



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV TENZIDŮ A KOSMETICKÝCH POLYSACHARIDŮ NA PARAMETRY PLETI A JEJÍ MIKROBIOM

INFLUENCE OF SURFACTANTS AND COSMETIC POLYSACCHARIDES ON SKIN PARAMETERS AND
HUMAN SKIN MICROBIOME

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alina Pilipenco

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Matějková Ilona, Mgr.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1408/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Alina Pilipenco**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Matějková Ilona, Mgr.**

Název diplomové práce:

Vliv tenzidů a kosmetických polysacharidů na parametry pleti a její mikrobiom

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše – vypracování literárního přehledu ma téma kožní mikrobiom a jeho struktura a funkce
- 2) Zjištění vlivu tenzidů na parametry pleti
- 3) Stanovení vlivu tenzidů na hlavní druhy mikrobiomu
- 4) Testování vlivu kosmetických polysacharidů na obnovu parametrů kůže
- 5) Určení vlivu kosmetických polysacharidů na hlavní druhy mikrobiomu kůže

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

Bc. Alina Pilipenco
student(ka)

Matějková Ilona, Mgr.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo zkoumání vlivu tenzidů a kosmetických polysacharidů na parametry pleti a její mikrobiom. V rámci stanovení účinku tenzidů byly testovány 3 povrchově aktivní látky: Dodecyl Sulfat Sodný (SDS), Kokamidopropyl betain (CAPB), Decylglucosid (DG). Pro porovnání byla použita i destilovaná voda. Pro další část experimentální práce bylo vybráno 6 surovin: vysokomolekulární Hyaluronic Acid (HMW HA), nízkomolekulární Hyaluronic Acid (LMW HA), Sodium Caproyl Hyaluronate (CaproylHA), Sodium Carboxymethyl β -Glucan (NaCMG), Schizophyllan a Glucomannan. Pro porovnání byly zařazeny do testů také placebo a neošetřená kontrola (pokožka ošetřená pouze CAPB). První část práce je literární rešerší na zadané téma, která obsahuje následující části: anatomie kůže a její biofyzikální vlastnosti, kožní mikrobiom a jeho funkce, popsání použitých tenzidů a polysacharidů. Experimentální část je především zaměřena na bioinženýrské metody hodnocení kožních parametru a qRT-PCR pro stanovení relativního zastoupení hlavních bakteriálních druhů kožního mikrobiomu. Nejprve byl analyzován efekt na CT genu 16S rDNA a pro další analýzu byly zvolené kmeny *Propionibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis*. Na závěr je uveden přehled všech vlastností vybraných látek a zhodnocení z ohledu na jejich aplikace v kosmetice.

Klíčová slova

Kožní mikrobiom, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* polysacharidy, tenzidy, qRT-PCR, hydratace, sebum, TEWL, kožní textura.

Abstract

The aim of this diploma thesis was to investigate the effect of surfactants and cosmetic polysaccharides on skin parameters and its microbiome. Three surfactants were tested to determine their effect: Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Cocamidopropyl Betaine (CAPB), Decylglucoside (DG). Distilled water was also used for comparison. For the next part of the experimental work were selected 6 polysaccharides: high molecular weight Hyaluronic Acid (HMW HA), very low molecular weight Hyaluronic Acid (VLMW HA), Sodium Caproyl Hyaluronate (CaproylHA), Sodium Carboxymethyl β -Glucan (NaCMG), Schizophyllan and Glucomannan. For comparison, placebo and untreated control (only CAPB treatment) were also included in the tests. The first part of the work is a literature search on the assigned topic, which contains the following parts: skin anatomy and its biophysical properties, skin microbiome and its functions, description of used surfactants and polysaccharides. The experimental part is mainly focused on bioengineering methods for evaluation of skin parameters and qRT-PCR to determine the relative proportion of main bacterial species of skin microbiome. First, the effect on the CT gene of 16S rDNA was analysed, and *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* strains were selected for further analysis. In conclusion are presented an overview of all properties of selected substances and assessment of their application in cosmetics.

Keywords

Skin microbiome, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* polysaccharides, surfactants, qRT-PCR, hydration, sebum, TEWL, skin texture.

PILIPENCO, Alina. Vliv tenzidů a kosmetických polysacharidů na parametry pleti a její mikrobiom. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124137>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce: Matějková Ilona, Mgr.

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 využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí Matějkové Iloně, Mgr za účinnou metodickou a pedagogickou pomoc, a také za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Andree Němcové, Ph.D. za velikou ochotu, podporu a pomoc při vypracování diplomové práce.

Určitě bych taky poděkovala pracovníkům firmy Contipro a.s. za vstřícný přístup a zúčastnění se v měření. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala Soně Moravčikové, která mi pomáhala při měření.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Kůže.....	8
2.1.1	Anatomie kůže.....	8
2.1.2	Biofyzikální parametry kůže	11
2.2	Mikrobiom kůže	15
2.2.1	Bakterie	16
2.2.2	Houby	17
2.2.3	Roztoči	17
2.2.4	Viry.....	17
2.2.5	Faktory ovlivňující mikrobiom kůže.....	18
2.2.6	Funkce mikrobiomu	21
2.3	Tenzidy	22
2.3.1	Laurylsulfát sodný.....	22
2.3.2	Decylglukosid.....	22
2.3.3	Kokamidopropyl betain.....	23
2.4	Polysacharidy používané v kosmetice.....	23
2.4.1	Sodium hyaluronate.....	23
2.4.2	Hydrolyzed Sodium Hyaluronate.....	24
2.4.3	Sodium Caproyl Hyaluronate.....	24
2.4.4	Schizophyllan	25
2.4.5	Sodium Carboxymethyl β -Glucan.....	25
2.4.6	Glucomannan	26
2.5	PCR.....	26
2.5.1	Základní princip PCR.....	26
2.5.2	Real time RCR	30
2.5.3	Složení PCR směsi	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1	Použité chemikálie.....	35
3.2	Komponenty pro qPCR	35
3.3	Přístroje a pomůcky	35
3.4	Příprava detergentu.....	36

3.5	Příprava kosmetických emulzí.....	36
3.6	Vliv tenzidů na parametry a mikrobiom kůže	37
3.7	Vliv kosmetických surovin na obnovu parametrů kůže a mikrobiomu.....	38
3.8	Měření parametrů kůže	38
3.9	Izolace DNA	38
3.10	qRT-PCR.....	39
3.11	Statistické zpracování dat	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1	Vliv tenzidů na parametry kůže.....	41
4.1.1	Sebum.....	41
4.1.2	Textura	42
4.1.3	TEWL.....	43
4.1.4	Hydratace	44
4.2	Vliv detergentů na mikrobiom kůže	44
4.2.1	16S rDNA.....	45
4.2.2	<i>Propionibacterium acnes</i>	46
4.2.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	47
4.3	Vliv kosmetických polysacharidů na parametry kůže.....	47
4.3.1	Sebum.....	48
4.3.2	Textura	49
4.3.3	TEWL.....	50
4.3.4	Hydratace	51
4.4	Vliv kosmetických polysacharidů na mikrobiom kůže po aplikaci tenzidu.....	51
4.4.1	16S rDNA.....	52
4.4.2	<i>Propionibacterium acnes</i>	53
4.4.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	53
5	ZÁVĚR.....	55
6	LITERATURA.....	56
7	ZKRATKY	62
8	PŘÍLOHA.....	63

1 ÚVOD

Čištění pleti je složitá fyzikální a chemická interakce mezi vodou, detergentem a pokožkou. Hlavní funkcí čistících přípravků a tenzidů, které jsou v nich přítomné, je odstranění produktů kůže, jako je sebum, zaschlé zbytky potu a odumřelých buněk *Stratum corneum*. Současně jsou odstraňovány nečistoty a část mikroorganismů sídlících na povrchu pokožky.

Čistící prostředky jsou účinné při udržování hygieny pokožky, ale mohou způsobit poškození kožní bariéry. To nastává, protože povrchově aktivní látky nemohou rozlišovat mezi lipofilními zbytky kůže vyžadujícími odstranění a lipofilními intercelulárními lipidy potřebnými pro udržování bariéry.

Čištění kůže se stalo součástí léčivého mytí v 19. století a později bylo začleněno do každodenní péče o tělo. Dopad přípravků na odlíčení na kůži byl předmětem řady klinických studií a výzkum stále pokračuje. Moderní výzkumy prokázaly důležitost zdravého mikrobiomu. Jeho poruchy mohou vést ke kožním onemocněním, jako je akné, ekzém, či dermatitida. Proto pro odlíčení a čištění pleti je důležité používat vhodné přípravky, které jsou k tomuto účelu speciálně určeny [1].

Hlavním zaměřením kosmetiky je zlepšování kožních parametrů, jako je hydratace, hladkost a lesk. Výrazným moderním trendem kosmetiky je v současnosti také mikrobiom kůže, jmenovitě látky, které se mohou chovat jako prebiotika a podporovat růst nutných mikroorganismů.

V současnosti je k dispozici velké množství metod pro přímé nebo nepřímé vyhodnocení vlivu kosmetických přípravků na vlastnosti kůže. Mezi základní metody řadíme například měření hydratace SC, transepidermální ztráty vody (TEWL), produkce seba (obsah lipidů na povrchu SC), či textury povrchu kůže.

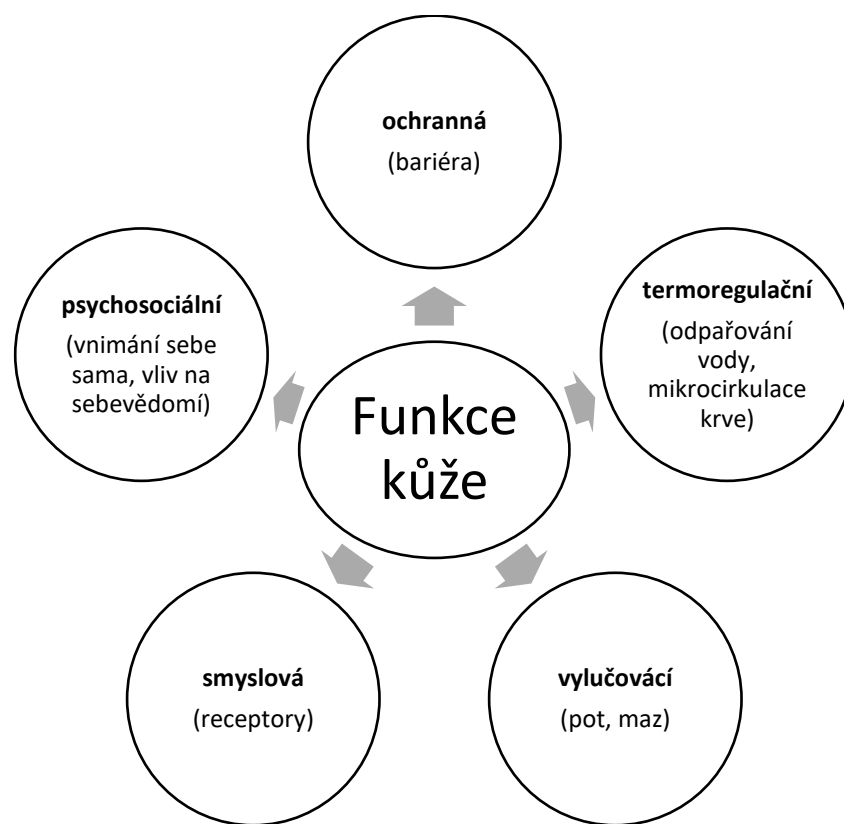
Při analýze bakteriální části mikrobiomu se často používá metoda amplifikace prokaryotického genu pro malou ribozomální podjednotku (16S rDNA) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) přímo ze vzorků získaných z povrchu kůže. Přístup k sekvenování genu 16S rDNA se spoléhá na sekvenování genu 16S rDNA jako genetického markéru ke studiu bakteriální fylogeneze a taxonomie [2].

Cílem teoretické části práce je studium literatury a vypracování literárního přehledu na téma kožní mikrobiom a jeho struktura a funkce. Cílem experimentální části práce je sledování vlivu vybraných tenzidů na vybrané parametry pleti a kožní mikrobiom. Dalším zaměřením je sledování účinku některých kosmetických polysacharidů na obnovu parametrů kůže a určení jejich vlivu na hlavní druhy mikrobiomu kůže.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Lidská kůže je největším multifunkčním orgánem těla, který tvoří bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím organismu. U dospělého člověka má plochu cca 1,8 m² a její hmotnost tvoří přibližně 15 % z celkové hmotnosti těla. Z chemického hlediska kůže obsahuje 64 % vody, 22 % bílkovin, 13 % lipidů, 0,5 % polysacharidů a další látky organické i anorganické povahy. Má řadu funkcí jak fyzikálních a biochemických, tak imunologických. Vzhledem k tomu, že pokožka je v kontaktu s prostředím, hraje důležitou roli při ochraně těla před patogeny a zároveň představuje prostředí pro komensální mikroorganismy, které ovlivňují lidské zdraví a nemoci. Kůže také představuje bariéru proti nadměrným ztrátám vody a mezi její další funkce patří syntéza vitamínu D a ochrana vitamínu B9, uskladňování tuku a ostatní (viz Obrázek 1) [3],[4].



Obrázek 1 Funkce kůže (Upraveno z [1]).

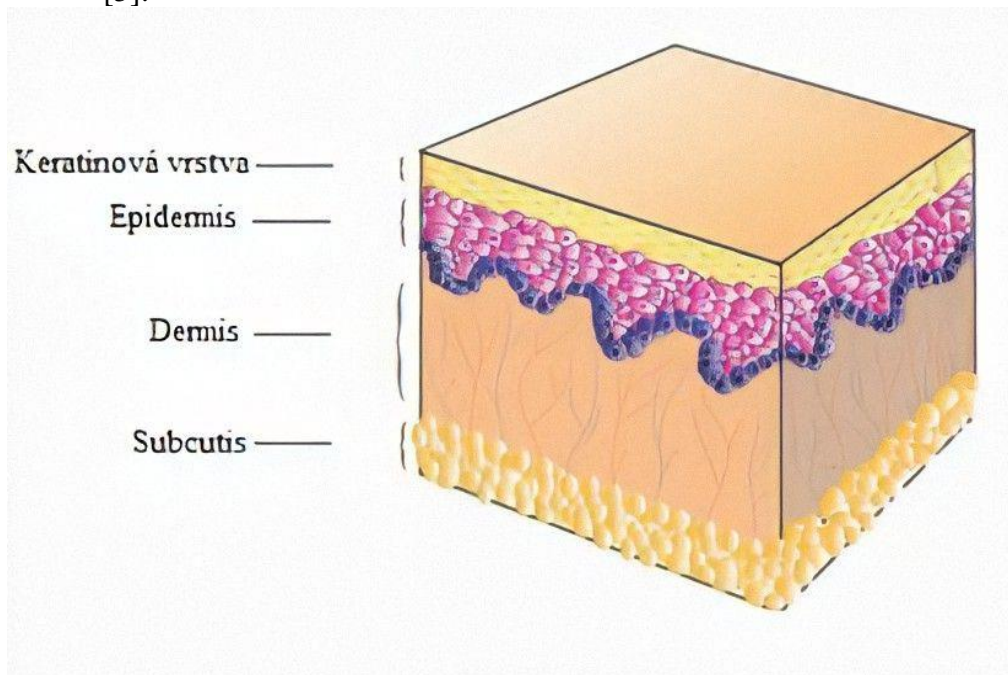
2.1.1 Anatomie kůže

Tloušťka kůže závisí na lokalizaci na těle a na věku člověka a pohybuje se průměrně od 1 do 4 mm. Nejtenčí je na očních víčkách (cca 0,1 mm), naopak je zvláště silná na chodidlech a dlaních rukou, kde je přibližně 1 mm silná. Anatomicky je možné rozlišit dvě vrstvy: *epidermis* a *dermis* (Obrázek 2). Pod *dermis* leží ještě *subcutis* [4],[5].

- *Epidermis* (pokožka) tvoří vnější vrstvu. Tato vrstva je tvořena zejména keratinocyty. Kromě těchto buněk, kterých je až 90 %, pokožka taky obsahuje další typy buněk – melanocyty tvořící 8 % buněk, Langerhansovy buňky, které jsou součástí imunitního systému a Merkelovy buňky, které jsou čidla hmatu. Na bazální membráně této vrstvy

se buňky nepřetržitě dělí pomocí mitózy, kdy se vytváří dvě dceřiné buňky. Jedna zůstává v bazální vrstvě, zatímco druhá migruje směrem k povrchu pokožky. Během tohoto procesu dochází k diferenciaci keratinocytů. Nakonec se mrtvé buňky, korneocyty, v nejsvrchnější vrstvě odlupují [3],[5].

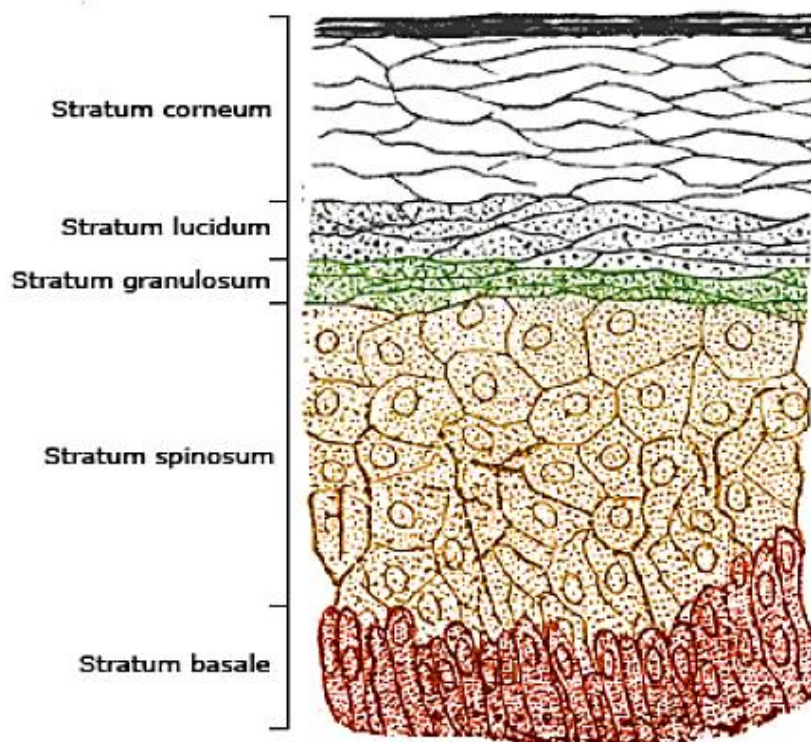
- *Dermis* (škára) - tvoří vrstvu pod epidermis a je silnější než epidermis. Dermis je tvořena hlavně kolagenovými a elastinovými vlákny. Obsahuje také krevní cévy, nervy, smyslové orgány, mazové žlázy, potní žlázy a vlasové folikuly. Obsahuje tři hlavní typy buněk: fibroblasty, makrofágy a mastocyty [5].
- *Subcutis* (podkožní vazivo) - tato vrstva leží pod dermis a skládá se z tukových buněk [5].



Obrázek 2 Anatomické složení kůže. (Upraveno z [5]).

2.1.1.1 Pokožka – epidermis

Epidermis je vnější vrstva kůže, tvořená přibližně 15 až 20 vrstvami buněk, které formují vodotěsný ochranný obal kolem povrchu těla. Jedná se o tenký vrstevnatý epitel z dlaždicových buněk a bazální membránu. V epidermis je možné rozlišit několik vrstev: *Stratum Corneum* (SC), *Stratum Lucidum*, *Stratum Granulosum*, *Stratum Spinosum* a *Stratum basale* (viz Obrázek 3) [5],[6].



Obrázek 3 Vrstvy edidermis [6].

Bariérová funkce SC je zajištěna lipidovými lamelami lokalizovanými v extracelulárních prostorech mezi korneocyty a hydrolipidovým filmem. Tato lamelová struktura se průběžně obnovuje a po poškození se okamžitě opraví. Při nízké vlhkosti se zvětšuje tloušťka SC, zvyšuje se obsah lipidů v něm a zvyšuje se jeho nepropustnost pro vodu. Vodotěsnost této vrstvy je 1000krát vyšší než u jiných membrán živých organismů. Kožní film na jeho povrchu pak také zabraňuje odpařování vody. Tato vrstva zároveň umožňuje mechanickou ochranu (pevnost, pružnost a soudržnost). Spodní epidermální vrstvy jsou také významné v bariérové funkci, takže po SC představují druhou linii epidermální bariéry [7],[8].

Chemická a biochemická bariéra sestává z lipidů, kyselin, hydrolytických enzymů, antimikrobiálních peptidů a makrofágů. Imunologická bariéra je složena z humorálních a buněčných složek imunitního systému. Když je bariérová funkce kůže poškozena fyzikálně nebo chemicky, série homeostatických procesů v bariérové funkci je okamžitě urychlena a bariéra se vrátí na původní úroveň. Tento proces zahrnuje syntézu lipidů, zpracování lipidů a zrychlení exocytózy lamelárních tělísek. Langerhansovy buňky zachycují látky, které pronikly do epidermis, a vyvolají imunologické reakce [7],[8].

2.1.1.2 Škára – dermis

Dermis leží pod epidermis. Tvoří 70–90 % celkové tloušťky kůže. Dermis je jako dobře hydratovaný a perfundovaný mukopolysacharidový gel s elastickými vlastnostmi díky síti propletených elastinových a kolagenových vláken [9].

Dermis obsahuje tři hlavní typy buněk: fibroblasty, makrofágy a žírné buňky (mastocyty). Kromě těchto buněk je dermis také složena z matricových složek, jako je kolagen, který

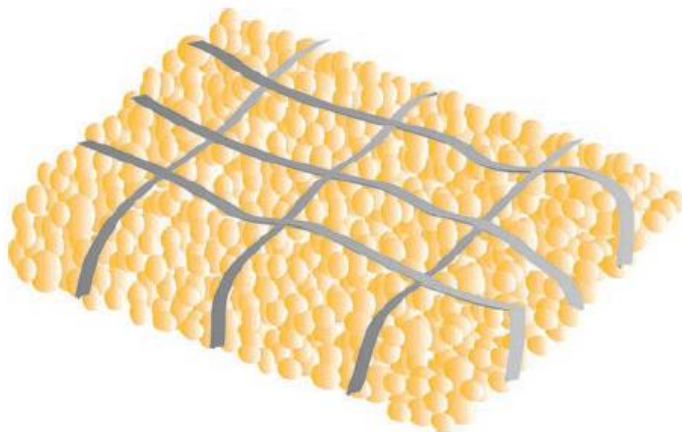
poskytuje pevnost, elastin, který poskytuje elasticitu, a extrafibrilární matrix, extracelulární gelovité látky primárně složené z glykosaminoglykanů (zejména hyaluronanu), proteoglykanů a glykoproteiny. V této vrstvě jsou uloženy také kapiláry, krevní cévy, mazové žlázy, vlasové folikuly, nehty potní žlázy, nervy a nervové receptory [9].

V příčném řezu škály jsou patrné 2 vrstvy: papilární a retikulární. Papilární vrstva je horní a je charakteristická jemnějšími kolagenními vlákny a větším počtem buněk a cév ve srovnání se spodní retikulární vrstvou. Proti pokožce vysílá tzv. papily, což jsou výběžky, ve kterých jsou kapilární sítě a nervová zakončení. Tento systém zvětšuje výživnou plochu pokožky a zvyšuje pevnost spojení epidermis a dermis [9].

2.1.1.3 Podkožní vazivo – subcutis

Podkožní tkáň není součástí kůže a leží pod dermis. Jejím účelem je propojení kůže k podkladové kosti nebo svalů a její zásobení krevními cévami a nervy. Skládá se z volné pojivové tkáně a elastinu. Hlavními typy buněk jsou fibroblasty, makrofágy a adipocyty (subkutánní tkáň obsahuje 50 % tělesného tuku). Obsahuje také Vater-Paciniova tělíska – receptory tahu a tlaku, dále tukové lalůčky a řídké podkožní vazivo, které umožňuje značnou pohyblivost kůže na některých částech těla (na krku, čele atd.) [5].

Tato vrstva tuku pod dermis funguje jako tlumící vrstva k ochraně životně důležitých vnitřních orgánů před mechanickým traumatem a také jako izolační vrstva chránící před chladem. Kromě toho je tuk důležitým zdrojem energie pro tělo a rozpouští se v něm vitamíny A, D, E, K. Množství a distribuce tuku závisí do velké míry na dědičných faktorech, stravě a fyzické aktivitě. Skupiny tukových buněk jsou odděleny tuhými oddíly tvořenými hlavně kolagenními vlákny, jak je znázorněno na obrázku 4 [5].



Obrázek 4 Skupiny tukových buněk oddělené kolagenními vlákny[5].

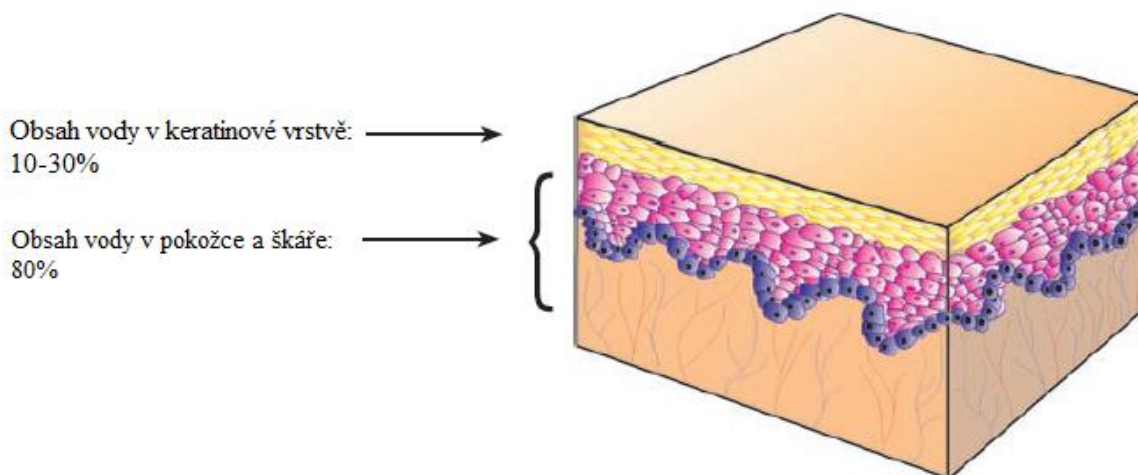
2.1.2 Biofyzikální parametry kůže

V současnosti je k dispozici velké množství metod pro přímé nebo nepřímé vyhodnocení vlastností kůže. Mezi základní metody řadíme například měření hydratace SC, transepidermální ztráty vody (TEWL), produkce seba (obsah lipidů na povrchu SC), či textury povrchu kůže [10].

Další metody slouží ke znázornění kůže nebo její struktury. Dělíme je na přímé, kde získáváme obraz podobný tomu, co vidí naše oko (lupa, mikroskop, fotografie) a nepřímé založené na využití různých fyzikálních jevů (teplota, ultrazvuk, lasery, elektrony). Jen vzájemná kombinace těchto přístupů vyhovuje požadavkům výzkumu a klinické praxi, protože se jejich možnosti a vlastnosti navzájem doplňují [10].

2.1.2.1 Hydratace kůže

Voda tvoří za normálních podmínek až 70 % hmotnosti kůže. Avšak vnější vrstva kůže tvořená odumřelými kožními buňkami má výrazně nižší obsah vody, přibližně 10 % až 30 % (Obrázek 5). Když obsah vody v SC klesne pod 10 %, SC se stane nefunkční a křehkým. Optimální hydratace SC je nezbytná pro fungování enzymatických reakcí, které usnadňují maturaci SC, korneodesmolýzu a deskvamaci. Stupeň hydratace SC je ovlivněn několika faktory: přítomnost tak zvaných natural moisturizing factor (NMF) v SC; transepidermální ztrátou vody; přítomností plně ceramidových hydrofobních korneocytů, které ovlivňují difúzi a odpařování vody z SC určené klimatickými faktory. Změna hydratace SC pak ovlivňuje vzhled kůže, mechanické vlastnosti a procesy signalizace buněk [5],[11].



Obrázek 5 Obsah vody v jednotlivých vrstvách kůže (Upraveno z [5]).

Kromě keratinu, který může vázat značné množství vody, obsahuje *stratum corneum* řadu dalších hydrofilních činidel (volné aminokyseliny, pyrrolidonkarboxylová kyselina, laktát, močovina) souhrnně označovaných jako NMF. Protože NMF jsou účinné humektanty (zvlhčující látky), mají pozitivní dopad na biochemické a mechanické vlastnosti SC. Také lipidy SC hrají důležitou roli při udržování hydratace pokožky. Tyto mezibuněčné lipidy jsou uspořádány ve vysoce organizovaném lamelárním uspořádání s přítomností pouze velmi malého množství vody, pravděpodobně interagující s lipidovými polárními hlavovými skupinami. Tato kompaktní lamelární struktura je velmi účinnou bariérou proti nadměrnému odparu vody z kůže. K hydrataci přispívá také hydrofobní kožní film, který zabraňuje vysychání, čímž se udržuje potřebné množství vody v kůži [12].

Měření hydratace SC v *in vivo* podmínkách je založeno na následujícím principu. Voda přítomná v této vrstvě v bezprostředním okolí sondy korneometru ovlivňuje kapacitanci detektoru. Jedná se o dvě kovové desky elektricky izolované tzv. dielektrikem (např. vakuem,

vzduchem, sklem či plastem), které vytvářejí mezi sebou elektrické pole se střídavou přitažlivostí a fungují jako kondenzátor. Měření je na základě změn hodnot dielektrické konstanty v závislosti na obsahu vody ve SC. Hydratace je uvedena v korneometrických jednotkách [12],[13].

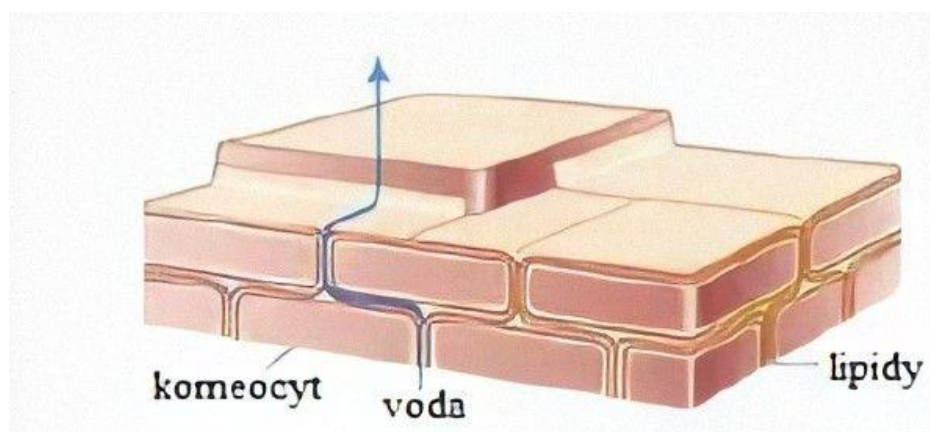
Průměrné hodnoty pro jednotlivé typy kůže jsou uvedené v tabulce 1. Je velmi důležité, aby vlastní měření bylo prováděno za standardizovaných podmínek (vlhkost a teplota okolního vzduchu) aby nedocházelo ke zkreslení výsledků [13].

Tabulka 1 Typy pleti související s vlhkostí a odpovídající jednotky Corneometer CM 825 [13].

Typ kůže	Korneometrické jednotky [c.j.]
velmi suchá	<30
suchá	30-40
normální	>40

2.1.2.2 Transepidermální odpar vody

Parametr TEWL popisuje ztrátu vody skrz epidermis (Obrázek 6). Bariéra SC není dokonalá. Množství vodních par se pohybuje mezi 20-50 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$. Hodnoty závisí na bariérové funkci SC, která zase do značné míry závisí na integritě lipidových dvojvrstev, které obklopují korneocyty. Když je bariérová funkce kůže poškozena, odpar vody se zvyšuje. Celistvost bariéry může být narušena mechanickým či chemickým poškozením, nebo vystavením kůže prostředí s nízkou relativní vlhkostí či působením UV záření [11],[12].



Obrázek 6 Tok vody skrz SC (Upraveno z [11]).

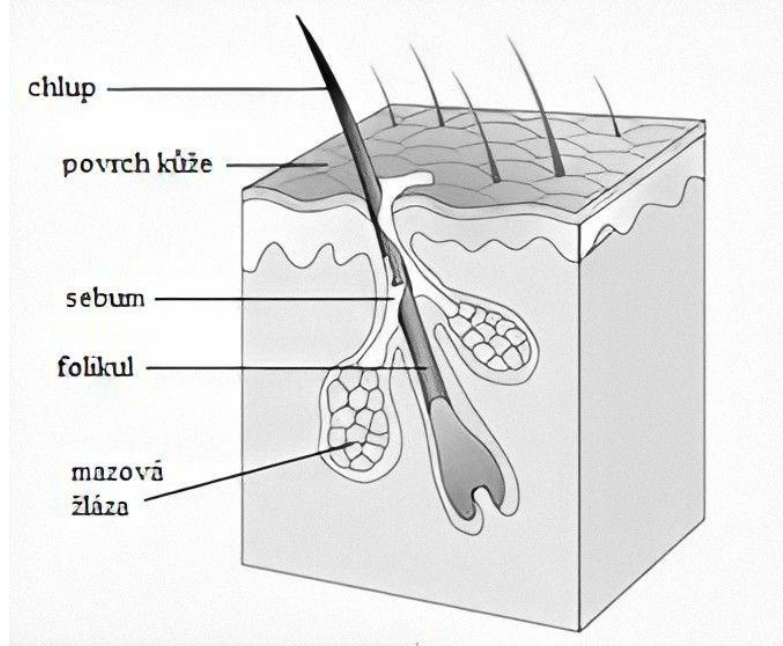
Měření TEWL může být užitečné pro identifikaci poškození kůže způsobeného určitými chemikáliemi, mechanickým poškozením nebo patologickými podmínkami, jako je atopická dermatitida. Hodnota TEWL se zvyšuje úměrně s úrovní poškození. Naopak pokud se obsah intercelulárních lipidů v SC zvyšuje, TEWL klesá [7],[8].

Transepidermální ztráta vody se měří na základě detekce koncentrace páry nad pokožkou. Sonda přístroje je složena ze sady dvou termistorů a dvou hygrosenzorů. Tyto senzory jsou

umístěné v určité vzdálenosti od povrchu kůže, kde je poté měřen gradient odpařování vody přes SC. Rovnovážná hodnota rychlosti úniku vody z epidermis je vyjádřena v $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ [13].

2.1.2.3 Sebum

Mazová žláza (*glandula sebacea*) je mikroskopická exokrinní žláza v kůži, která se otevírá do vlasového folikulu a vylučuje mastnou nebo voskovou hmotu zvanou sebum (kožní maz) (Obrázek 7). Ten má primární roli při promašťování pokožky, čímž zabraňuje mechanickému tření a pomáhá udržovat hydrataci. Nedávné studie odhalily, že maz také hraje roli při dodávání antimikrobiálních lipidů a antioxidantů ve formě skvalenu, koenzymu Q10 a vitamínu E [14].



Obrázek 7 Vlasový folikul a mazová žláza (Upraveno z [15]).

Mazové lipidy jsou nejčastěji triglyceridy a volné mastné kyseliny (57 %), voskové estery (26 %), skvalen (12 %) a cholesterol (2 %). Triglyceridy jsou hydrolyzovány na volné mastné kyseliny (FFA) bakteriálními a kvasinkovými lipázami poté, co jsou vyloučeny na povrch kůže. Dysfunkce produkce seba může vést k abnormální hydrolipidové fólii a dysfunkci kožní bariéry. Povrchové lipidy tvoří emulzi s vodou a hrají roli při udržování povrchové hydratace (i když netvoří bariéru pro vodní páru). Zvýšená tvorba mazu může také přispět ke změnám v mikrobiotě kůže. Vysoký obsah seba na pokožce má přímou korelaci se seboroickou dermatitidou a akné a inverzní vztah s atopickou dermatitidou [14],[16].

Množství lipidů přítomných na povrchu SC *in vivo* se měří například sebumetrem. Během měření jsou lipidy na povrchu kůže obtisknuty na sebumetrickou pásku, čímž se mění její transparentnost. Páska je následně analyzována spektrofotometricky. Systém pak určuje množství kožního mazu v $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. Hodnoty množství seba se nejčastěji pohybují v rozsahu 50–350 g/cm^2 [17].

2.1.2.4 Textura kůže

Koeficient tření kůže ukazuje odpor povrchu kůže proti pohybu předmětů na něm a popisuje další parametr biofyzikálních vlastností kůže. Vlastnosti textury kůže závisí na mnoha

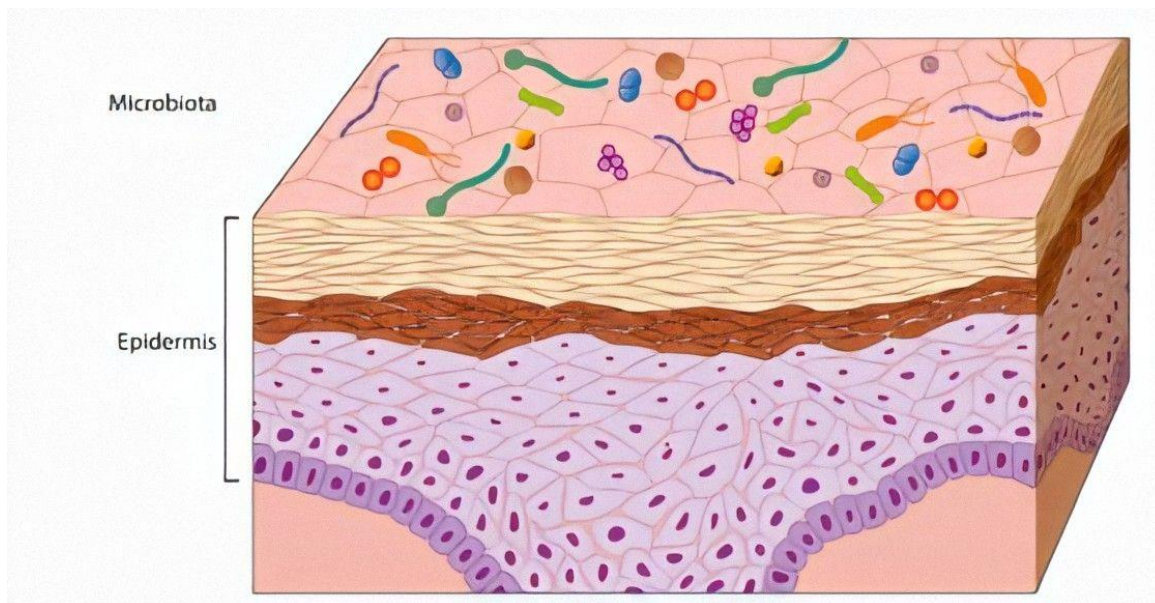
proměnných, jako jsou různé anatomické oblasti a parametry subjektu (věk / pohlaví / zdraví). Důležitými faktory jsou například také ohebnost vrstvy SC, pro kterou je nezbytná mezibuněčná dvouvrstvá lipidová membrána. Pak je důležitá produkce potu, které změkčuje vrstvu SC. Předchozí studie ukázaly, že koeficient tření kůže pozitivně koreluje s hydratací SC s aplikací humektantu, ale negativně koreluje s mastnotou pokožky. Odpor kůže je měřen například frictiometerem a souvisí s její elasticitou a plasticitou. V dermatologii lze stanovení textury povrchu kůže použít k vývoji metod pro asistovanou diagnostiku kožních poruch. Kvantifikace je užitečná, například při měření pokroku hojení. Taková měření lze použít pro diagnostiku kůže a vyhodnocení terapeutických nebo kosmetických ošetření [18],[19].

Špička sondy přístroje je vyrobena z teflonu. Povrch kůže dotýkající se povrchu hrotu je 2 cm². Sonda působí silou rovnoběžně s kožním povrchem a třecí hlava se otáčí. Během měření se zaznamenává třecí odpor povrchu, kdy se třením snižuje nastavená konstantní rychlost třecí hlavy. Koeficient tření je uvedený ve frikciometrických jednotkách. Zjišťuje se rozdíl v tření kůže ve vztahu k vlastnostem pokožky nebo přípravkům aplikovaným na kůži [19].

2.2 Mikrobiom kůže

Termín „mikrobiom“ (nebo „mikrobiota“) označuje celkovou populaci mikroorganismů (bakterie, houby, viry, roztoči) v konkrétním prostředí (Obrázek 8). Celkově je teplota povrchu pokožky nižší než tělesná teplota, obsah vody na povrchu kůže je nižší než u vnitřních tkání, pH je mírně kyselé (pH: 4,1-5,8) a díky neustálému procesu deskvamace jsou z povrchu kůže nepřetržitě odstraňovány šupiny. Tyto podmínky výrazně ovlivňují druhové složení kožního mikrobiomu, který je proto druhově velmi odlišný od například střevního mikrobiomu. Vztah mikroorganismů a hostitele může být s ohledem na celkový fyzický a imunitní stav hostitele komenzální, symbiotický nebo parazitární. Ve zdravém stavu má naše pokožka synergistický vztah s komenzálními mikroorganismy, kteří zároveň eliminují potenciálně nebezpečné patogeny [12],[20],[21],[22].

Mikrobiota kůže zahrnuje dvě skupiny: (i) Rezidentní mikroorganismy, které stabilně osidlují kůži a jejich populace se po narušení obnoví. Tyto mikroorganismy jsou komenzální, což znamená, že tyto mikroorganismy jsou obvykle neškodné, a některé i symbiotické, tedy poskytují hostiteli nějaký přínos. (ii) Přejídné mikroorganismy, které pocházejí z vnějšího prostředí a na kůži přetrvávají hodiny až dny, než zmizí [16].



Obrázek 8 Přehled kožní mikrobioty (Upraveno z [5]).

Analýzy mikrobiomů jak zdravých jedinců, tak pacientů ukázala, že „zdravý mikrobiom kůže“ je charakterizován vysokou rozmanitostí druhů a rovnováhou v kvantitativních poměrech mezi jednotlivými druhy. Bakterie jsou nejrozšířenějším skupinou mikroorganismů, a naopak houby jsou méně časté. Ačkoli je o dalších rezidentních mikroorganismech, jako jsou viry, a roztoči, méně známo, pravděpodobně interagují s širším ekosystémem a ovlivňují kožní imunitu [21],[22].

2.2.1 Bakterie

Většina bakterií patří k symbiotickým druhům a představují nejstabilnější prvek mikrobiomu kůže. Bakterie hrají zásadní roli při udržování rovnováhy v kvantitativním a kvalitativním složení mikrobiomu tím, že ovlivňují růst jiných mikroorganismů. Kůže je obývána především čtyřmi skupinami bakterií: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* (Obrázek 9). V komplexní studii, která se zabývala kultivací za aerobních i anaerobních podmínek, se kolonizace kůže bakteriemi lišila mezi anatomickými místy a nejvyšší bakteriální zátěž byla pozorována v místech s vyšší produkcí mazu [23].

<i>Actinobakteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Corynebacteria</i> • <i>Propionobacteria</i> • <i>Microbacterium</i> • <i>Micrococcus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Spaphylococcus</i> • <i>Closridium</i> • <i>Streptococcus</i> • <i>Enterococcus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Janthinobacteriu</i> <i>m</i> • <i>Serratia</i> • <i>Halomonas</i> • <i>Delfia</i> • <i>Comamonas</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sphingobacteriu</i> <i>m</i> • <i>Chryseobacteriu</i> <i>m</i>

Obrázek 9 Hlavní druhy bakterií žijících na kůži (Upraveno z [23]).

Na kůži se vyskytují:

- aerobní bakterie – *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Mycobakterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacteriaceae*, atd.;
- anaerobní bakterie – *Propionibacterium acnes*, *Peptococcus sp.* [24].

Odhaduje se, že 50 % všech bakterií rezidentních na kůži patří do druhu *Staphylococcus epidermidis* obývajících mimo jiné i horní část vlasového folikulu. Mezi další bakteriální druhy žijící na povrchu kůže patří *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* a *S. capitis*. Dominantní bakteriální druhy rodů *Corynebacterium* a *Propionibacterium* jsou *C. jeikeium* a *P. acnes*. Mezi členy bakteriálního rodu *Micrococcus* patří *M. luteus* a, méně často, *M. vars*, *M. lylae*, *M. sedentarius*, *M. roseus*, *M. kristinae* a *M. nishinomiyaensis* [21],[25].

2.2.2 Houby

Dominantními houbovými druhy žijícími na kůži jsou lipofilní kvasinky rodu *Malassezia*, které tvoří 1–22 % lidského mikrobiomu. Rod *Malassezia* zahrnuje 14 druhů, z nichž 9 je schopno kolonizovat lidskou kůži. Dominantní druhy jsou *M. globosa* a *M. stricta*. Jiné druhy *Malassezia* se nacházejí na kůži v menším množství. Za příznivých podmínek mají kvasinky *Malassezia* (zejména *M. globosa* a *M. sympodialis*) sklon způsobovat kožní onemocnění (seboroidní dermatitidu, lupy, psoriázy, atopické dermatitidy) a v případě výrazné imunitní nedostatečnosti mohou – podobně jako bakterie – hrát roli v systémových infekcích. Mezi nejčastější choroby způsobené kvasinkami rodu *Malassezia* patří pityriasis versicolor a folikulitida [21].

Lidská kůže je také kolonizována houbami 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 *Rhodotorul*. Kvasinky *C. albicans* a houby rodu *Cryptococcus* jsou schopné kolonizovat pokožku za určitých podmínek (poškozený povrch epidermis, zvýšená vlhkost a teplota, okluze) a způsobují kandidózu a kryptokokózu. Patogenní houby s potenciálem vyvolat kožní onemocnění zahrnují dermatofyty (*Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*) [21],[23].

2.2.3 Roztoči

Kromě bakterií a hub mikrobiota kůže může obsahovat také roztoče *Demodex* – parazitický pavoukovec řádu *Acari*, který obývá vlasové folikuly a mazové žlázy. Tento roztoč byl identifikován i na zdravé kůži. Mezi zástupce fyziologické mikroflóry kůže patří *D. folliculorum* žijící ve vlasových folikulech a *D. brevis* obývající mazové a meibomové žlázy. Nadměrný růst roztoče *Demodex* a přidružených bakterií (*Demodex* mikrobiota) je příčinou demodikózy a pravděpodobně hraje roli v etiologii a průběhu růžovky (*Rosacea*) [21],[26].

2.2.4 Viry

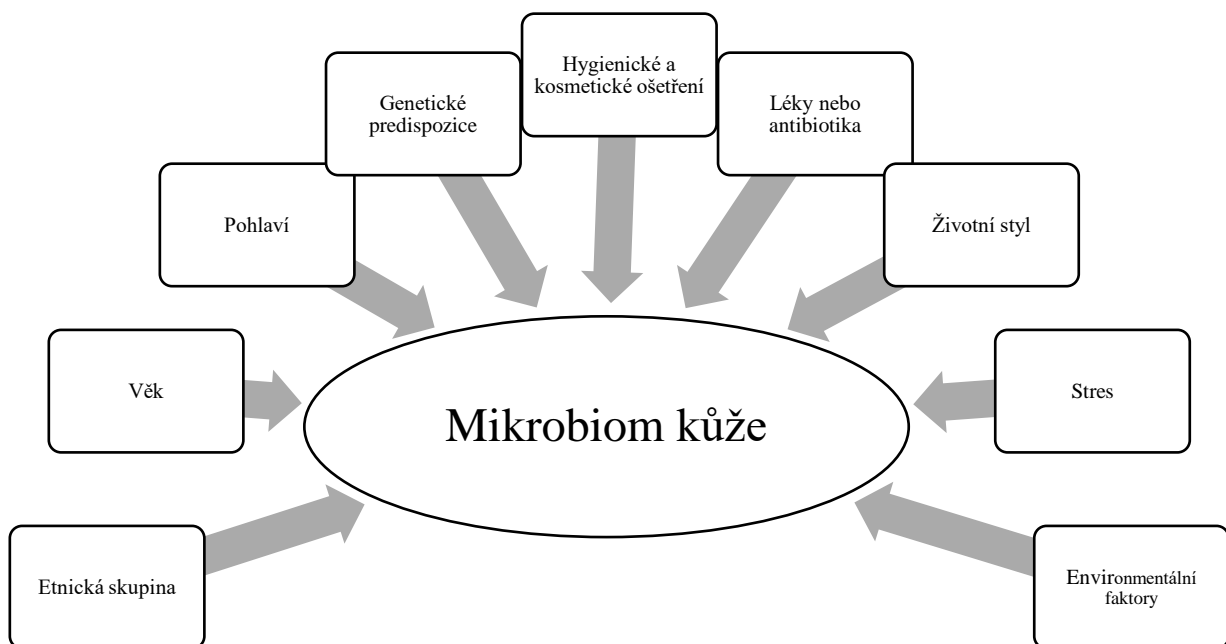
Dosud jsou viry nejméně známými členy kožní mikroflóry, protože izolace a identifikace virů nalezených na povrchu kůže je obtížná. Tyto nebuněčné organismy se liší svým genetickým

materiálem (DNA a RNA viry) a podléhají rychlému vývoji, což ztěžuje vytváření genomických knihoven. Viry také nemají konzervované oblasti genomu srovnatelné s oblastmi, které jsou přítomny v genomech bakterií a hub (16S rDNA u bakterií, respektive ITS či 18S rDNA). Viry jsou považovány jak za patogenní původce, tak také za faktory přispívající k udržení homeostázy kůže. O virech je známo, že jsou nestabilní, byť nezbytnou součástí kožního mikrobiomu, zejména viry obsahující dvouvláknovou DNA (dsDNA), jako jsou *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae* [21],[26].

2.2.5 Faktory ovlivňující mikrobiom kůže

Kůže a její mikrobiom fungují jako štít, který chrání tělo před vnějšími agresiemi. Mezi hostitelskou rezidentní a / nebo přechodnou bakteriální populací existuje vyvážená rovnováha, která je nepřetržitě ovlivňována vnitřními (hostitelskými) a vnějšími (environmentálními) faktory, které mění složení komunit kožních mikroorganismů a funkci hostitelské kožní bariéry. Narušení této rovnováhy se nazývá dysbióza [26].

Mikrobiom se vyvíjí a mění v závislosti na lokalitě na těle, věku, pohlaví, etnické skupině, klimatu, UV záření, pracovním a životním prostředí, životním stylu (stravovací, hygienické a kosmetické návyky), druhu oblečení, sportovních aktivitách, konzumaci alkoholu a jiných stimulantů atd. Variace v kožní mikrobiotě lze definovat pomocí několika parametrů: topografická, interpersonální a časová diverzita (Obrázek 10)[21],[22].



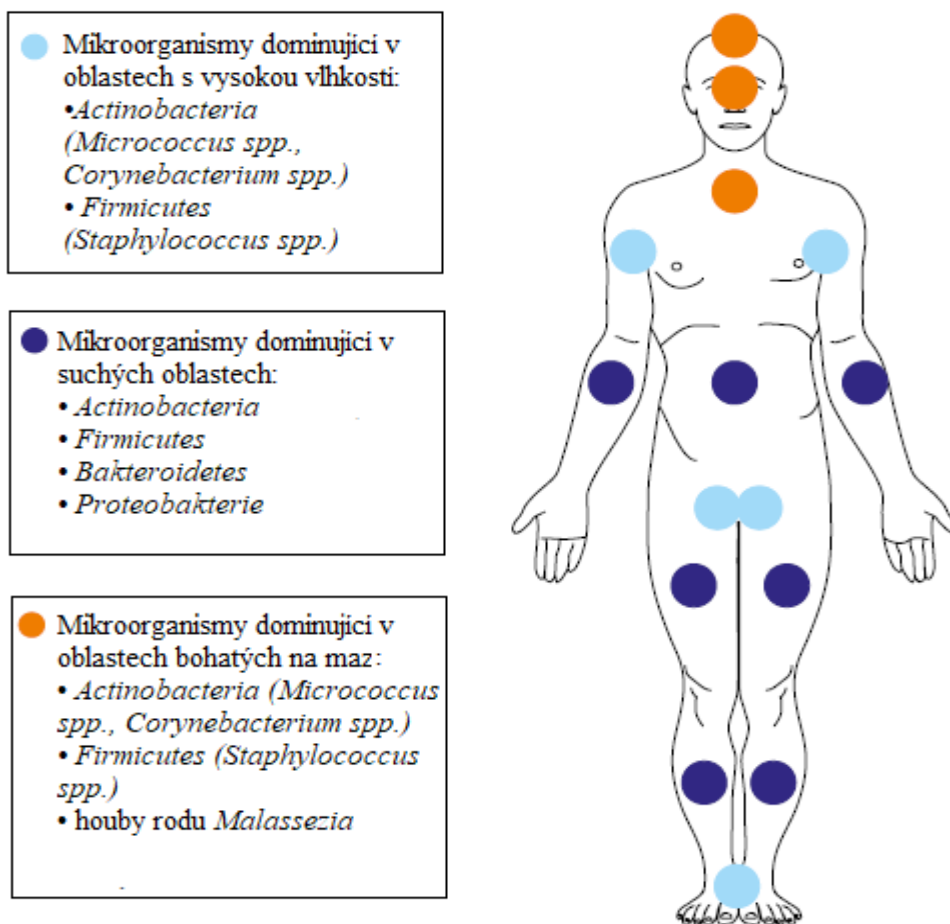
Obrázek 10 Faktory ovlivňující mikrobiom kůže (Upraveno z [21]).

2.2.5.1 Topografická rozmanitost mikrobiomu lidské kůže

Každá mikrobiální komunita je adaptována svým druhovým složením i relativním zastoupením těchto druhů na specifické mikroprostředí na kůži (Obrázek 11). Mezi hlavní faktory ovlivňující růst mikroorganismů na povrchu kůže patří množství a složení mazu a potu. Při použití sekvenčního přístupu 16S rDNA u zdravých dospělých bylo zjištěno, že mastnější oblasti,

například: *glabella* (čelo mezi obočím), horní polovina zad, jsou přednostně kolonizovány rody *Propionibacterium* a *Staphylococcus*; vlhká místa, například: *nare* (uvnitř nosní dírky), axilární klenba (podpaží), *umbilicus* (oblast spodní poloviny břicha) jsou převážně osídlena rody *Corynebacterium* a *Staphylococcus*; a suchá místa, například: hýždě, jsou i přes obecně vyšší variabilitu osídlený nejčastějšími zástupci b-Proteobakterie a *Flavobacteriales*. Dalšími faktory ovlivňujícími mikrobiální růst jsou teplota (v rozmezí od 29,5 ° C na prstech do 36,6 ° C v podpaží) a pH (od 4,2 na tvářích do 7,9 v podpaží) [21],[25].

Bakterie nejsou přítomny pouze na povrchu kůže, ale nacházejí se také v hlubších vrstvách *epidermis*, a dokonce i v *dermis* a dermální tukové tkáni. Tyto vrstvy mají specifické profily mikrobiomu a také obsahují mnoho specializovaných typů buněk, jako jsou dendritické buňky, melanocyty a Langerhansovy buňky, které aktivně reagují na složky mikroorganismů. Sebaceózní folikuly představují anaerobní prostředí bohaté na lipidy, na které je rod *Propionibacterium* zvláště přizpůsoben [16].



Obrázek 11 Mikrobiální druhy na povrchu kůže (Upraveno z [21]).

2.2.5.2 Věk

Během prenatálního stádia zůstává kůže sterilní, ale už během porodu či okamžitě po něm je kolonizována mikroorganismy. Jejich druhové složení je velmi dynamické již v raném věku. Tyto komunity se stabilizují, když se blížíme k dospělosti, ale nadále se vyvíjejí v reakci na různé hostitelské a environmentální faktory [12],[22].

Kůže novorozenců je kolonizována mateřskou mikroflórou (*Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Sneathia spp.*) při průchodu vaginálním kanálem. V případě porodu císařským řezem je kůže novorozence od samého počátku vystavena mikroorganismům na pokožce matky a zdravotnického personálu a mikroflóre přítomné v nemocničním prostředí. Proto kůže je pak kolonizována zcela odlišnými bakteriálními druhy (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*). Houby rodu *Malassezia* jsou detekovatelné na povrchu kůže již v první den života u 89–100 % novorozenců. Největší změny v zastoupených druzích se dějí do věku 3 let. Během tohoto období se mikrobiota vyvíjí v reakci na změny ve fyziologii kůže a stravě [21].

Účinek hormonálního systému na kožní mikrobiotu je pak nejvýraznější během puberty (u žen také během těhotenství, kojení a menopauzy). Zvýšení androgenní aktivity u dospívajících vede ke zvýšené aktivitě mazových žláz, které jsou stanovištěm pro *P. acnes*. Nadměrný růst *P. acnes* bývá spojován s rozvojem *acne vulgaris* [21].

U dospělých jedinců je „základní“ složení kožního mikrobiomu určeno hlavně anatomickými a fyziologickými faktory, proto existují rozdíly v mikrobiomu kůže mezi ženami a muži [21].

U starší populace prochází kožní mikrobiom změnami ovlivňujícími, jak počet mikroorganismů, tak jejich druhovou rozmanitost. Z důvodu pomalejší obnovy epidermis, a tím i nižší úrovně deskvamace na povrchu kůže, spolu se snížením aktivity imunitního systému, je kůže starších lidí častěji obývána kvasinkami a dermatofyty než kůže mladých lidí [21].

2.2.5.3 Hygienické a kosmetické ošetření

Kosmetické výrobky mění mikrobiální rozmanitost, jakož i dynamiku a strukturu molekul na povrchu kůže. Variabilita ve složení mikrobiomu je specifická pro produkt, místo a osobu a změny jsou pozorovány od prvního týdne používání kosmetických prostředků. Bylo prokázáno že eliminace použití základní kosmetiky, jako je šampon a deodorant, zvyšuje rozmanitost mikrobiomu pokožky během krátké doby (několik dní) [21].

Mezi hlavní faktory nepříznivě ovlivňující rozmanitost mikroorganismů na povrchu kůže patří také některá hygienická ošetření prováděné pomocí chemických látek. Taková činidla neustále odstraňují mikroflóru kůže. Následné změny fyzikálně-chemických podmínek na povrchu kůže znesnadňují komenzální mikroflóre rekolonizaci pokožky a současně vytvářejí příznivé podmínky pro kolonizaci kůže patogeny. Například bylo prokázáno, že časté mytí a odstranění lipidového filmu narušuje kožní bariéru, což vede k podráždění kůže a ke změnám mikrobiomu [21].

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* [28].

2.2.5.4 pH

Kyselý charakter povrchu pokožky poprvé zmínil Heuss a později Schade a Marchionini, kteří pro kyselý pH vnějšího povrchu pokožky představili termín „kyselý plášť“. Kyselá povaha

pokožky hraje klíčovou roli v bariérové homeostáze a imunitní funkci. Dále se ukázalo, že pokožka částečně odolává kyselé / alkalické agresi. Hodnota pH má velký vliv na růst a množení mikroorganismů. Extrémně vysoká nebo nízká hodnota pH může způsobit smrt mikroorganismů [12].

Ke snížení pH povrchu kůže přispívají také FFA produkované bakteriemi. Například *S. epidermidis*, *P. acnes*, *Pityrosporum ovale* a *Corynebacteria* produkují lipázy a esterázy, které rozbíjejí triglyceridy na volné mastné kyseliny, což vede k nižšímu pH povrchu kůže, a tím vytváří nepříznivé prostředí pro některé kožní patogeny. Například, oblasti s vyššími koncentracemi rezidentního mikroorganismu *S. epidermidis* jsou o něco kyselější (pH 4,7), zatímco jeho růst je inhibován za alkalických podmínek (pH 8,5). Naopak neutrální pH nevyhovuje patogennímu *S. aureus*, který pro svůj růst vyžaduje mírně zvýšené pH [1],[12].

Změny pH kůže a dalších parametrů kůže hrají roli v některých patologiích kůže a v jejich prevenci a léčbě. *P. acnes* je klasickým příkladem toho, jak mírné zvýšení pH kůže může pomoci komenzálním bakteriím stát se patogenními. Při pH 5,5 je růst *P. acnes* kontrolován; avšak mírný posun směrem k vyššímu pH by měl za následek zvýšený růst tohoto organismu [12].

2.2.6 Funkce mikrobiomu

Lidská symbiotická mikroflóra se podílí na metabolických procesech, má vliv na proces zrání tkání při ontogenezi a představuje základní prvek obranného systému těla proti patogenním mikroorganismům. Tento proces se označuje jako kolonizační rezistence. Kromě toho mikrobiota kůže (zejména *S. epidermidis*) inhibuje růst patogenů vylučováním antimikrobiálních peptidů (AMP) a zároveň stimuluje i jejich produkci v keratinocytech. Je známo, že bakterie rezidentní na kůži mají významný vliv na udržení imunitní homeostázy. Modulují vrozenou imunitní odpověď a ovlivňují vývoj získané imunitní odpovědi. Jedná se o komensální a často i symbiotický vztah mezi mikroorganismy a hostitelem. Kůže umožňuje kolonizaci a růst mikroorganismů, které chrání hostitele před patogenními bakteriemi přímo i nepřímo. Tyto bakterie mohou působit tak, že produkují antibakteriální peptidy (např. bakteriocin), toxické metabolity, indukují nízký oxidační potenciál, vyčerpávají základní živiny, zabraňují přilnutí konkurenčních bakterií, inhibují translokaci, degradují toxiny, apod [12],[21],[22].

Výzkumy v poslední době prokazují také velký význam probiotik a prebiotik. Probiotika jsou „živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství přináší hostiteli zdravotní přínos“, zatímco prebiotika jsou „neživotaschopné složky, které přináší hostiteli zdravotní přínos spojený s modulací mikrobioty“ [27].

Ukazuje se, že lokální dodání specifických živých mikroorganismů, mikrobiálních lyzátů 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 [27].

2.3 Tenzidy

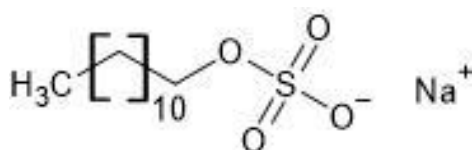
Čištění pleti patří mezi základní kosmetické procedury a přispívá k estetickému vzhledu kůže. Hlavní funkcí čistících přípravků je odstranění produktů kůže, jako je sebum, zaschlé zbytky potu a odumřelých buněk SC. Současně jsou odstraňovány nečistoty, část mikroorganismů sídlících na povrchu pokožky a zejména u žen také make-up [5].

Protože jsou nečistoty navázány nejčastěji v mastném filmu na povrchu pokožky, není mytí čistou vodou dostatečné. Aby bylo možné účinně odstranit nečistoty je proto třeba použít tenzid. V současné době existuje široká škála přípravků na čištění a odlíčení pleti, tyto přípravky se liší nejen složením, ale i formou [5].

Tenzidy jsou organické povrchově aktivní látky (PAL), které jsou schopny se hromadit na fázovém rozhraní již při velmi nízké koncentraci. Na základě toho snižují mezifázovou energii soustavy. Pod pojmem detergenční rozumíme schopnost odstranit nečistotu z pevného povrchu [1],[29].

2.3.1 Laurylsulfát sodný

Laurylsulfát sodný (SDS) je členem skupiny solí sulfatovaných ethoxylovaných alkoholů (Obrázek 12) jejichž bezpečnost byla hodnocena panelem odborníků pro kontrolu kosmetických přísad (The Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, CIR). SDS je aniontová PAL, u které bylo prokázáno, že je dráždivá pro pokožku a oči. Problémy však způsobuje zejména u jedinců s citlivou pokožkou (ekzematická a suchá pokožka) a při dlouhodobém kontaktu s vysokou koncentrací této látky. Jeho dlouhodobé užívání způsobuje vysoušení pokožky a vlasů. SDS není řazena mezi karcinogenní látky ani látky, které by způsobovaly orgánovou toxicitu. Je biologicky rozložitelný za aerobních i anaerobních podmínek. SDS se používá primárně jako čistící PAL v širokém rozmezí koncentrací od 0,008 % do 50,0 %. Nedávno bylo objasněno, že SDS poškozuje epidermální bariéru a nabitě povrchově aktivní látky mohou být začleněny do lipidové dvojvrstvé struktury, což způsobuje destabilizaci této dvojvrstvy a zvýšenou permeabilitu SC [1],[30].

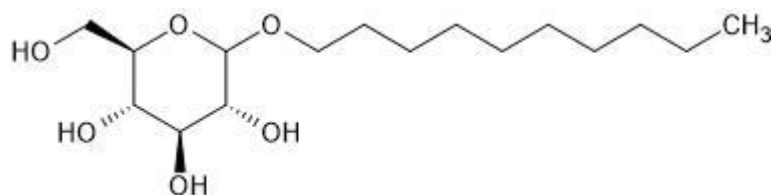


Obrázek 12 Struktura laurylsulfátu sodného [30].

2.3.2 Decylglukosid

Obecná struktura decylglukosidu (DG) je znázorněna na obrázku 13. Jedná se o mírně neionogenní PAL, která může být monomerní nebo polymerní. Název International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI) bude stále decylglukosid pro oba typy. Tyto sloučeniny jsou často dostupné v kapalném či pevném stavu. DG se vyrábí reakcí glukózy z kukuřičného škrobu s mastným alkoholem dekanolem a v přírodní kosmetice slouží jako náhrada za chemické sulfáty (např. SDS). Je šetrný k dětské, suché, citlivé i přecitlivělé pokožce a je biodegradabilní. DG je povolen v kosmetice do 33 %. CIR vyhodnotil bezpečnost

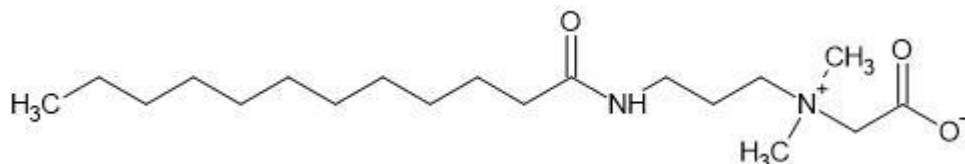
decylglukosidů používaných v kosmetice a dospěl k závěru, že tyto složky jsou bezpečné v současných aplikacích a koncentracích, proto jsou formulovány jako nedráždivé [31],[32].



Obrázek 13 Struktura decylglukosidu [32].

2.3.3 Kokamidopropyl betain

Kokamidopropyl betain (CAPB) je amfoterní amoniiová sloučenina obsahující část nasycené nebo nenasyčené mastné kyseliny v délce od 6 do 18 uhlíků v amidové vazbě s aminopropyl betainem (Obrázek 14). Zdrojem těchto mastných kyselin, zejména kyseliny laurové, je kokosový olej. Používá se především jako pseudoamfoterní PAL v šamponech, kondicionérech a dalších čisticích přípravcích. Je to přírodní tenzid, který nahrazuje funkci sulfátů (SDS, laurethsulfát sodný, SLES), je ale šetrnější a nevysušuje. Bakteriostatická aktivita byla detekována v kulturách *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Bacillus subtilis*. Fungicidní aktivita byla pozorována v kulturách *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* a *Pityrosporum ovale*. Koncentrace CAPB se ve výrobcích pohybuje od 0,01 do 50 %. Na základě dostupných údajů je použití CAPB v kosmetických produktech považováno za bezpečné [33].



Obrázek 14 Struktura kokamidopropyl betainu [33].

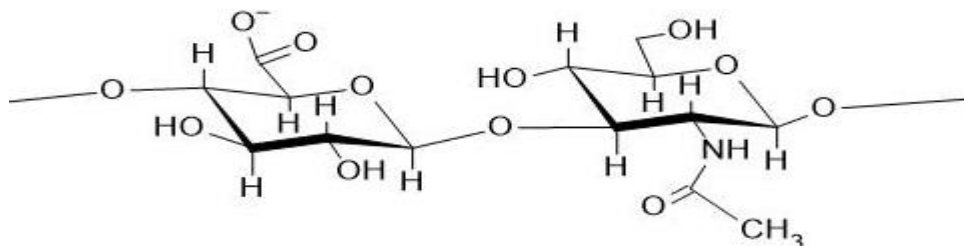
2.4 Polysacharidy používané v kosmetice

2.4.1 Sodium hyaluronate

Sodium Hyaluronate je vysokomolekulární (HMW) kyselina hyaluronová (HA) (Obrázek 15) je přírodní glykosaminoglykan vytvořený vazbou N-acetyl-glukosaminu s glukuronovou kyselinou. Molekula HA může dosáhnout 10 000 nebo více párů disacharidů, s molekulovou hmotností až 4 MDa. Podle Mezinárodního slovníku kosmetických přísad a příručky je HA známá také jako hyaluronan. HA se v kosmetice používá v koncentracích do 1 % [34].

HA je tělu vlastní látka, přirozeně se vyskytuje v lidském těle, například v synoviální tekutině či sklivci. Získává se primárně pomocí fermentace nehemolytického mikrobiálního kmene *Streptococcus equi*. HA nebyla ve studiích na zvířatech imunogenní ani nepůsobila jako senzibilizátor a není genotoxická. Široce rozšířené klinické použití HA, zejména ve formě injekcí, nemá významné nežádoucí účinky. HA a její sodné soli jsou považovány za bezpečné pro použití v kosmetice. [34].

HA v kosmetice působí jako změkčující a hydratační látka. HA se používá v kosmetických přípravcích proti stárnutí pleti. Bylo prokázáno, že nízkomolekulární (LMW) HA zvyšuje hladinu hydratace poškozené pokožky a urychluje opravu poškození. Roztoky vysokomolekulární (HMW) HA, pokud jsou aplikovány na povrch kůže, tvoří hydratovaný viskoelastický film. Poskytuje hydrataci SC a vytváří optimální podmínky pro proteázy zajišťující správné deskvamace. HA má hojivý účinek a dokáže si udržet velké množství vody, proto dodává pleti pružnost [34].



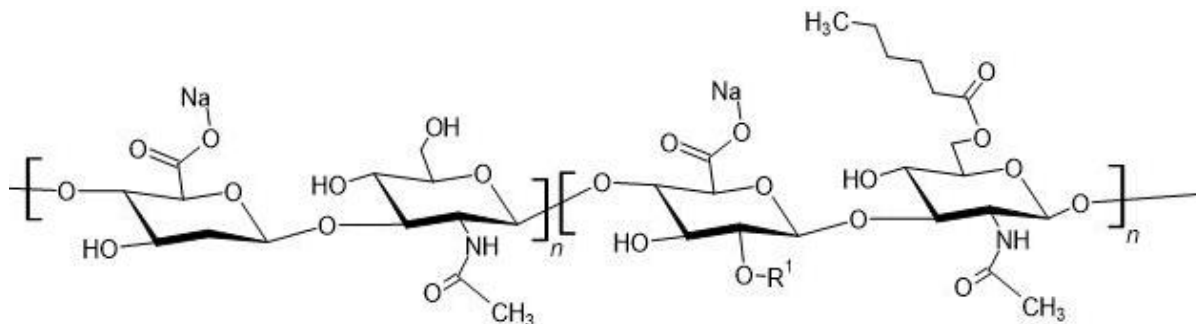
Obrázek 15 Struktura hyaluronové kyseliny [34].

2.4.2 Hydrolyzed Sodium Hyaluronate

Hydrolyzed Sodium Hyaluronate je směs oligosacharidů kyseliny hyaluronové s $M_r < 5$ kDa, nebo-li moc nízkomolekulární (VLWH) HA. Je vysoce biologicky aktivní a lépe proniká do pokožky než HMW HA. Získává se hydrolytickým štěpením HA s vysokou molekulovou hmotností. Zmenšuje hloubku vrásek a zvyšuje elasticitu kůže. Zabraňuje degradaci extracelulární matrix. Snižuje prozánětlivé cytokiny, podporuje angiogenezi, stimuluje mikrocirkulaci krve v pokožce a snižuje erytém. Udržuje hydratační účinky, protože je hydrofilní molekulou. Stimuluje produkci kyseliny hyaluronové kožními buňkami. VLMW HA se v kosmetice používá v koncentracích do 0,25 % [35],[36].

2.4.3 Sodium Caproyl Hyaluronate

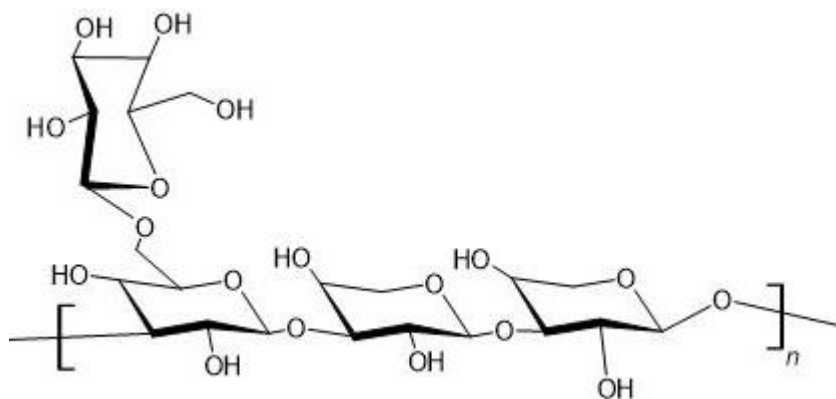
Sodium caproyl hyaluronate (CaproylHA) (Obrázek 16) je tedy HA substituovaná hexanovou (kaproovou) kyselinou acylací HA se stupněm substituce 50–80 %. Stimuluje proliferaci, migraci, diferenciaci keratinocytů a fibroblastů. Snižuje tvorbu mazu a lesku kůže snížením aktivity mazových žláz a velikosti pórů kůže. Podporuje angiogenezi, obnovuje funkci bariéry kůže, hydrataci a zlepšuje elasticitu. Snižuje erytém a rozsah pigmentových skvrn [37].



Obrázek 16 Struktura caproylu hyaluronátu sodného, kde $R^1 = -CO-(CH_2)_4-CH_3$ [37].

2.4.4 Schizophyllan

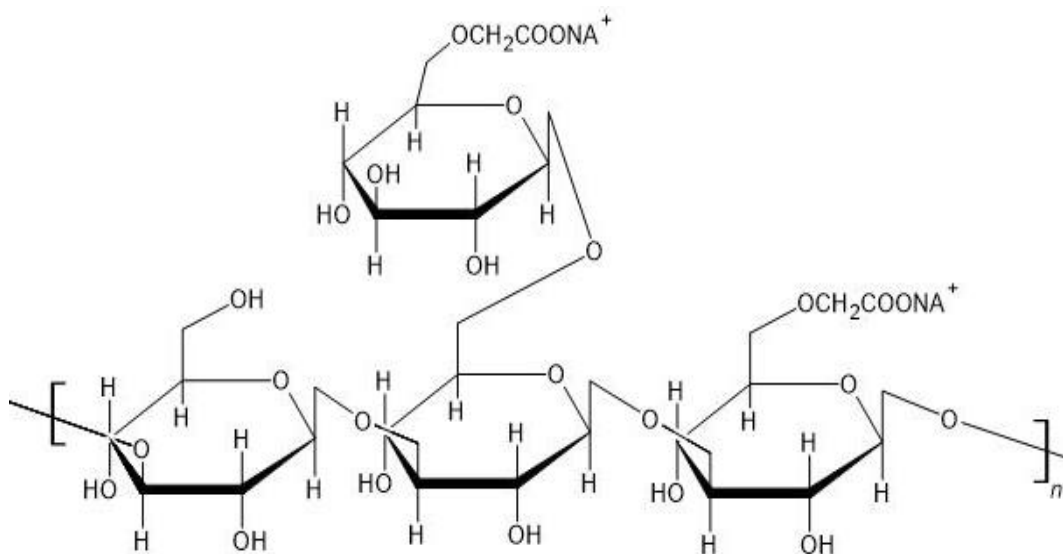
Jedná se o extracelulární polysacharid (Obrázek 17) z buněčné stěny hub *Schizophyllum commune*. Je to beta-glukan (rozvětvený polysacharid D-glukózových monomerů). Jeho molekulová hmotnost je snížena specifickým štěpením. Je plně rozpustný ve vodě a vytváří stabilní trojitou strukturu šroubovice ve vodných roztocích. Významně zlepšuje funkce bariéry kůže a hydrataci. Podílí se na zvyšování metabolismu a zlepšování imunitního systému. Zvyšuje produkci kolagenu a snižuje jeho degradaci. Má uklidňující vlastnosti a zmenšuje hloubku vrásek [38],[39].



Obrázek 17 Struktura schizophyllanu [38].

2.4.5 Sodium Carboxymethyl β -Glucan

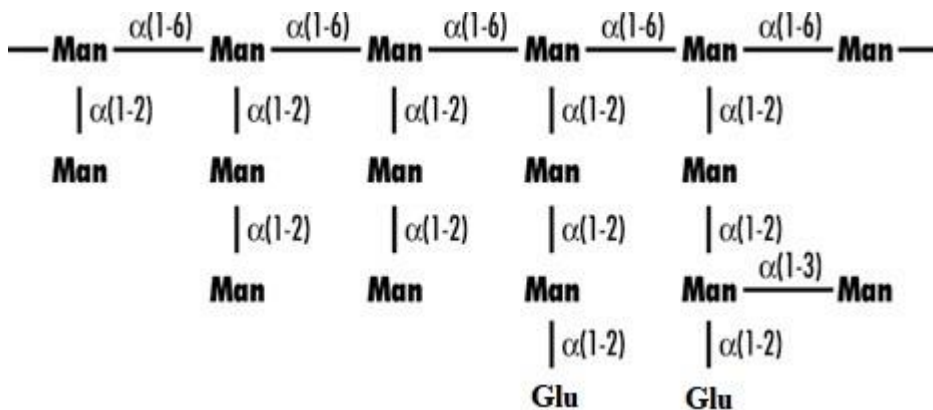
Sodium Carboxymethyl β -glucan (NaCMG) je chemicky modifikovaný β -glukan izolovaný ze *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské kvasnice). Ve vodě rozpustný derivát polysacharidu β -(1,3), (1,6) -D-glukan (Obrázek 18), ve kterém jsou určité hydroxylové skupiny glukopyranozylových jednotek substituovány karboxymethylovou skupinou. Stimuluje antioxidační kapacitu pokožky, chrání proteiny a lipidy před poškozením, kontroluje imunitní odpověď. Má protizánětlivé vlastnosti a zlepšuje strukturu a pružnost pokožky [40].



Obrázek 18 Struktura karboxymethylu beta-glukanu sodného[40].

2.4.6 Glucomannan

Glucomannan (Obrázek 19) je extracelulární polysacharid z kvasinek *Candida utilis*. Rozvětvený polysacharid (páteř z manózoových jednotek s připojenými molekulami glukózy) tvoří ve vodě rozpustná vlákna. Vyrábí se alkalickou extrakcí z buněčné stěny kvasinek. Chrání před UV zářením. Podporuje procesy oprav DNA. Reguluje zánětlivé procesy v kůži [41].



Obrázek 19 Struktura glucomannanu [41].

2.5 PCR

Tato metoda je revoluční pro celý obor molekulární biologie. Kary Mullis přišel s myšlenkou PCR v roce 1983 a první článek popisující tuto metodu se objevil v roce 1985 v časopise Science. V roce 1993 obdržel Kary Mullis Nobelovu cenu za objev techniky PCR [42].

Metoda je založená na amplifikaci požadovaných sekvencí nukleových kyselin (především DNA), za použití oligonukleotidů specifických pro tyto sekvence (takzvané primery), tepelně stabilní DNA polymerázy a tepelného cyklování. V tradiční PCR se detekce a kvantifikace amplifikované sekvence provádí na konci reakce po posledním cyklu PCR a zahrnuje post-PCR analýzu, jako je gelová elektroforéza a analýza obrazu. V kvantitativní PCR v reálném čase (často zkrácené na real time PCR nebo RT qPCR) se produkt PCR měří v každém cyklu [42].

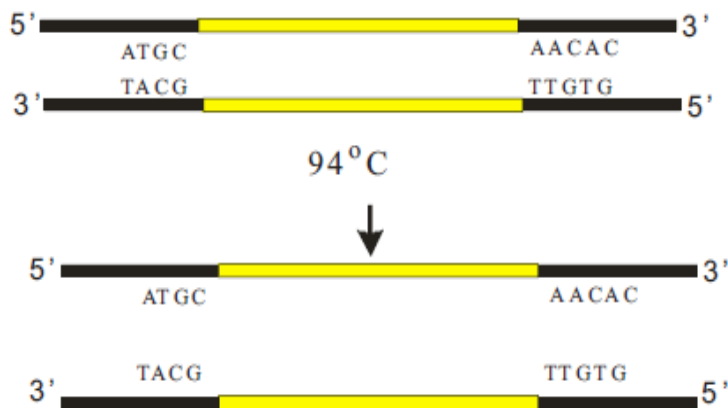
PCR teoreticky amplifikuje DNA exponenciálně, a tedy zdvojnásobuje počet cílových molekul v každém amplifikačním cyklu. Když je molekula DNA dostatečně zahřátá, jsou vodíkové vazby, které drží pohromadě dvojistou spirálu, přerušeny a molekula se rozdělí neboli denaturuje na jednotlivé řetězce. Pokud se roztok DNA zchladne, mohou se komplementární páry bází reformovat a obnovit původní dvojistou spirálu. Aby bylo možné použít PCR, musí být známa přesná sekvence nukleotidů, které lemují (leží na obou stranách) oblasti zájmu (cílová oblast, která musí být amplifikována). Toto jsou absolutní minimální data nezbytná před použitím typické reakce PCR [42].

2.5.1 Základní princip PCR

Existují tři hlavní kroky, které tvoří každý cyklus PCR.

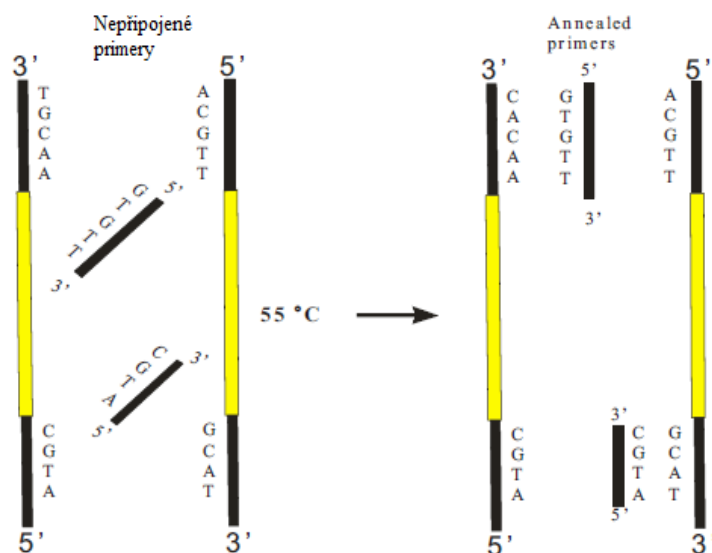
1. Denaturace – inkubace při vysoké teplotě se používá k „roztavení“ dsDNA do jednotlivých řetězců a uvolnění sekundární struktury v jednořetězcové DNA (ssDNA) (Obrázek 20). Když se molekula dsDNA zahřeje na 94°C , párové řetězce se oddělí

(denaturují). To umožňuje primerům přístup k ssDNA templátům. Obvykle se používá nejvyšší teplota, kterou DNA polymeráza vydrží (obvykle 92-96 ° C). Denaturační čas lze zvýšit, pokud je obsah GC bází vysoký. Zahřátí bývá před prvním krokem často prodloužené, aby se dosáhlo úplné denaturace celého vlákna, protože původní templátová DNA je mnohonásobně delší než cílový amplikon [42].



Obrázek 20 Průběh denaturace[42].

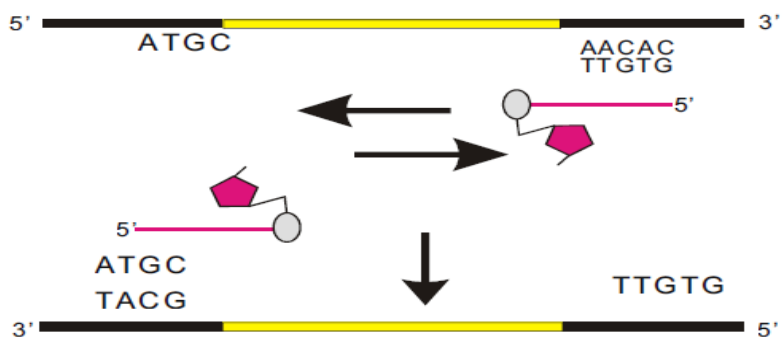
- Hybridizace primerů (annealing) - dosáhne se jí ochlazením reakční směsi na teplotu okolo 50-60 ° C, v závislosti na délce a nukleotidové složení použitých primerů (Obrázek 21). Během annealingu mají komplementární sekvence primerů příležitost navázat se (hybridizovat) na templátovou DNA, takže se použije vhodná teplota, která je založena na vypočtené teplotě tání (T_m) primerů (obvykle 5 ° C pod T_m primeru) [42].



Obrázek 21 Průběh hybridizace primerů (Upraveno z [42]).

- Syntéza DNA (elongace) vyžaduje opět zahřátí (Obrázek 22) a to na optimální teplotu zvolené polymerázy (v případě Taq polymerázy je to 70-72 ° C). V přítomnosti tepelně stabilní polymerázy, PCR pufri, deoxynukleosid trifosfáty (dNTP) a hořčnatých iontů, začíná replikační proces. Při této teplotě polymeráza vykazuje nejvyšší enzymatickou

aktivitu a prodlužování primerů probíhá ve směru 5'→ 3' na základě komplementarity bází podle templátových vláken DNA s nasednutými primery s rychlostí až 100 bází za sekundu (Obrázek 23) [42].

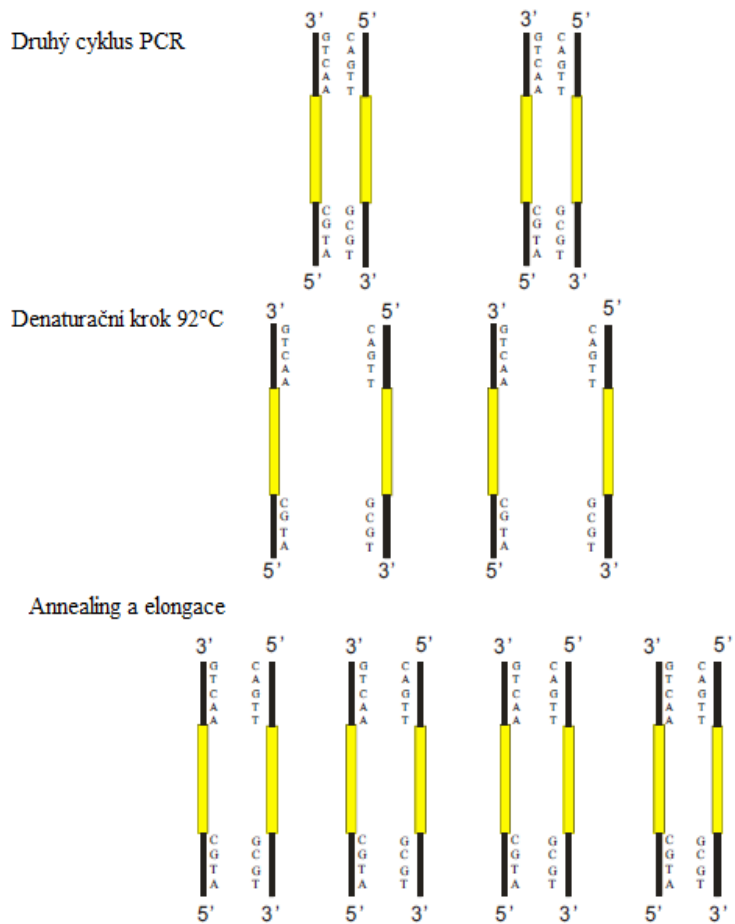


Obrázek 22 První PCR cyklus při 72 °C [42].



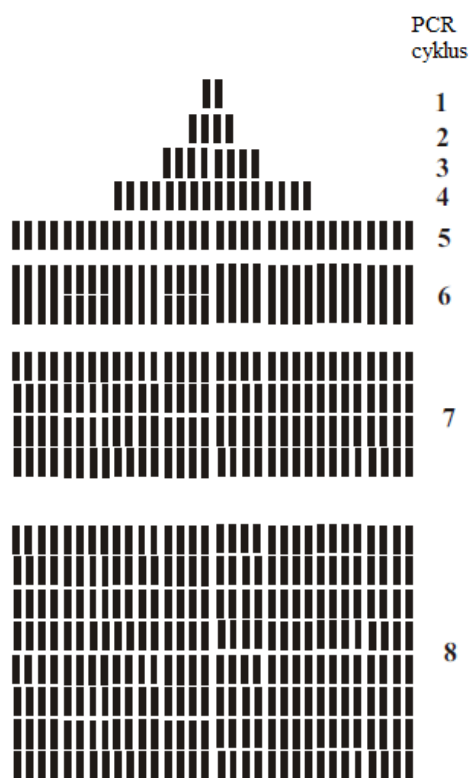
Obrázek 23 Amplifikace [42].

Druhý cyklus PCR reakce (Obrázek 24): dvě dvouvláknové DNA vzniklé v prvním cyklu (amplikony) jsou denaturovány, aby se získaly 4 jednotlivé řetězce. Přidání primerů, enzymů a bází umožňuje jejich kopírování jako v prvním cyklu, čímž se získají 4 dvouřetězcové amplikony [42].



Obrázek 24 Průběh druhého cyklu PCR reakce (Upraveno z [42]).

Zvýšení DNA se zvýšeným počtem cyklů PCR (denaturace, nasedání a prodloužení). Graficky lze vidět z obrázku 25, že počet molekul v krátkém čase rychle roste. Ve 40 cyklech PCR je jedna cílová molekula DNA zvýšena na miliardy kopií (2^{40}) [42].



Obrázek 25 Zvýšení DNA se zvýšeným počtem cyklů PCR (Upraveno z [42]).

2.5.2 Real time PCR

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR) monitoruje amplifikaci cílené molekuly DNA během PCR (tj. v reálném čase), nikoli až na jejím konci, jako klasická PCR. Pokud je ve vzorku častá určitá sekvence (DNA nebo RNA), je pozorován její signál v dřívějších cyklech; pokud je sekvence vzácná, je amplifikace pozorována v pozdějších cyklech. Kvantifikace amplifikovaného produktu je založena za použití fluorescenčních sond a PCR přístrojů, které měří fluorescenci při provádění tepelného cyklování pro PCR. Pro RT qPCR je optimální počet cyklů 25-35 protože při příliš vysokém počtu cyklů se také zvyšuje počet nespecifických produktů PCR [42].

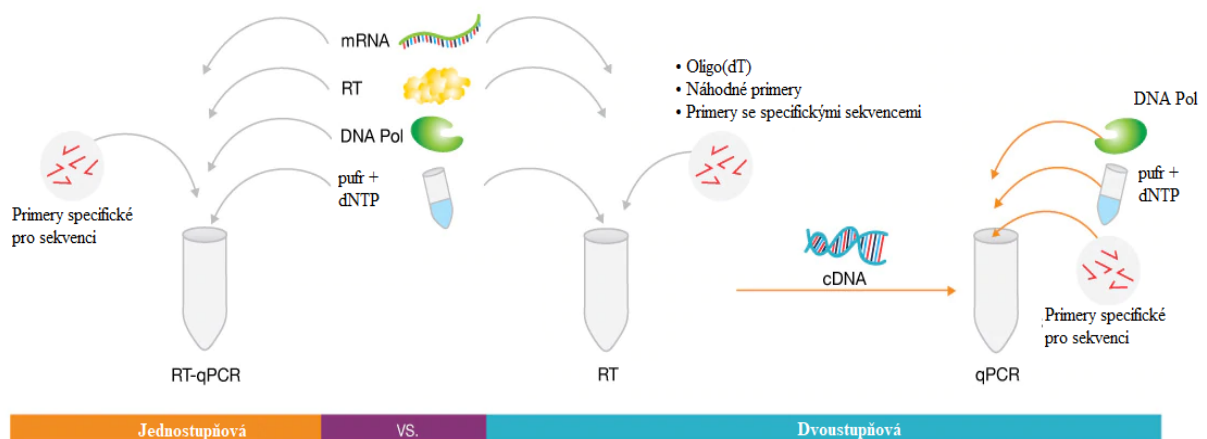
Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, kdy se používají sondy (fluorescenční látky), které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikované DNA. V kvantitativní analýze genové exprese nejčastěji používají dvě metody SYBR Green a TaqMan [43].

SYBR Green I je fluorescenční barvivo, které se váže na menší drážku dvouřetězcové kyseliny deoxyribonukleové (dsDNA). Jeho fluorescence je tisíckrát větší, v případě navázání na DNA než když je volně v roztoku. Zvyšující se množství dsDNA přítomné v reakční zkumavce tedy vede k většímu množství vázaných barviv a ke zvýšení fluorescenčního signálu ze SYBR Green I. Tato metoda je relativně levná a snadno se používá. Specifičnost je nejdůležitějším problémem s použitím jakýchkoli nespecifických dsDNA vázajících barviv, jako je SYBR Green [43].

TaqMan metoda využívá hydrolytické sondy, Jedná se o sekvenčně specifické duálně fluorofórem značené DNA oligonukleotidy. K 5' konci této sondy je připojen „reportér“, což je

fluorescenční barvivo, jehož fluorescence signalizuje amplifikaci produktu. Na 3' konci sondy je takzvaný zhášec, který potlačuje fluorescenci z reportéru v intaktních sondách. Zhášec také blokuje 3' konec sondy, takže ji nelze prodloužit termostabilní DNA polymerázou. V případě, že se zahájí transkripce templátové DNA, dojde postupně k odbourávání (hydrolýze) na templát nasednuté sondy, tím se uvolní reportér od zhášecce a dojde k emitaci fluorescence. Hydrolytické sondy jsou více specifické, protože se měří pouze sekvenčně specifické amplifikace [43],[44].

qRT-PCR lze provádět v jednom kroku nebo ve dvou krocích (Obrázek 26). Jednostupňové testy kombinují reverzní transkripci RNA na cDNA a PCR v jediné zkumavce a pufru, za použití reverzní transkriptázy spolu s DNA polymerázou. Jednostupňový RT-qPCR používá pouze primery specifické pro sekvenci. Ve dvoukrokových testech jsou kroky reverzní transkripce a PCR prováděny v oddělených zkumavkách, s různými optimalizovanými pufrů, reakčními podmínkami a strategiemi aktivace [44],[45].



Obrázek 26 Rozdíly mezi jednostupňovým a dvoustupňovým průběhem RT-qPCR (Upraveno z [46]).

2.5.2.1 Dvoustupňová qRT-PCR

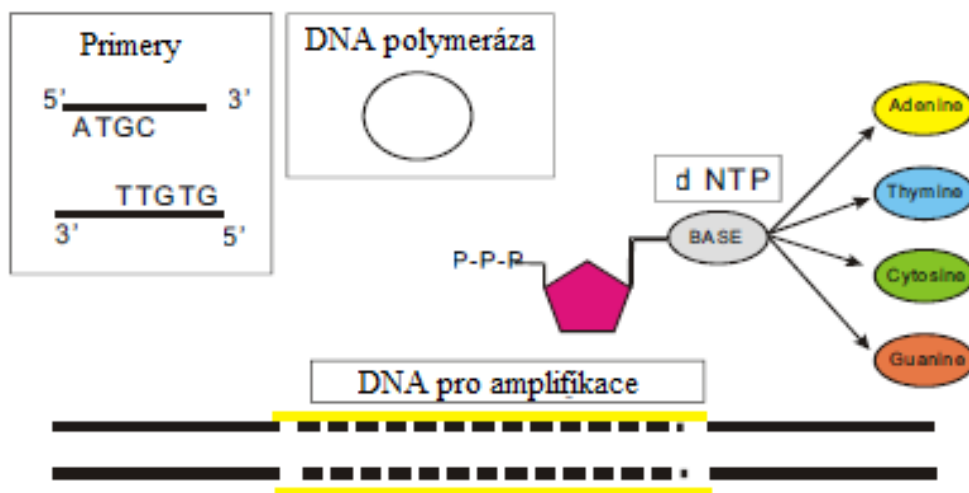
Dvoustupňová qRT-PCR začíná reverzní transkripcí buď celkové RNA nebo poly (A) RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Tato reakce syntézy cDNA může být aktivována pomocí náhodných primerů, např. oligo(dT) (jednovláknová sekvence deoxythymidinu) nebo genově specifických primerů. Mnoho vědců používá náhodné primery nebo směs oligo(dT) a náhodných primerů, aby poskytly stejnou reprezentaci všech cílů v PCR aplikacích v reálném čase a aby se zabránilo přednostní replikaci z oligo(dT) primerů. Teplota použitá pro syntézu cDNA závisí na zvolené reverzní transkriptáze. Po reverzní transkripci je cDNA přenesena do samostatné zkumavky pro qRT PCR [44].

2.5.2.2 Jednostupňová qRT-PCR

Jednokroková qRT-PCR kombinuje syntézu cDNA a qRT PCR reakci ve stejné zkumavce, což zjednodušuje nastavení reakce a snižuje možnost kontaminace. Jsou vyžadovány genově specifické primery. Je to proto, že použití oligo (dT) nebo náhodných primerů bude generovat nespecifické produkty v jednostupňovém postupu a snižovat množství požadovaného produktu [44].

2.5.3 Složení PCR směsi

Ke katalyzování amplifikace se používá tepelně stabilní DNA polymeráza a tento enzym musí být dodán s vhodným pufrům, kofaktorem (kovovými ionty) a stavebními bloky dNTP (Obrázek 27). Pro případ specifických aplikací (tj. ke stabilizaci enzymu, manipulaci s denaturačními teplotami atd.) lze přidat další volitelné složky [42].



Obrázek 27 Základními komponentami PCR směsi jsou: 1. dva oligonukleotidové primery (každý přibližně 20 oligonukleotidů) 2. DNA-polymeráza 3. dNTP (směs všech nukleotidů) 4. templátová DNA 5. pufr obsahující Mg^{2+} ionty 6. značení – sondy (pouze u qPCR) / ethidium bromid 7. ddH₂O (Upraveno z [42]).

Templátová DNA

Templátová DNA pro replikaci může být z jakéhokoli zdroje DNA, jako je genomická DNA (gDNA), komplementární DNA (cDNA) a plazmidová DNA. Je však důležité, aby vzorek nebyl kontaminován žádnou jinou DNA. Optimální množství templátu se také může lišit v závislosti na typu použité DNA polymerázy. Optimalizace množství vstupní DNA je důležitá, protože vyšší množství zvyšuje riziko nespecifické amplifikace, zatímco příliš nižší množství snižuje výtěžky [44],[47].

Primery

Primery PCR jsou syntetické oligonukleotidy DNA s přibližně 15–30 bázemi. PCR primery jsou navrženy tak, aby se navázaly (prostřednictvím sekvenční komplementarity) na sekvence, které lemují oblast zájmu v templátové DNA. Během PCR prodlužuje DNA polymeráza primery z jejich 3' konců. Vazebná místa primerů musí být jedinečná, s minimální homologií s jinými sekvencemi vstupní DNA, aby se zajistila specifická amplifikace zamýšleného cíle. Kromě sekvenční homologie musí být primery navrženy pečlivě, aby se specifická amplifikace PCR zvýšila. Sekvence primerů by měly mít teploty tání (T_m) v rozmezí 55–70 ° C, s T_m obou primerů v rozmezí 5 ° C. Kromě toho by obsah GC v primeru měl být v ideálním případě 40–60 %, s rovnoměrným rozložením bází C a G, aby se zabránilo formování různých smyček. Podobně by neměly být na 3'-koncích primerů přítomny více než tři báze G nebo C,

aby se minimalizovala nescifická aktivace. Na druhé straně, jeden C nebo G nukleotid na 3' konci primeru může podporovat prospěšné ukotvení a prodloužení primeru [47]

Sonda

Sonda je fragment DNA nebo RNA s proměnnou délkou (obvykle 100–10000 bází dlouhý), který lze radioaktivně nebo fluorescenčně značit. Poté může být použit ve vzorcích DNA nebo RNA pro detekci přítomnosti nukleotidových látek, které jsou komplementární k sekvenci sondy. Příklady sond: Scorpion sondy, Molecular Beacon sondy, TaqMan sondy, LNA (Locked Nucleic Acid) sondy, Cycling Probe Technology (CPT) [44].

DNA polymeráza

Výkonnost PCR často souvisí s termostabilní DNA polymerázou. Nejčastěji používanou DNA-polymerázou je Taq DNA-polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Taq DNA polymeráza má relativně vysokou termostabilitu, s poločasem přibližně 40 minut při 95 ° C. Integruje nukleotidy rychlostí asi 60 bází za sekundu při 70 ° C a může amplifikovat délky asi 5 kb, takže je vhodný pro standardní PCR bez zvláštních požadavků. Jedním z hlavních faktorů negativně ovlivňujících specificitu PCR je skutečnost, že Taq DNA polymeráza má zbytkovou aktivitu (residual activity) při nízkých teplotách. Primery mohou nescificky nasedat na DNA během nastavení reakce, což umožňuje polymeráze syntetizovat nescifický produkt. Problém nescifických produktů vyplývajících z chybného primingování lze minimalizovat použitím enzymu „hot-start“ tedy takové DNA polymerázy, která není aktivní během přípravy reakční směsi a počátečního kroku denaturace DNA. Pro specializovanější aplikace, jako je klonování, PCR, dlouhá amplifikace a PCR bohatá na GC, jsou preferovány DNA polymerázy s vyšším výkonem. Tyto enzymy jsou schopné vytvářet produkty PCR s nižší chybou z dlouhých templátů, v kratším čase s lepšími výtěžky a vyšší odolností vůči inhibitorům [44],[47].

Deoxynukleosid trifosfáty (dNTP)

dNTP se skládají ze čtyř základních nukleotidů – deoxyadenosin trifosfát (dATP), deoxycytidin trifosfát (dCTP), deoxyguanosin trifosfát (dGTP), deoxythymidin trifosfát (dTTP) -jako stavebních bloků nových řetězců DNA. Tyto dNTP jsou přítomny v reakční směsi ve formě sodných nebo lithných solí. Tyto čtyři nukleotidy jsou typicky přidávány do PCR reakce v ekvimolárních množstvích pro optimální začlenění báze. Avšak v určitých situacích, jako je náhodná mutagenese pomocí PCR, jsou záměrně dodávány nevyvážené koncentrace dNTP, aby se podpořil vyšší stupeň nesprávné inkorporace nekorrigující DNA polymerázou [47].

Mg²⁺

Hořčatý iont (Mg²⁺) funguje jako kofaktor pro aktivitu DNA polymeráz tím, že umožňuje inkorporaci dNTP během polymerace. Ionty Mg²⁺ se běžně dodávají jako roztok MgCl₂ do směsi PCR. Některé polymerázy, jako je Pfu DNA polymeráza, však dávají přednost MgSO₄, protože síran za určitých okolností zajišťuje robustnější a reprodukovatelnější výkon. Ionty hořčíku v aktivním místě enzymu katalyzují tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 3'-OH primeru

a fosfátovou skupinou dNTP. Kromě toho Mg^{2+} usnadňuje tvorbu komplexu mezi primery a templáty DNA stabilizací negativních nábojů na jejich fosfátových řetězcích. Nízké koncentrace Mg^{2+} mají za následek sníženou aktivitu polymerázy, a tudíž malý nebo žádný produkt PCR. Na druhé straně, vysoké koncentrace Mg^{2+} často produkují nespecifické PCR produkty ze zvýšené stability komplexů primer-templát, jakož i zvýšení replikačních chyb z nesprávné inkorporace dNTP [44],[47].

Pufrovací roztok

PCR se provádí v pufru, který poskytuje vhodné chemické prostředí pro aktivitu DNA polymerázy. Hodnota pH pufru je obvykle mezi 8,0 a 9,5 a je často stabilizována pomocí Tris-HCl. Pro Taq DNA polymerázu je běžnou součástí v pufru draselný iont (K^+) z KCl, který podporuje annealing primerů. KCl v pufru může občas nahradit síran amonný $(NH_4)_2SO_4$. Amoniový iont (NH_4^+) má destabilizační účinek, zejména na slabé vodíkové vazby mezi neshodným párováním bází a templátů, čímž se zvyšuje specifita reakce [44],[47].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Benzylalcohol-DHA, CAS:520-45-6, Making Cosmetics, USA
- Carboxymethylglucan (CMG) , č.š. 190514, Contipro, CZ
- Cetylalkohol, CAS: 36653-82-4, Making Cosmetics, USA
- Cocamidopropyl Betaine (CAPB), č.š. 20104003, Acetrade, CZ
- Decylglucoside (DG), č.š.20104003, Contipro, CZ
- DePC Voda, Contipro, CZ
- DNeasy Blood & Tissue Kits, LOT: 163031593, Qiagen
- Ethanol 96 %, CAS: 36653-82-4, Penta, CZ
- Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt (EDTA), CAS: 6381-92-6, Sigma-Aldrich, USA
- Glyceryl Stearate Citrate, č. 112350, Ekokoza, CZ
- Hydroxid Sodný, CAS: 1310-73-2, Lach-ner, CZ
- Chlorid Sodný, CAS: 7647-14-5, Lach-Ner, CZ
- Kyselina Citronová, CAS: 77-92-9, Making Cosmetics, USA
- Kyselina Hyaluronová (HA), č.š.190520-E1, Contipro, CZ
- Lysozyme From Chicken Egg White, CAS: 12650-88-3, Sigma-Aldrich, USA
- Oligohyaferte, č.š. OH-190506, Contipro, CZ
- Schizophyllan, č.š. 191114-E1, Contipro, CZ
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), č.š. STBH6852, Sigma-Aldrich, CZ
- TanActine, č.š.140217-E1, Contipro, Cz
- Tennenladerm, č.š. 090418, Contipro, CZ
- Capric Triglyceride, CAS: 20099088, Acetrade, CZ
- Triton X-100, CAS: 9002-93-1, Lach-Ner, Cz
- Trizma Base, CAS: 77-86-1, Sigma-Aldrich, USA
- Tween 20, CAS: 9005-64-5, Sigma-Aldrich, USA

3.2 Komponenty pro qPCR

- INJ Voda, Contipro, CZ
- Sonda 16S, Elisabeth Pharmacon, CZ
- Sonda PA, Elisabeth Pharmacon, CZ
- Sonda SE, Elisabeth Pharmacon, CZ
- Taqman Fast PCR Universal Master Mix, LOT: 00764857, Thermo Fisher Scientific, USA

3.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické Váhy ME204 Mettler Toledo
- Automatické Pipety v různém rozsahu Objemu, Eppendorf Research Plus
- Laminární Box Class II, Microbiological Safety Cabinet, Thermo Scientific
- Magnetická Míchačka, IKA RCT Basic, Thermo Scientific
- MPA 580 Firmy Courage & Khazaka
- Corneometer CM 825, Courage & Khazaka

- Tewameter TM300, Courage & Khazaka
- Sebumeter SM 815, Courage & Khazaka
- Frictiometer FR 700, Courage & Khazaka
- Multifunkční Centrifuga Thermo-Juan IEC CL31R, Thermo Scientific
- Real-Time PCR Equipment, Quant Studio 3, Thermo Scientific
- Sterilní Váhy XP205 Delta Range Mettler Toledo
- Termostat IKA Dry Block Heater 4, Thermo Scientific

3.4 Příprava detergentu

Roztoky detergentu byly vždy čerstvě připravené v den měření. Bylo připraveno 10 ml 10 % roztoku daného tenzidu. Pro porovnání byla použita destilovaná voda. V tabulce 2 je uveden seznam použitých detergentů v práci.

Tabulka 2 Použité detergenty.

Pracovní název suroviny	Popis
SDS	10 % Laurylsulfat sodný v destilované vodě
CAPB	10 % Kokamidopropyl betain v destilované vodě
DG	10 % Decylglucosid v destilované vodě

3.5 Příprava kosmetických emulzí

Byly připravené emulze typu olej ve vodě. Složení viz Tabulka 3 Složení emulze O/V

Tabulka 3 Složení emulze O/V.

Fáze	Obchodní název	%	INCI	Funkce
A- olejová	Triglycerid	25	Caprylic/Capric triglyceride	Okluze
	Glyceryl stearát-citrát	5	Glyceryl stearate citrate	Emulgátor
	Cetylalkohol	2	Cetyl alcohol	Emulgátor
B vodná	Destilovaná voda	56,2	Aqua	rozpouštědlo
C aktivní látka*	HMW HA	1	Sodium Hyaluronate	Aktivní látka
	VLMW HA		Hydrolyzed Sodium Hyaluronate	
	CaproylHA		Sodium Caprooyl Hyaluronate	

	NaCMG		Sodium Carboxymethyl Beta-Glucan	
	Schizophyllan		Schizophyllan	
	Glucomannan		Glucomannan	
	Destilovaná voda	10	Aqua	rozpouštědlo
D – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	Konzervant
E-úprava pH	Kys. citronová/hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	Citric acid/sodium hydroxide	Úprava pH

* pro přípravu emulze byla použita vždy jedna z uvedených aktivních látek. Bylo připraveno 6 emulzí obsahujících aktivní látku.

Pro přípravu olejové fáze byly do kádinky naváženy látky dle tabulky 3. Vzniklá směs byla za stálého míchání zahřata na teplotu 75 °C. Fáze B byla zahřata na 75°C. Jakmile měly obě fáze stejnou teplotu, byla vodná fáze za stálého míchání postupně přidána do olejové fáze. Po emulgaci byla vzniklá směs intenzivně míchána až do vychladnutí. Do emulze o teplotě 40 °C byla poté přidána fáze C za stálého míchání. Poté byl přidán konzervant (fáze D) a směs se řádně promíchala. Bylo změřeno pH vzniklé emulze a případně bylo upraveno 10 % roztokem NaOH na hodnoty 5-5,2.

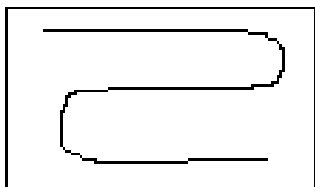
Placebo bylo připraveno stejným způsobem jen bez přidání aktivní látky. Přesné navážky složek emulze jsou uvedeny v příloze.

3.6 Vliv tenzidů na parametry a mikrobiom kůže

Obě provedené *in vivo* studie byly schváleny interní etickou komisí společnosti Contipro a.s.. Studie se zúčastnilo 10 žen ve věkovém rozmezí 23-41 let (průměr 31 let), bez akutních či chronických dermatologických potíží, bez akutního UV ozáření v oblasti měření, které nežívaly antibiotika nebo antimykotika (systémové nebo lokální podání v místě aplikace) alespoň 6 měsíců před odběrem. Účastnice neaplikovaly 8 hodin před měřením žádné kosmetické prostředky ani vodu na zkoumanou oblast, tzn. čelo.

Jedna polovina čela byla otřena dvěma tampony buničité vaty napuštěnými 1 ml roztoku testovaného detergentu případně destilovanou vodou (schéma aplikace detergentu viz Obrázek 28). Parametry kůže jako hydratace, obsah seba, TEWL a textura byly měřeny v časech: T₀ (původní stav – před otřením pokožky), 15 min, 2, 4 a 24 hod po otření. Ve všech časových bodech byl zároveň odebrán i vzorek mikrobiomu. Odběr vzorku mikrobiomu byl prováděn stěrem pomocí sterilní vatové tyčinky napuštěné sterilním roztokem 0,15 M NaCl a 0,1 % Tween 20. Odběr vzorku byl získán z plochy kůže cca 4 cm². Stěr tyčinkou byl prováděn

opakovaně cca 50 x po dobu 30 s aplikací stálého tlaku. Pro každé místo byla použita 1 vatová tyčinka. Hlavička vatové tyčinky byla potom vložena do 1,5ml zkumavky, vzorky byly pak uloženy do -80 °C. Stěr z čela byl proveden dezinfikovanými rukavicemi, aby se zamezila nežádoucí kontaminace. Po 2 dnech byl experiment opakován se zbývajícími dvěma detergenty.



Obrázek 28 Aplikace detergentu na tampon.

3.7 Vliv kosmetických surovin na obnovu parametrů kůže a mikrobiomu

Studie se zúčastnilo 10 žen ve věkovém rozmezí 23-41 (průměr 31 let). Aplikace tenzidu CAPB proběhla stejně jako v předchozím experimentu a parametry kůže byly měřeny v časech T_0 (před aplikací tenzidu), 15 min, 2 a 24 hod po aplikaci tenzidu. Ve stejných časech byly také odebrány vzorky mikrobiomu výše popsaným způsobem. V čase 15 min byla na oblast oťřenou tenzidem poprvé aplikována emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo (1 aktivní látka na 1 polovinu obličeje). Další aplikaci emulze provedli dobrovolníci tentýž den večer po umytí sledované plochy vodou (minimálně 8 hodin před odběrem následující den). Opět experimenty byly opakovány ve 2denních rozestupech do té doby, než byly provedeny experimenty se všemi testovanými aktivními látkami.

3.8 Měření parametrů kůže

Před měřením byli dobrovolníci aklimatizováni 10 minut v kondicionované místnosti. Studie probíhala vždy ve stejné místnosti, s vlhkostí vzduchu v průměru 40 % a průměrnou teplotou 23°C. Pomocí přístroje MPA 580 firmy Courage & Khazaka bylo prováděno měření hydratace pokožky (Corneometer CM825), transepidermální ztráty vody (Tewameter TM 300), obsah seba (Sebumeter SM 815) a textury pokožky (Frictiometer FR 700). Všechny sondy byly během měření temperovány na 37°C.

3.9 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního setu QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kits podle návodu výrobce s modifikací postupu pro Gram-pozitivní bakterie. V prvním kroku bylo do zkumavky se vzorkem přidáno 180 ul lyzačního pufru (20 mM Tris.Cl pH=8; 2 mM EDTA; 1,2 % Triton X-100; lysozym (20 mg/ml, byl přidán těsně před použitím pufru)). Poté byl roztok se vzorkem mírně vortexován po dobu 30 s. S lyzačním pufrem byl inkubován alespoň 30 minut v 37 °C. Po tomto kroku byly odstraněny vatové tyčinky a k roztoku bylo přidáno 25 ul proteinázy K a 200 ul pufru AL. Vzniklá směs byla vortexována. Vzorky byly inkubovány 30 minut v 56 °C. Pak bylo přidáno 200 ul ethanolu a znovu byly vzorky důkladně vortexovány. Takto připravený roztok byl přenesen do kolonky umístěné do 2 ml sběrné zkumavce. Poté byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 6000 g. Vzniklý eluát byl vyhozen. Bylo přidáno 500 ul AW1 pufru a kolonky se znovu odstředily (1 min při alespoň 6000 g). Eluát byl opět vyhozen. Bylo přidáno 500 ul AW2 pufru a kolonky se odstředily 3 min při alespoň 20000 g, aby se

vysušila membrána. Po tomto kroku byl eluát vyhozen (kolonku je nutné vyndávat opatrně, aby se kolonka nedostala do kontaktu s eluátem, pokud došlo ke kontaktu, poslední krok centrifugace byl zopakován). Kolonky byly umístěny do čisté 1,5 ml nebo 2 ml eppendorfky. Pak bylo napipetováno 100 ul pufu AE přímo na DNasy membránu, Kolonky byly inkubovány 1 min při RT a centrifugovány 1min při alespoň 6000 g. Eluce byla opakována (kolonka byla promyta znovu jen vzorkem). Vzorky od jednoho dobrovolníka byly vždy izolované spolu. Vzorky DNA byly uchovány při teplotě - 20 °C.

3.10 qRT-PCR

V tabulce 4 jsou uvedeny sekvence použitých primerů a sond.

Tabulka 4 Sekvence použitých primerů a sond.

Mikroorganismus	gen	primer / sonda (P)	Sekvence	konc. primer , sonda (nM)
<i>Propionibacterium acnes</i> [48]	16S rDNA	F	GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA	100
		R	TTCCGACGCGATCAACCA	
		P	AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> [49]	femA	F	CAACTCGATGCAAATCAGCAA	200
		R	GAACCGCATAGCTCCCTGC	
		P	TACTACGCTGGTGGAACCTCAAATCGTTATCG	
16S rDNA gene (endogenní kontrola) [50]	16S rDNA	F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	500
		R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
		P	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC3	

Všechny komponenty byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány. Sondy a primery byly naředěny na koncentraci uvedenou v tabulce 4.

Poté byla připravena směs o objemu 10 µl podle postupu uvedeném v tabulce 5.

Tabulka 5 Rozpis složek směsi na 1 reakci.

Složka	Objem (ul)
TaqMan Fast PCR Universal Master Mix	5
TaqMan Gene expression Assay	0,5
Vzorek DNA	4,5

Poté byly stripy zavíčkované, promíchány a stočeny 2 min při 4000 rpm. Vzorky byly připraveny v dubletech. Stejným postupem byla připravena negativní kontrola, pouze matricová DNA byla nahrazena stejným objemem vody pro PCR. Pro analýzu byl použit PCR systém QuantStudio 3. Amplifikace vyizolované DNA byla provedena při takto nastaveném teplotním programu:

1. krok (denaturace) 21 vteřin při 95 °C
 2. krok (elongace) 20 vteřin při 60 °C
- Opakování: 40 cyklů

3.11 Statistické zpracování dat

Všechny naměřené hodnoty byly matematicky, statisticky a graficky zpracovány pomocí MS Excel. Všechna data, pokud není uvedeno jinak, byla normalizována na hodnoty získané v čase T_0 a normalizace dat probíhala pro každého účastníka samostatně. Data vyjádřena jako průměr \pm SEM. Pro stanovení statistické významnosti byl použit párový Studentův test (T-test).

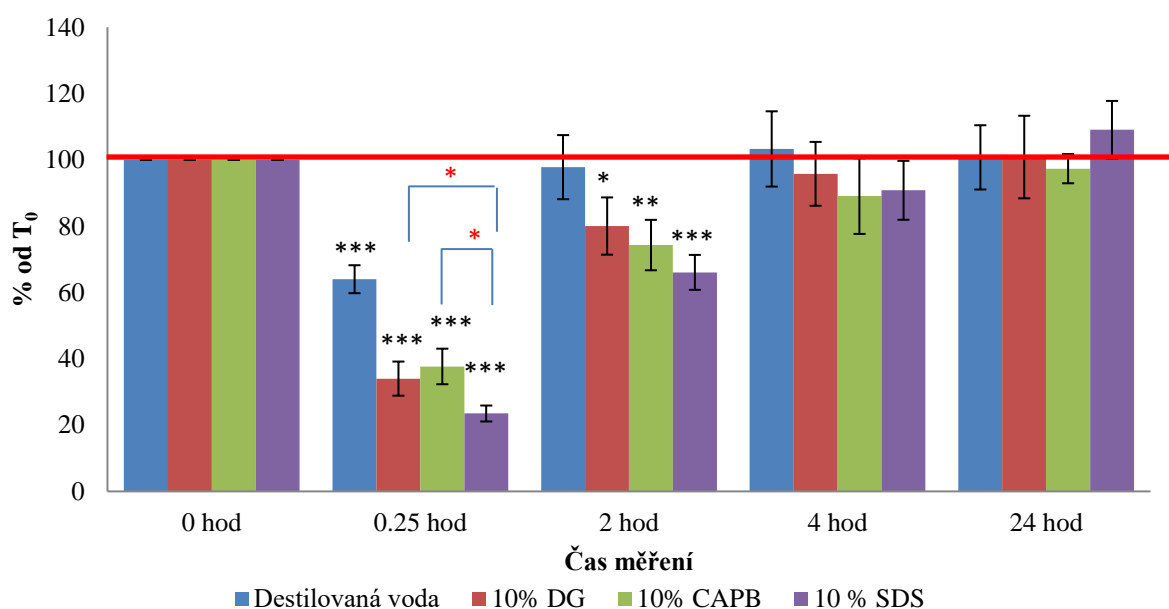
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv tenzidů na parametry kůže

Přestože čištění pleti patří ke každodenní rutině, v literatuře je popsán negativní efekt některých čistících prostředků. Proto jsme se zaměřili experimentální část na běžně používané tenzidy v kosmetice a jejich vliv jak na parametry kůže, tak i na její mikrobiom [51].

V rámci stanovení vlivu tenzidů na parametry kůže byly testovány 3 látky: dodecyl sulfát (SDS) jako aniontová PAL, decylglukosid (DG) jako neionogenní PAL a kokamidopropyl betain (CAPB) jako amfoterní PAL. Pro porovnání byla použita i destilovaná voda. Veškeré použité suroviny byly již v minulosti předmětem testů dermální dráždivosti a kosmetických studií, kdy nevykazovaly známky cytotoxicity a fototoxicity. Veškeré použité látky jsou látky běžně používané v kosmetickém průmyslu a splňují patřičné bezpečnostní standardy.

4.1.1 Sebum



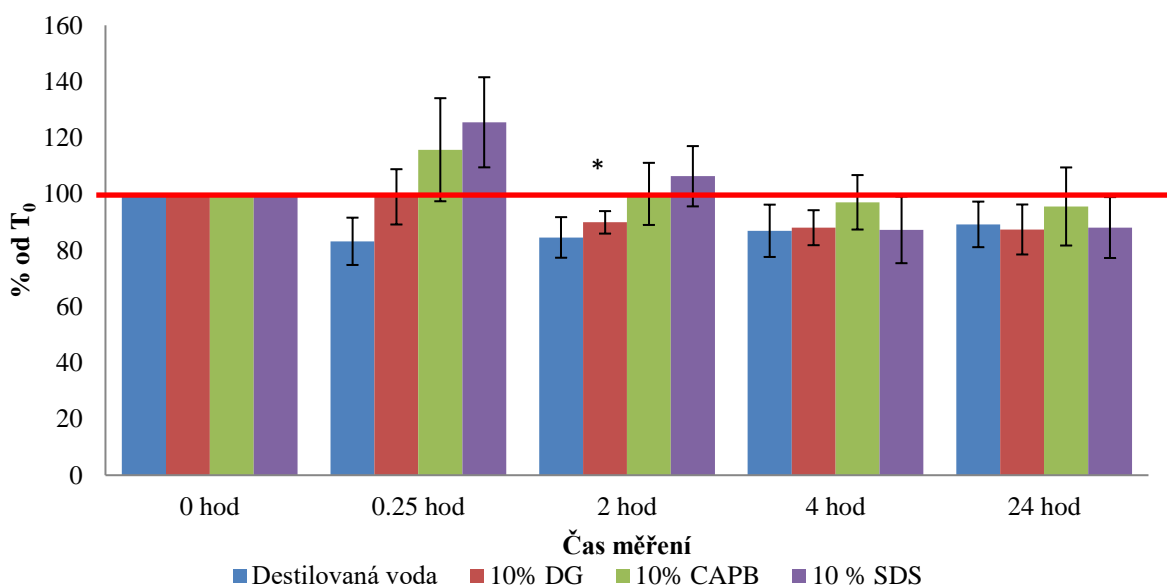
*Graf 1 Vliv tenzidů na obsah seba. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. Obsah seba byl měřen v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.*

Účelem tohoto experimentu bylo stanovit účinnost při krátkodobé aplikaci tenzidů na sebum. Z grafu 1 lze vidět, že odlišení výrazně snižují množství lipidů na SC. Pokles seba je pozorován po 15 minutách u všech testovaných detergentů i destilované vody, i když její efekt je menší než efekt tenzidů. Efekt tenzidů je statisticky signifikantní ještě 2 hodiny po aplikaci, naopak v případě vody došlo o úplnému obnovení množství seba na pokožce. Po 4 hodinách už snížení obsahu seba není významné u žádného z testovaných tenzidů a po 24 hodinách se sebum obnovilo na původní hodnoty, v případě SDS naopak mírně narostlo.

Měřením jsme potvrdili skutečnost, že tenzidy odstraňují lipidy z povrchu kůže, což je jev známý jako delipidace neboli odmaštění. Dopad povrchově aktivních látek na epidermální

lipidy je charakterizován narušením, solubilizací a dezorganizací lipidů SC. Současný výzkum ukázal, že mytí pokožky tekutým čisticím základem (roztok PAL bez jakýchkoli zvlhčujících přísad) může snížit hladinu mastných kyselin v pokožce i po jediném omytí. Největší vliv měl SDS, ale po 24. hodinách se hodnoty postupně vrátily na původní stav nebo mírně ho překročily. Kromě svého účinku na hladiny seba SDS vyvolává změny v organizaci lipidových lamel, což je v souladu s významným nárůstem TEWL, jak bylo také zjištěno v této práci. Při dlouhodobé aplikaci tohoto detergentu může docházet k negativnímu efektu, nabitě povrchově aktivní látky mohou být začleněny do lipidové dvojvrstvy, čímž způsobovat destabilizaci ochranné vrstvy a zvýšenou permeabilitu SC. Je zřejmé, že neiontové povrchově aktivní látky mají větší tendenci k rozpuštění mastných kyselin než aniontové povrchově aktivní látky, což může převést k většímu odmaštění kůže. Tato hypotéza je v souladu se současným měřením, kde je patrné, že roztok na bázi neiontových PAL SDS mění lipidovou oblast ve větší míře než mírné čisticí detergenty jako amfoterní CAPB nebo aniontový DG [1],[52],[53].

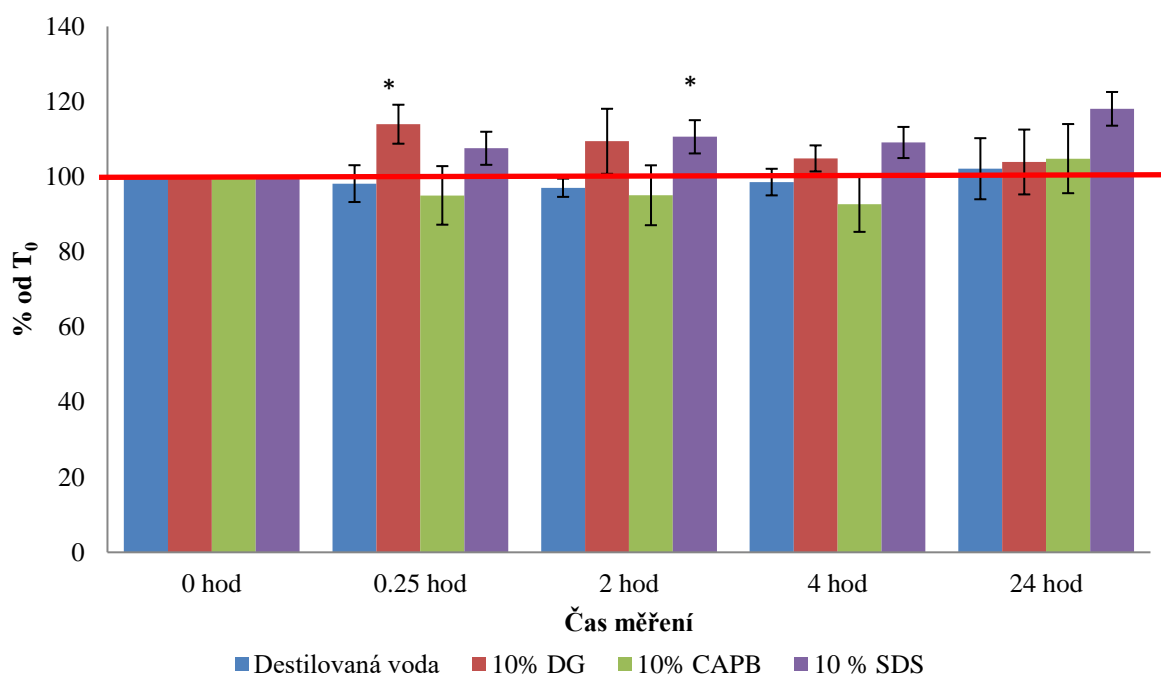
4.1.2 Textura



*Graf 2 Vliv tenzidů na texturu. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. Textura byla měřena v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.*

V této části byl zkoumán také vliv tenzidů na texturu kůže. Na grafu 2 můžeme pozorovat, že po 15 minutách po aplikaci tenzidů největší nárůst v hrubosti pokožky ukazoval SDS (125,5 %), následovaný CAPB (115,8 %). Destilovaná voda ukazovala opačný jev, u tohoto způsobu odlišení bylo snížení o 17 %. Po 2 hodinách hodnoty klesají u všech látek a tato tendence pokračuje po celé době měření. V tuto dobu byly účinky destilované vody, SDS a DG srovnatelné, hodnoty CAPB byly mírně vyšší. Předchozí studie ukázaly, že koeficient tření kůže pozitivně koreluje s hydratací SC, ale negativně koreluje s mastnotou pokožky. I zde je patrná souvislost koeficientu tření kůže s množstvím seba na SC. SDS, který nejsilněji odmašťoval kůže ukazoval také největší odpor 15 minut po aplikaci tenzidu [19].

4.1.3 TEWL

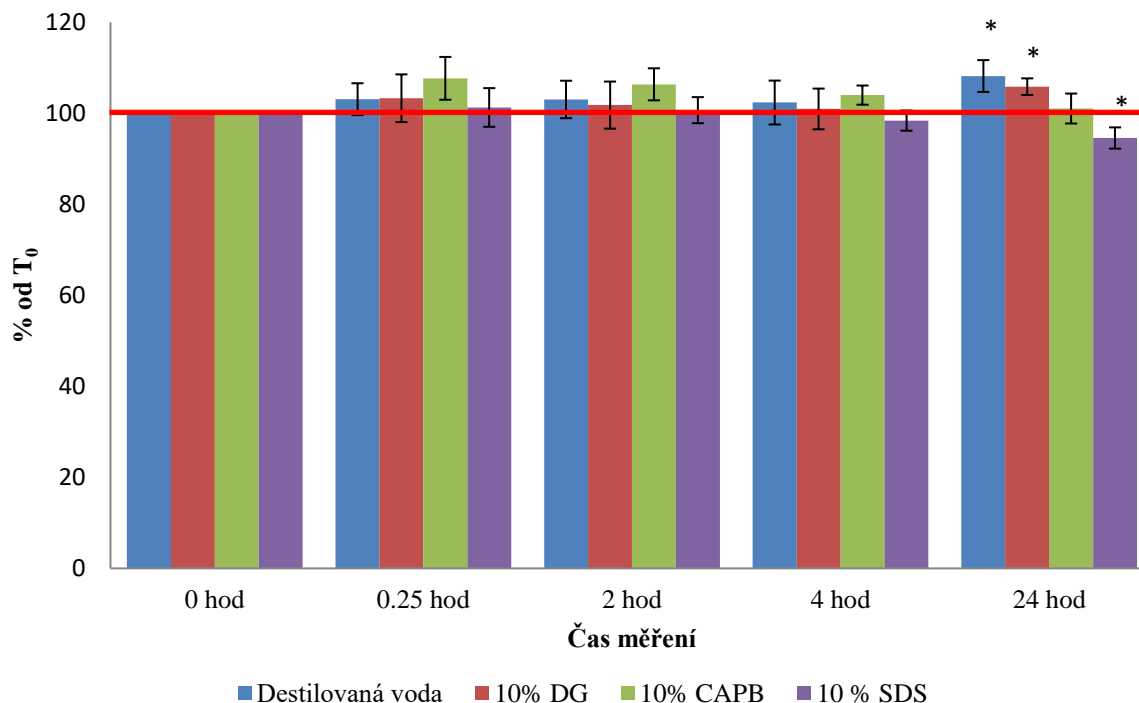


Graf 3 Vliv různých tenzidů na TEWL. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. TEWL byl měřen v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Mezi TEWL a stupněm narušení kožní bariéry existuje obecně přijímaný vztah. V důsledku toho se měření TEWL jeví jako velmi užitečný parametr k vyhodnocení kosmetických přípravků. Na grafu 3 je možné pozorovat, že po použití DG a SDS vedlo ke zvýšení transepidermálního odparu vody. Počáteční narušení kožní bariéry těmito detergenty bylo patrné i v dalších časových intervalech po počáteční aplikaci. Po 15 minutách DG měl největší nárůst TEWL, což bylo o 15 % vyšší oproti počátečnímu stavu a tento trend pokračoval i po 2 hodinách, poté se hodnoty vrátily na původní stav. SDS zvyšoval TEWL ve všech bodech měření. Po 24 hodinách SDS měl nejvýraznější efekt ve srovnání s ostatními detergenty, 15 % oproti T_0 . Nárůst TEWL u DG a SDS je pravděpodobně spojený s odstraněním seba, ale že je překvapivé, že u CAPB není pozorovaný stejný efekt. Nicméně naše výsledky potvrzují i další studie. Literární data ukazují, že PAL jako SDS může ovlivnit jak proteinové, tak lipidové struktury SC, čím způsobit zvýšenou propustnost lidské kůže odstraněním ochranné povrchové vrstvy lipidů. Tato vrstva pomáhá regulovat a udržovat TEWL a její odstranění okamžitě ovlivňuje hodnoty TEWL. Zvýšený TEWL může být způsoben přímými změnami v mezibuněčných lipidových membránách a / nebo narušením struktury keratinu. Nárůst ztráty vody z kůže po aplikaci SDS byl popsán jako sekundární jev v důsledku spongiózy (mezibuněčný edém v epidermis), vyvolanou denaturací α -helikálních keratinových proteinů v důsledku konformační interakce s PAL. Destilovaná voda TEWL neměnila a v případě CAPB je možné pozorovat mírný trend v poklesu TEWL až do 4 hodin. Po 24 hodinách hodnota TEWL u těchto vzorků se vrátila na počáteční stav. V různých studiích byl zkoumán CAPB,

kteřý by mohl ve větší či menší míře způsobit podráždění kůže a výsledky jsou shrnuty následovně: CAPB snižuje hodnotu TEWL, ale vykazuje dráždivé vlastnosti ve srovnání s neošetřenou pokožkou [53],[54],[55],[56].

4.1.4 Hydratace



Graf 4 Vliv různých tenzidů na hydrataci kůže. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napaštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. Hydratace byla měřena v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Dalším parametrem kůže, na který jsme se zaměřili při hodnocení vlivu tenzidů na pokožku byla hydratace SC. Již na první pohled na grafu 4 je patrné, že v hydrataci docházelo během testování pouze k minimálním změnám. Celkově byla pokožka stabilně hydratovaná v průběhu celého měření. CAPB měl nejlepší výsledky po 15 minutách od aplikace a tyto účinky se postupně snižovaly, po 24 hodinách se hodnoty vrátily do původního stavu. Tento jev je taky popsán v literatuře a potvrdili jsme, že tento detergent nemá negativní vliv na hydrataci a nevysušuje kůže (viz 2.3.3). Naopak SDS snižoval hydrataci 24 hodin po aplikaci, kdy hodnoty klesly o 6 % oproti počátečnímu stavu. Tento jev byl taky pozorován v jiných studiích. Dle našeho měření má nejhorší účinky SDS, což může souviset s tím, že tento tenzid patří k potenciálně zdraví škodlivým chemickým látkám (viz 2.3.1) [55].

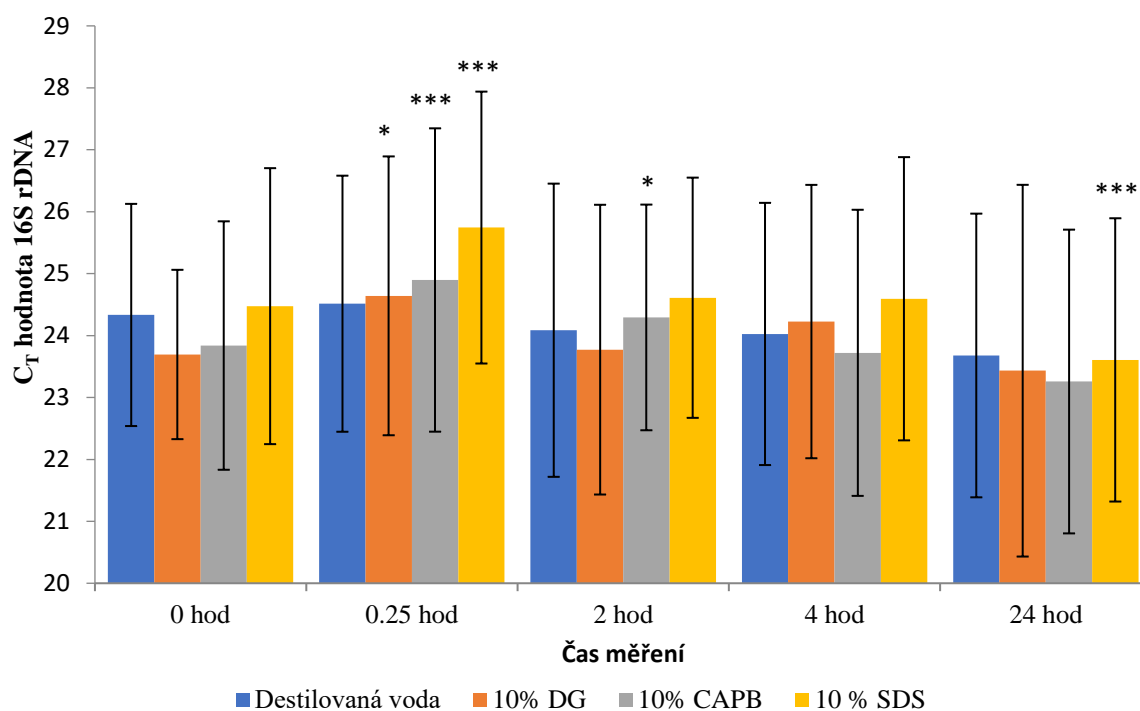
4.2 Vliv detergentů na mikrobiom kůže

Mezi hlavní kosmetické procedury nepříznivě ovlivňující kožní mikrobiom patří čištění pleti za použití detergentů. Tenzidy napomáhají při celkové hygieně těla fyzickým odstraňováním nečistot a mazu ulpívajících na pokožce, ale s tím odstraňují i symbiotické mikroorganismy z povrchu kůže. Sebaceózní místa, jako je čelo, vykazují nejnížší bakteriální diverzitu, což

naznačuje, že pouze malá podskupina organismů může tento stav tolerovat. Cílem předkládané studie bylo popsat efekt jednotlivých detergentů na mikrobiom kůže [21].

4.2.1 16S rDNA

Nejprve byl analyzován efekt tenzidů na celkové zastoupení bakterií na kůži, což jsme sledovali pomocí změn C_T genu 16S rDNA, který jsme zvolili protože tento gen je konzervovaný ve všech bakteriích. Může tedy sloužit jednak jako endogenní kontrola pro bakteriální druhy, ale také jako ukazatel relativního zastoupení bakterií.

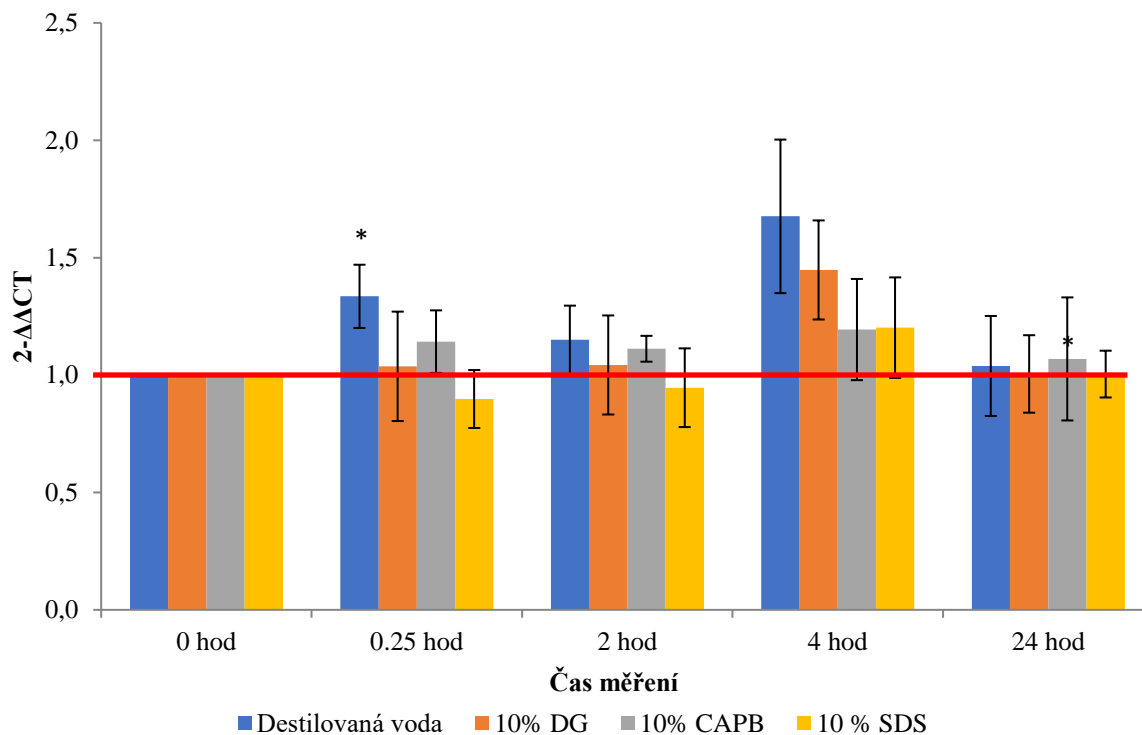


Graf 5 Efekt tenzidů na C_T hodnotu genu 16S rDNA. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otržena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. Sčítání mikrobiomu probíhalo v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Z grafu 5 lze pozorovat, že hodnoty C_T byly významně vyšší po aplikaci všech tenzidů, což značí úbytek bakterií, neboť bylo potřeba více cyklů PCR reakce pro to, aby bylo dosaženo prahové hodnoty. Výchozí množství bakteriální DNA ve vzorcích bylo tedy menší než v případě T_0 . Tento jev naznačuje, že mytí pokožky tekutým čisticím základem (roztok PAL bez jakýchkoli zvlhčujících přísad) snižuje počet bakterií na pokožce i po jediném omytí. Předchozí studie ukázaly, že taková činidla neustále odstraňují mikroflóru kůže a při dlouhodobé aplikaci znesnadňují komenzální mikroflóre rekolonizaci pokožky. Také je pozorovaná souvislost mezi obsahem lipidů a celkovým množstvím bakterií na pokožce. Látky, které nejvíc odmašťovaly kůži v minulém experimentu měly největší vliv na mikrobiom. Náš experiment potvrdil, že pro bakterie osidlující čelo, sebum je důležitou složkou pro jejich množení. Po 2 hodinách hodnoty se vrátily na počáteční stav s výjimkou CAPB, kde C_T hodnota zůstala ještě signifikantně zvýšená [21].

4.2.2 *Propionibacterium acnes*

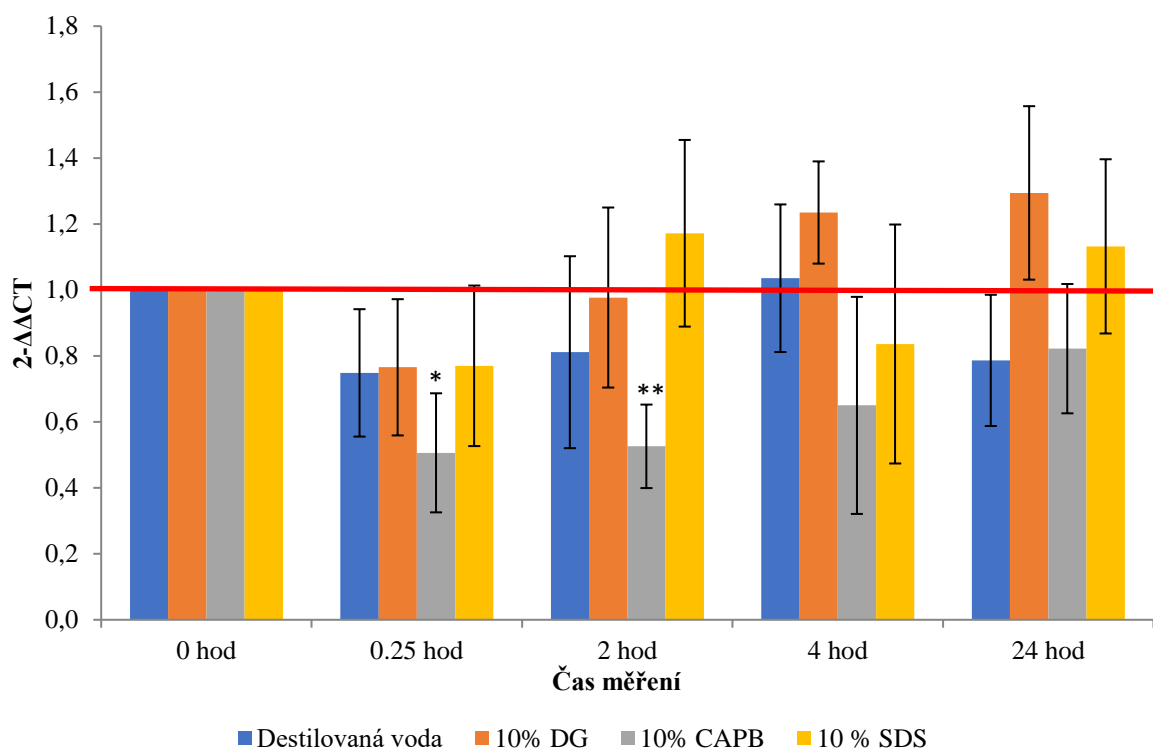
Z literatury je známo, že u zdravých dospělých jsou mastné oblasti, jako čelo, přednostně kolonizovány především *P. acnes* a *S. epidermidis*. Proto pro naši analýzu byly vybrány tyto druhy.



Graf 6 Vliv různých tenzidů na relativní zastoupení *P. acnes*. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla očištěna kosmetickým tamponem napaštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. Stěr mikrobiomu probíhal v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Na grafu 6 je shrnutý efekt testovaných tenzidů na relativní množství *P. acnes*. Je zřejmé, že po 15 minutách tenzidy nemají vliv na relativní zastoupení *P. acnes*, zatímco u destilované vody je viditelný výrazný nárůst zastoupení *P. acnes*. Tato tendence je pozorovaná i po 4 hodinách, nicméně tento nárůst už není statisticky významný. Po 24. hodinách na konci experimentu hodnoty všech látek pohybovaly kolem T_0 . Relativní zastoupení *P. acnes* koreluje s celkovým množstvím lipidů na kůži. Vylučovaný maz využívá *P. acnes* jako zdroj živin. Proto po aplikaci destilované vody je pozorován nárůst *P. acnes*, který souvisí s výsledky seba (4.1.1). Tento experiment ukázal, že tenzidy nemají vliv na relativní množství *P. acnes*. [57], [58].

4.2.3 *Staphylococcus epidermidis*



Graf 7 Vliv různých tenzidů na relativní zastoupení *S. epidermidis*. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla očištěna kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku tenzidu nebo destilované vody jako negativní kontrola. Stěr mikrobiomu probíhal v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2, 4 a 24 h po aplikaci tenzidu. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

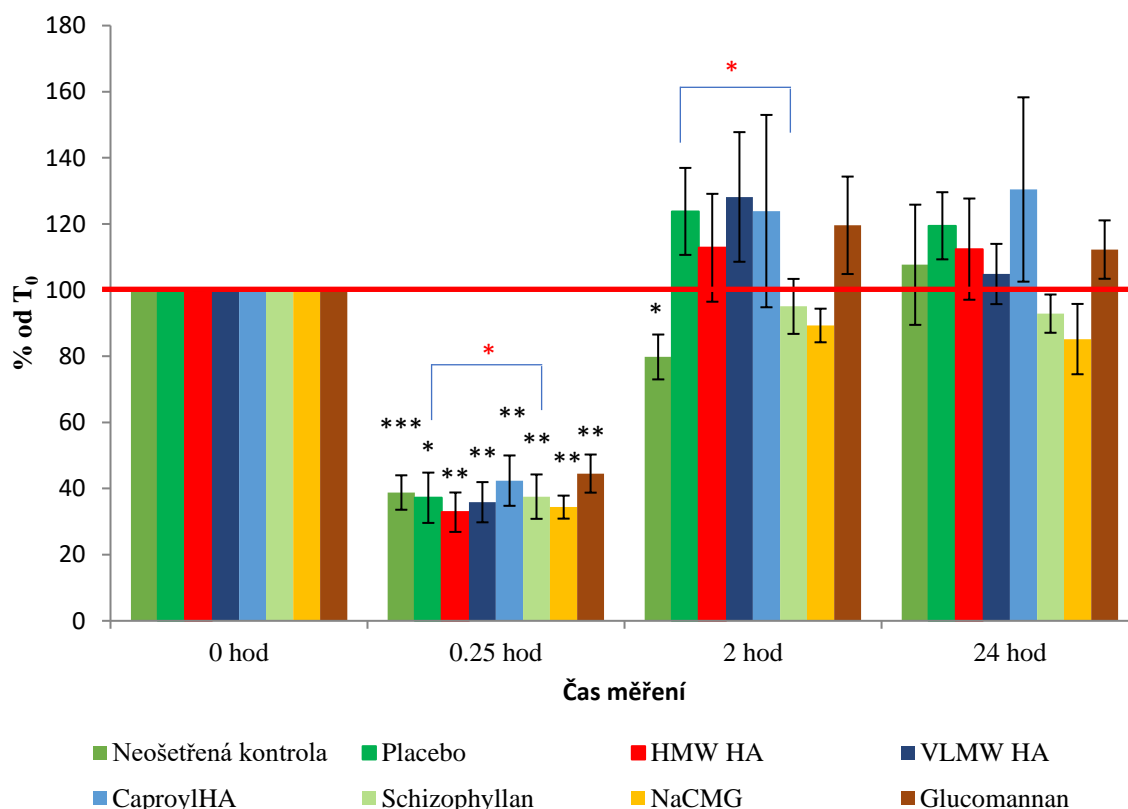
Na grafu 7 je shrnutý efekt testovaných tenzidů na relativní zastoupení *S. epidermidis*. Z grafu je patrný výrazný pokles *S. epidermidis* již po 15 minutách u všech testovaných látek. největší negativní efekt na měl CAPB, tato látka snížila relativní zastoupení o 50 %. Ostatní detergenty, ale i voda snižují populaci o 35 % oproti původnímu stavu. Po 2 hodinách lze pozorovat návrat k původnímu stavu jak u DG, tak u SDS. Naopak na místech ošetřených CAPB se populace *S. epidermidis* obnovovala pomalu a k původnímu stavu se nevrátila ani po 24 h. Tento výsledek je překvapující, protože CAPB je nejčastějším povrchově aktivním činidlem, který nahrazuje funkci sulfátů (SDS, SLES), přičemž je považován za šetrnější. *S. epidermidis* je hlavním rezidentem zdravé kůže, zabraňuje tvorbě akné, protože vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus* a *P. acnes* a jeho pokles může ovlivnit zdraví pokožky. Proto jsme pro další experiment zaměřený na efekt kosmetických polysacharidů vybrali tento detergent [57],[59].

4.3 Vliv kosmetických polysacharidů na parametry kůže

Polysacharidy, zejména z přírodních zdrojů, se v kosmetické oblasti široce používají díky multifunkčním vlastnostem. Kosmetické přípravky s těmito složkami, jako je kyselina hyaluronová, schizophyllan a další látky získané biotechnologickým procesem, mohou zlepšit účinnost přípravků a udržet kůži v dobrých podmínkách.

Cílem této experimentální části je zjistit vliv vybraných polysacharidů na parametry kůže po odlíčení pomocí CAPB a jejich schopnost obnovit nebo zlepšit stav mikrobioty. Pro náš experiment bylo vybráno 6 surovin: 3 chemikálie na bázi kyseliny hyaluronové (HMW HA, VLMW HA, CaproyHA) a 3 další přírodní polysacharidy (Schizophyllan, NaCMG, Glucomannan). Pro porovnání byly zařazeny do testů také placebo a neošetřená kontrola (pokožka ošetřená pouze CAPB).

4.3.1 Sebum



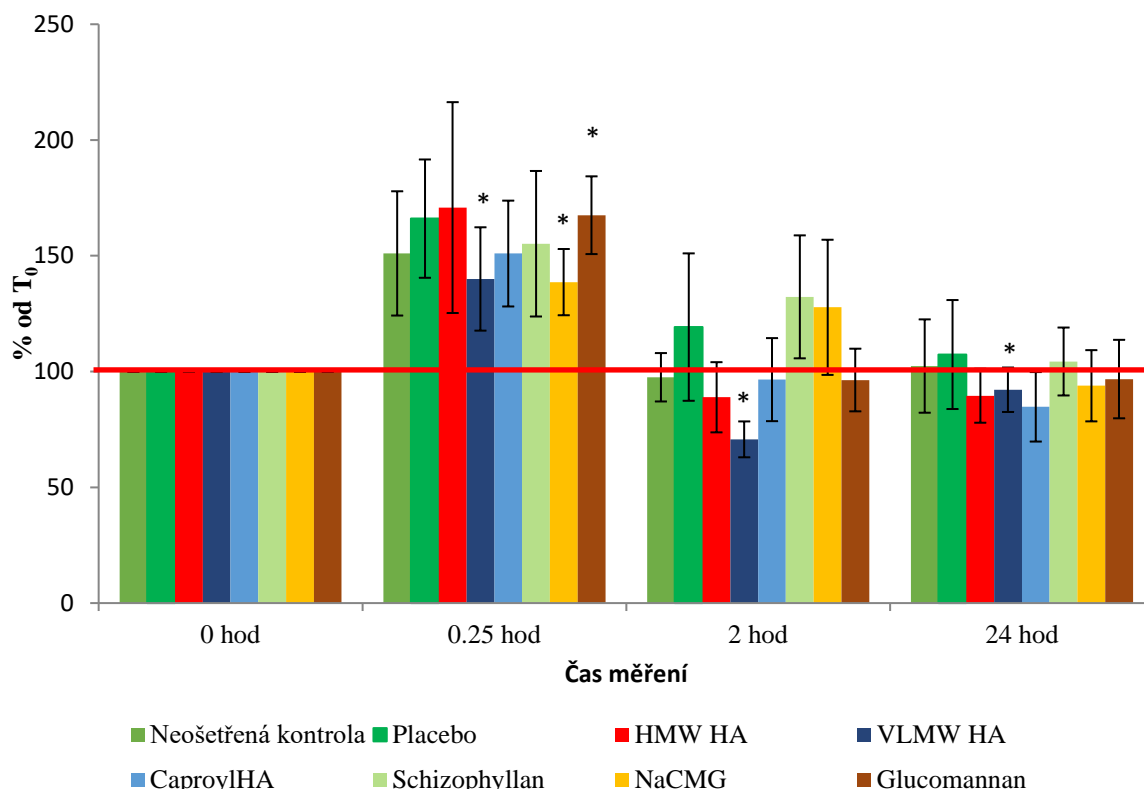
Graf 8 Vliv odlíčení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na obsah seba. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. Obsah seba byl měřen v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut, 2 a 24 h po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Graf 8 ukazuje pokles obsahu seba po aplikaci CAPB, což potvrzuje odstranění lipidů aplikací tenzidu. Po 2 hodinách je patrný velký nárůst obsahu seba u placebo a srovnatelné výsledky byly získány i po aplikaci emulzí s testovanými aktivními látkami, což naznačuje, že k obnově seba přispívá zejména olejová fáze použité emulze. U normální pokožky je to důležitý fakt: nadměrné odstranění seba může nepříznivě ovlivnit stav kůže, protože sebum pomáhá udržovat hydrataci a hraje roli při dodávání FFA. Naopak neošetřená kontrola ukazovala 79 %, což se koreluje s výsledkem minulého experimentu. Po 24 hodinách hodnoty se vrátily na počáteční

stav u neošetřené kontrole. V tuto dobu většina polysacharidů ukazovala stejnou účinnost jako placebo, jen u Schizophyllanu hodnoty byly signifikantně odlišné [58].

Z toho experimentu lze usoudit, že aplikace krému po očištění pokožky CAPB může obnovit množství lipidů na pokožce. Zajímavé je, že na rozdíl od ostatních látek NaCMG a Schizophyllan, nevracely hodnoty k původním. CaproylHA naznačil největší účinek po 24 hodinách a tenhle jev byl pozorován i v minulých experimentech [35],[60].

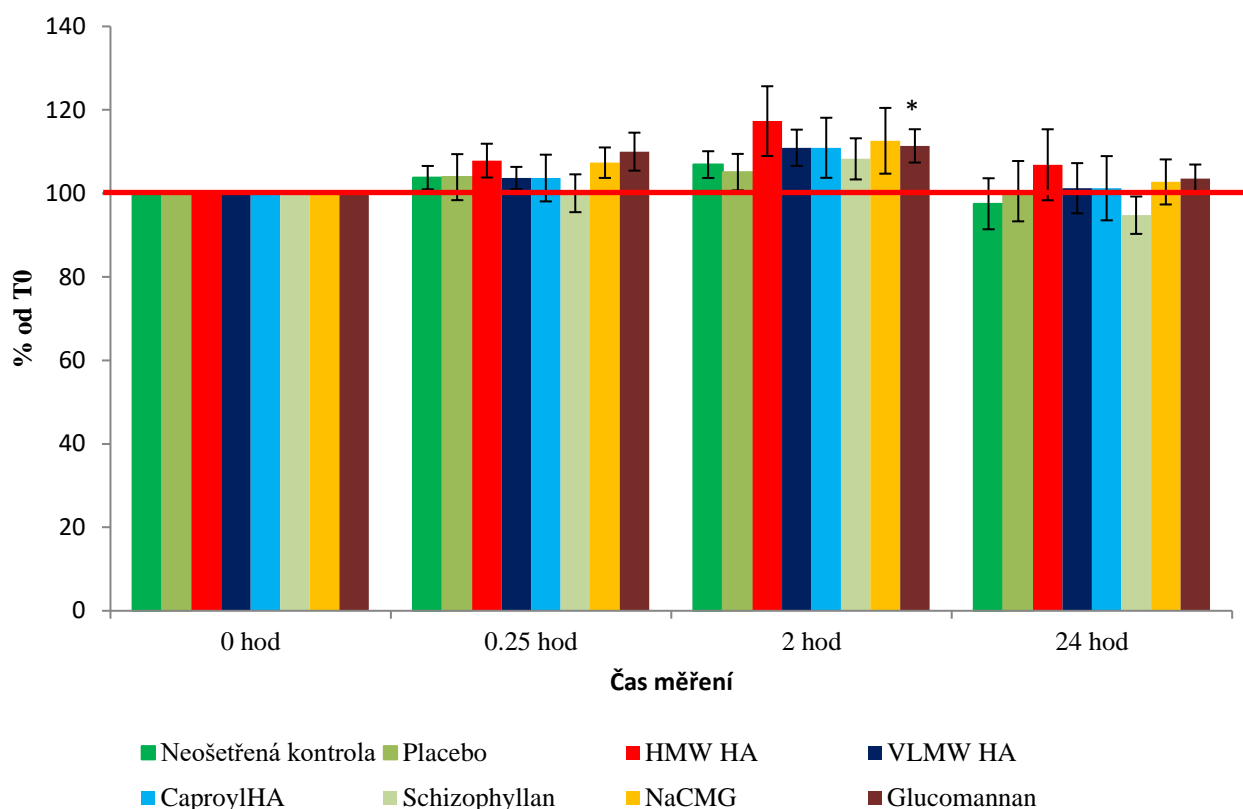
4.3.2 Textura



Graf 9 Vliv odličení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na texturu kůže. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. Textura byla měřena v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut 2 a 24 h po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Na grafu 9 je patrné, že 15 minut po aplikaci CAPB narůstá hrubost pokožky. V kapitole 2.1.2.4 je uveden vztah mezi texturou a mastnou pokožkou, který zde byl také detekován. Po 2 hodinách pozorované hodnoty klesají u všech látek a tato tendence pokračuje po celé době měření. Po dvou hodinách je zajímavý efekt VLMW HA, kde byl pozorován významně nejmenší odpor (71 %). Je známo, že tento polysacharid zvyšuje elasticitu kůže a měření textury souvisí s tímto parametrem, což lze taky pozorovat v tomhle experimentu. Po 24 hodinách je pozorováno, že všechny polysacharidy kromě Schizophyllanu mírně zlepšily texturu kůže, tenhle polysacharid měl neutrální vliv na texturu.

4.3.3 TEWL



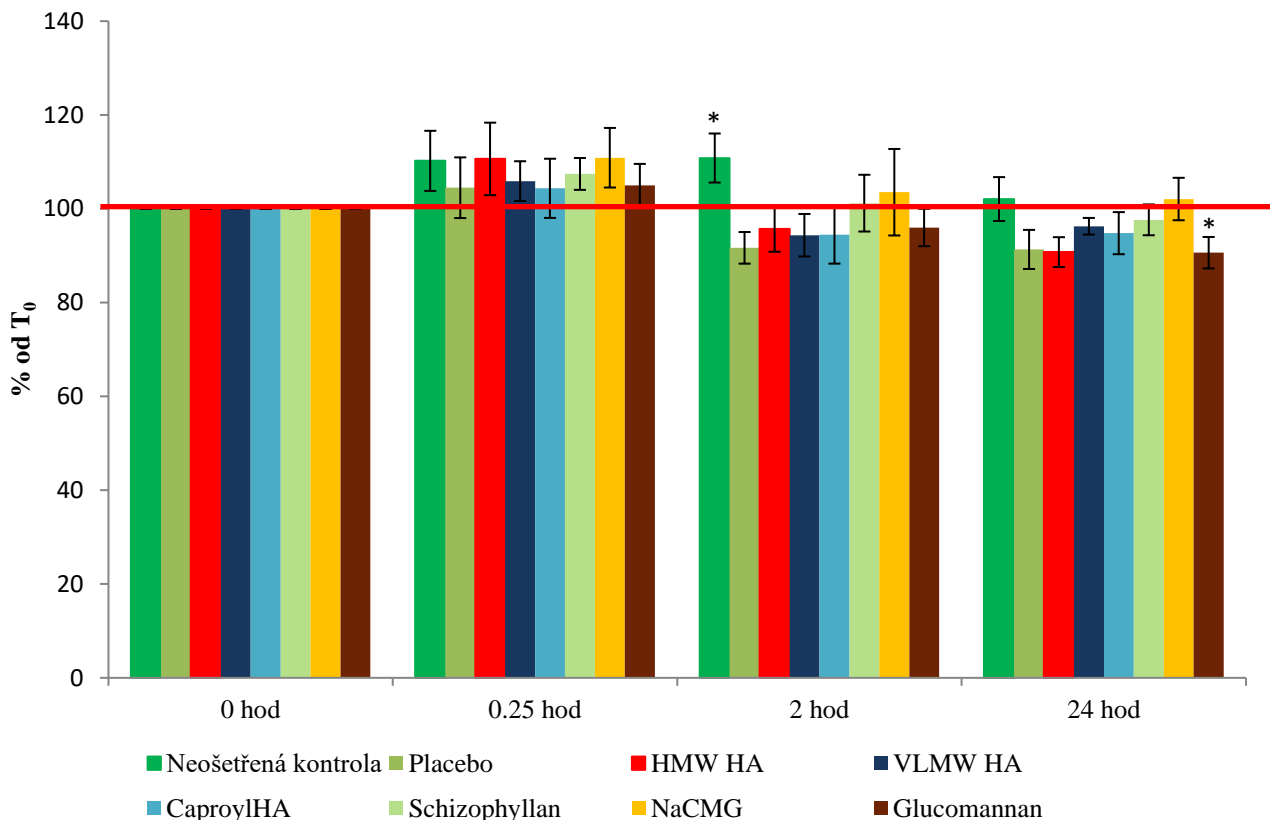
Graf 10 Vliv odlišení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na TEWL. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla očištěna kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. TEWL byl měřen v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut 2 a 24h po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Na grafu 10 lze vidět, že po očištění pokožky pomocí CAPB docházelo pouze k malým změnám v transepidermálním odparu vody u všech měření. Dvě hodiny po aplikaci emulze byl pozorován nárůst TEWL nicméně všechny testované látky kromě HMW HA a Glucomannanu, který signifikantně zvýšil TEWL v tomto bodě ($p=0,017$), měly srovnatelný účinek jako placebo a neostřená kontrola. Zvýšený TEWL u těchto dvou látek je překvapivý, protože nesouhlasí s výsledky předchozích experimentů. Každopádně to může být způsobeno porovnáváním krátkodobých a dlouhodobých efektů. Ostatní emulze neprokazovaly žádný výrazný efekt na tento parametr. Po 24 hodinách nejmenší ztráta vody z kůže byla detekována u Schizophyllanu, zatímco všechny ostatní testované látky se stejně jako placebo pohybovaly kolem hodnot bodu T_0 . V tomto experimentu byl odhalen mírně pozitivní účinek Schizophyllanu na transepidermální ztrátu vody po 24 hodinách. Tato látka byla schopna podporovat bariérovou funkci kůže a výsledek je v souladu s předchozími experimenty [60].

Je zajímavé, že předchozí klinické studie ukázaly, že kosmetické prostředky na bázi polysacharidů podporují snížení transepidermální ztráty vody, čímž chrání funkci kožní bariéry. Zatím v našem experimentu je pozorován spíše opačný trend. Tento jev může souviset

s předchozím ošetřením CAPB. Také minulé studie probíhaly dlouhodobě. V našem experimentu lze pozorovat snížení hodnot po 24 hodinách oproti 2 hodinám, což by mohlo dále pokračovat po následující aplikaci emulze [60][61].

4.3.4 Hydratace



Graf 11 Vliv odličení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na hydrataci kůže. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. Hydratace byla měřena v čase T₀ (před aplikací tenzidu), 15 minut a 24 h po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T₀. * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001

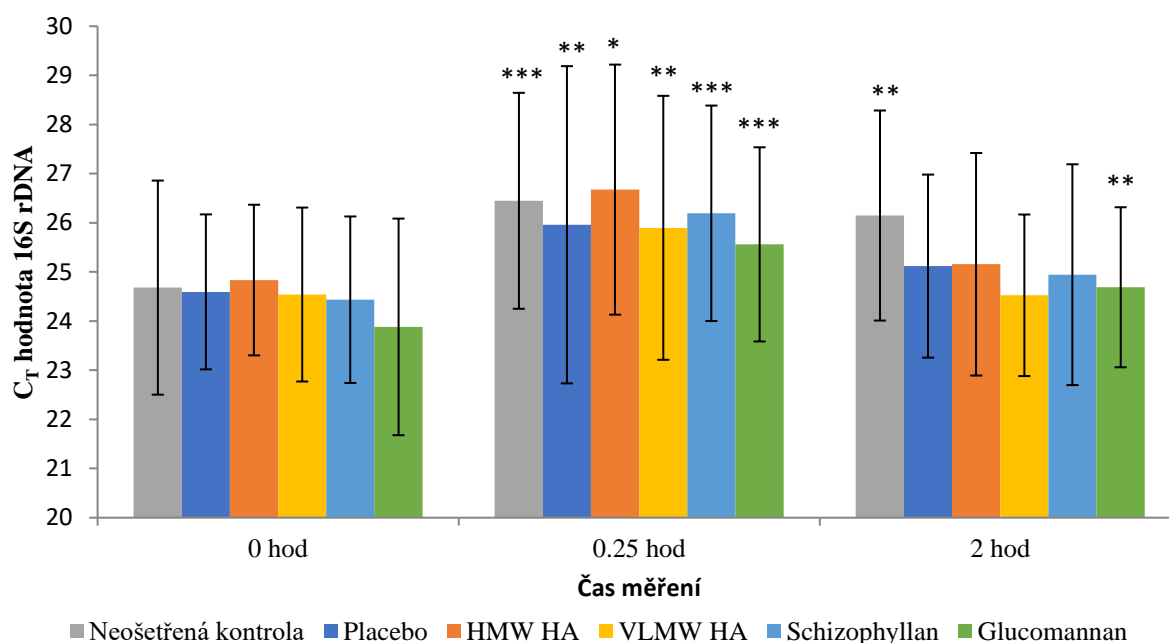
Z grafu 11 je možné vyčíst, že po použití detergentu CAPB se hydratace výrazně nezměnila, stejně jako u předchozí části studie (viz 4.1.4). Navíc všechny testované látky měly téměř stejný účinek jako placebo. Po 24 hodinách u glucomannanu je pozorován významný pokles (p=0,03), zatímco se u ostatních hydratace pohybuje kolem původních hodnot. V minulých experimentech glucomannan taky neukazoval významně hydratační vlastnosti. Z toho experimentů lze usoudit, že aplikace tenzidů a polysacharidů výrazně nemění hydrataci [60].

4.4 Vliv kosmetických polysacharidů na mikrobiom kůže po aplikaci tenzidu

S rostoucí popularitou prebiotik, probiotik, postbiotik, symbiotik a dalších terapií se zkoumají alternativní vliv jiných látek na mikrobiom kůže. Protože účinek použitých kosmetických polysacharidů není dobře prostudován z hlediska jejich efektu na mikrobiom kůže, zkoumali jsme také jejich vliv na růst *P. acnes* a *S. epidermidis* po aplikaci CAPB v *in vivo* podmínkách. V této části byly vybrány jen 4 polysacharidy: HMW HA, VLMW HA, Schizophyllan a

Glucomannan. Pro porovnání byly zařazeny do testů také placebo a neošetřená kontrola (pokožka ošetřená pouze CAPB).

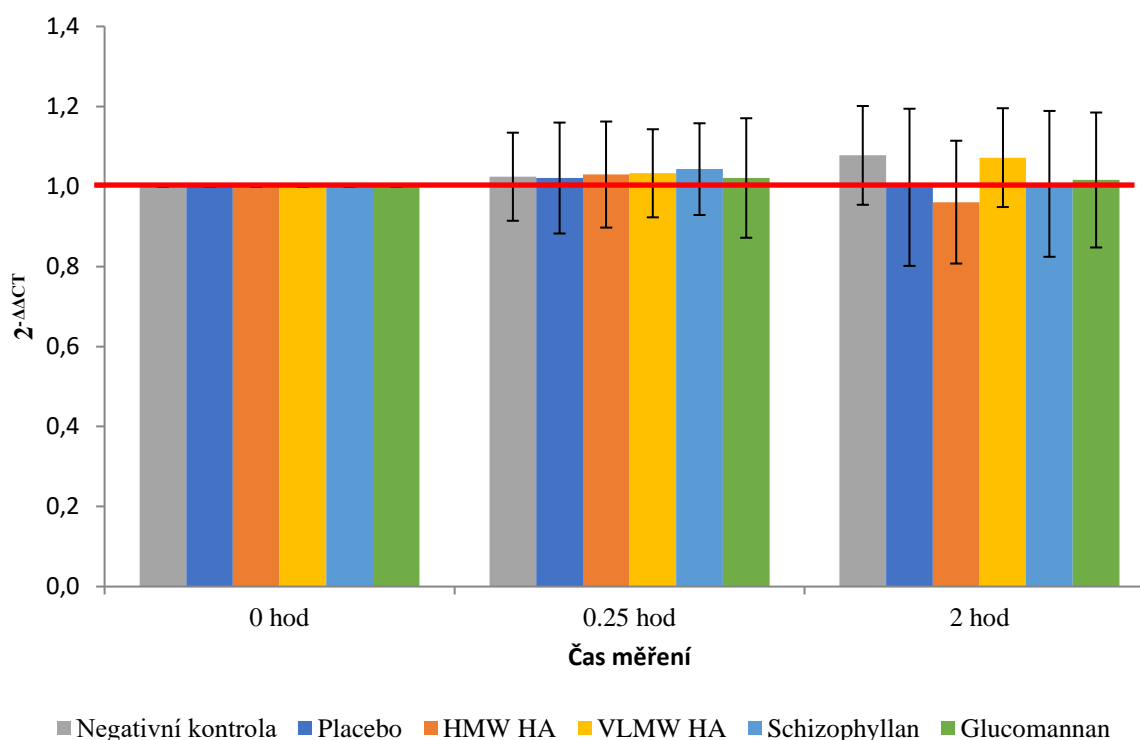
4.4.1 16S rDNA



Graf 12 Vliv odlišení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na C_T hodnotu genu 16S rDNA. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla očištěna kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. Sčítání mikrobiomu probíhal v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut 2 po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Na grafu 12 lze pozorovat, že se C_T hodnoty genu 16S rDNA po aplikaci CAPB významně zvýšily, což potvrdilo úbytek bakterií po aplikaci tenzidu stejně jako v minulém experimentu. Po 2 hodinách je zajímavý pokles hodnot u všech látek kromě neošetřené pokožky. Tento výsledek nám ukazuje, že olejová fáze emulze poskytla dostatečné zdroje pro obnovu bakteriální populace na pokožce. Glucomannan v tuto dobu ukazoval statisticky významné zvýšení CT ($p=0,006$) oproti T_0 .

4.4.2 *Propionibacterium acnes*

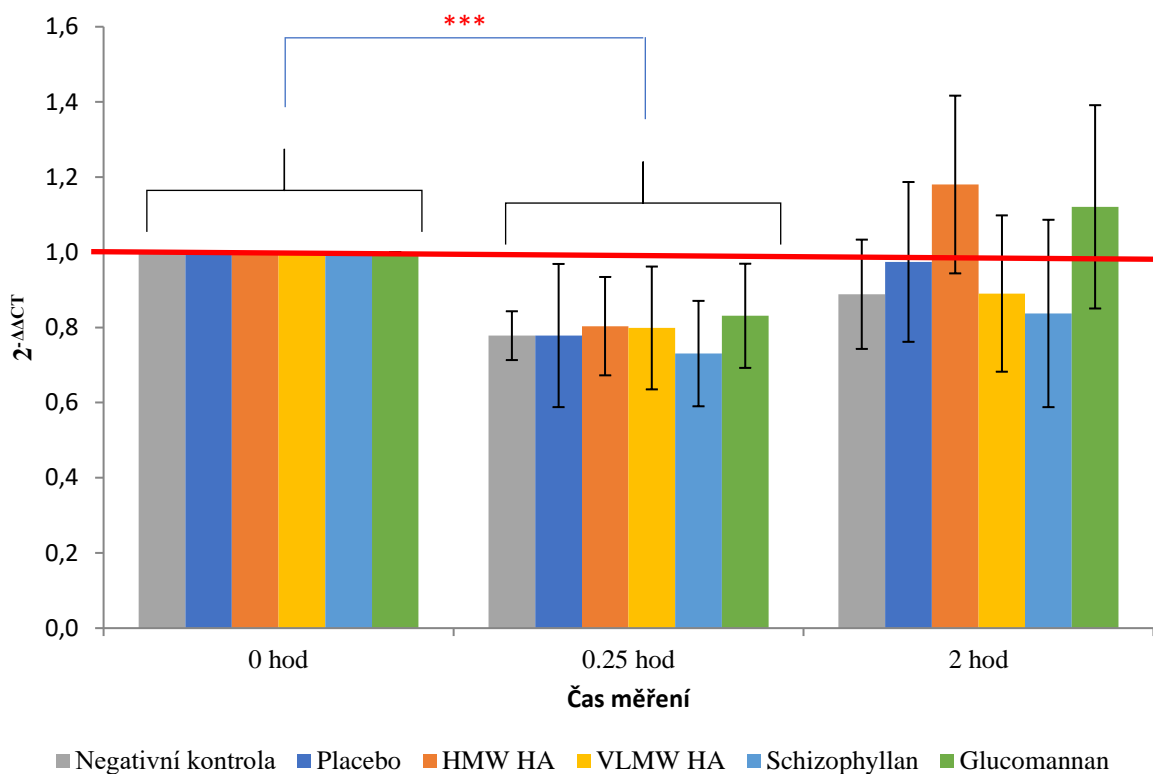


Graf 13 Vliv odlišení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na relativní zastoupení *P. acnes*. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. Stěr mikrobiomu probíhal v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut 2 po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Graf 13 ukazuje, že aplikace CAPB nemá žádný vliv na relativní zastoupení *P. acnes*. Takle tendence je pozorovaná i po 2 hodinách. Toto se nám říká že ani aplikace CAPB ani následná aplikace emulzí s testovanými polysacharidy neovlivnily relativní zastoupení *P. asnes* na pokožce. V předchozích studiích bylo zjištěno, že většící b-1,3-glukany, jako je Schizophyllan, nejsou účinné proti *P.acnes*, což jsme potvrdili v tomhle experimentu [62].

4.4.3 *Staphylococcus epidermidis*

Na grafu 14 je patrný výrazný pokles *S. epidermidis* 15 minut po aplikaci CAPB stejně jako v minulém experimentu (viz 4.2.3). Po 2 hodinách lze pozorovat návrat k původnímu stavu u placebo (97 %), neošetřené kontroly, VLMW HA a schizophyllanu. V tuto dobu HMW HA podpořila nárůst populace *S. epidermidis* o 18 % oproti T_0 . Glucomannan zlepšil relativní zastoupení této bakterie o 12 %. Tento jev koresponduje s faktem, že Glucomannan funguje jako stimulant prospěšné střevní mikroflóry podobně probiotikům (bifidobakterie a laktobacily), má protizánětlivý účinek a podporuje procesy opravy DNA. Proto tento polysacharid může působit jako prebiotikum pro *S. epidermidis* a podporovat jeho nárůst [63].



Graf 14 Vliv odličení a následné aplikace kosmetických polysacharidů na relativní zastoupení *S. epidermidis*. Polovina čela 10 žen (24-40 let) byla otřena kosmetickým tamponem napuštěným 1ml 10 % roztoku CAPB a následně proběhla aplikace emulze s obsahem sledovaných aktivních látek, případně placebo jako negativní kontrola. Sčítání mikrobiomu probíhal v čase T_0 (před aplikací tenzidu), 15 minut 2 po aplikaci emulze. Červená čára ukazuje 100 %, tzn. T_0 . * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

V tomto experimentu lze také pozorovat zajímavý fenomén rozdílného efektu nízko a vysokomolekulární kyseliny hyaluronové. Možným vysvětlením může být fakt, že VLMW HA penetruje lépe do kůže a má tedy menší vliv na vnější mikroorganismy. Naopak HMW LA zůstává na povrchu, kde aktivně interagují s bakteriemi. Proto působí jako prebiotikum. Rozdíl účinku na bakterie kyselinou hyaluronovou s nízkou a vysokou molekulovou hmotností byl také zaznamenán v jiných pracích [64].

5 ZÁVĚR

Výstupem diplomové práce je především posouzení vlivu tenzidů a kosmetických polysacharidů na parametry pleti a její mikrobiom. Součástí práce bylo také vypracování literární rešerše, která se zabývala řešením následujících úkolů: anatomie kůže a její biofyzikální vlastnosti, kožní mikrobiom a jeho funkce, popsání použitých tenzidů a polysacharidů.

V rámci stanovení vlivu tenzidů na parametry kůže byly testovány 3 tenzidy: Dodecyl Sulfat Sodný, Kokamidopropyl betain, Decylglucosid. Pro porovnání byla použita i destilovaná voda. Pro další část experimentální práce bylo vybráno 6 surovin: HMW HA, VLMW HA, CaproylHA, NaCMG, Schizophyllan a Glucomannan. Pro porovnání byly zařazeny do testů také placebo a neošetřená kontrola (pokožka ošetřená pouze CAPB).

Tento experiment ukázal, že tenzidy mají vliv na stav kůže a její mikrobiotu. Z našeho experimentu je patrné, že odlišení výrazně snižují množství lipidů na SC. Na druhou stranu po analýze lze usoudit, že aplikace tenzidů a polysacharidů výrazně nemění hydrataci. V našem experimentu SDS vykazoval nejvýraznější vliv na parametry kůže a největší efekt na snížení celkového množství mikroorganismů hned po aplikaci. Pak bylo pozorováno, že nejmenší vliv na kožní parametry mělo odličování pomocí destilované vody a DG. Destilovaná voda však nevykazovala dobré odmašťující vlastnosti. Bylo potvrzeno, že CAPB má mírný trend v poklesu TEWL a dobře snižuje sebum. Na druhou stranu překvapivě měl horší efekt než SDS na *S.epidermidis*. Proto pro další experimenty jsme vybrali CAPB.

Dále bylo zkoumán vliv polysacharidů na parametry kůže po aplikaci CAPB. Bylo pozorováno, že aplikace krému může obnovit množství lipidů na pokožce a zlepšit texturu kůže po očištění pokožky pomocí CAPB. Taky je zajímavý vliv Schizophyllanu. Tato látka signifikantně snížila sebum na rozdíl od placeba. Na opačné straně byl odhalen mírně pozitivní vliv této látky na TEWL na rozdíl od ostatních polysacharidů, což je v souladu s výsledky předchozích studií. Po analýze C_T hodnoty genu 16S rDNA bylo zjištěno, že olejová fáze emulze poskytla dostatečné zdroje pro obnovu bakteriální populace na pokožce po aplikaci tenzidů. Z experimentů je patrné, že ani aplikace tenzidů ani následná aplikace emulzí s testovanými polysacharidy neovlivnila relativní zastoupení *P. asnes* na pokožce. Zatímco vliv na *S. epidermidis* je moc zajímavý. HMW HA a Glucomann podpořily její narůst po ošetření CAPB, tzn. se projevovaly jako prebiotikum.

Můžeme tedy shrnout, že v této diplomové práci bylo potvrzeno, že odlišení kůže pomocí tenzidů může hodně ovlivnit kožní parametry: výrazně snižuje množství seba a má negativní vliv na TEWL. Přičemž některé z těchto látek mohou snížit relativní zastoupení bakterií a zvláště negativně ovlivnit narůst *S. epidermidis*. Dále je pozorováno, že další aplikace krému může obnovit sebum a má dostatečné zdroje pro obnovu mikrobiomu. Je třeba taky podotknout, že HMW HA a Glucomannan se mohou chovat jako prebiotika pro *S. epidermidis*.

Už z této práce je zřejmé, že polysacharidy mají budoucnost v jejich využití jako prebiotika v kosmetice. Pro další výzkum doporučuji zvolit jiný kosmetický základ a provést zjištění jejich dlouhodobých účinků pro jasnější pochopení vlivu.

6 LITERATURA

- [1]BLAAK, Jürgen a Peter STAIB. The Relation of pH and Skin Cleansing. SURBER, Christian, Christoph ABELS a Howard MAIBACH, ed. PH of the Skin: Issues and Challenges [online]. S. Karger, 2018, 2018-8-21, s. 132-142 [cit. 2020-03-24]. Current Problems in Dermatology. DOI: 10.1159/000489527. ISBN 978-3-318-06384-4. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/489527>
- [2]CHEN, Yiyin Erin a Hensin TSAO. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. Journal of the American Academy of Dermatology [online]. 2013, 69(1), 143-155.e3 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.1016/j.jaad.2013.01.016. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962213000765>
- [3]MCLAFFERTY, Ella, Charles HENDRY a Alistair FARLEY. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. Nursing Standard [online]. 2012, 27(3), 35-42 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299. ISSN 0029-6570. Dostupné z: <http://rcnpublishing.com/doi/abs/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>
- [4]KREJČÍ, Jiří. *Kosmetika a kosmetologie: Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů*. Fakulta technologická UTB ve Zlíně [online]. 2013 [cit. 2019-10-10]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/EntityDisplayTab.aspx?id=19>
- [5]SHAI, Avi, Howard I. MAIBACH a Robert BARAN. *Handbook of Cosmetic Skin Care: (Series in Cosmetic and Laser Therapy) 2nd Edition*. Informa Health Care. CRC Press, 2009. ISBN 9780415467186.
- [6]EGNER, Pavlína. *Kosmetické technologie: Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů*. Fakulta technologická UTB ve Zlíně.
- [7]Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clinics in Dermatology, 30(3), 257–262. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
- [8]Zhai, H., & Maibach, H. I. (2002). Occlusion vs. skin barrier function. Skin Research and Technology, 8(1), 1–6. doi:10.1046/j.0909-752x.2001.10311.x
- [9]STERRY, Wolfram, Ralf PAUS a Walter H. C. BURGDORF. *Dermatology*. New York: Thieme, c2006. ISBN 978-313-1359-117.
- [10]RESL, Vladimír. *Dermatovenerologie: učební texty pro bakalářské studium*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-04566.
- [11]Freudlová, Michaela. *BIOENGINEERING TESTING OF THE HUMAN SKIN AND THE USE OF COSMETIC PRODUCTS: Studium Vybraných Parametru Lidské Kůže V Závislosti Na Aplikaci Kosmetických Prostředku*. Brno, 2008. Master's Thesis. Brno University Of Technology. Vedoucí Práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.
- [12]BAREL, A. O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2009. ISBN 978-1-4200-6963-1.
- [13]FLUHR, Joachim. *Bioengineering of the skin: water and the stratum corneum*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. ISBN 0-8493-1443-7.
- [14]Hong, J. Y., Park, S. J., Seo, S. J., & Park, K. Y. (2020). Oily sensitive skin: A review of management options. Journal of Cosmetic Dermatology. doi:10.1111/jocd.13347

- [15] Kožní maz: Sebum. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2020 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Ko%C5%BEn%C3%AD_maz
- [16] 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. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2016, 30(12), 2038-2047 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1111/jdv.13965. ISSN 09269959. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jdv.13965>
- [17] Songsantiphap C, Asawanonda P. The Correlations between Follicular Fluorescence and Casual Sebum Levels in Subjects with Normal Skin. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2019 Aug;12(8):24-27. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31531168; PMCID: PMC6715127.
- [18] WILHELM, Klaus-P-, Peter ELSNER, Enzo BERARDESCA a Howard I. MAIBACH. *Bioengineering of the skin: Skin Surface Imaging and Analysis*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. ISBN 0-8493-8375-7.
- [19] Zhu, Y. H., Song, S. P., Luo, W., Elias, P. M., & Man, M. Q. (2011). Characterization of Skin Friction Coefficient, and Relationship to Stratum Corneum Hydration in a Normal Chinese Population. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(2), 81–86. doi:10.1159/000321993
- [20] Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*. doi:10.1111/1346-8138.14489
- [21] ADAMCZYK, Katarzyna, Agnieszka A. GARNCARCZYK a Paweł P. ANTONCZAK. The microbiome of the skin. *Dermatology Review*. 2018, 105(2), 285-297. DOI: 10.5114/dr.2018.75584. ISSN 0033-2526. Dostupné také z: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/dr.2018.75584>
- [22] SCHARSCHMIDT, Tiffany C. a Michael A. FISCHBACH. 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. DOI: 10.1016/j.ddmec.2012.12.003. ISSN 17406765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740676513000023>
- [23] Hannigan, G. D., & Grice, E. A. (2013). Microbial Ecology of the Skin in the Era of Metagenomics and Molecular Microbiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(12), a015362–a015362. doi:10.1101/cshperspect.a015362
- [24] JEDLIČKOVÁ, Anna. *Antimikrobiální terapie. 2. rozšířené vydání*. Praha: Maxdorf s.r.o., 2004. 356 s. ISBN 80-85912-63-5.
- [25] GRICE, E. A., H. H. KONG, S. CONLAN, et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* [online]. 2009, 324(5931), 1190-1192 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1126/science.1171700. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1171700>
- [26] ADALSTEINSSON, Jonas A., Shivani KAUSHIK, Sonal MUZUMDAR, Emma GUTTMAN a Jonathan UNGAR. An Update on the Microbiology, Immunology and Genetics of Seborrheic Dermatitis. *Experimental Dermatology* [online]. 2020 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1111/exd.14091. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/exd.14091>

- [27]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* [online]. 2017, 10 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1186/s40413-017-0160-5. ISSN 19394551. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1939455119300286>
- [28]BOUSLIMANI, Amina, Ricardo DA SILVA, Tomasz KOSCIOLEK, et al. The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics. *BMC Biology* [online]. 2019, 17(1) [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1186/s12915-019-0660-6. ISSN 1741-7007. Dostupné z: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-019-0660-6>
- [29]ŠMIDRKAL, J.: Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, 421-427. ISSN 1213-7103.
- [30]ROBINSON, Valerie C., Wilma F. BERGFELD, Donald V. BELSITO, et al. Final Report of the Amended Safety Assessment of Sodium Laureth Sulfate and Related Salts of Sulfated Ethoxylated Alcohols. *International Journal of Toxicology* [online]. 2010, 29(4_suppl), 151S-161S [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1177/1091581810373151. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581810373151>
- [31]Boozalis, E., & Patel, S. (2018). Allergen of the Year alkyl glucoside is an ingredient in top-selling sunscreens and facial moisturizers. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(4), 809–810. doi:10.1016/j.jaad.2017.10.013
- [32]FIUME, Monice M., Bart HELDRETH, Wilma F. BERGFELD, et al. Safety Assessment of Decyl Glucoside and Other Alkyl Glucosides as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology* [online]. 2013, 32(5_suppl), 22S-48S [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1177/1091581813497764. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581813497764>
- [33]Final Report on the Safety Assessment of Cocamidopropyl Betaine. *Journal of the American College of Toxicology* [online]. 2016, 10(1), 33-52 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.3109/10915819109078621. ISSN 0730-0913. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3109/10915819109078621>
- [34]BECKER, Lillian C., Wilma F. BERGFELD, Donald V. BELSITO, et al. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. *International Journal of Toxicology* [online]. 2016, 28(4_suppl), 5-67 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1177/1091581809337738. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581809337738>
- [35]HE, Jing, Hao HUANG, Xiaopeng ZOU, Yang WANG, Guocheng DU a Zhen KANG. Construction of saturated odd- and even-numbered hyaluronan oligosaccharide building block library. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 231 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115700. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861719313682>
- [36]SLEVIN, Mark, Shant KUMAR a John GAFFNEY. Angiogenní oligosacharidy hyaluronanu indukují mnohočetné signální dráhy ovlivňující mitogenní a hojivé reakce na cévní endoteliální buňky. *Žurnál biologické chemie* [online]. 2002, 277 (43), 41046-

- 41059 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1074 / jbc.M109443200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109443200>
- [37]NEŠPOROVÁ, Kristina, Jana ŠÓGORKOVÁ, Daniela ŠMEJKALOVÁ, Jaromír KULHÁNEK, Gloria HUERTA-ANGELES, Lukáš KUBALA a Vladimír VELEBNÝ. Influence of serum albumin on intracellular delivery of drug-loaded hyaluronan polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, 511(1), 638-647 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.057. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316307074>
- [38]Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., & Osada, M. (2017). Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in Brief*, 15, 382–388. doi:10.1016/j.dib.2017.09.067
- [39]Jamshidian, H., Shojaosadati, S. A., Vilaplana, F., Mousavi, S. M., & Soudi, M. R. (2016). Characterization and optimization of schizophyllan production from date syrup. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 484–493. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.059
- [40]KUBALA, Lukas, Jana RUZICKOVA, Kristina NICKOVA, Jozef SANDULA, Milan CIZ a Antonin LOJEK. The effect of (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. *Carbohydrate Research* [online]. 2003, 338(24), 2835-2840 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/j.carres.2003.09.007. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621503004609>
- [41]Ruszova, E., Pavek, S., Hajkova, V., Jandova, S., Velebny, V., Papezikova, I., & Kubala, L. (2008). Photoprotective effects of glucomannan isolated from *Candida utilis*. *Carbohydrate Research*, 343(3), 501–511. doi:10.1016/j.carres.2007.11.010
- [42]VILJOEN, Gerrit J., L. H. NEL a J. R. CROWTHER. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Dordrecht: Springer, c2005. ISBN 978-1-4020-3403-9.
- [43]TAJADINI, Mohamadhasan, Mojtaba PANJEHPOUR a ShaghayeghHaghjooy JAVANMARD. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research* [online]. 2014, 3(1) [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.4103/2277-9175.127998. ISSN 2277-9175. Dostupné z: <http://www.advbiores.net/text.asp?2014/3/1/85/127998>
- [44]Real-time PCR handbook: Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2020-03-31]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019861-Update-qPCR-Handbook-branding-Americas-FHR.pdf>
- [45]BUSTIN, Stephen A. *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla, CA: International University Line, 2004. ISBN 978-0963681782.
- [46]One-Step vs. Two-Step RT-qPCR. In: ThermoFisher Scientific: *Molecular Biology Resource Library* [online]. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html

- [47]PCR Setup—Six Critical Components to Consider: Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2020-04-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>
- [48]Yamada, T., Eishi, Y., Ikeda, S., Ishige, I., Suzuki, T., Takemura, T., Koike, M. (2002). In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. *The Journal of Pathology*, 198(4), 541–547. doi:10.1002/path.1243
- [49]Ikeda, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Ishibashi, K., & Kikuchi, K. (2004). PCR-based identification of *Staphylococcus epidermidis* targeting *gseA* encoding the glutamic-acid-specific protease. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(7), 493–498. doi:10.1139/w04-055
- [50]Nadkarni, M. A., Hunter, N., Jacques, N. A., & Martin, F. E. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257–266. doi:10.1099/00221287-148-1-257
- [51]Weinhammer, A. P., Scheman, A., & Reeder, M. J. (2019). Prevalence of Surfactant in the Contact Allergen Management Program. *Dermatitis*, 30(6), 358–362. doi:10.1097/der.0000000000000511
- [52]Ananthapadmanabhan, K. P., Moore, D. J., Subramanyan, K., Misra, M., & Meyer, F. (2004). Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatologic Therapy*, 17(s1), 16–25. doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04s1002.x
- [53]Soltanipoor, M., Stilla, T., Riethmüller, C., Thyssen, J. P., Sluiter, J. K., Rustemeyer, T., Angelova-Fischer, I. (2018). Specific barrier response profiles after experimentally induced skin irritation in vivo. *Contact Dermatitis*, 79(2), 59–66. doi:10.1111/cod.12981
- [54]1-Propanaminium, 3-amino-N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-, N-coco acyl derivs., hydroxides, inner salts: Endpoint summary. ECHA: The European Chemicals Agency [online]. [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/25362/7/4/1>
- [55]Atrux-Tallau, N., Romagny, C., Padois, K., Denis, A., Haftek, M., Falson, F., ... Maibach, H. I. (2009). Effects of glycerol on human skin damaged by acute sodium lauryl sulphate treatment. *Archives of Dermatological Research*, 302(6), 435–441. doi:10.1007/s00403-009-1021-z
- [56]Atrux-Tallau, N., Romagny, C., Padois, K., Denis, A., Haftek, M., Falson, F., ... Maibach, H. I. (2009). Effects of glycerol on human skin damaged by acute sodium lauryl sulphate treatment. *Archives of Dermatological Research*, 302(6), 435–441. doi:10.1007/s00403-009-1021-z
- [57]Xu, H., & Li, H. (2019). Acne, the Skin Microbiome, and Antibiotic Treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*. doi:10.1007/s40257-018-00417-3

- [58]Eady, E. A., Layton, A. M., & Cove, J. H. (2013). A Honey Trap for the Treatment of Acne: Manipulating the Follicular Microenvironment to Control *Propionibacterium acnes*. *BioMed Research International*, 2013, 1–8. doi:10.1155/2013/679680
- [59]Claudel, J.-P., Auffret, N., Leccia, M.-T., Poli, F., Corvec, S., & Dréno, B. (2019). *Staphylococcus epidermidis*: A Potential New Player in the Physiopathology of Acne? *Dermatology*, 1–8. doi:10.1159/000499858
- [60]ANTI AGEING BROCHURE: CONTIRPO [online]. 2019 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z : <https://www.contipro.com/images/downloads/ANTI-AGEING-BROCHURE 2019.pdf>
- [61]Maia Campos, P. M. B. G., de Melo, M. O., & de Camargo Junior, F. B. (2014). Effects of Polysaccharide-Based Formulations on Human Skin. *Polysaccharides*, 1–18. doi:10.1007/978-3-319-03751-6_64-1
- [62]MORIKAWA, K., TAKEDA, R., YAMAZAKI, M. a MIZUNO, D. Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear b- 1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. *Cancer research*: 45. April 1985, 1496-1501.
- [63]Behera, S. S., a Ray, R. C. (2016). Konjac glucomannan, a promising polysaccharide of *Amorphophallus konjac* K. Koch in health care. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 942–956. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.098
- [64]Pirnazar, P., Wolinsky, L., Nachnani, S., Haake, S., Pilloni, A., a Bernard, G. W. (1999). Bacteriostatic Effects of Hyaluronic Acid. *Journal of Periodontology*, 70(4), 370–374. doi:10.1902/jop.1999.70.4.370

7 ZKRATKY

AMP – antimikrobiálních peptidů

CAPB – Cocamidopropyl betaine

CaproylHA – Sodium Caproyl Hyaluronate

CIR – The Cosmetic Ingredient Review Expert Panel

ddH₂O – double-distilled water

DG – Decylglucoside

dNTP – deoxynukleosid trifosfáty

dsDNA – dvouvláknová DNA

FFA – volné mastné kyseliny

gDNA – genomická DNA

HMW HA – High Molecular Weight Hyaluronic Acid

INCI – International Nomenclature of Cosmetic Ingredients

NaCMG – Sodium Carboxymethyl β -Glucan

NMF – natural moisturizing factor

P. acnes – *Propionibacterium acnes*

PAL – povrchově aktivní látky

qRT-PCR – Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

rDNA – ribozomální DNA

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

SC – *Stratum corneum*

SDS – Sodium lauryl sulfate

SLES – laurethsulfát sodný

ssDNA – jednořetězové DNA

TEWL – transepidermální ztráta vody

T_m – teplota tání

VLMW HA – Very Low Molecular Weight Hyaluronic Acid

8 PŘÍLOHA

Tabulka 6 Přehled navážek pro přípravu placebo.

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	25,03
	Glyceryl stearate citrate	5	5,06
	Cetylalkohol	2	2,01
B – vodná	Water	67,2	67,2
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200 µl

Tabulka 7 Přehled navážek pro přípravu emulze s HMW HA.

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	25,16
	Glyceryl stearate citrate	5	4,99
	Cetylalkohol	2	2
B – vodná	Water	67,1	10+57,1
	HA (kosmet.)	0,1	0,1054
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200 µl

Tabulka 8 Přehled navážek pro přípravu emulze s NaCMG.

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	24,98
	Glyceryl stearate citrate	5	5,09
	Cetylalkohol	2	2
B – vodná	Water	67,1	10+57,1
	NaCMG	0,1	0,1028
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200 µl

Tabulka 9 Přehled navážek pro přípravu emulze se Schizophyllanem.

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	25,16
	Glyceryl stearate citrate	5	5,03
	Cetylalkohol	2	2,01
B – vodná	Water	67,1	10+57,1
	Schizophyllan	0,1	0,1052
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200 µl

Tabulka 10 Přehled navážek pro přípravu emulze s LMW HA

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	25,1
	Glyceryl stearate citrate	5	4,99
	Cetylalkohol	2	2,01
B – vodná	Water	67,1	10+57,1
	Oligohyaferre	0,1	0,1023
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200 ul

Tabulka 11 Přehled navážek pro přípravu emulze s CaproylHA.

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	25,21
	Glyceryl stearate citrate	5	5,02
	Cetylalkohol	2	2,03
B – vodná	Water	67,1	10+57,15
	Tenneliderm	0,1	0,1009
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200ul

Tabulka 12 Přehled navážek pro přípravu emulze s Glucomannanem.

Fáze	Obchodní název	100 g	navážka
A-olejová	Triglyceride	25	25,04
	Glyceryl stearate citrate	5	5,01
	Cetylalkohol	2	1,99
B – vodná	Water	67,1	10+57,1
	Tanactine	0,1	0,1015
C – konzervant	Benzylalcohol-DHA	0,8	0,8
D-úprava pH	10 % hydroxid sodný	Množství pro úpravu pH	200 µl