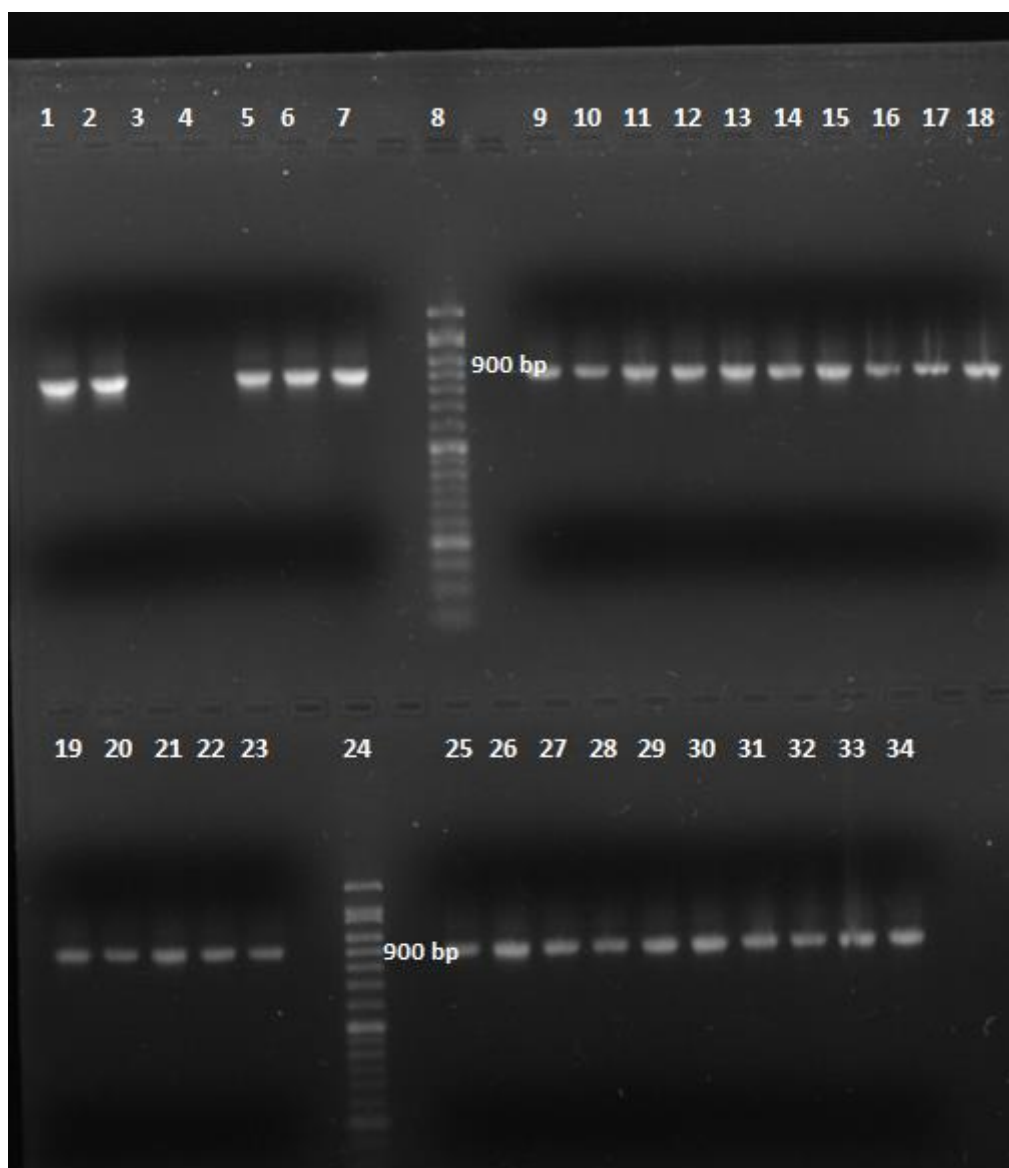
respondentka	průměrné zastoupení SE (počet kolonií)	procentuální zastoupení SE (%)	průměrné zastoupení B (počet kolonií)	procentuální zastoupení B (%)
„L“	15	75	5	25
„M“	17	85	3	15



Obrázek 43: Procentuální zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*

5.5.4.1 Elektroforéza produktů qPCR s primery 16Sekont-F a 16Sekont-R

V případě použití primerů 16Sekont-F a 16Sekont-R specifických pro doménu *Bacteria* byl produkt qPCR detekován u všech zbylých vzorků. U respondentky „L“ se jednalo o kolonie 18, 19 a 20 z Petriho misky č. 1, o kolonie 21, 22, 23 a 24 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56 a 58 z Petriho misky č. 3. U respondentky „M“ se jednalo o kolonie 2, 6, 7 a 8 z Petriho misky č. 1, o kolonie 30, 31 a 32 z Petriho misky č. 2 a o kolonie 54, 55 a 56 z Petriho misky č. 3. Amplifikace těchto kolonií byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou, jejíž výsledek je zobrazen na Obrázku 44. Výsledky elektroforézy potvrzují výsledky z analýzy křivek tání a u všech zbylých kolonií byla zjištěna přítomnost DNA z domény *Bacteria*.



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 18	+++

6	respondentka „L“ kolonie 19	+++
7	respondentka „L“ kolonie 20	+++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „L“ kolonie 21	++
10	respondentka „L“ kolonie 22	++
11	respondentka „L“ kolonie 23	++
12	respondentka „L“ kolonie 24	++
13	respondentka „L“ kolonie 42	++
14	respondentka „L“ kolonie 43	++
15	respondentka „L“ kolonie 44	++
16	respondentka „L“ kolonie 45	++
17	respondentka „L“ kolonie 46	++
18	respondentka „L“ kolonie 47	++
19	respondentka „L“ kolonie 48	++
20	respondentka „L“ kolonie 56	++
21	respondentka „L“ kolonie 58	++
22	respondentka „M“ kolonie 2	++
23	Standard DNA 50 bp	-
24	respondentka „M“ kolonie 6	++
25	respondentka „M“ kolonie 7	++
26	respondentka „M“ kolonie 8	++
27	respondentka „M“ kolonie 30	++
28	respondentka „M“ kolonie 31	++
29	respondentka „M“ kolonie 32	++
30	respondentka „M“ kolonie 54	++
31	respondentka „M“ kolonie 55	++
32	respondentka „M“ kolonie 56	++
33	PK	++
34	PK	++

Obrázek 44: Agarózový gel s produkty qPCR s primery 16Sekont-F a 16Sekont-R specifickými pro doménu Bacteria (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)

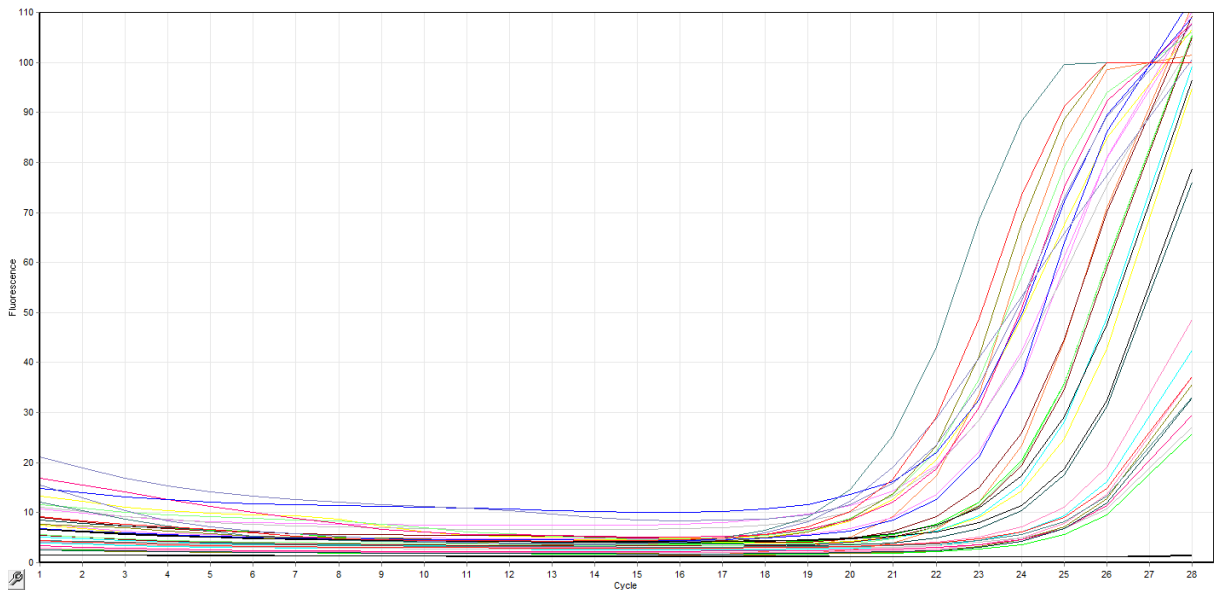
5.6 Výsledky qPCR po týdenním používání polysacharidu Nanomoist

Respondentky si po dobu jednoho týdne ve stejnou dobu aplikovaly 100 µl polysacharidu Nanomoist na kůži čela. Po této době byl proveden stěr a izolace DNA podle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Opět byly kultivovány 3 Petriho misky a z každé bylo odebráno shodně 20 kolonií. Všechny 60 kolonií respondentky „L“ a „M“ bylo otestováno na vybrané mikroorganismy. Jelikož analýzami stěrů před používáním polysacharidů bylo potvrzeno, že bakterie *Staphylococcus epidermidis* se na kůži nachází v největší míře, byly izolované kolonie opět nejprve otestovány na přítomnost DNA této bakterie. Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena PCR dle postupu a programu v kapitole 4.7

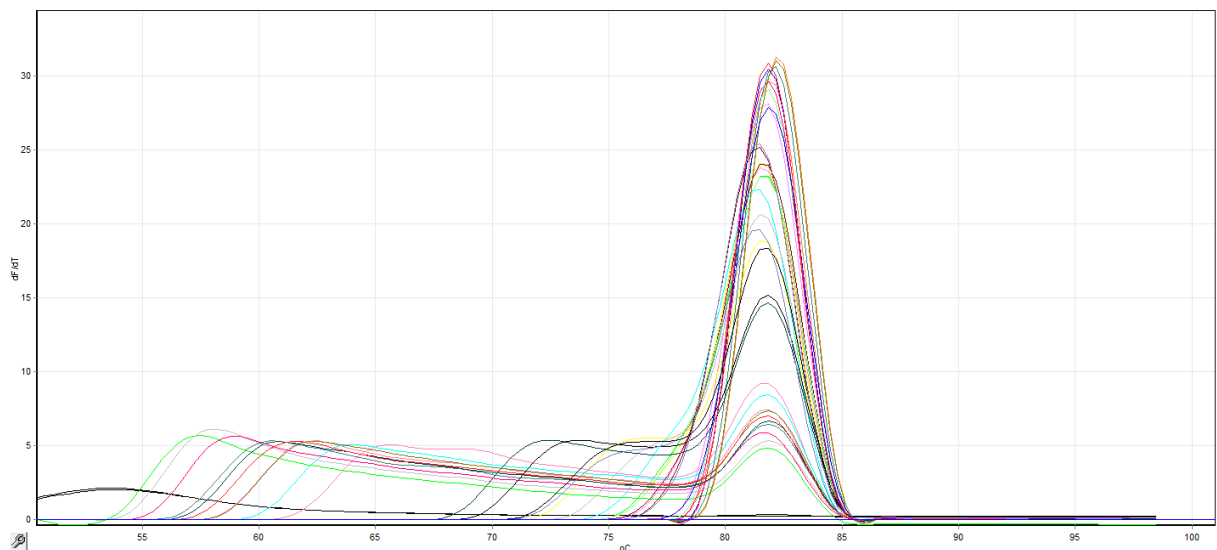
5.6.1 *Staphylococcus epidermidis*

Nejprve byla opět provedena qPCR za použití primerů femA-SE_F a femA-SE_R, jelikož bakterie *Staphylococcus epidermidis* by měla být na kůži zastoupena v největší míře, což již bylo potvrzeno výsledky analýz stěrů před používáním kosmetických polysacharidů. Pro

přehlednost jsou na následujících obrázcích zobrazeny pouze vybrané amplifikační křivky a analýzy křivek tání. Další jsou zobrazeny v přílohách. Obrázek 45 znázorňuje amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „M“ s primery femA-SE_F a femA-SE_R a Obrázek 46 pak analýzu křivek tání těchto kolonií.



Obrázek 45: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „M“ s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK - černá



Obrázek 46: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „M“ s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK - černá

V Tabulce 20 je uveden přehled výsledků qPCR po používání kosmetického polysacharidu Nano moist. U respondentky „L“ nebyla detekována přítomnost DNA *Staphylococcus epidermidis* u kolonií č. 30 a 31. U respondentky „M“ byl produkt qPCR detekován ve všech případech, tedy ve všech izolovaných koloniích byla zjištěna přítomnost DNA bakterie *Staphylococcus epidermidis*. V porovnání se stěry, které byly provedeny před používáním kosmetických polysacharidů, můžeme vidět, že došlo k výraznému zvýšení zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Tento polysacharid tedy může pozitivně působit na její růst a vystupovat jako prebiotikum. Tento pozitivní vliv kosmetických polysacharidů byl

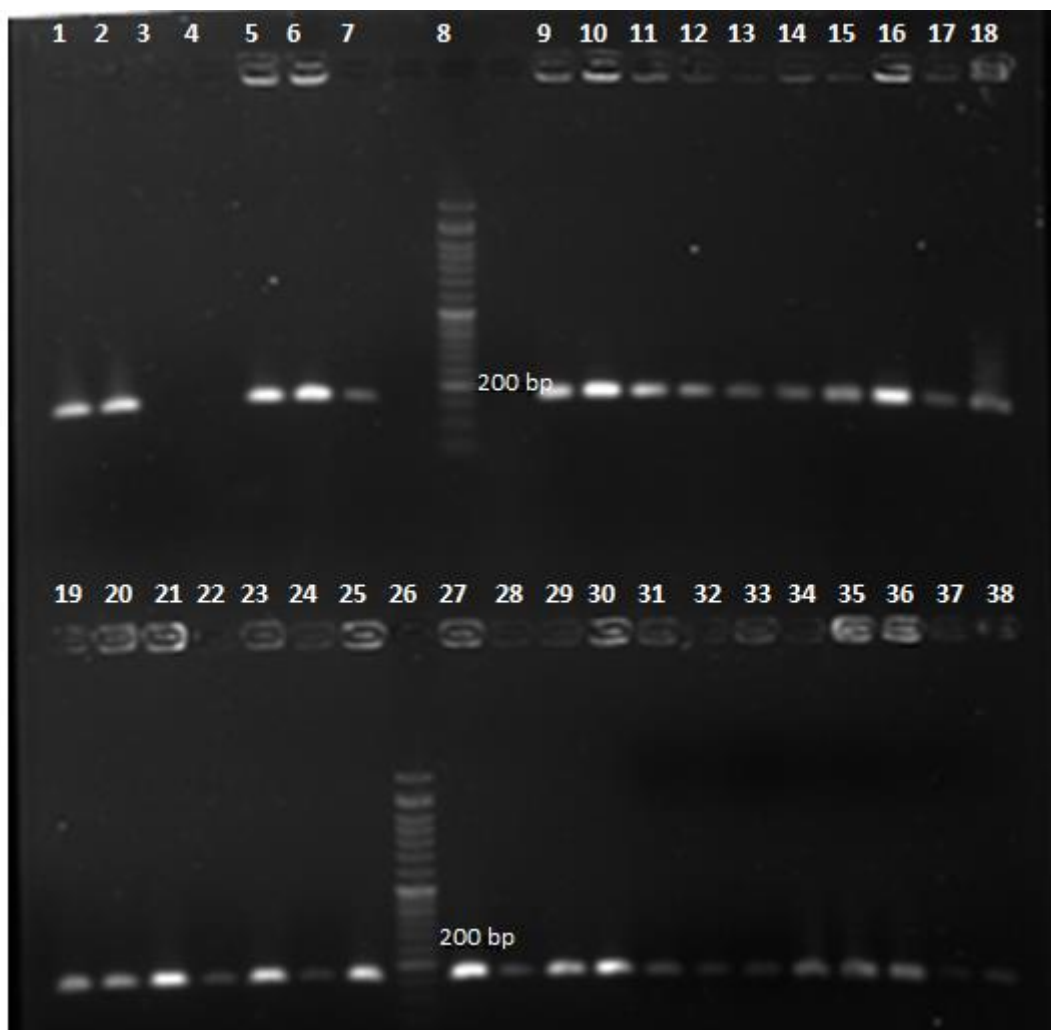
pozorován i v případě antimikrobiálních testů. Zároveň může růst bakterie *Staphylococcus epidermidis* negativně ovlivňovat další mikroorganismy mikrobiomu kůže a její zastoupení je tak nejvyšší. Všechny zbylé DNA kolonií, u kterých nebyl detekován produkt qPCR s primery femA-SE_F a femA-SE_R, byly následně otestovány na další vybrané mikroorganismy.

Tabulka 20: Přehled výsledků qPCR s primery pro SE specifickými pro *Staphylococcus epidermidis*

kolonie - responde ntka „L“	amplifik ace SE	kolonie - responde ntka „L“	amplifik ace SE	kolonie - responde ntka „M“	amplifik ace SE	kolonie - responde ntka „M“	amplifik ace SE
1	+	31	-	1	+	31	+
2	+	32	+	2	+	32	+
3	+	33	+	3	+	33	+
4	+	34	+	4	+	34	+
5	+	35	+	5	+	35	+
6	+	36	+	6	+	36	+
7	+	37	+	7	+	37	+
8	+	38	+	8	+	38	+
9	+	39	+	9	+	39	+
10	+	40	+	10	+	40	+
11	+	41	+	11	+	41	+
12	+	42	+	12	+	42	+
13	+	43	+	13	+	43	+
14	+	44	+	14	+	44	+
15	+	45	+	15	+	45	+
16	+	46	+	16	+	46	+
17	+	47	+	17	+	47	+
18	+	48	+	18	+	48	+
19	+	49	+	19	+	49	+
20	+	50	+	20	+	50	+
21	+	51	+	21	+	51	+
22	+	52	+	22	+	52	+
23	+	53	+	23	+	53	+
24	+	54	+	24	+	54	+
25	+	55	+	25	+	55	+
26	+	56	+	26	+	56	+
27	+	57	+	27	+	57	+
28	+	58	+	28	+	58	+
29	+	59	+	29	+	59	+
30	-	60	+	30	+	60	+

5.6.1.1 Elektroforéza produktů qPCR s primery femA-SE_R a femA-SE_F

Po počátečním otestování všech kolonií za použití primerů pro *Staphylococcus epidermidis* byly všechny produkty qPCR podrobeny agarózové gelové elektroforéze. Elektroforézy produktů qPCR byly provedeny v 1,5% agarózovém gelu. Délka specifických produktů se pohybovala okolo 170 bp, což odpovídá zjištěné hodnotě délky ampliconů pomocí vyhledávače Primer-Blast. Pro přehlednost je na Obrázku 47 uveden snímek elektroforézy s PCR produkty kolonií 1 až 32 respondentky „M“. Všechny ostatní jsou uvedeny v přílohách.



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „M“ kolonie 1	+++
6	respondentka „M“ kolonie 2	+++
7	respondentka „M“ kolonie 3	++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „M“ kolonie 4	+++
10	respondentka „M“ kolonie 5	+++
11	respondentka „M“ kolonie 6	+++
12	respondentka „M“ kolonie 7	++
13	respondentka „M“ kolonie 8	++
14	respondentka „M“ kolonie 9	++
15	respondentka „M“ kolonie 10	++
16	respondentka „M“ kolonie 11	+++
17	respondentka „M“ kolonie 12	+
18	respondentka „M“ kolonie 13	++
19	respondentka „M“ kolonie 14	++
20	respondentka „M“ kolonie 15	++

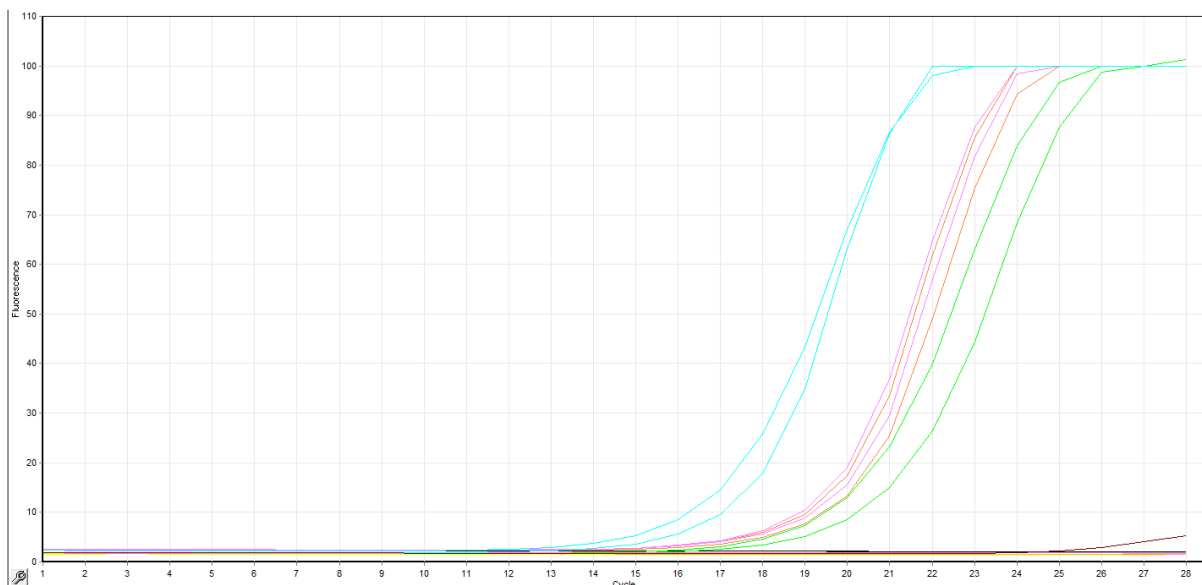
21	respondentka „M“ kolonie 16	+++
22	respondentka „M“ kolonie 17	+
23	respondentka „M“ kolonie 18	+++
24	respondentka „M“ kolonie 19	+
25	respondentka „M“ kolonie 20	+++
26	Standard DNA 50 bp	-
27	respondentka „M“ kolonie 21	+++
28	respondentka „M“ kolonie 22	++
29	respondentka „M“ kolonie 23	+++
30	respondentka „M“ kolonie 24	+++
31	respondentka „M“ kolonie 25	++
32	respondentka „M“ kolonie 26	+
33	respondentka „M“ kolonie 27	+
34	respondentka „M“ kolonie 28	++
35	respondentka „M“ kolonie 29	++
36	respondentka „M“ kolonie 30	++
37	respondentka „M“ kolonie 31	+
38	respondentka „M“ kolonie 32	+

Obrázek 47: Agarózový gel s produkty qPCR s primery *femA-SE_R* a *femA-SE_F* specifickými pro *SE* (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)

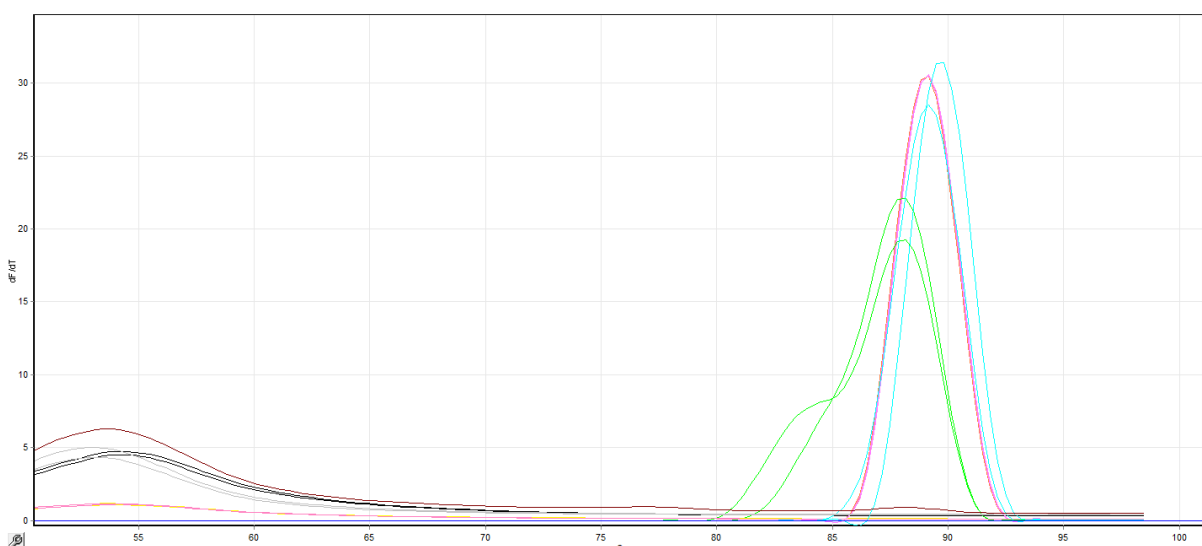
Výsledky elektroforézy potvrzují výsledky analýzy křivek tání, tedy že u respondentky „L“ nebyla detekována přítomnost DNA *Staphylococcus epidermidis* u kolonií č. 30 a 31. U respondentky „M“ došlo k amplifikaci DNA ve všech případech a to se potvrdilo i gelovou elektroforézou, tedy ve všech izolovaných koloniích byla detekována přítomnost DNA bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Negativní kontroly byly čisté ve všech případech a délka specifických produktů se pohybovala okolo 170 bp, což odpovídá zjištěné hodnotě délky ampliconů pomocí vyhledávače Primer-Blast.

5.6.2 *Escherichia coli*, *Cutibacterium acnes*, doména *Bacteria*

Pro kolonie č. 30 a 31 respondentky „L“ byly použity primery *uspA Up* a *uspA Down* specifické pro *Escherichia coli*, primery *CA-F* a *CA-R* specifické pro *Cutibacterium acnes* a primery *16Sekont-F* a *16Sekont-R* specifické pro doménu *Bacteria*. Obrázek 48 znázorňuje amplifikační křivky DNA kolonií č. 30 a 31 respondentky „L“. Obrázek 49 pak znázorňuje analýzy křivek tání těchto kolonií. Produkt qPCR byl detekován ve všech případech pozitivních kontrol (zelená PK pro *Cutibacterium acnes*, oranžová PK pro *E. Coli* a modrá PK pro bakterie) a v případě obou kolonií, u kterých byly použity primery *uspA Up* a *uspA Down* specifické pro *Escherichia coli*.



Obrázek 48: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 30 a 31 respondentky „L“, zelená PK pro *Cutibacterium acnes*, oranžová PK pro *E. Coli* a modrá PK pro doménu *Bacteria*, růžová -specifický produkt PCR s primery *uspA Up* a *uspA Down* pro *Escherichia coli*, NK- černá



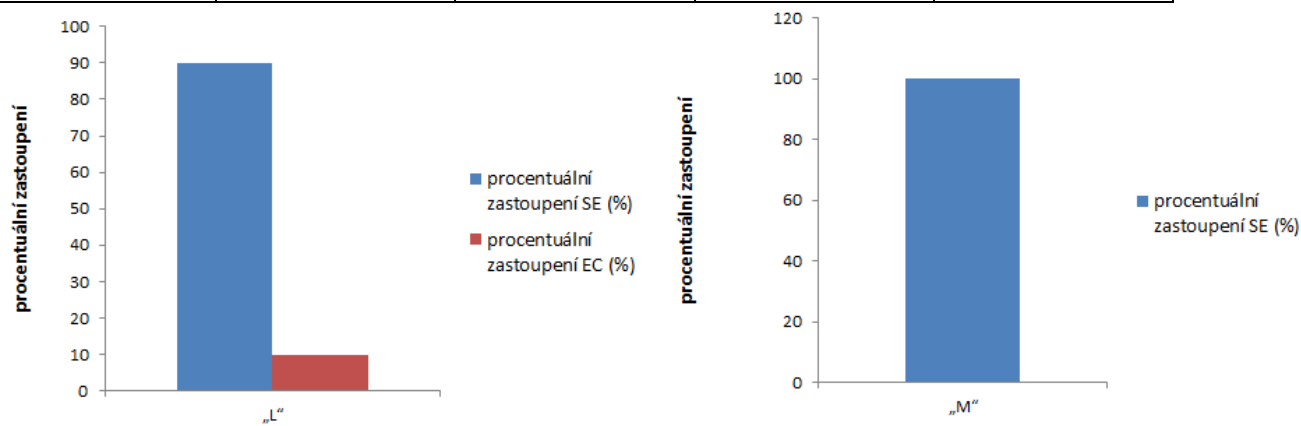
Obrázek 49: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 30 a 31 respondentky „L“, zelená PK pro *Cutibacterium acnes*, oranžová PK pro *E. Coli* a modrá PK pro doménu *Bacteria*, růžová -specifický produkt PCR s primery *uspA Up* a *uspA Down* pro *Escherichia coli*, NK- černá

U respondentky „M“ byla bakterie *Staphylococcus epidermidis* detekována ve 100 % odebraných kolonií již po týdenním používání kosmetického polysacharidu. Toto vysoké zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis* je podpořeno faktem, že v jejím případě byla tato bakterie zastoupena ve vysoké míře již na začátku a variabilita mikrobiomu byla nízká. Naopak u respondentky „L“ byla zjištěna vyšší variabilita mikrobiomu na začátku, a proto i zde lze vidět, že bakterie *Staphylococcus epidermidis* není zastoupena v takové míře. Přesto je její procentuální obsah vysoký a můžeme říci, že polysacharid Nano moist může plnit prebiotickou funkci pro mikroorganismy kůže. Příznak této funkce mohl být viděn už ve výsledcích antimikrobiálních testů. Také lze říci, že růst bakterie *Staphylococcus epidermidis* může negativně ovlivňovat růst ostatních organismů mikrobiomu kůže a jeho podíl na kůži ve srovnání s ostatními mikroorganismy po používání kosmetických výrobků narůstá.

Tabulka 21 ukazuje průměrné zastoupení mikroorganismů izolovaných z jedné Petriho misky (=20 kolonií). Poměr bakterie *Staphylococcus epidermidis* k ostatním bakteriím u obou respondentek znázorňuje ještě Obrázek 50.

Tabulka 21: Průměrné zastoupení mikroorganismů vztahované na jednu Petriho misku (20 kolonií)

respondentka	průměrné zastoupení SE (počet kolonií)	procentuální zastoupení SE (%)	průměrné zastoupení EC (počet kolonií)	procentuální zastoupení EC (%)
„L“	18	90	2	10
„M“	20	100	-	-

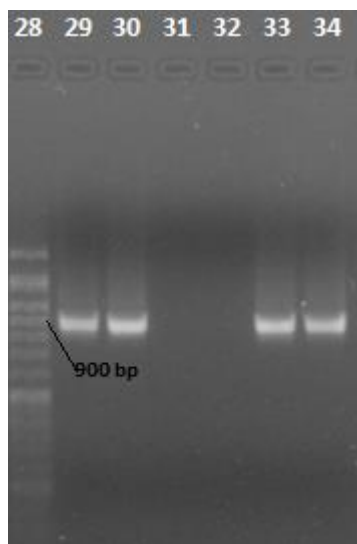


Obrázek 50: Procentuální zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*

5.6.2.1 Elektroforéza produktů qPCR s primery *uspA UP* a *uspA Down*

V případě použití primerů *uspA Up* a *uspA Down* specifických pro *Escherichia coli* byl produkt PCR detekován v případě obou zbývajících kolonií. Přítomnost specifických ampliconů byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou, jejíž výsledek je zobrazen na Obrázku 51.

Výsledek elektroforézy potvrzuje výsledky analýzy křivek tání, kdy u obou kolonií byla detekována přítomnost DNA *Escherichia coli*. Velikost odpovídá zjištěné hodnotě délky ampliconů pomocí vyhledávače Primer-Blast. Negativní kontroly byly čisté.



Běh	DNA	Detekce
28	Standard DNA 50 bp	-
29	PK	++
30	PK	++
31	NK	-
32	NK	-
33	respondentka „L“ kolonie 30	++
34	respondentka „L“ kolonie 31	++

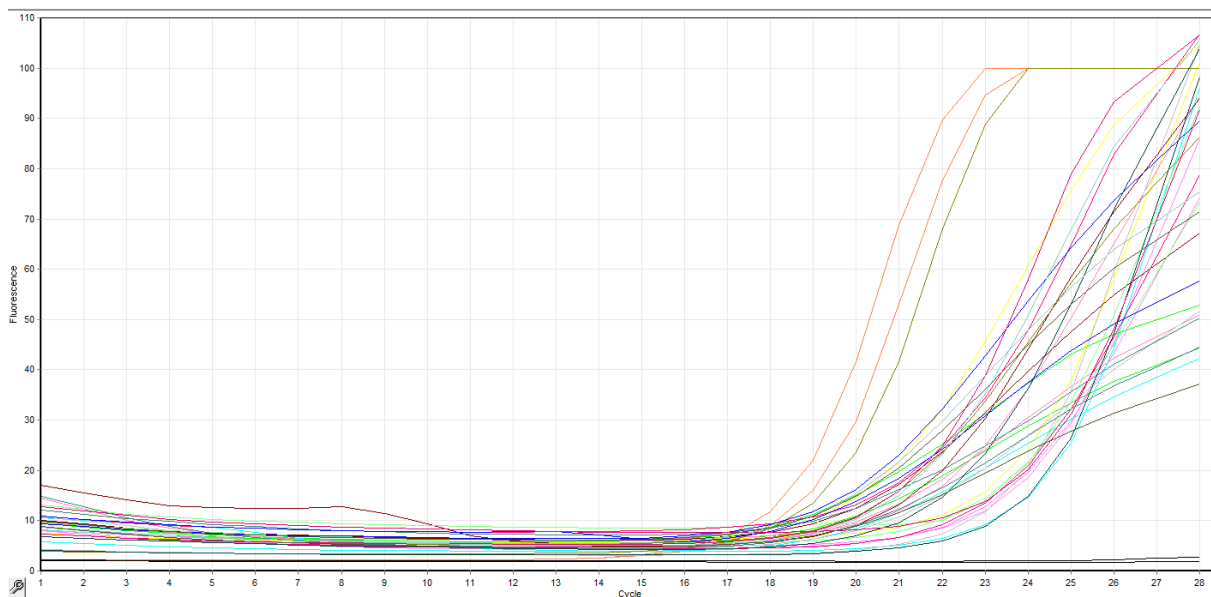
Obrázek 51: Agarózový gel produktů qPCR s primery *uspA Up* a *uspA Down* specifickými pro EC (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)

5.7 Výsledky qPCR po týdenním používání polysacharidu PoLevan S

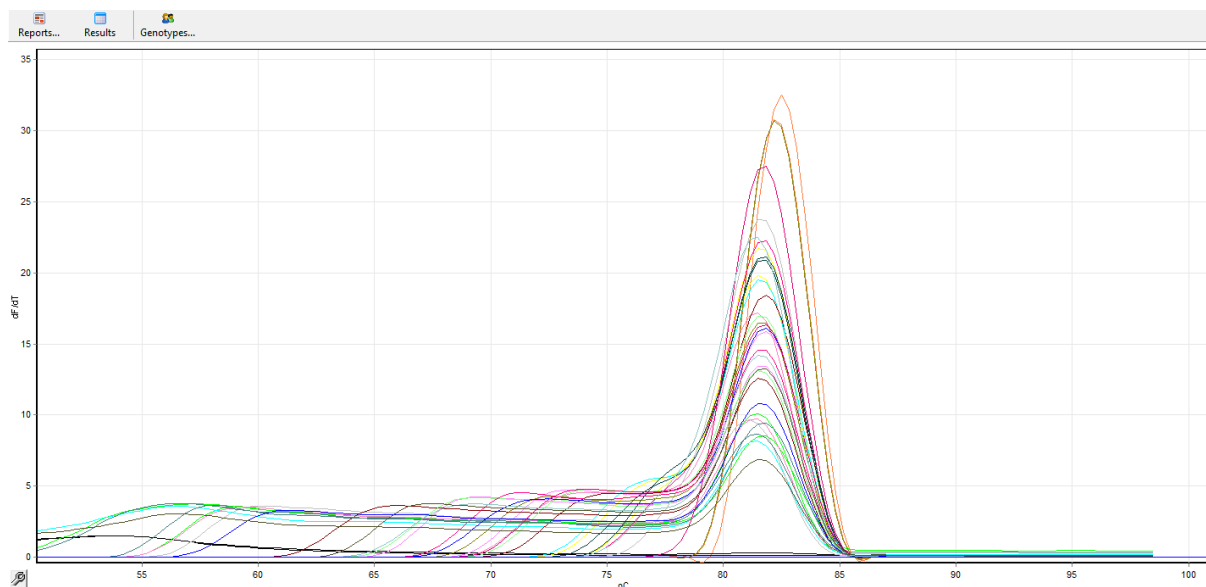
Respondentky si po dobu jednoho týdne ve stejnou dobu aplikovaly 100 µl polysacharidu PoLevan S na kůži čela. Po této době byl proveden stěr a izolace DNA podle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Opět byly kultivovány 3 Petriho misky a z každé bylo odebráno shodně 20 kolonií. Všechny 60 kolonií respondentky „L“ a „M“ bylo otestováno na vybrané mikroorganismy. Jelikož analýzami stěrů před používáním polysacharidů bylo potvrzeno, že bakterie *Staphylococcus epidermidis* se na kůži nachází v největší míře, byly izolované kolonie opět nejprve otestovány na přítomnost této bakterie. Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena PCR dle postupu a programu v kapitole 4.7.

5.7.1 *Staphylococcus epidermidis*

Po týdenním používání polysacharidu PoLevan S byly všechny kolonie nejprve otestovány na přítomnost DNAbakterie *Staphylococcus epidermidis* s použitím primerů *femA-SE_F* a *femA-SE_R*, jelikož bakterie *Staphylococcus epidermidis* by měla být na kůži zastoupena v největší míře, což již bylo potvrzeno výsledky analýz stěrů před používáním kosmetických polysacharidů. Pro přehlednost jsou na následujících obrázcích zobrazeny pouze vybrané amplifikační křivky a analýzy křivek tání. Další jsou zobrazeny v přílohách. Obrázek 52 znázorňuje amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „L“ a Obrázek 53 pak analýzu křivek tání těchto kolonií.



Obrázek 52: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „L“ s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R* specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



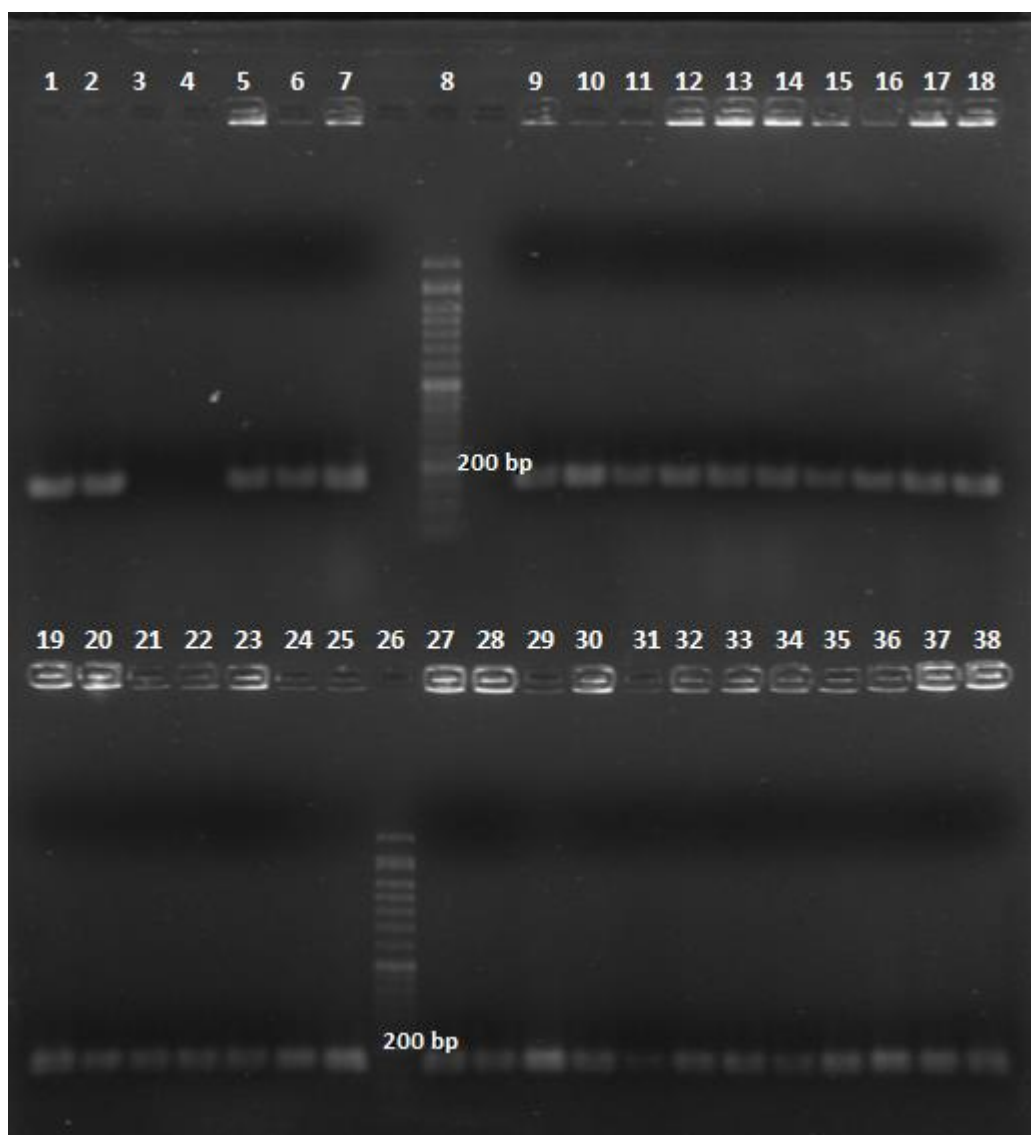
Obrázek 53: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 1 až 32 respondentky „L“ s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R* specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá

U obou respondentek došlo po týdenním používání druhého kosmetického polysacharidu k detekci produktu qPCR ve všech případech izolovaných kolonií. Ve všech izolovaných kolonií byla zjištěna přítomnost DNA bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Oproti stěrům, které byly provedeny na začátku před používáním kosmetických polysacharidů, můžeme vidět, že došlo k výraznému zvýšení zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*. U respondentky „L“ byla na začátku bakterie zjištěna v 75 % kolonií a došlo ke zvýšení na 100 %, u respondentky „M“ došlo k nárůstu z 85 % na 100 %. U respondentky „M“ není tento rozdíl tak velký, přesto také došlo ke zvýšení zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Tento polysacharid tedy může pozitivně působit na její růst a vystupovat jako prebiotikum. Tento pozitivní vliv kosmetických polysacharidů byl pozorován i v případě antimikrobiálních

testů. Zároveň může růst bakterie *Staphylococcus epidermidis* negativně ovlivňovat další mikroorganismy mikrobiomu kůže a její zastoupení je tak nejvyšší.

5.7.1.1 Elektroforéza produktů qPCR s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R*

Po otestování všech kolonií za použití primerů pro *Staphylococcus epidermidis* byly všechny produkty qPCR podrobeny agarózové gelové elektroforéze. Elektroforézy produktů qPCR byly provedeny v 1,5% agarózovém gelu. Amplikony mají velikost přibližně 170 bp. Pro přehlednost je na Obrázku 54 uveden snímek gelu s PCR produkty kolonií 1 až 32 respondentky „L“. Všechny ostatní jsou uvedeny v přílohách.



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 1	++
6	respondentka „L“ kolonie 2	++
7	respondentka „L“ kolonie 3	++
8	Standard DNA 50 bp	-

9	respondentka „L“ kolonie 4	++
10	respondentka „L“ kolonie 5	++
11	respondentka „L“ kolonie 6	+
12	respondentka „L“ kolonie 7	++
13	respondentka „L“ kolonie 8	++
14	respondentka „L“ kolonie 9	++
15	respondentka „L“ kolonie 10	+
16	respondentka „L“ kolonie 11	+++
17	respondentka „L“ kolonie 12	+++
18	respondentka „L“ kolonie 13	++
19	respondentka „L“ kolonie 14	++
20	respondentka „L“ kolonie 15	++
21	respondentka „L“ kolonie 16	+
22	respondentka „L“ kolonie 17	+
23	respondentka „L“ kolonie 18	+
24	respondentka „L“ kolonie 19	+
25	respondentka „L“ kolonie 20	++
26	Standard DNA 50 bp	-
27	respondentka „L“ kolonie 21	+
28	respondentka „L“ kolonie 22	+
29	respondentka „L“ kolonie 23	++
30	respondentka „L“ kolonie 24	+
31	respondentka „L“ kolonie 25	+
32	respondentka „L“ kolonie 26	+
33	respondentka „L“ kolonie 27	+
34	respondentka „L“ kolonie 28	+
35	respondentka „L“ kolonie 29	+
36	respondentka „L“ kolonie 30	++
37	respondentka „L“ kolonie 31	++
38	respondentka „L“ kolonie 32	+

Obrázek 54: Agarózový gel s produkty PCR s primery *femA-SE_F* a *femA-SE_R* specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)

Výsledky gelové elektroforézy potvrzují výsledky analýzy křivek tání. Ve všech případech byla detekována přítomnost DNA *Staphylococcus epidermidis*. Negativní kontroly byly čisté ve všech případech a délka specifických produktů se pohybovala okolo 170 bp, což odpovídá zjištěné hodnotě délky ampliconů pomocí vyhledávače Primer-Blast.

5.8 Shrnutí výsledků PCR

Bylo získáno celkem 60 kolonií od každé respondentky. Ze získaných kolonií respondentky „L“ jich v průměru 75 % odpovídalo bakterii *Staphylococcus epidermidis*. U respondentky „M“ jich v průměru 85 % odpovídalo bakterii *Staphylococcus epidermidis*. U obou respondentek nebyla zjištěna přítomnost bakterií *Escherichia coli* ani *Cutibacterium acnes*. Bylo pouze zjištěno, že u zbývajících kolonií se jedná o bakterie.

Poté si respondentky týden aplikovaly na čelo polysacharid Nano moist v koncentraci 2%. Po této týdenní aplikaci byl stejným způsobem proveden stěr z jejich čela. U respondentky „M“ odpovídaly všechny získané kolonie bakterii *Staphylococcus epidermidis*. U respondentky „L“ pak byla přítomnost bakterie *Staphylococcus epidermidis* zjištěna v 90 % odebraných kolonií.

Další týden si respondentky aplikovaly na čelo polysacharid PoLevan S v koncentraci 2%. Poté byl stejným způsobem proveden stěr a jeho kultivace. Bylo opět získáno 60 kolonií od každé respondentky. Ve všech případech se jednalo o bakterii *Staphylococcus epidermidis*. Shrnutí výsledků PCR je uvedeno v Tabulce 22.

Tabulka 22: Procentuální zastoupení *Staphylococcus epidermidis* před a po použití vybraných polysacharidů

respondentka	procentuální zastoupení bakterie <i>Staphylococcus epidermidis</i> (%)		
	před používáním polysacharidu	po týdenním používání polysacharidu Nano moist	po týdenním používání polysacharidu PoLevan S
„L“	75	90	100
„M“	85	100	100

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na posouzení vlivu polysacharidů používaných v kosmetice na vybrané druhy bakterií mikrobiomu kůže, jakožto i posouzení těchto polysacharidů jako prebiotik na vybrané druhy bakterií mikrobiomu kůže. Byla vybrána gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a grampozitivní bakterie *Cutibacterium acnes*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermidis*. Jako polysacharidy používané v kosmetice byly vybrány tyto dva: Nano moist a PoLevan S.

Pro antimikrobiální testy byly připraveny dvě koncentrace obou těchto polysacharidů, a to 1% a 2%. Polysacharidy se právě v těchto koncentracích nachází v kosmetických výrobcích nejčastěji. Pomocí difuzního agarového testu a dilučního jamkového testu byla vyloučena jakákoliv antimikrobiální aktivita vybraných polysacharidů. Tyto experimenty ukázaly, že ani jeden z polysacharidů nemá inhibiční efekt na výše uvedené vybrané druhy bakterií mikrobiomu kůže, protože nebyla pozorována žádná inhibiční zóna po 24 hodinové kultivaci. Naopak se pomocí dilučního jamkového testu ukázalo, že oba polysacharidy mají pozitivní vliv na růst vybraných druhů bakterií mikrobiomu kůže. Nárůst kultur dostatečně přesahoval hranici 100%, která reprezentovala nárůst čisté kultury bez přidání polysacharidu. Největší pozitivní vliv měly kosmetické polysacharidy na bakterii *Staphylococcus epidermidis*. V případě 1% koncentrace polysacharidu PoLevan S došlo k nárůstu o 58 % většímu než v případě kontroly bez polysacharidu, v případě 2% koncentrace byl nárůst o 73 % větší než v případě kontroly bez polysacharidu. U 1% koncentrace polysacharidu Nano moist došlo k nárůstu o 59 % většímu než v případě kontroly bez polysacharidu, u 2% koncentrace pak k nárůstu o 75 % většímu než v případě kontroly bez polysacharidu.

Polysacharidy Nano moist a PoLevan S byly také přidány v obou koncentracích přímo do kultivačního média s agarem a po zatumnutí a 24 hodinové kultivaci bylo porovnán počet narostlých kolonií. Tyto experimenty podpořily výsledky antimikrobiálních testů a u všech vybraných druhů bakterií mikrobiomu kůže došlo k výrazně vyššímu nárůstu kolonií po 24 hodinové kultivaci ve srovnání s koloniemi, jejichž kultivační médium přidané polysacharidy neobsahovalo.

Byly osloveny dvě respondentky, u nichž na začátku proběhl stěr z čela kůže pro zanalyzování jejich původního mikrobiomu. Stěr proběhl vždy 3x a po 24 hodinové kultivaci bylo z každé Petriho misky odebráno 20 kolonií. Tím bylo získáno 60 kolonií od každé respondentky.

Poté si respondentky týden aplikovaly na čelo polysacharid Nano moist v koncentraci 2%. Po této týdenní aplikaci byl stejným způsobem proveden stěr a následná 24 hodinová kultivace na Petriho miskách. Porovnáním s výsledky qPCR před používáním kosmetických polysacharidů můžeme vidět výrazný nárůst procentuálního zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*, tedy lze říci, že polysacharid Nano moist může plnit prebiotickou funkci pro tuto bakterii. Zároveň její růst může negativně ovlivňovat ostatní druhy mikrobiomu kůže, protože jejich počet se po týdenním používání tohoto polysacharidu procentuálně snížil. Velikost produktů qPCR byla ještě ověřena agarózovou gelovou elektroforézou.

Další týden si respondentky aplikovaly na čelo polysacharid PoLevan S v koncentraci 2%. Poté byl stejným způsobem proveden stěr a jeho kultivace. Bylo opět získáno 60 kolonií od

každé respondentky, které byly analyzovány qPCR. Porovnáním těchto výsledků s výsledky PCR před používáním polysacharidů můžeme opět vidět nárůst procentuálního zastoupení bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Můžeme tedy konstatovat, že i polysacharid PoLevan S má pozitivní vliv na růst této bakterie. Pravděpodobně i samotná bakterie negativně ovlivňuje růst dalších druhů mikrobiomu kůže, protože jiný mikroorganismus v tomto případě nebyl detekován.

7 LITERATURA

- [1] MCLAFFERTY, Ella, Charles HENDRY, Alistair FARLEY, Eleonora RUOCCO, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*. 2012, **27**(3), 35-42. ISSN 0029-6570. Dostupné z: doi:10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299
- [2] LAI-CHEONG, Joey E., John A. MCGRATH, Alistair FARLEY, Eleonora RUOCCO, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Structure and function of skin, hair and nails: anatomy, physiology and function of skin. *Medicine*. 2017, **45**(6), 347-351. ISSN 13573039. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2017.03.004
- [3] ADLER, Yael. Kůže zblízka: vše o našem největším orgánu. Praha: Euromedia, 2018. Esence. ISBN 978-80-7549-532-7.
- [4] BARONI, Adone, Elisabetta BUOMMINO, Vincenza DE GREGORIO, Eleonora RUOCCO, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Structure and function of the epidermis related to barrier properties: anatomy, physiology and function of skin. *Clinics in Dermatology*. 2012, **30**(3), 257-262. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
- [5] CHOUDHURY, Subholakshmi, Amitava DAS, Vincenza DE GREGORIO, Eleonora RUOCCO, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Advances in generation of three-dimensional skin equivalents: pre-clinical studies to clinical therapies. *Cytotherapy*. 2021, **23**(1), 1-9. ISSN 14653249. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcyt.2020.10.001
- [6] WICKETT, R. Randall, Marty O. VISSCHER, Vincenza DE GREGORIO, Eleonora RUOCCO, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Structure and function of the epidermal barrier: pre-clinical studies to clinical therapies. *American Journal of Infection Control*. 2006, **34**(10), S98-S110. ISSN 01966553. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajic.2006.05.295
- [7] PATRA, VijayKumar, Karin WAGNER, Velmurugesan ARULAMPALAM, Peter WOLF, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Skin Microbiome Modulates the Effect of Ultraviolet Radiation on Cellular Response and Immune Function: pre-clinical studies to clinical therapies. *IScience*. 2019, **15**(10), 211-222. ISSN 25890042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2019.04.026
- [8] ADAMCZYK, Katarzyna, Agnieszka A. GARNCARCZYK, Paweł P. ANTOŃCZAK, Peter WOLF, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. The microbiome of the skin: pre-clinical studies to clinical therapies. *Dermatology Review*. 2018, **105**(2), 285-297. ISSN 0033-2526. Dostupné z: doi:10.5114/dr.2018.75584
- [9] COGEN, A.L., V. NIZET, R.L. GALLO, Peter WOLF, Vincenzo RUOCCO a Ronni WOLF. Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*. 2008, **158**(3), 442-455. ISSN 00070963. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x
- [10] DRÉNO, B., E. ARAVIISKAIA, E. BERARDESCA, G. GONTIJO, M. SANCHEZ VIERA, L.F. XIANG, R. MARTIN a T. BIEBER. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists: a source of disease or defence? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2016, **30**(12), 2038-2047. ISSN 09269959. Dostupné z: doi:10.1111/jdv.13965

- [11] GALLO, Richard L., E. ARAVIISKAIA, E. BERARDESCA, G. GONTIJO, M. SANCHEZ VIERA, L.F. XIANG, R. MARTIN a T. BIEBER. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes: a source of disease or defence? *Journal of Investigative Dermatology*. 2017, **137**(6), 1213-1214. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2016.11.045
- [12] NAKATSUJI, Teruaki, Hsin-I. CHIANG, Shangi B. JIANG, Harish NAGARAJAN, Karsten ZENGLER, Richard L. GALLO, R. MARTIN a T. BIEBER. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin: a source of disease or defence? *Nature Communications*. 2013, **4**(1), 1213-1214. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2441
- [13] SANFORD, James A., Richard L. GALLO, Shangi B. JIANG, Harish NAGARAJAN, Karsten ZENGLER, Richard L. GALLO, R. MARTIN a T. BIEBER. Functions of the skin microbiota in health and disease: a source of disease or defence? *Seminars in Immunology*. 2013, **25**(5), 370-377. ISSN 10445323. Dostupné z: doi:10.1016/j.smim.2013.09.005
- [14] SCHARSCHMIDT, Tiffany C., Michael A. FISCHBACH, Shangi B. JIANG, Harish NAGARAJAN, Karsten ZENGLER, Richard L. GALLO, R. MARTIN a T. BIEBER. What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2013, **10**(3-4), e83-e89. ISSN 17406765. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddmec.2012.12.003
- [15] VIEIRA, Abrahão Osta, Gisele Viana de OLIVEIRA, Shangi B. JIANG, Harish NAGARAJAN, Karsten ZENGLER, Richard L. GALLO, R. MARTIN a T. BIEBER. Skin Care and Microbiome: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. Reference Module in Food Science. Elsevier, 2022, **10**(3-4), e83-e89. ISBN 9780081005965. ISSN 17406765. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819265-8.00021-8
- [16] MUSTHAQ, Shenara, Anna MAZUY, Jeannette JAKUS, Harish NAGARAJAN, Karsten ZENGLER, Richard L. GALLO, R. MARTIN a T. BIEBER. The microbiome in dermatology: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Clinics in Dermatology*. Elsevier, 2018, 2022, **36**(3), 390-398. ISBN 9780081005965. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2018.03.012
- [17] PRESCOTT, Susan L., Danica-Lea LARCOMBE, Alan C. LOGAN, et al. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *World Allergy Organization Journal*. Elsevier, 2017, 2022, **10**(3), 390-398. ISBN 9780081005965. ISSN 19394551. Dostupné z: doi:10.1186/s40413-017-0160-5
- [18] SCHOMMER, Nina N., Richard L. GALLO, Alan C. LOGAN, et al. Structure and function of the human skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *Trends in Microbiology*. Elsevier, 2013, 2022, **21**(12), 660-668. ISBN 9780081005965. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2013.10.001

- [19] OLIVEIRA DA SILVA, Thaila Fernanda, Sheila Mara SANCHES LOPES, Juliana Cristina CASTRO, et al. Extraction, isolation, characterization and prebiotic activity of fructans from *Conyza* sp. roots: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. Elsevier, 2021, 2022, **25**(12), 660-668. ISBN 9780081005965. ISSN 22126198. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcdf.2020.100257
- [20] ÖNER, Ebru Toksoy, Lázaro HERNÁNDEZ, Joan COMBIE, et al. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*. Elsevier, 2016, 2022, **34**(5), 827-844. ISBN 9780081005965. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2016.05.002
- [21] GARCÍA-OCHOA, F, V.E SANTOS, J.A CASAS a E GÓMEZ. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* [online]. 2000, **18**(7), 549-579 [cit. 2021-7-22]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/S0734-9750(00)00050-1
- [22] KANG, Yan, Panyu LI, Xiaotong ZENG, Xi CHEN, Yi XIE, Yu ZENG, Yongkui ZHANG a Tonghui XIE. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* with additional furfural. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **216**, 369-375 [cit. 2021-7-22]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.018
- [23] ABBASZADEH, A., M. LAD, M. JANIN, G.A. MORRIS, W. MACNAUGHTAN, G. SWORN a T.J. FOSTER. A novel approach to the determination of the pyruvate and acetate distribution in xanthan. *Food Hydrocolloids* [online]. 2015, **44**, 162-171 [cit. 2021-7-22]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2014.08.014
- [24] THOMBARE, Nandkishore, Usha JHA, Sumit MISHRA a M.Z. SIDDIQUI. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **88**, 361-372 [cit. 2021-7-22]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001
- [25] SINGH, Saumya, Gursharan SINGH a Shailendra Kumar ARYA. Mannans: An overview of properties and application in food products. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **119**, 79-95 [cit. 2021-7-22]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.130
- [26] DAS, Aatrayee, Sonia KUNDU, Sumanta Kumar GHOSH, Aalok BASU, Mradu GUPTA a Arup MUKHERJEE. Guar gum cinnamate ouzo nanoparticles for bacterial contact killing in water environment. *Carbohydrate Research* [online]. 2020, **491** [cit. 2021-7-22]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2020.107983
- [27] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**(3), 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022202X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>

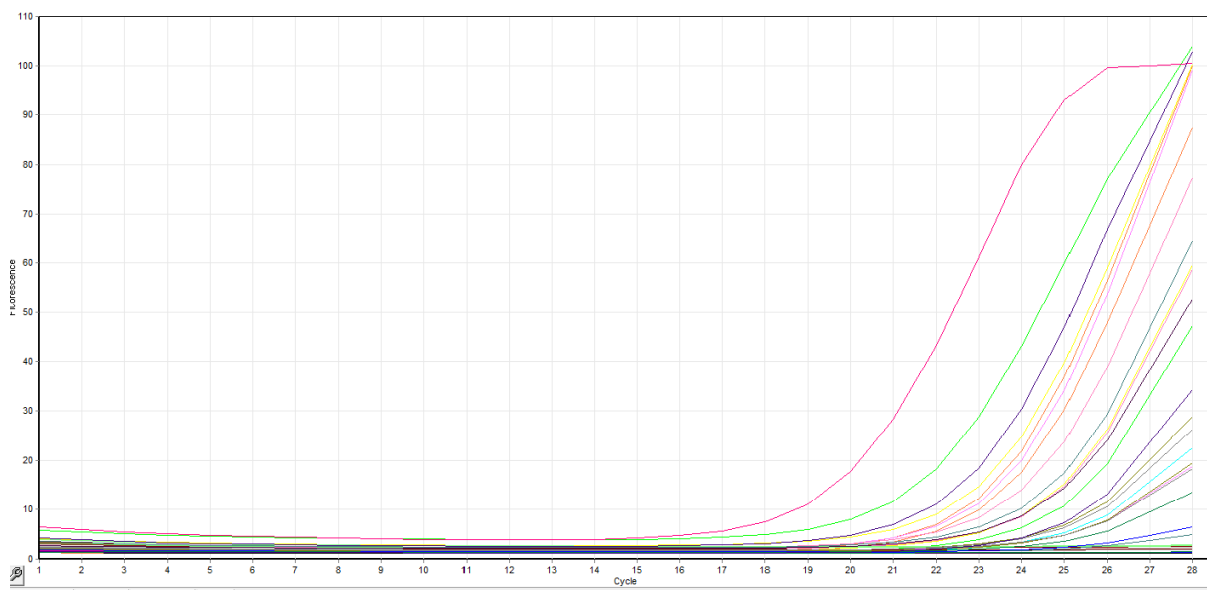
- [28] LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63). DOI: 10.3791/3998. ISSN 1940-087X. Dostupné také z: <http://www.jove.com/video/3998/>
- [29] MITH, Cindy J. a A. Mark OSBORN. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009, 67(1), 6-20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x. ISSN 01686496. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- [30] VALASEK, Mark A. a Joyce J. REPA. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* [online]. 2005, 29(3), 151-159 [cit. 2021-7-22]. ISSN 1043-4046. Dostupné z: doi:10.1152/advan.00019.2005
- [31] BELLER, Harry R., Staci R. KANE, Tina C. LEGLER a Pedro J. J. ALVAREZ. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Anaerobic, Hydrocarbon-Degrading Bacteria Based on a Catabolic Gene. *Environmental Science & Technology* [online]. 2002, 36(18), 3977-3984 [cit. 2021-7-22]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es025556w
- [32] ELKINS, Kelly M. Determination of Quality and Quantity of DNA Using Agarose Gel Electrophoresis. *Forensic DNA Biology* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 53-57 [cit. 2021-7-22]. ISBN 9780123945853. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394585-3.00005-5
- [33] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62) [cit. 2021-7-27]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923
- [34] EFENDI, Ferry, Retno HANDAJANI a Nursalam NURSALAM. Searching for the best agarose candidate from genus Gracilaria, Eucheuma, Gelidium and local brands. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 2015, 5(10), 865-869 [cit. 2021-7-27]. ISSN 22211691. Dostupné z: doi:10.1016/j.apjtb.2015.06.009
- [35] ARAKI, Choji. Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. 1956, 29(4), 543-544 [cit. 2021-7-27]. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.29.543
- [36] VYTŘASOVÁ, Jarmila a Zuzana BÍLKOVÁ. Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie. Vyd. 2. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003. ISBN 80-7194-610-9.
- [37] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [38] Bacterial DNA Purification Kit. Elisabeth Pharmacon [online]. Brno, 2019 [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-bacterial-dna-purification-kit.html>

- [39] ALEXOVÁ, Adéla. Studium vlivu kosmetických přípravků na mikrobiom lidské kůže pomocí molekulárních technik. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131498>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Němcová.
- [40] CHUNG, Yousun, Taek Soo KIM, Young Gi MIN, et al. Usefulness of Multiplex Real-Time PCR for Simultaneous Pathogen Detection and Resistance Profiling of Staphylococcal Bacteremia. *BioMed Research International* [online]. 2016, **2016**, 1-7 [cit. 2021-7-21]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2016/6913860.
- [41] YAMADA, Tetsuo, Yoshinobu EISHI, Satoshi IKEDA, Ikuo ISHIGE, Takashige SUZUKI, Tamiko TAKEMURA, Touichiro TAKIZAWA a Morio KOIKE. In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. *The Journal of Pathology* [online]. 2002, **198**(4), 541-547 [cit. 2021-7-21]. ISSN 0022-3417. Dostupné z: doi:10.1002/path.1243.
- [42] HAGA, S., Y. HIRANO, O. MURAYAMA, B.C. MILLAR, J.E. MOORE a M. MATSUDA. Structural analysis and genetic variation of the 16S-23S rDNA internal spacer region from Micrococcus luteus strains. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2003, **37**(4), 314-317 [cit. 2021-7-21]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01399.x.
- [43] GODAMBE, Lipika Pansare, Jayant BANDEKAR a Ravindranath SHASHIDHAR. Species specific PCR based detection of Escherichia coli from Indian foods. *3 Biotech* [online]. 2017, **7**(2) [cit. 2021-7-21]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-017-0784-8.
- [44] NADKARNI, Mangala A, F. Elizabeth MARTIN, Nicholas A JACQUES a Neil HUNTER. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* [online]. 2002, **148**(1), 257-266 [cit. 2021-7-21]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-148-1-257.

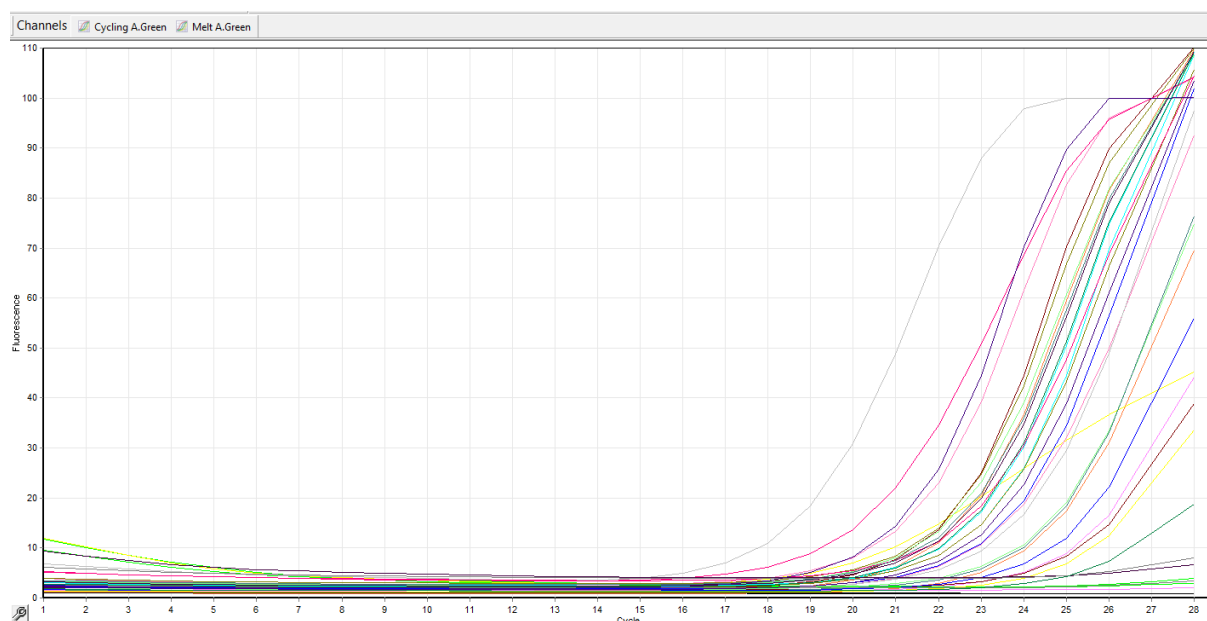
8 SEZNAM ZKRATEK

B	doména <i>Bacteria</i>
bp	pár bází (base pair)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)
CA	<i>Cutibacterium acnes</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	<i>Escherichia coli</i>
NK	negativní kontrola
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	pozitivní kontrola
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

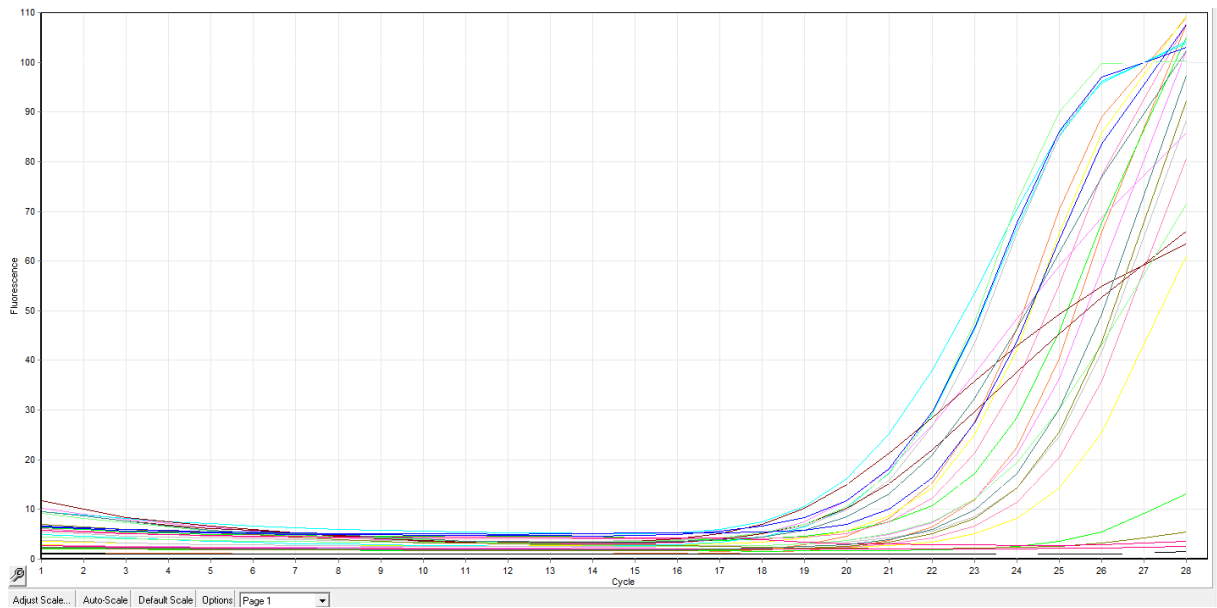
9 PŘÍLOHY



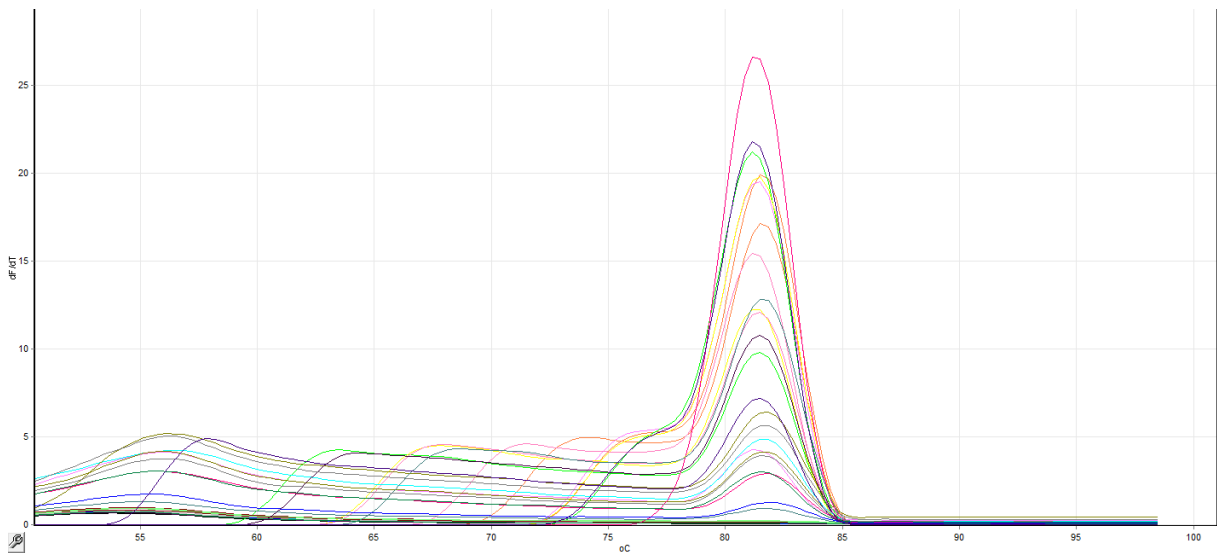
Příloha 1: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 33 až 60 respondentky „L“ a 1 až 4 respondentky „M“ před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



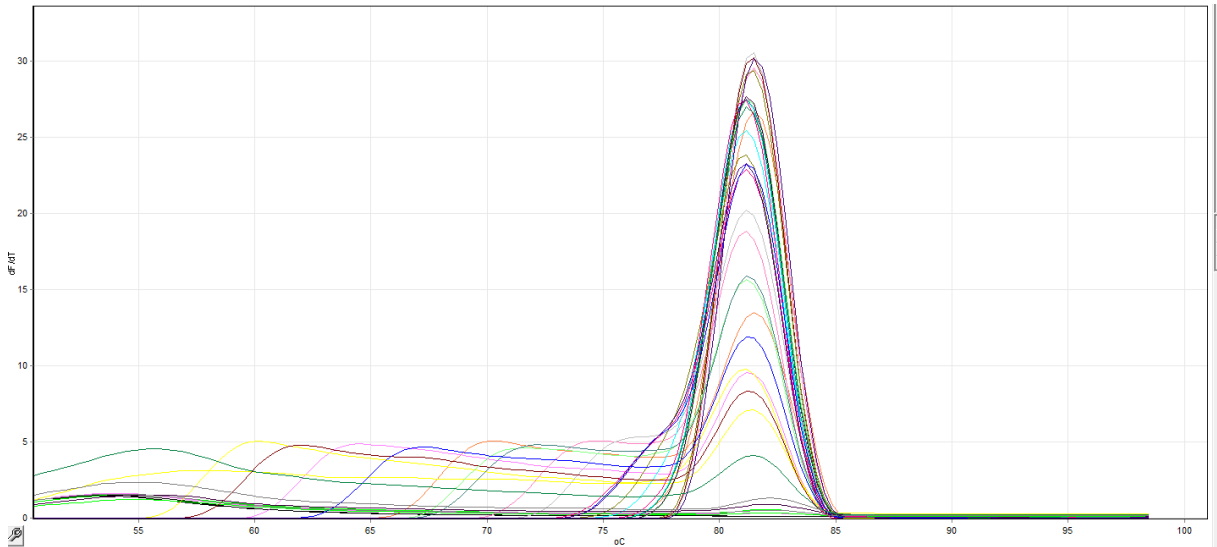
Příloha 2: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 5 až 36 respondentky „M“ před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



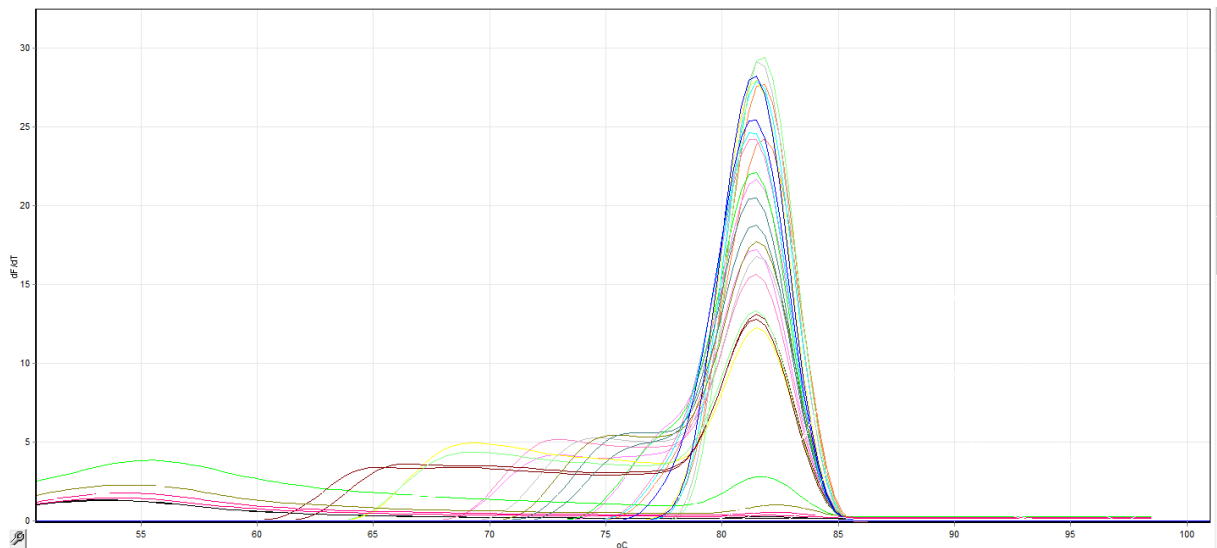
Příloha 3: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 37 až 60 respondentky „M“ před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE,, PK - oranžová, NK- černá



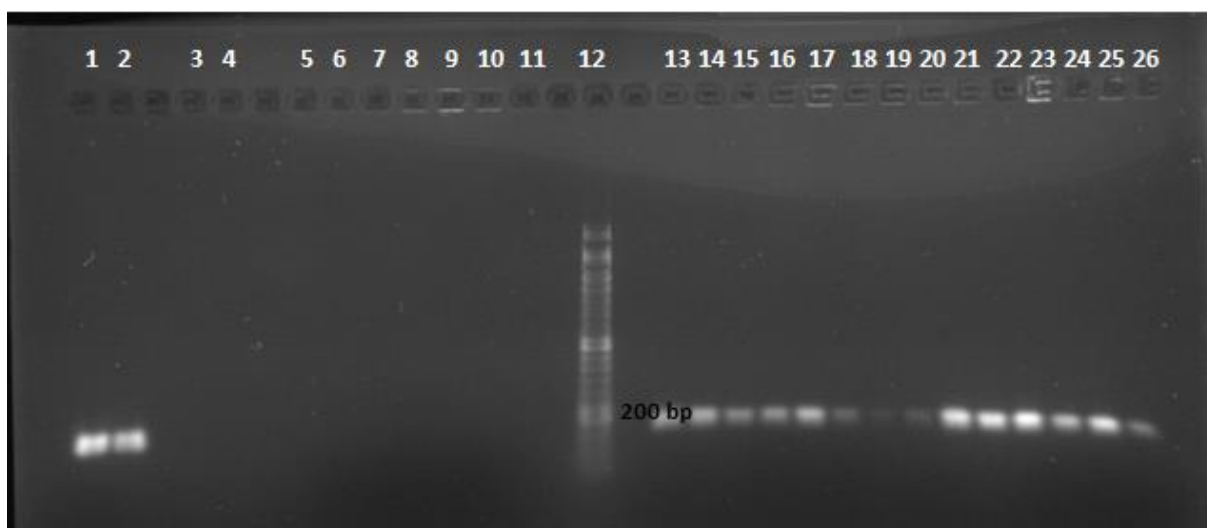
Příloha 4: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 33 až 60 respondentky „L“ a 1 až 4 respondentky „M“ před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE,, PK - oranžová, NK- černá



Příloha 5: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 5 až 36 respondentky „M“ před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá

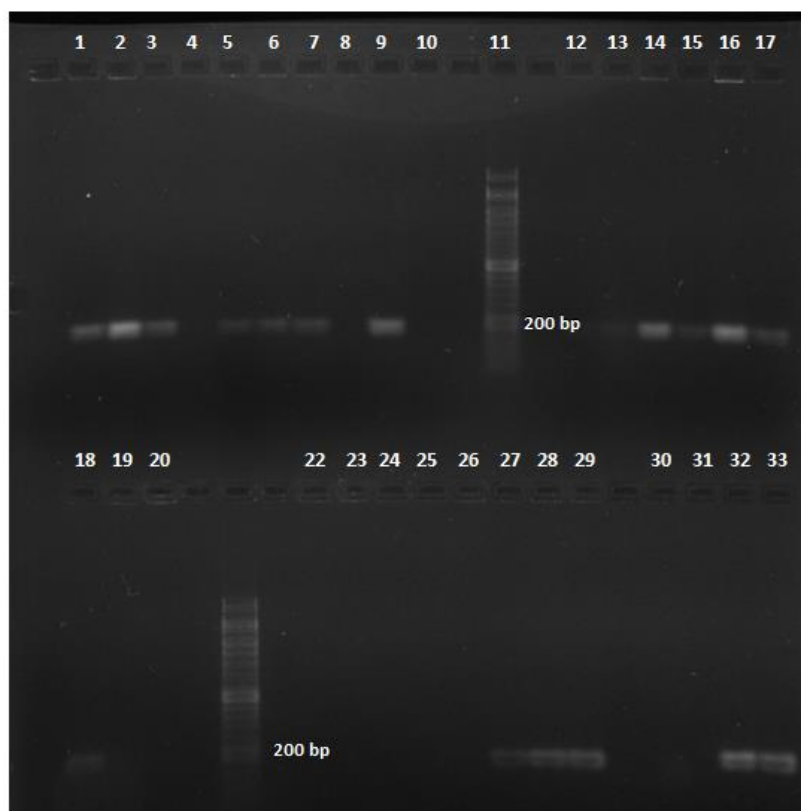


Příloha 6: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 37 až 60 respondentky „M“ před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 18	-
6	respondentka „L“ kolonie 19	-
7	respondentka „L“ kolonie 20	-
8	respondentka „L“ kolonie 21	-
9	respondentka „L“ kolonie 22	-
10	respondentka „L“ kolonie 23	-
11	respondentka „L“ kolonie 24	-
12	DNA Standard 50 bp	-
13	respondentka „L“ kolonie 25	++
14	respondentka „L“ kolonie 26	++
15	respondentka „L“ kolonie 27	++
16	respondentka „L“ kolonie 28	++
17	respondentka „L“ kolonie 29	+++
18	respondentka „L“ kolonie 30	+
19	respondentka „L“ kolonie 31	+
20	respondentka „L“ kolonie 32	+
21	respondentka „L“ kolonie 33	+++
22	respondentka „L“ kolonie 34	+++
23	respondentka „L“ kolonie 35	+++
24	respondentka „L“ kolonie 36	++
25	respondentka „L“ kolonie 37	++
26	respondentka „L“ kolonie 38	+

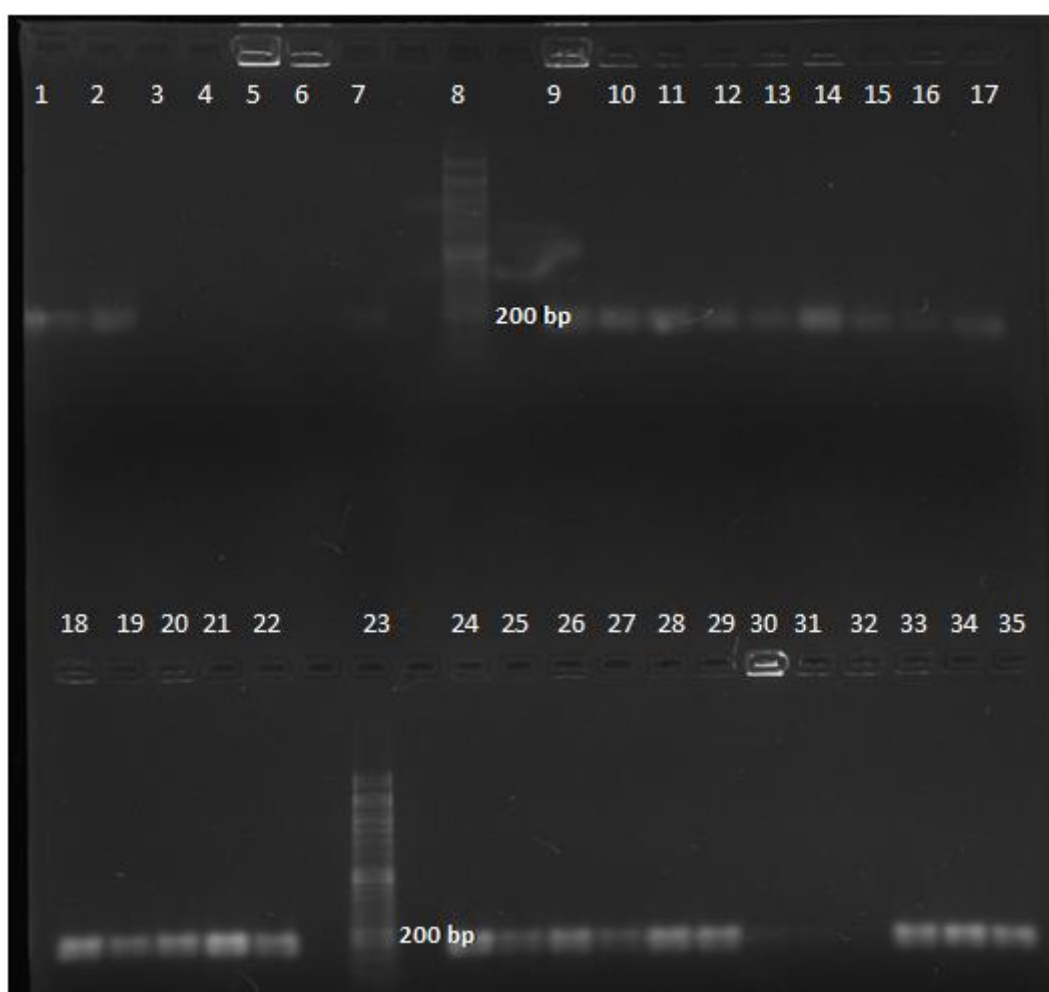
Příloha 7: Agarózový gel s produkty PCR před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



Běh	DNA	Detekce
1	respondentka „M“ kolonie 5	+
2	respondentka „M“ kolonie 4	++
3	respondentka „M“ kolonie 3	+
4	respondentka „M“ kolonie 2	-
5	respondentka „M“ kolonie 1	+
6	respondentka „L“ kolonie 60	+
7	respondentka „L“ kolonie 59	+
8	respondentka „L“ kolonie 58	-
9	respondentka „L“ kolonie 57	++
10	respondentka „L“ kolonie 56	-
11	Standard DNA 50 bp	-
12	respondentka „L“ kolonie 55	+
13	respondentka „L“ kolonie 54	+
14	respondentka „L“ kolonie 53	++
15	respondentka „L“ kolonie 52	+
16	respondentka „L“ kolonie 51	++
17	respondentka „L“ kolonie 50	+
18	respondentka „L“ kolonie 49	+
19	respondentka „L“ kolonie 48	-
20	respondentka „L“ kolonie 47	-
21	Standard DNA 50 bp	-
22	respondentka „L“ kolonie 46	-
23	respondentka „L“ kolonie 45	-
24	respondentka „L“ kolonie 44	-
25	respondentka „L“ kolonie 43	-
26	respondentka „L“ kolonie 42	-

27	respondentka „L“ kolonie 41	+
28	respondentka „L“ kolonie 40	++
29	respondentka „L“ kolonie 39	++
30	NK	-
31	NK	-
32	PK	++
33	PK	++

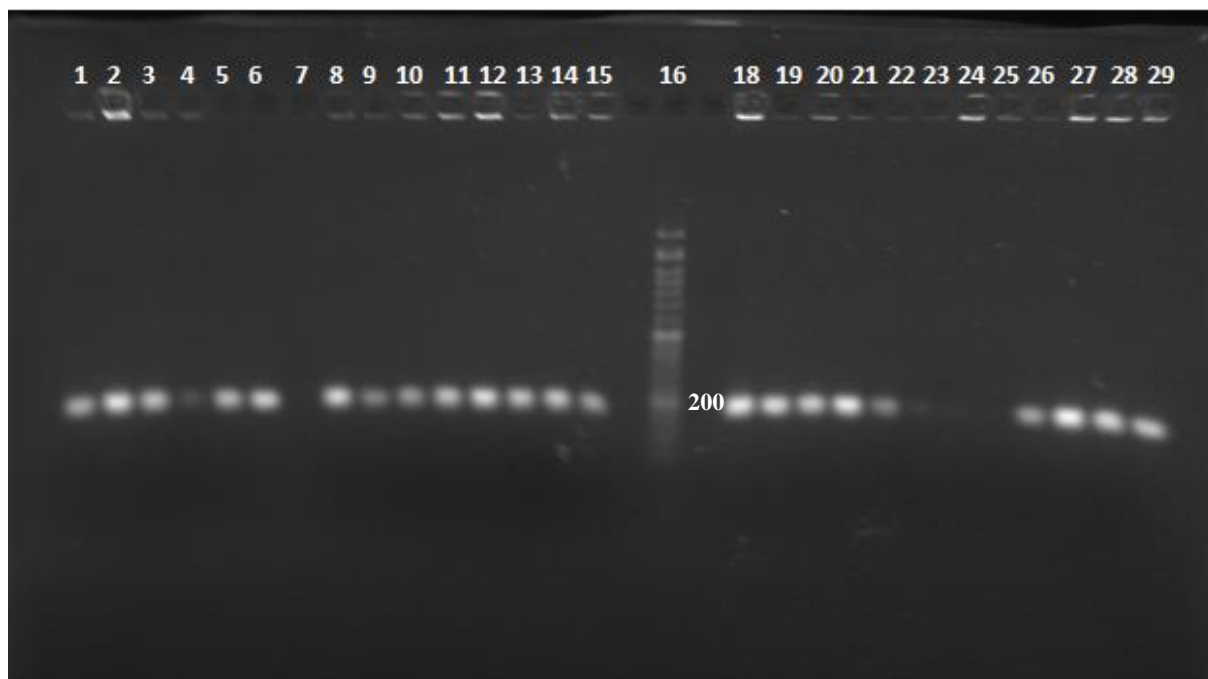
Příloha 8: Agarózový gel s produkty PCR před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+
2	PK	+
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „M“ kolonie 7	-
6	respondentka „M“ kolonie 8	-
7	respondentka „M“ kolonie 9	+
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „M“ kolonie 10	+

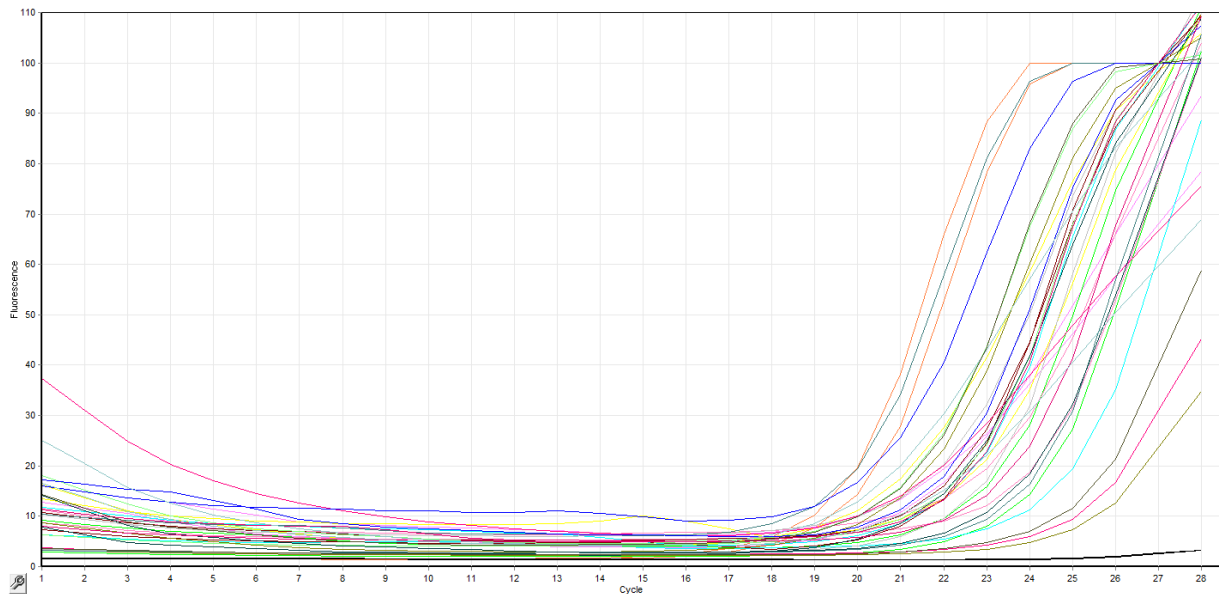
10	respondentka „M“ kolonie 11	+
11	respondentka „M“ kolonie 12	+
12	respondentka „M“ kolonie 13	+
13	respondentka „M“ kolonie 14	+
14	respondentka „M“ kolonie 15	+
15	respondentka „M“ kolonie 16	+
16	respondentka „M“ kolonie 17	+
17	respondentka „M“ kolonie 18	+
18	respondentka „M“ kolonie 19	+
19	respondentka „M“ kolonie 20	++
20	respondentka „M“ kolonie 21	++
21	respondentka „M“ kolonie 22	+
22	respondentka „M“ kolonie 23	++
23	Standard DNA 50 bp	-
24	respondentka „M“ kolonie 24	++
25	respondentka „M“ kolonie 25	+
26	respondentka „M“ kolonie 26	++
27	respondentka „M“ kolonie 27	+
28	respondentka „M“ kolonie 28	++
29	respondentka „M“ kolonie 29	++
30	respondentka „M“ kolonie 30	-
31	respondentka „M“ kolonie 31	-
32	respondentka „M“ kolonie 32	-
33	respondentka „M“ kolonie 33	++
34	respondentka „M“ kolonie 34	++
35	respondentka „M“ kolonie 35	++

Příloha 9: Agarózový gel s produkty PCR před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)

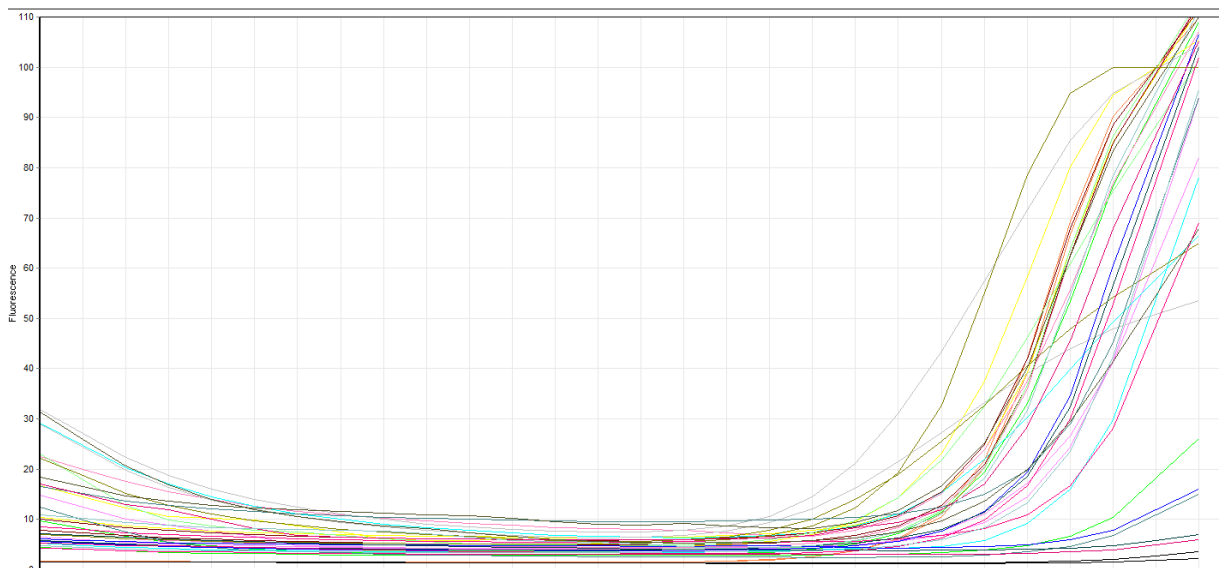


Běh	DNA	Detekce
1	respondentka „M“ kolonie 37	++
2	respondentka „M“ kolonie 38	++
3	respondentka „M“ kolonie 39	++
4	respondentka „M“ kolonie 40	+
5	PK	++
6	PK	++
7	NK	-
8	respondentka „M“ kolonie 41	++
9	respondentka „M“ kolonie 42	++
10	respondentka „M“ kolonie 43	++
11	respondentka „M“ kolonie 44	++
12	respondentka „M“ kolonie 45	++
13	respondentka „M“ kolonie 46	++
14	respondentka „M“ kolonie 47	++
15	respondentka „M“ kolonie 48	++
16	Standard DNA 50 bp	-
18	respondentka „M“ kolonie 49	++
19	respondentka „M“ kolonie 50	++
20	respondentka „M“ kolonie 51	++
21	respondentka „M“ kolonie 52	++
22	respondentka „M“ kolonie 53	+
23	respondentka „M“ kolonie 54	-
24	respondentka „M“ kolonie 55	-
25	respondentka „M“ kolonie 56	-
26	respondentka „M“ kolonie 57	++
27	respondentka „M“ kolonie 58	++
28	respondentka „M“ kolonie 59	++
29	respondentka „M“ kolonie 60	++

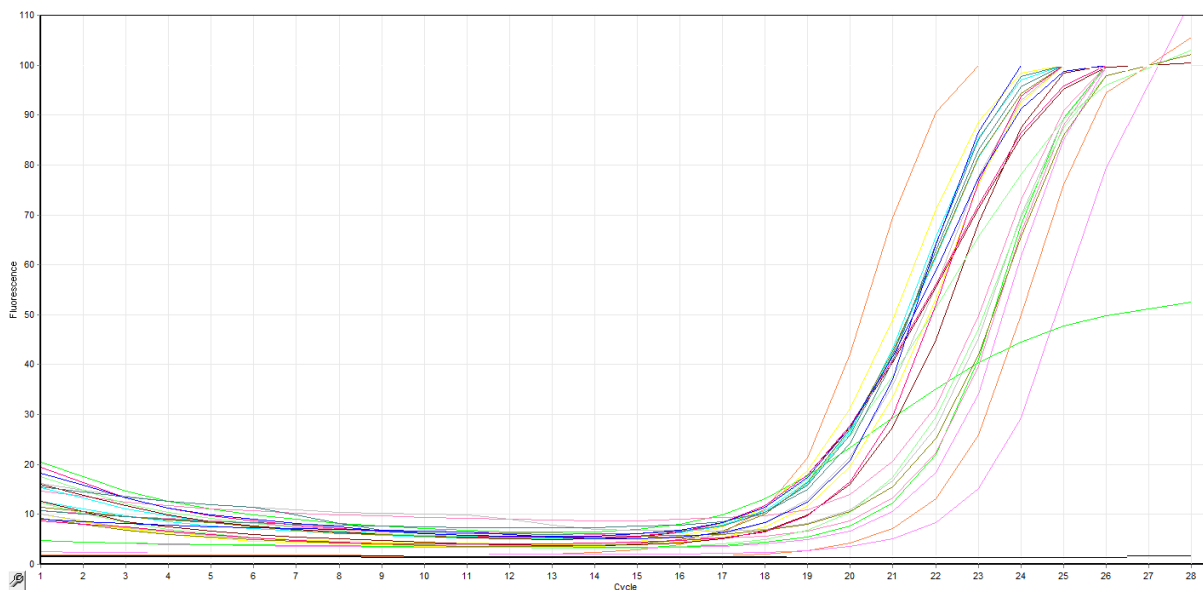
Příloha 10: Agarózový gel s produkty PCR před používáním polysacharidů s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



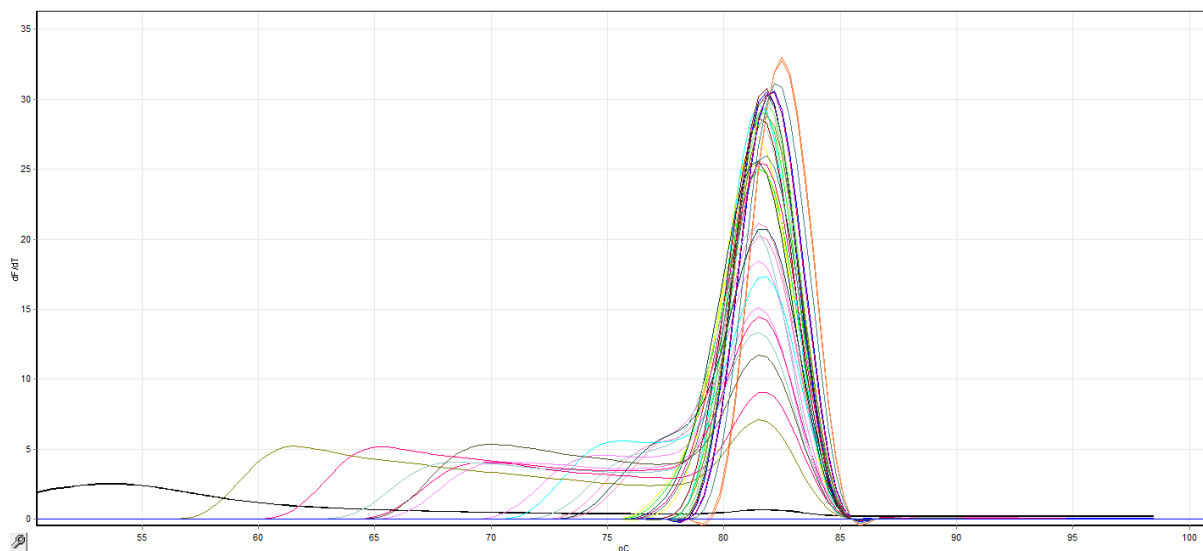
Příloha 11: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 33 až 60 respondentky „M“ a 1 až 4 respondentky „L“ po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



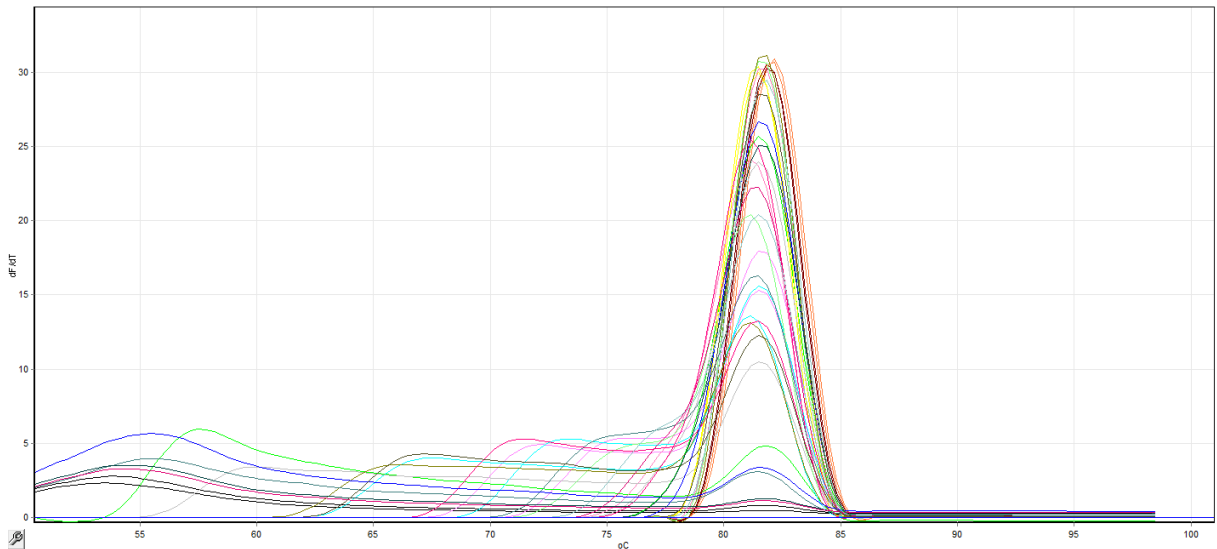
Příloha 12: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 5 až 36 respondentky „L“ po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



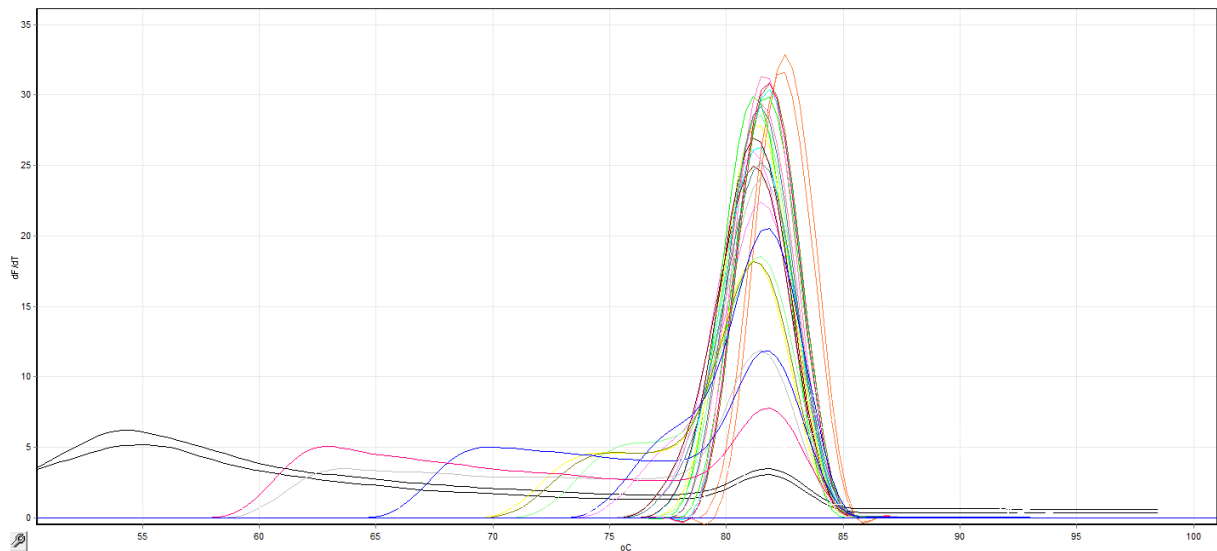
Příloha 13: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 37 až 60 respondentky „L“ po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



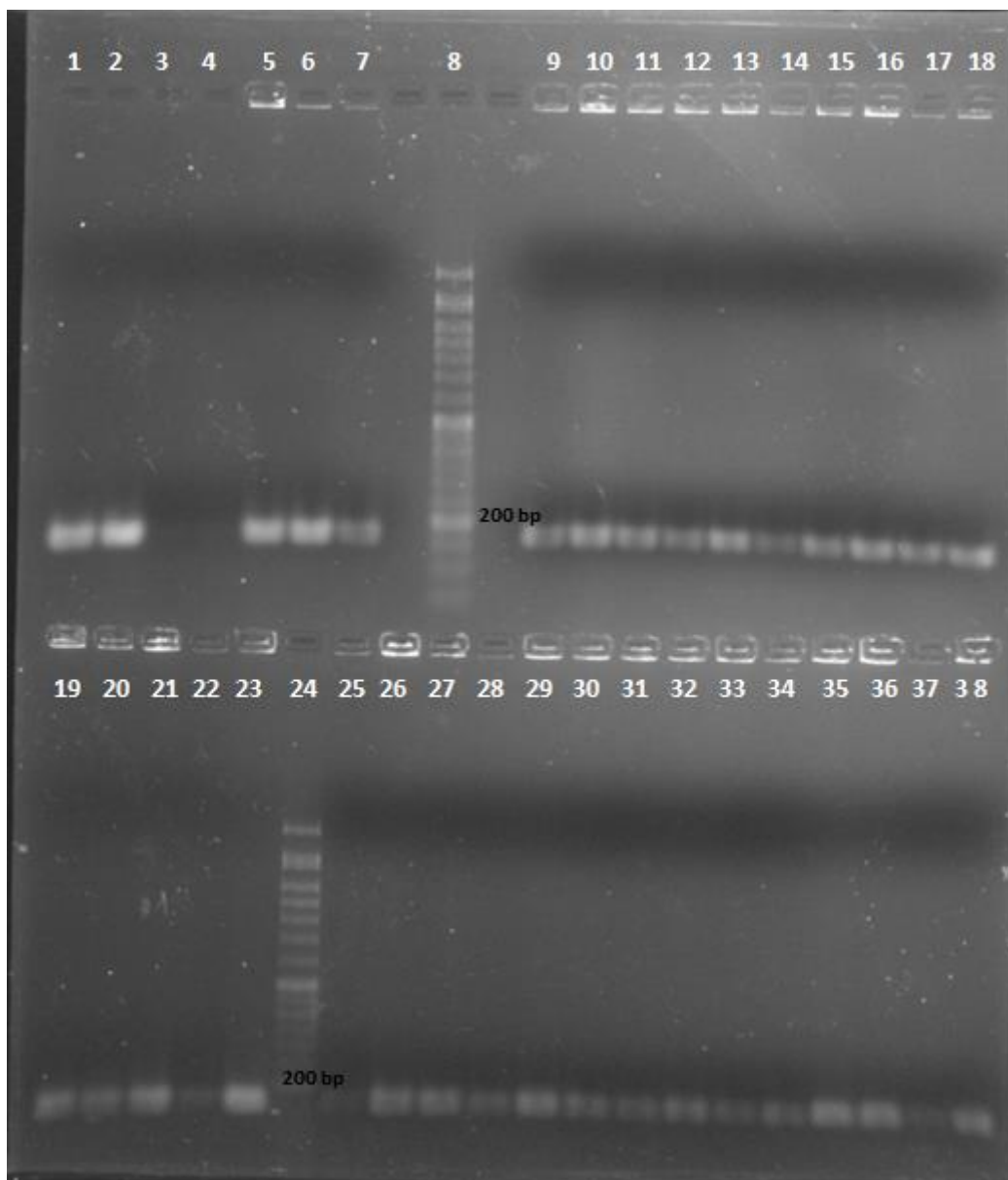
Příloha 14: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 33 až 60 respondentky „M“ a 1 až 4 respondentky „L“ po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



Příloha 15: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 5 až 36 respondentky „L“ po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



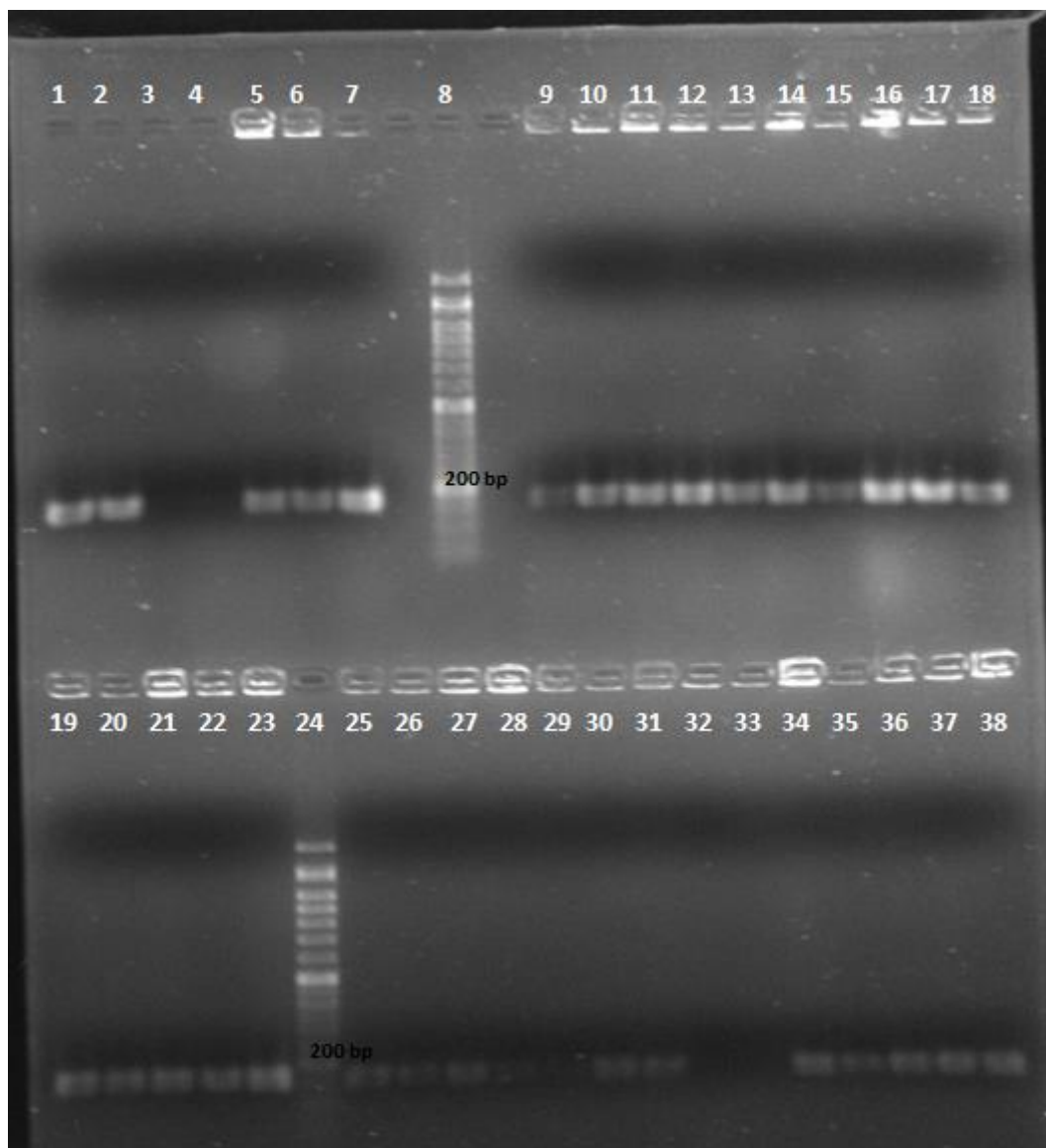
Příloha 16: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 37 až 60 respondentky „L“ po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „M“ kolonie 33	+++
6	respondentka „M“ kolonie 34	+++
7	respondentka „M“ kolonie 35	++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „M“ kolonie 36	++
10	respondentka „M“ kolonie 37	++
11	respondentka „M“ kolonie 38	++
12	respondentka „M“ kolonie 39	++
13	respondentka „M“ kolonie 40	++
14	respondentka „M“ kolonie 41	+
15	respondentka „M“ kolonie 42	++

16	respondentka „M“ kolonie 43	++
17	respondentka „M“ kolonie 44	++
18	respondentka „M“ kolonie 45	++
19	respondentka „M“ kolonie 46	++
20	respondentka „M“ kolonie 47	++
21	respondentka „M“ kolonie 48	++
22	respondentka „M“ kolonie 49	+
23	respondentka „M“ kolonie 50	++
24	Standard DNA 50 bp	-
25	respondentka „M“ kolonie 51	+
26	respondentka „M“ kolonie 52	++
27	respondentka „M“ kolonie 53	++
28	respondentka „M“ kolonie 54	++
29	respondentka „M“ kolonie 55	++
30	respondentka „M“ kolonie 56	+
31	respondentka „M“ kolonie 57	+
32	respondentka „M“ kolonie 58	++
33	respondentka „M“ kolonie 59	+
34	respondentka „M“ kolonie 60	+
35	respondentka „L“ kolonie 1	++
36	respondentka „L“ kolonie 2	++
37	respondentka „L“ kolonie 3	+
38	respondentka „L“ kolonie 4	+

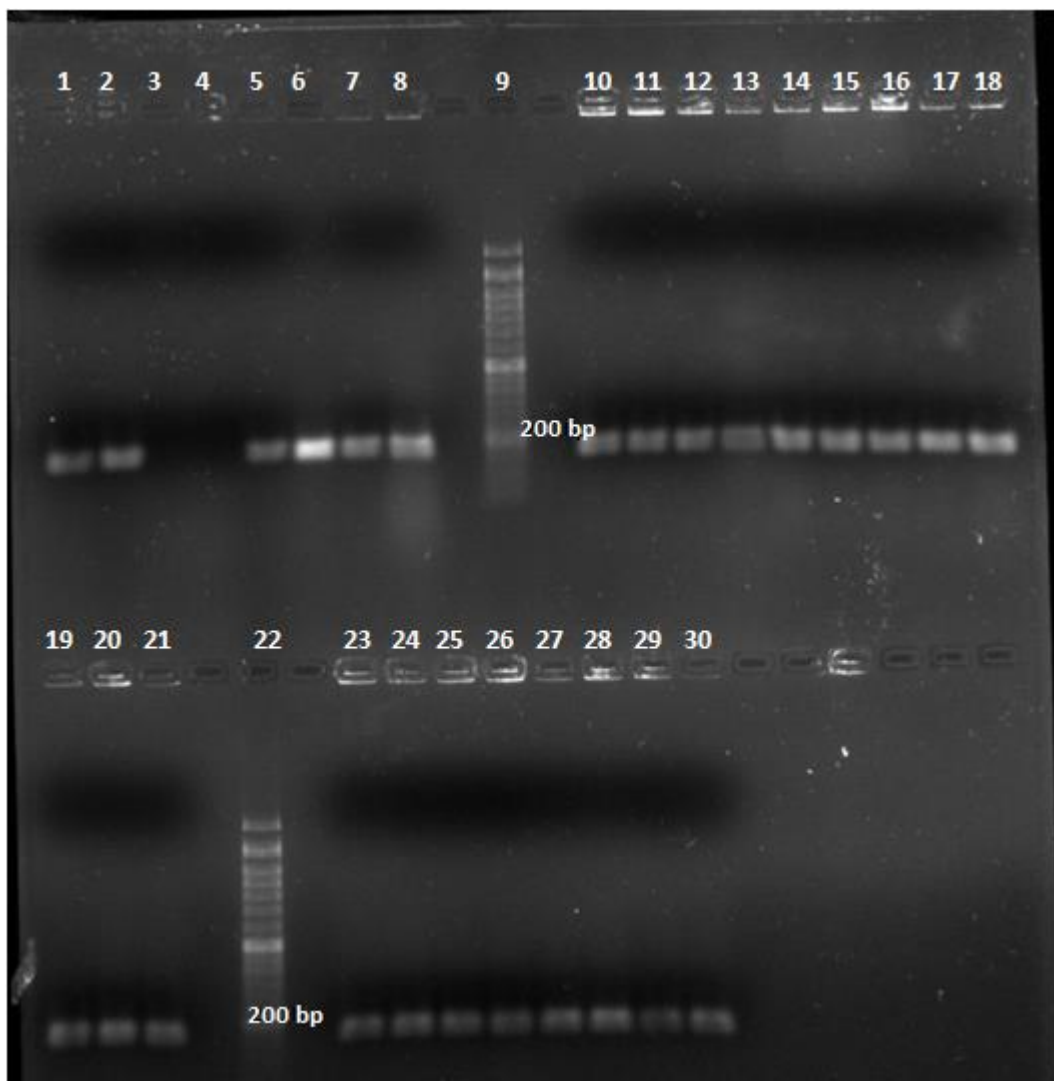
Příloha 17: Agarózový gel s produkty PCR po používání polysacharidu Nanomoist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 5	++
6	respondentka „L“ kolonie 6	++
7	respondentka „L“ kolonie 7	+++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „L“ kolonie 8	+
10	respondentka „L“ kolonie 9	++
11	respondentka „L“ kolonie 10	++
12	respondentka „L“ kolonie 11	++
13	respondentka „L“ kolonie 12	++
14	respondentka „L“ kolonie 13	++
15	respondentka „L“ kolonie 14	+
16	respondentka „L“ kolonie 15	+++

17	respondentka „L“ kolonie 16	+++
18	respondentka „L“ kolonie 17	++
19	respondentka „L“ kolonie 18	++
20	respondentka „L“ kolonie 19	++
21	respondentka „L“ kolonie 20	++
22	respondentka „L“ kolonie 21	++
23	respondentka „L“ kolonie 22	++
24	Standard DNA 50 bp	-
25	respondentka „L“ kolonie 23	+
26	respondentka „L“ kolonie 24	+
27	respondentka „L“ kolonie 25	+
28	respondentka „L“ kolonie 26	+
29	respondentka „L“ kolonie 27	+
30	respondentka „L“ kolonie 28	+
31	respondentka „L“ kolonie 29	+
32	respondentka „L“ kolonie 30	-
33	respondentka „L“ kolonie 31	-
34	respondentka „L“ kolonie 32	+
35	respondentka „L“ kolonie 33	+
36	respondentka „L“ kolonie 34	+
37	respondentka „L“ kolonie 35	+
38	respondentka „L“ kolonie 36	+

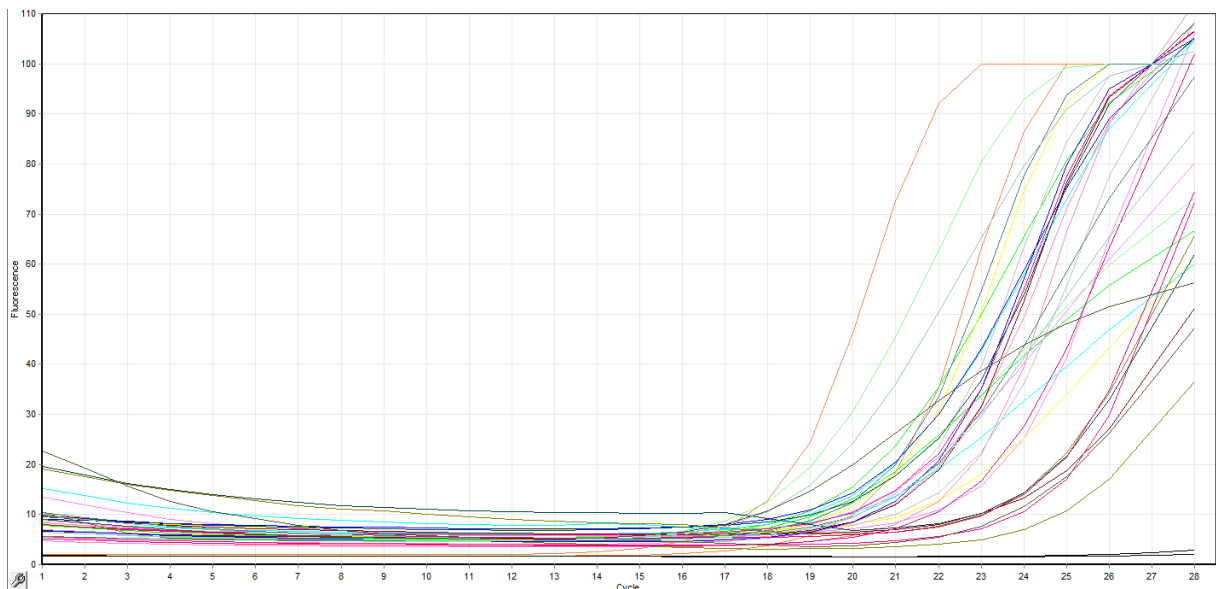
Příloha 18: Agarózový gel s produkty PCR po používání polysacharidu Nanomoist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



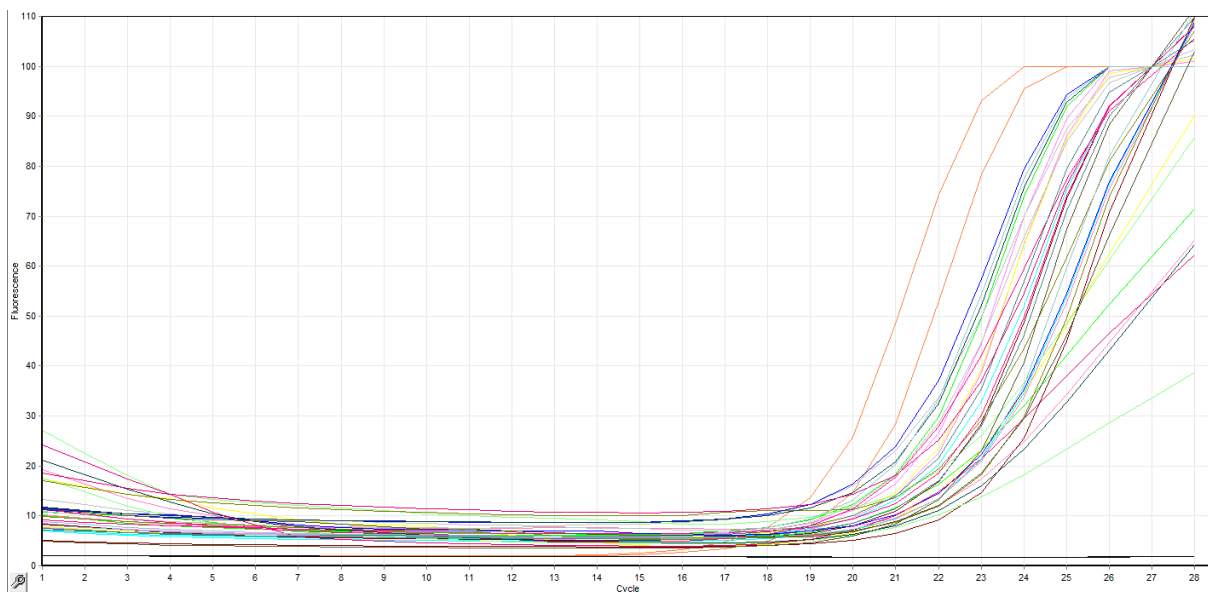
Běh	DNA	Detekce
1	PK	++
2	PK	++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 37	++
6	respondentka „L“ kolonie 38	+++
7	respondentka „L“ kolonie 39	++
8	respondentka „L“ kolonie 40	++
9	Standard DNA 50 bp	-
10	respondentka „L“ kolonie 41	++
11	respondentka „L“ kolonie 42	++
12	respondentka „L“ kolonie 43	++
13	respondentka „L“ kolonie 44	++
14	respondentka „L“ kolonie 45	++
15	respondentka „L“ kolonie 46	++
16	respondentka „L“ kolonie 47	++
17	respondentka „L“ kolonie 48	++
18	respondentka „L“ kolonie 49	++
19	respondentka „L“ kolonie 50	++

20	respondentka „L“ kolonie 51	++
21	respondentka „L“ kolonie 52	++
22	Standard DNA 50 bp	-
23	respondentka „L“ kolonie 53	++
24	respondentka „L“ kolonie 54	++
25	respondentka „L“ kolonie 55	++
26	respondentka „L“ kolonie 56	++
27	respondentka „L“ kolonie 57	++
28	respondentka „L“ kolonie 58	++
29	respondentka „L“ kolonie 59	+
30	respondentka „L“ kolonie 60	++

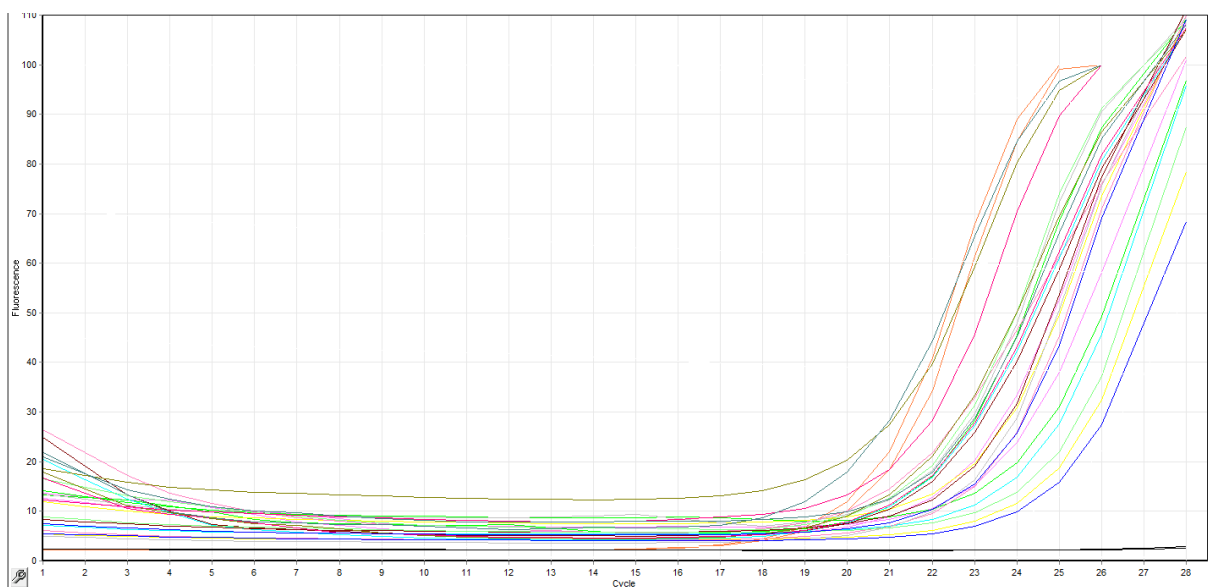
Příloha 19: Agarózový gel s produkty PCR po používání polysacharidu Nano moist s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



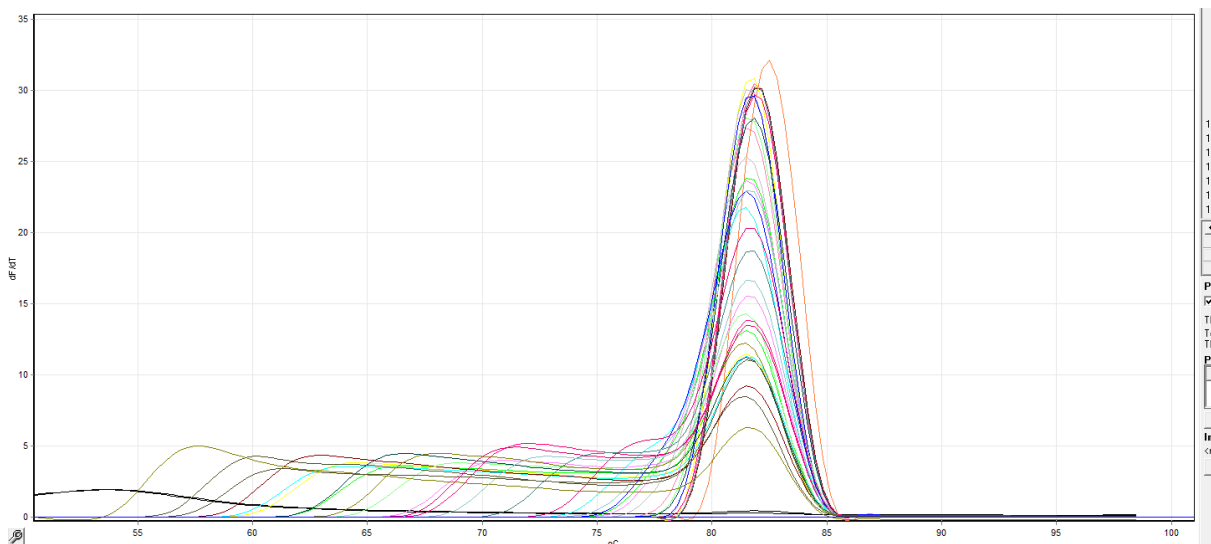
Příloha 20: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 33 až 60 respondentky „L“ a 1 až 4 respondentky „M“ po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



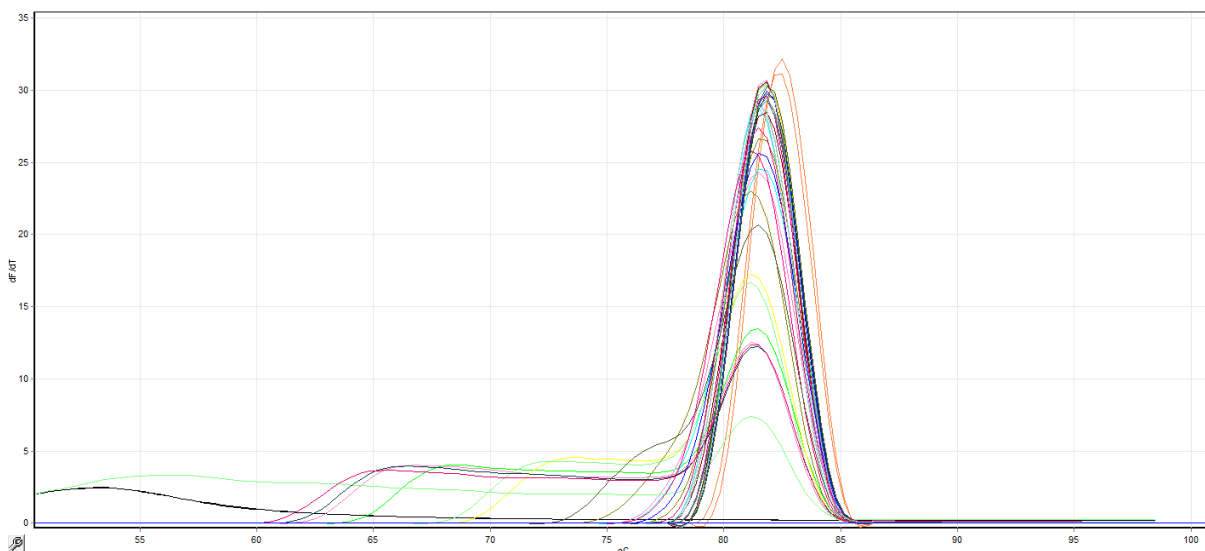
Příloha 21: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 5 až 36 respondentky „M“ po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



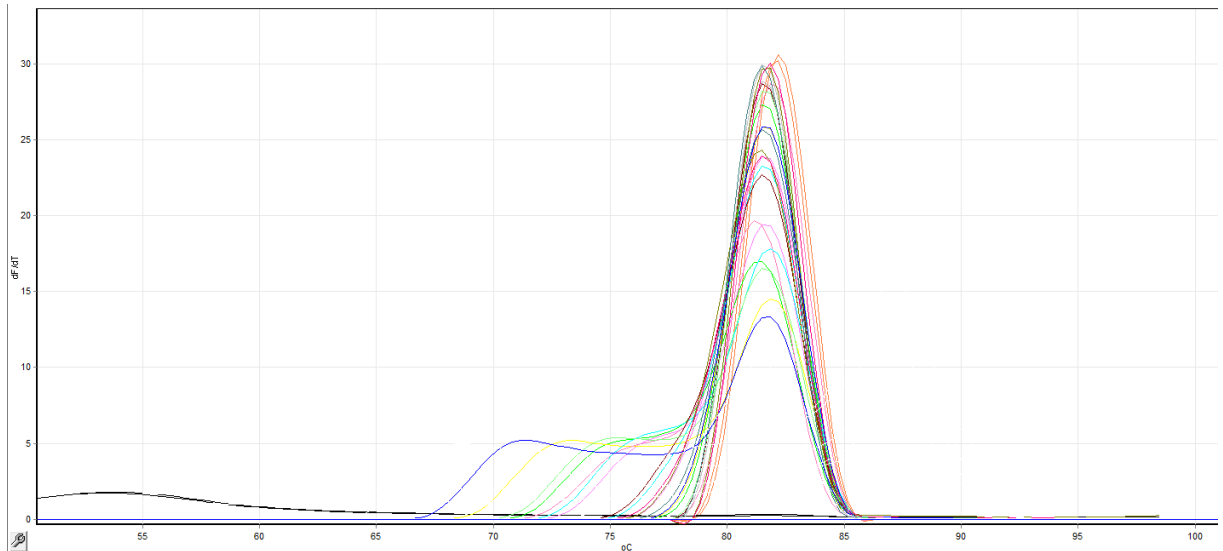
Příloha 22: Amplifikační křivky DNA izolovaných kolonií 37 až 60 respondentky „M“ po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



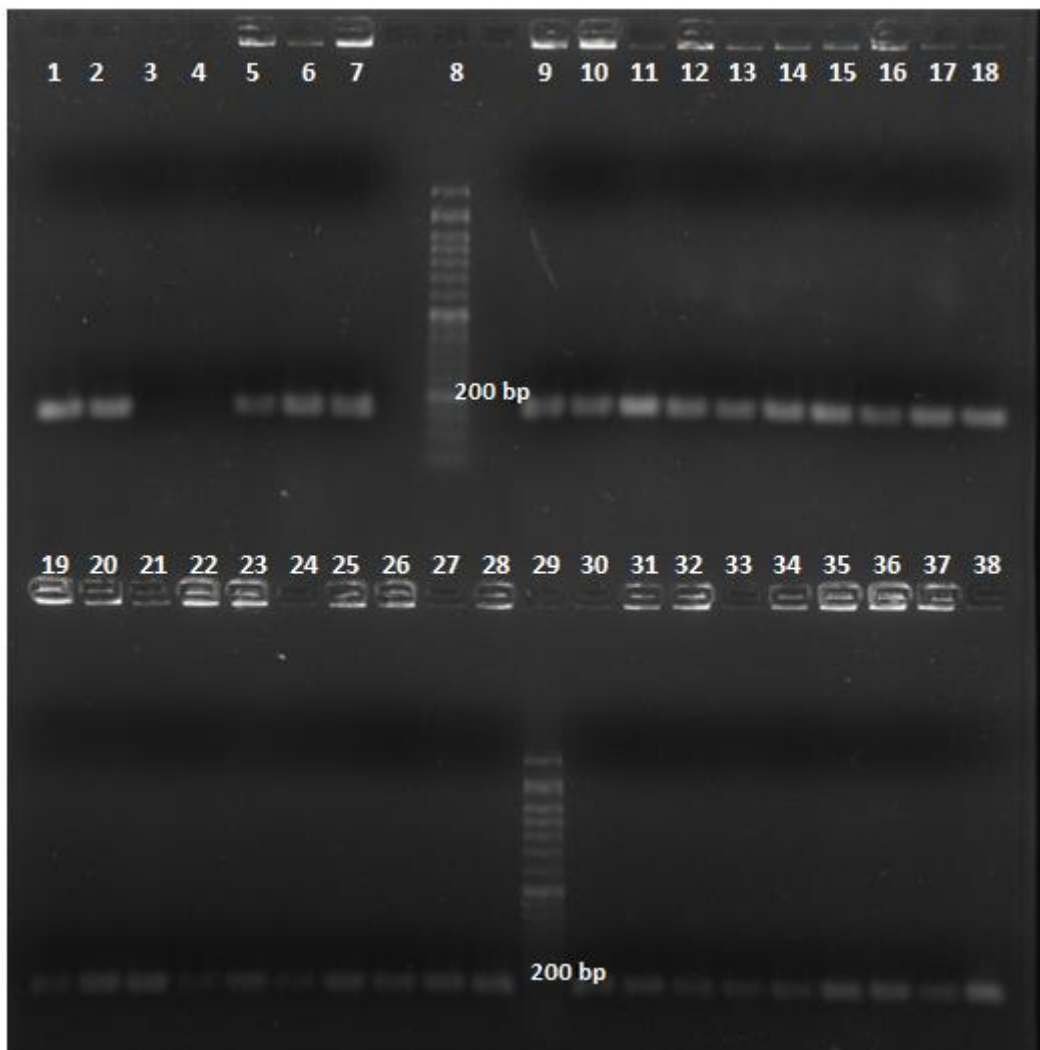
Příloha 23: Analýza křivek tání izolovaných kolonií 33 až 60 respondentky „L“ a 1 až 4 respondentky „M“ po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



Příloha 24: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 5 až 36 respondentky „M“ po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



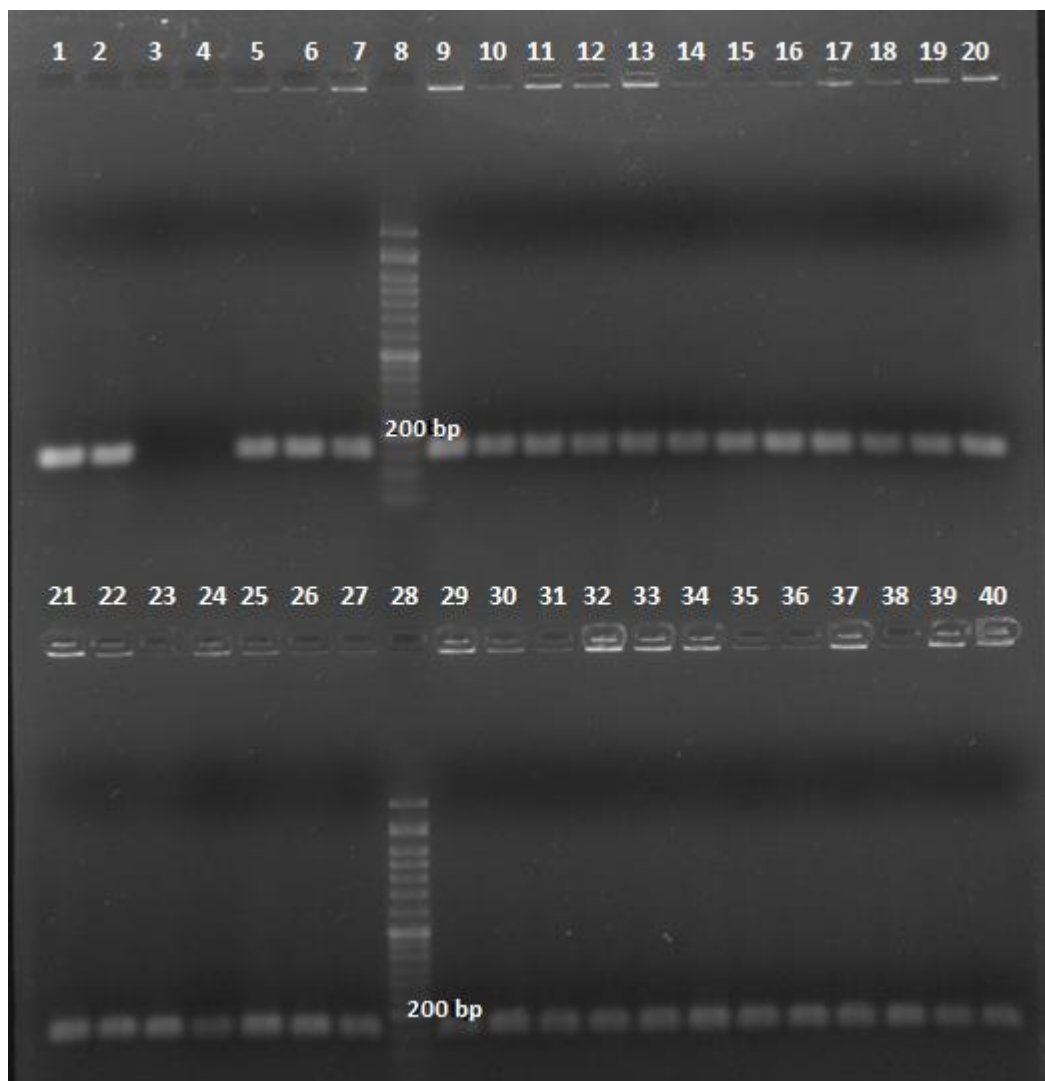
Příloha 25: Analýza křivek tání DNA izolovaných kolonií 37 až 60 respondentky „M“ po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE, PK - oranžová, NK- černá



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++

2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „L“ kolonie 33	++
6	respondentka „L“ kolonie 34	+++
7	respondentka „L“ kolonie 35	+++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „L“ kolonie 36	++
10	respondentka „L“ kolonie 37	++
11	respondentka „L“ kolonie 38	+++
12	respondentka „L“ kolonie 39	++
13	respondentka „L“ kolonie 40	++
14	respondentka „L“ kolonie 41	+++
15	respondentka „L“ kolonie 42	+++
16	respondentka „L“ kolonie 43	++
17	respondentka „L“ kolonie 44	+++
18	respondentka „L“ kolonie 45	+++
19	respondentka „L“ kolonie 46	+
20	respondentka „L“ kolonie 47	+
21	respondentka „L“ kolonie 48	+
22	respondentka „L“ kolonie 49	+
23	respondentka „L“ kolonie 50	+
24	respondentka „L“ kolonie 51	+
25	respondentka „L“ kolonie 52	+
26	respondentka „L“ kolonie 53	-
27	respondentka „L“ kolonie 54	+
28	respondentka „L“ kolonie 55	+
29	Standard DNA 50 bp	+
30	respondentka „L“ kolonie 56	+
31	respondentka „L“ kolonie 57	+
32	respondentka „L“ kolonie 58	+
33	respondentka „L“ kolonie 59	+
34	respondentka „L“ kolonie 60	+
35	respondentka „M“ kolonie 1	++
36	respondentka „M“ kolonie 2	++
37	respondentka „M“ kolonie 3	+
38	respondentka „M“ kolonie 4	++

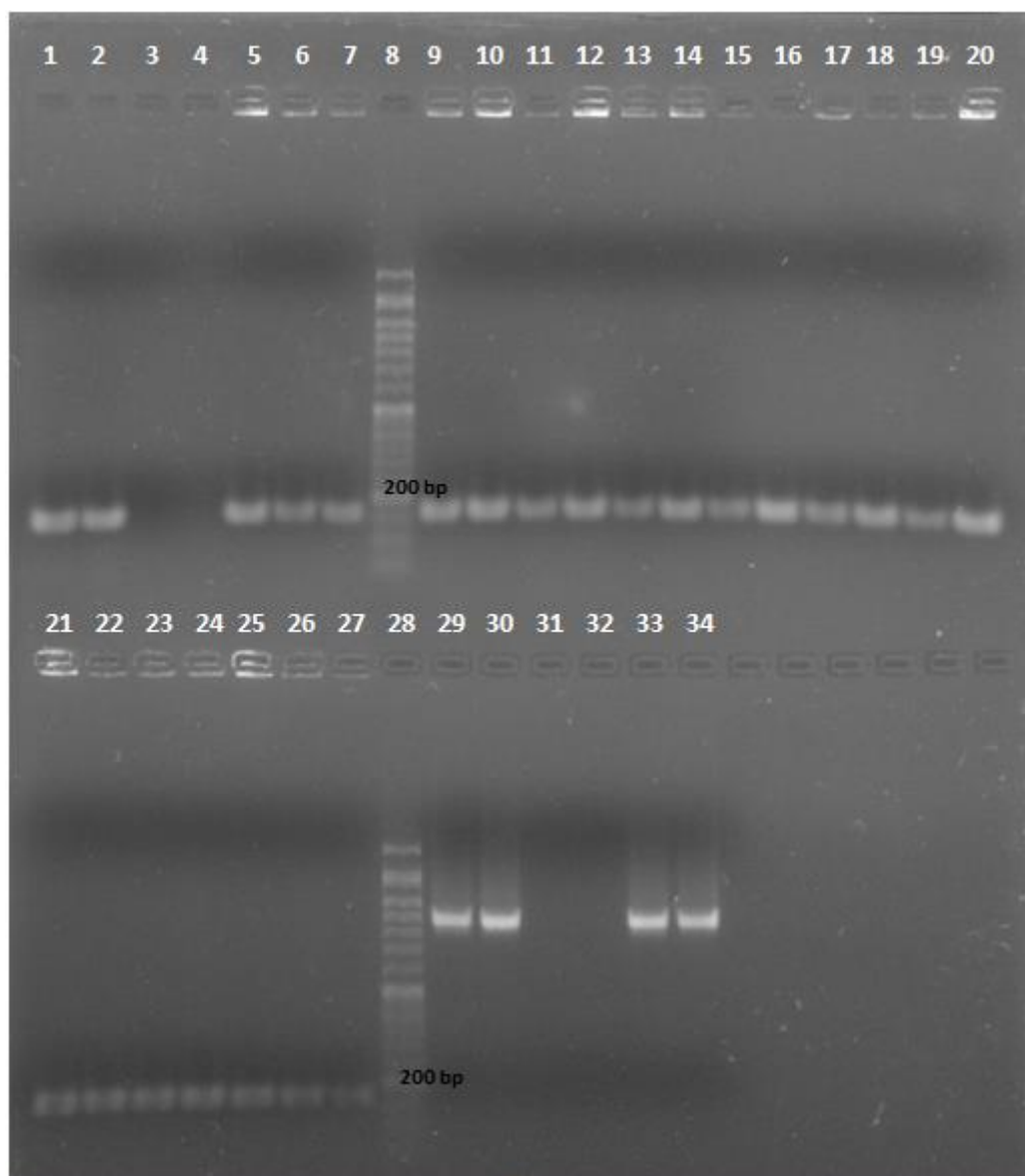
Příloha 26: Agarózový gel s produkty PCR po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



Běh	DNA	Detekce
1	PK	+++
2	PK	+++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „M“ kolonie 5	++
6	respondentka „M“ kolonie 6	++
7	respondentka „M“ kolonie 7	++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „M“ kolonie 8	++
10	respondentka „M“ kolonie 9	++
11	respondentka „M“ kolonie 10	++
12	respondentka „M“ kolonie 11	++
13	respondentka „M“ kolonie 12	++
14	respondentka „M“ kolonie 13	++
15	respondentka „M“ kolonie 14	++
16	respondentka „M“ kolonie 15	++
17	respondentka „M“ kolonie 16	++
18	respondentka „M“ kolonie 17	++
19	respondentka „M“ kolonie 18	++

20	respondentka „M“ kolonie 19	++
21	respondentka „M“ kolonie 20	++
22	respondentka „M“ kolonie 21	++
23	respondentka „M“ kolonie 22	++
24	respondentka „M“ kolonie 23	+
25	respondentka „M“ kolonie 24	++
26	respondentka „M“ kolonie 25	++
27	respondentka „M“ kolonie 26	++
28	DNA Standard 50 bp	-
29	respondentka „M“ kolonie 27	++
30	respondentka „M“ kolonie 28	++
31	respondentka „M“ kolonie 29	++
32	respondentka „M“ kolonie 30	++
33	respondentka „M“ kolonie 31	++
34	respondentka „M“ kolonie 32	++
35	respondentka „M“ kolonie 33	++
36	respondentka „M“ kolonie 34	++
37	respondentka „M“ kolonie 35	++
38	respondentka „M“ kolonie 36	++
39	respondentka „M“ kolonie 37	++
40	respondentka „M“ kolonie 38	++

Příloha 27: Agarózový gel s produkty PCR po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)



Běh	DNA	Detekce
1	PK	++
2	PK	++
3	NK	-
4	NK	-
5	respondentka „M“ kolonie 39	++
6	respondentka „M“ kolonie 40	++
7	respondentka „M“ kolonie 41	++
8	Standard DNA 50 bp	-
9	respondentka „M“ kolonie 42	++
10	respondentka „M“ kolonie 43	++
11	respondentka „M“ kolonie 44	++
12	respondentka „M“ kolonie 45	++
13	respondentka „M“ kolonie 46	+
14	respondentka „M“ kolonie 47	++
15	respondentka „M“ kolonie 48	+
16	respondentka „M“ kolonie 49	++

17	respondentka „M“ kolonie 50	+
18	respondentka „M“ kolonie 51	++
19	respondentka „M“ kolonie 52	+
20	respondentka „M“ kolonie 53	+
21	respondentka „M“ kolonie 54	+
22	respondentka „M“ kolonie 55	+
23	respondentka „M“ kolonie 56	+
24	respondentka „M“ kolonie 57	+
25	respondentka „M“ kolonie 58	+
26	respondentka „M“ kolonie 59	+
27	respondentka „M“ kolonie 60	+
28	DNA Standard 50 bp	-

Příloha 28: Agarózový gel s produkty PCR po používání polysacharidu PoLevan S s primery femA-SE_F a femA-SE_R specifickými pro SE (+, ++, +++ intenzita detekovaného produktu PCR, -produkt PCR nebyl detekován)