

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

PROPIONIBACTERIUM ACNES

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Karásková**
Osobní číslo: **C17170**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: ***Propionibacterium acnes***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Charakterizujte rod *Propionibacterium* a poté se zaměřte na *Propionibacterium acnes*.
2. Popište výskyt *Propionibacterium acnes*.
3. Specifikujte patogenitu *Propionibacterium acnes* a onemocnění, která způsobuje.
4. Nastíňte možnosti léčby onemocnění způsobených *Propionibacterium acnes*.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem *Propionibacterium acnes* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.7.2021

Tereza Karásková v.r.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Květě Koryčanové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, trpělivost a cenné rady při vypracování práce.

ANOTACE

KARÁSKOVÁ, T. *Propionibacterium acnes*. Pardubice, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko – technologická. Vedoucí práce: Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.

Bakalářská práce se zabývá charakteristikou a onemocněními způsobenými bakterií *Propionibacterium acnes*. Popisuje i základní charakteristiku rodu *Propionibacterium*, jejich metabolismus a produkci významných látek včetně vitamínu B₁₂ a kyseliny propionové. Důraz je kladen i na léčbu onemocnění vzniklým z důvodu působení této bakterie na lidský organismus. V neposlední řadě je zde uvedena i tvorba biofilmu a jeho význam.

KLÍČOVÁ SLOVA

Propionibacterium acnes, kyselina propionová, vitamin B₁₂, *acne vulgaris*, biofilm, antibiotika, rezistence, chronické onemocnění, bakteriofágy

TITLE

Propionibacterium acnes

ABSTRACT

The bachelor thesis is focuses on the characteristics and diseases caused by *Propionibacterium acnes*. It also describes the basic characteristics of the genus *Propionibacterium*, their metabolism and production of other substances including vitamin B₁₂ and propionic acid. The emphasis is also placed on treatment of diseases caused by this bacteria on the human body. Last but not least, present the biofilm formation and its importance.

KEY WORDS

Propionibacterium acnes, propionic acid, vitamin B₁₂, *acne vulgaris*, biofilm, antibiotics, resistance, chronic diseases, bacteriophages

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
POUŽITÉ ZKRATKY	10
ÚVOD	12
1 Charakteristika rodu <i>Propionibacterium</i>	13
1.1. Základní charakteristika	13
1.2. Skupiny rodu <i>Propionibacterium</i>	13
1.3. Biosyntéza kyseliny propionové.....	14
1.3.1. Vlastnosti a využití PA.....	14
1.3.2. Proces biosyntézy PA	15
1.4. Biosyntéza vitamínu B ₁₂	16
1.4.1. Vlastnosti a účinek vitamínu B ₁₂	16
1.4.2. Průmyslová výroba vitamínu B ₁₂	16
1.4.3. Proces biosyntézy vitamínu B ₁₂	17
1.5. Kultivace.....	18
2 <i>Propionibacterium acnes</i>.....	20
2.1. Historie	20
2.2. Charakteristika.....	20
2.3. Genom	20
3 Onemocnění.....	21
3.1. <i>Acne vulgaris</i>	21
3.1.1. Kožní mikrobiom.....	21
3.1.2. Mechanismus tvorby <i>acne vulgaris</i>	21
3.1.3. Laboratorní diagnostika pomocí MALDI TOF MS	23
3.2. Infekční endokarditida.....	25
3.3. Sarkoidóza	27
3.4. Další onemocnění spjatá s přítomností <i>Propionibacterim acnes</i>	28

3.4.1.	Osteomyelitida.....	28
3.4.2.	Souvislost bakterie <i>Propionibacterium acnes</i> s rakovinou prostaty	28
4	Tvorba biofilmu	30
4.1.	Historie	30
4.2.	Proces vytváření biofilmu.....	30
4.3.	Struktura	32
4.4.	Patogenita biofilmu	33
4.5.	Studie bakteriální kolonizace <i>Propionibacterium acnes</i> na kardiostimulátorech in vitro	33
4.6.	Antibiotická léčba.....	34
4.7.	Vyhodnocení přítomnosti biofilmu	35
4.7.1.	Metoda tkáňové kultury (TPC).....	35
4.7.2.	Metoda trubice.....	35
4.7.3.	Metoda červeného agaru (CRA).....	35
5	Léčba.....	36
5.1.	Léčba antibiotiky	36
5.1.1.	Rezistence na antibiotika.....	36
5.2.	Lokální antimikrobiální látky	37
5.2.1.	Kyselina azelaová.....	37
5.2.2.	Benzoylperoxid.....	38
5.3.	Systémové antimikrobiální látky	39
5.3.1.	Isotretionin.....	39
5.4.	Fyzikální terapie modrým světlem a jiné zdroje světelné terapie	40
5.5.	Bakteriofágová léčba	41
5.5.1.	Bakteriofágy bakterie <i>Propionibacterium acnes</i>	42
ZÁVĚR	44
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka 1. Zbarvení kolonií <i>Propionibacterium</i> na médiu s kvasničným extraktem	18
Obrázek 1. Dílčí cesty biosyntézy vitamínu B ₁₂	18
Obrázek 2. Schéma lidské kůže	23
Obrázek 3. Schéma vyšetření pomocí MALDI – TOF MS	24
Obrázek 4. Mechanismu adheze <i>P. acnes</i> na povrch poškozené srdeční chlopně	26
Obrázek 5. Schéma procesu tvorby biofilmu	31
Obrázek 6. Biofilm <i>Propionibacterium acnes</i>	32
Obrázek 7. Zobrazení mrtvých a živých buněk ve struktuře biofilmu	34
Obrázek 8. Strukturní vzorec kyseliny azelaové	38
Obrázek 9. Strukturní vzorec benzoylperoxidu	39
Obrázek 10. Strukturní vzorec isotretioninu	40

POUŽITÉ ZKRATKY

μg	mikrogram
μm	mikrometr
ALA	5-aminolevulová kyselina
APC	buňky prezentující antigen
ATB	antibiotikum
AzA	kyselina azelaová
BHI	brain-heart-infusion bujón
BPO	benzoylperoxid
C+G	cytosol + guanin baze
CFU	kolonie tvořící jednotky
CLSM	laserová rastrovací konfokální mikroskopie
CoA	koenzym A
CRA	metoda červeného agaru
CRP	C reaktivní protein
DDD	doporučená denní dávka
DMBI	5,6-dimethylbenzimidazol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
ERM	erytromycin-ribosom methyláza
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GAM	Gif anaerobní medium
IE	infekční endokarditida
IL	interleukin
kDa	kilodalton
Mb	megabaze
ml	mililitr
MLST	multilokusová sekvenční typizace
mm	milimetr
MSCRAMMS	mikrobiální adhezivní složky rozpoznávající molekuly adhezivní matrice

NF- κ B	nukleární faktor kappa B
nm	nanometr
PA	propionová kyselina
PAB	bakterie produkující kyselinu propionovou
PBG	porfobilinogen
PBS	fosfátový pufr
PDT	fotodynamická terapie
PDT	fotodynamická terapie
PEG – AzA	monoester pegylované kyseliny azelaové
PFU	plakotvorná jednotka
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
TNF	tumor nekrotizující faktor
TPC	metoda tkáňové kultury
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

ÚVOD

Bakterie rodu *Propionibacterium* získaly své pojmenování podle schopnosti produkce kyseliny propionové jako vedlejšího produktu svého metabolismu. *Propionibacterium acnes* patří mezi běžné komenzály lidské pokožky, sliznic a trávicího traktu. Při narušení rovnováhy kožního mikrobiomu však tato bakterie může působit jako silný patogen vyvolávající tvorbu zánětlivého kožního onemocnění – *acne vulgaris*. *Propionibacterium acnes* je rovněž bakterií tvořící biofilmy komplikující léčbu akné a vyvolávající infekce různých protetických materiálů. Podle vědeckých studií je tato bakterie přispívajícím faktorem rozvoje prostatické rakoviny.

Hlavním cílem bakalářské práce je soustředit se na onemocnění vyvolané bakterií *Propionibacterium acnes* a možnosti jejich léčby.

1 Charakteristika rodu *Propionibacterium*

1.1. Základní charakteristika

Bakterie rodu *Propionibacterium* byly prvně izolovány a popsány v polovině dvacátého století Eduardem von Freudenreichem, Orla-Jensenovou a van Nieleem, kteří tyto bakterie klasifikovali do třídy *Acinobacteria*, řád *Aktinomycetales* a čeledi *Propionibacteriaceae*.

Propionibacterium jsou grampozitivní, nesporeující pleomorfni tyčinky, produkující katalázu. Jejich délka je 1–5 μm . Tato skupina bakterií má vysoký podíl G+C bází, většinou pohybuje se v rozmezí 65–67 % v závislosti na druhu. Z hlediska metabolismu se jedná o aerotolerantní anaerobní až fakultativně anaerobní bakterie. Většina *Propionibacterium* jsou mesofilními bakteriemi, optimální podmínkami pro jejich růst je teplota 30 °C a neutrální pH. Nejsou odolné vůči vysokým či nízkým teplotám, vysoké koncentraci NaCl, kyselému pH a aktivitě vody.

Bakterie produkující kyselinu propionovou jsou obvykle menší velikosti, buňky mají tvar připomínající spíše koky či písmen V a Y (Gautier, 1999).

1.2. Skupiny rodu *Propionibacterium*

Bakterie rodu *Propionibacterium* má dvě hlavní skupiny: **kožní** a **klasické** (někdy uváděné jako mléčné). **Kožní** *Propionibacterium* jsou považovány za primární lidské patogeny. Vyskytují se na lidské kůži, na sliznici dutiny ústní a sliznici gastrointestinálního traktu. Na rozdíl od klasických propionibakterií jsou schopné produkovat indol a zkapalňovat želatinu. Jedná se o druhy *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum* a *P. propionicum*.

Druhá skupina zahrnuje **klasické** *Propionibacterium*, které mají své využití především v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Tato skupina se dále rozděluje na dva poddruhy. Do první podskupiny řadíme druhy *P. acidopropionici*, *P. jensenii* a *P. thoneii*. Druhá zahrnuje druh *P. freudenreichii* se svými dvěma poddruhy – *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* se schopností redukovat nitráty a *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, která má schopnost fermentace laktózy díky přítomnosti enzymu β -D-galaktosidázy.

Všechny bakterie rodu *Propionibacterium* řazené do skupiny klasických, mají schopnost fermentace a jsou schopné produkce spousty významných metabolitů. Příkladem je produkce vitamínu H a skupiny B – B₁₂, B₉, kyseliny propionové, či trehalózy. Bakterií produkujících kyselinu propionovou (označovány jako PAB) se využívá při výrobě sýrů a zavařenin, kde

se tato látka uplatňuje jako konzervant chránící produkty před napadením plísněmi či kvasinkami. Konzervace vzniká v důsledku fermentace laktátu na propionovou a octovou kyselinu. Další využití nacházejí jako přísady krmiv hospodářských zvířat, kde plní funkci probiotik, pomáhají vstřebávání železa a vápníků díky produkci vitamínu B₁₂ a též plní funkci konzervantu krmiva. Díky jejich přísadám do krmiv mladých zvířat dochází k jejich rychlejšímu růstu.

PAB stimuluje růst bakterií rodu *Bifidobacterium* v zažívacím traktu, chrání organismus před působením patogenních mikroorganismů a mykotoxinů. Též stimuluje imunitní systém a snižují mutagenní účinky fekálních enzymů. Zajímavostí je apoptické působení bakterie *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii* na rakovinou tvorné buňky v tlustém střevě v důsledku produkce octové a propionové kyseliny (Cousin, 2016).

Do rodu *Propionibacterium* řadíme i nový druh *P. cyclohexanicum*. Nejedná se sice o bakterii vyskytující se v mléčných výrobcích, jelikož byla izolována ze zkažené pomerančové šťávy, ale z výsledků rRNA sekvence se potvrdilo, že má návaznost na *P. freudenreichii* (Gautier, 1999).

1.3. Biosyntéza kyseliny propionové

1.3.1. Vlastnosti a využití PA

Kyselina propionová (C₂H₅COOH) je důležitý meziproduct chemických reakcí. Především se využívá jako konzervační látka (E280), jelikož inhibuje růst kvasinek a plísní. Až 80 % syntetizované PA se využívá při konzervaci potravin a krmiv pro zvířata. Své využití taktéž nachází při syntéze celulósových vláken, herbicidů, parfémů a léčiv.

Jedná se o organickou kyselinu řadící se do skupiny karboxylových kyselin. Kyselina propionová je bezbarvá, při pokojové teplotě ve vodě rozpustná látka s charakteristickým štiplavým zápachem. V současné době se pro výrobu propionové kyseliny používají petrochemické procesy s využitím hydrokarboxylace ethylenu. V poslední době však dochází k nedostatku zdrojů a značnému znečištění životního prostředí těmito procesy, proto svoji pozornost dostávají metody získávání kyseliny propionové z obnovitelných zdrojů (Piwowarek, 2018; Ahmady, 2017).

1.3.2. Proces biosyntézy PA

V současnosti jsou známy tři procesy biosyntézy PA. První z nich **využívá bakterií** *Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola* a *Megasphaera elsdenii*. V první fázi je pyruvát cestou glykolýzy přeměněn na laktát pomocí enzymu L-laktát dehydrogenáza. Následně je generován laktoyl-CoA v přítomnosti protionát-CoA transferázy a následně přeměněn na akryloyl-CoA dehydrogenázovou aktivitou. V konečném kroku je akryloyl-CoA redukován na propionyl-CoA. Tento způsob je však neúčinný, jelikož sloučenina akryloyl-CoA se jeví jako toxická pro bakteriální buňky.

Druhým způsobem získávání PA biosyntézou je **fermentace propandiolu**. Některé bakterie jsou schopny z laktátu, deoxyacetonu a deoxy cukrů (ramnóza, fukóza) syntetizovat 1,2-propandiol. Jedná se především o bakterie rodu *Lactobacillus* nebo bakterii *Salmonella enterica*. Výtěžky PA závisí na použití výchozí sloučeniny. Největší výtěžnost vykazuje použití deoxy cukrů jako zdroje uhlíku, avšak dominantním produktem této cesty biosyntézy je kyselina octová.

Třetí možností, kterou využívají i bakterie rodu *Propionibacterium*, je **Wood – Werkmanova cesta** biosyntézy PA. Jedná se o nevhodnější cestu biosyntézy PA. Kromě bakterií rodu *Propionibacterium* tuto cestu vykazují bakterie *Veilonella alcalescens* a *Selenomonas ruminantium*. *Propionibacterium* využívají celou řadu zdrojů uhlíku, nejčastěji glukózu, pyruvát, kyselinu mléčnou či xylózu. Tvorba kyseliny propionové je doprovázena tvorbou acetátu. Výhodou je, že tímto procesem nedochází k syntéze žádných meziproductů, které by měly na bakterie toxický vliv. Menším problémem může být okyselení prostředí v důsledku produkce kyselin, čímž dochází k inhibici růstu bakterií a snižování výtěžnosti PA. Tento problém se však řeší neutralizací prostředí. Maximální teoretické výtěžky jsou 54,8 hmotnostních % kyseliny propionové (Ahmady, 2017).

Zahajovacím krokem je reakce pyruvátu, vzniklého glykolýzou, na oxalacetát, z kterého katalyzovanou reakcí enzymem methylmalonyl-CoA karboxytransferáza vzniká malát. Dalšími enzymaticky katalyzovanými reakcemi vznikají fumarát a následně sukcinát, sukcinyl-CoA, z kterého vzniká výchozí sloučenina Wood – Werkmanova cyklu – methylmalonyl-CoA. Cestou Wood – Werkmanova cyklu vzniká propionyl-CoA, z kterého je následně za působení enzymu CoA-transferáza uvolněn CoA, čímž vzniká propionát – tedy kyselina propionová (Piwowarek, 2018).

1.4. Biosyntéza vitamínu B₁₂

1.4.1. Vlastnosti a účinek vitamínu B₁₂

Vitamin B₁₂ (*kyanokobalamin*) je důležitý pro krvetvorbu, růst organismu a správnou funkci nervové soustavy. Účastní se metabolismu sacharidů a lipidů a podporuje imunitní systém. Jeho nedostatek se projevuje psychickými obtížemi, anémií, slabostí a celkovou únavou. Doporučená denní dávka (DDD) pro dospělého člověka činí 2,4 μg bez rozdílu na pohlaví (jedná se o jedince ≥14 let). V graviditě a při kojení jsou DDD vyšší, a to 2,6 – 2,8 μg (Čermáková, 2005).

Vitamin B₁₂ spadá do skupiny látek s kobalaminovou skupinou, které se dělí na 4 formy podle toho, jakou skupinou je kobalt nahrazen: může se jednat o CN–skupinu (kyanokobalaminy), OH–skupinu (hydroxokobalaminy), CH–skupinu (methylkobalaminy) a deoxy–adenosylcobalaminy s deoxyadenosyl jednotkou (Piwowarek, 2018; Burgess, 2009).

Kobalaminová molekula je složena z tetrapyrrolového jádra, které je vytvořeno spojením podjednotky A a D v alfa poloze. Centrální uhlík obsahuje vyšší a nižší ligand, kterými mohou být například adenosin či 5,6-dimethylbenzimidazol (DMBI), který je odpovědný za terapeutické účinky vitamínu B₁₂.

Některé bakterie a archea jsou schopné produkovat tzv. pseudovitamin B₁₂. Jedná se o sloučeninu, která místo DMBI v dolní poloze na centrálním uhlíku makrocyclické sloučeniny obsahuje jiný substituent, například adenosin. Jelikož tato sloučenina neobsahuje již zmíněný DMBI, nemá na lidský organismus terapeutický účinek. Bakterie rodu *Propionibacterium* mají schopnost aerobní cestou přeměňovat neaktivní pseudovitamin na aktivní formu vitamínu B₁₂ (Piwowarek, 2018).

1.4.2. Průmyslová výroba vitamínu B₁₂

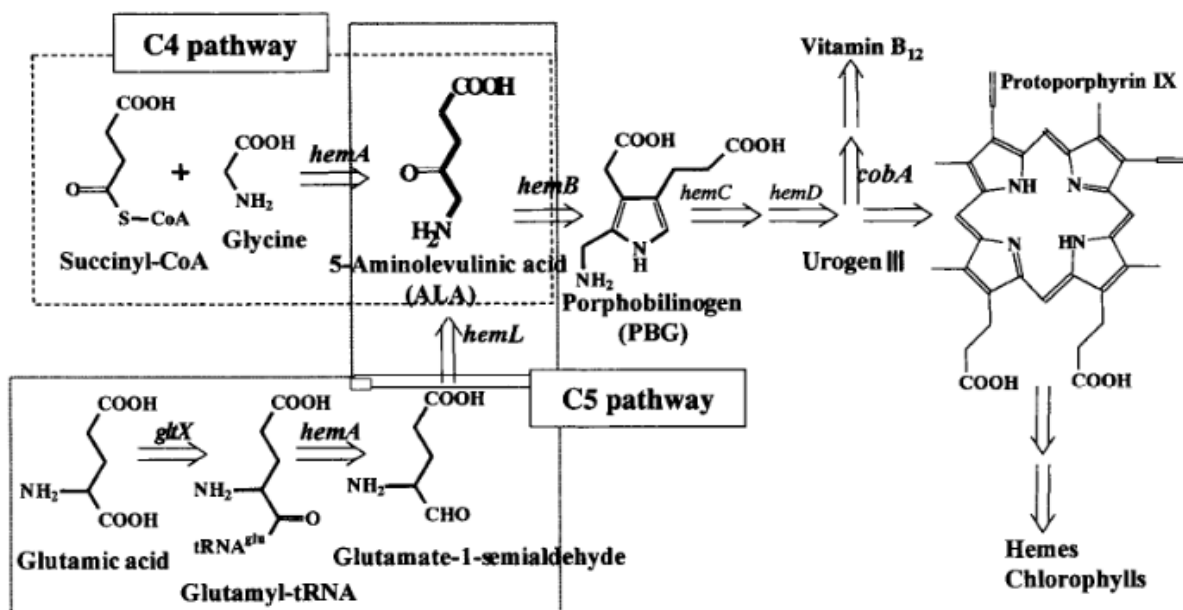
Dříve byl komerční vitamin B₁₂ chemicky syntetizován, avšak od tohoto způsobu výroby se upustilo kvůli své náročnosti (proces vyžaduje až sedmdesát kroků) a vysokým nákladům na výchozí látky. Chemická syntéza byla nahrazena biosyntézou s využitím anaerobních bakterií, především *Propionibacterium freudenreichii* a *Pseudomonas denitrificans*. Větší výnosnost má *Pseudomonas denitrificans*, proto je využívána častěji (až ze 2/3), avšak finanční nároky na výrobní proces jsou u obou druhů bakterií stejné (Gautier, 1999).

1.4.3. Proces biosyntézy vitamínu B₁₂

K biosyntéze vitamínu B₁₂ u bakterií dochází dvěma mechanismy – **aerobní** a **anaerobní cestou**. Aerobní cesta vyžaduje přítomnost kyslíku, jelikož bakterie obsahují COB geny sloužící k produkci enzymů závislých na kyslíku. Naopak bakterie s anaerobní cestou produkce mají CBI geny, které kódují enzymy na kyslíku nezávislých. Bakterie rodu *Propionibacterium* využívají oba mechanismy, mají tedy ve své genetické výbavě COB i CBI geny. K produkci enzymů dochází v plazmidech bakterií (Piwowarek, 2018; Burgess, 2009).

Prekurzorem syntézy vitamínu B₁₂ je kyselina 5-aminolevulová (dále jen ALA), která je syntetizována dvěma dílčími cestami – C4 a C5. C4 cestou vzniká ALA kondenzací glycinu a sukcinátu (sukcinyl-Co-A) katalyzovanou enzymem aminolevulát-syntházou. Anaerobní bakterie, včetně *Propionibacterií*, využívají C5 cestu, kdy je ALA produkována z glutamátu sledem několika reakcí. Glutamát je přidán k tRNA za působení enzymu glutamyl-tRNAglu-syntetáza. Tato enzymatická reakce vyžaduje dodání energie ve formě jedné molekuly ATP. Následuje redukce tRNA na GLU-1-semialdehyd a následně katalytická reakce této sloučeniny enzymem GLU-1-semiandehydaminotransferáza na 5-ALA. Následuje transformace osmi molekul ALA na porfobilinogen (PBG) za pomoci enzymu PBG-syntázy. Polymerizací čtyř molekul PBG vzniká preuroporfyirinogen a z něho inverzí a cyklizací biologicky aktivní uroporfyirinogen III (urogen III). Reakce jsou katalyzovány enzymy hemB, hemC, hemD. K následujícím krokům biosyntézy je nutná přítomnost kyslíku, jedná se tedy o aerobní cestu. Enzymy účastníci se reakcí jsou kódováni geny s cob prefixem. Důležitou součástí biosyntézy je enzymatický komplex BlueB/CobT2 – redukcí sloučeniny FMNH₂ enzymem BlueB dochází k syntéze terapeuticky aktivní látky DMBI, která je aktivována enzymem CobT2 a to tím, že ji zavádí do molekuly kobinamidu (neaktivního prekurzoru vitamínu B₁₂), čímž dochází k vytvoření aktivního kobalaminu (již aktivní vitamin B₁₂ s terapeutickými účinky) (Deptula, 2015; Burgess, 2009).

Jelikož bakterie rodu *Propionibacterium* využívají oba mechanismy biosyntézy, je důležité dodržovat následující podmínky – v prvním kroku je nutná anaerobní kultivace, aby došlo k vytvoření kobinamidu. V následujícím kroku je nutné provzdušňování kultury, aby došlo k navázání nižšího ligandu, tedy DMBI na centrální uhlík kobinamidu. Taktéž je nutné dodržení neutrálního pH a optimální teploty, odstranění produktů kvašení (mléčné a octové kyseliny) a obohacování sloučenin sloužících k produkci vitamínu B₁₂. Těmito sloučeninami se rozumí kobaltové ionty, glycin, ALA či DMBI (Piwowarek, 2018).



Obrázek 1. Dílčí cesty biosyntézy vitamínu B₁₂, převzato z Kinatpapan, 2002

1.5. Kultivace

Bakterie rodu *Propionibacterium* rostou na komplexních půdách jako BHI bujón dobře, ale velmi pomalu díky čemuž může docházet ke kontaminaci a neschopnosti izolovat čistou kulturu. Při optimálním pH, teplotě 30 °C a anaerobním prostředí rostou až 2 týdny, proto se pro jejich kultivaci používají především selektivní média. V dnešní době se však spíše dává přednost využití molekulárních metod k jejich rychlejší detekci. Především se používá kvasniční extrakt s laktátem sodným jako zdrojem uhlohydrátu. Médium se často obohacuje agarózou. Po 5 až 6 dnech kultivace jsou výsledkem různě zbarvené kolonie s průměrem 2 mm.

Tabulka 1. Zbarvení kolonií *Propionibacterium* na médiu s kvasničním extraktem, převzato a upraveno z Gautier, 1999

Druh	Zbarvení kolonií
<i>P. acidipropionici</i>	Krémové
<i>P. freudenreichii</i>	Krémové
<i>P. jenseinii</i>	Oranžové nebo cihlově červené
<i>P. thoenii</i>	Cihlově červené

Dále se využívá selektivní medium s komerčním názvem Pal Propiobac®. Toto médium obsahuje substrát glycerol, bromkresol purpur, lithium pro inhibici bakterií mléčného kvašení a antibiotika pro potlačení růstu gram-negativních bakterií. Vyrostlé kolonie propionibakterií jsou hnědě zbarvené s průměrem více jak 0,5 mm. Kolem kolonií se vyskytuje žlutý dvorec vzniklý v důsledku poklesu pH při fermentaci glycerolu (Gautier, 1999).

2 *Propionibacterium acnes*

2.1. Historie

Bakterie *Propionibacterium acnes* byla poprvé zaznamenána dermatologem P.G. Unnou roku 1896 při jeho histologické studii „černých teček“. Vzhledem k tomu, že morfologicky je velice podobná bakteriím druhu *Corynebacterium*, byla roku 1923 pod názvem *Corynebacterium parvum* nejprve zařazena mezi ně. Po identifikaci vztahu ke kyslíku a vzhledem k povaze katabolických procesů byla později přeřazena do rodu *Propionibacterium* (Knobler, 2004).

2.2. Charakteristika

Propionibacterium acnes je anaerobní, aerotolerantní, gram-pozitivní bakterie nacházející se v mazových žlázách, na povrchu lidské kůže, spojivce, zevním zvukovodu, na sliznici dutiny ústní a trávicím traktu. *P. acnes* je nejčastěji spojována s tvorbou akné, avšak způsobuje i jiná onemocnění, která jsou podrobněji popsána v kapitole 3 (Kinatpapan, 2002).

2.3. Genom

Celý genom bakterie *P. acnes* o velikosti 2,5 Mb s 2488 geny byl zcela sekvencován. a pomocí multilokusové sekvenční typizace (MLST) byla *P. acnes* rozdělena nejprve na 3 typy – I, II, III. Postupem času byly zjištěny podskupiny těchto typů. Nyní je známo 6 fylotypů *P. acnes* – IA 1, IA 2, IB, IC, II a III. *P. acnes* patří mezi běžné komenzály lidské kůže, avšak podle zastoupení těchto fylotypů může docházet k patogenitě. Především se jedná o fylotyp IA 1, který je nejčastěji spjat s výskytem akné. Ze studií vyplývá, že na lidské kůži ať zdravé, tak s chronickým akné je stejná hojnost výskytu *P. acnes*, záleží však na poměru jednotlivých fylotypů. U jedinců se zdravou pokožkou bylo větší zastoupení fylotypů IB, IC, II a III, naopak u jedinců trpících *acne vulgaris* převažoval fylotyp IA 1 (Kinatpapan, 2002; Zhang 2017).

Před nedávnem došlo k novému označení jednotlivých fylotypů této bakterie na základě různého složení peptidoglykanu. Typ I se nyní označuje jako *Cutibacterium*, typ II jako *Pseudopropionibacterium* a typ III jako *Acidibacterium*, přičemž fylotyp IA 1 spojený s tvornou *acne vulgaris* se nyní pojmenovává jako *Cutibacterium acnes* (Zhang, 2017).

3 Onemocnění

3.1. *Acne vulgaris*

„*Acne vulgaris* je chronické kožní onemocnění způsobené ucpáním či zánětem vlasového folikulu a jeho přidružených mazových žláz – dohromady nazývaných jako pilosebaceózní jednotka.“ (Mahto, 2017).

Akné je jedním z nejčastějších kožních onemocnění postihující především mladistvé vlivem změn hormonálních hladin, avšak může se projevovat i ve starším věku, a to především v důsledku výkyvů hladin hormonů během menstruačního cyklu a těhotenství. V období adolescence postihuje především mužské pohlaví, ve vyšším věku jsou tomuto onemocnění náchylnější ženy.

Ačkoliv se nejedná o život ohrožující onemocnění, může zapříčinit vážné psychické problémy, kterými jsou snížené sebevědomí, sociální odtazítost či deprese (Mahto, 2017; Knobler, 2004)

3.1.1. Kožní mikrobiom

Taktéž jako existuje střevní či poševní mikrobiom, i kůže má svůj vlastní mikrobiom tvořený mikroorganismy, které neindikují přítomnost onemocnění, naopak jsou užitekem pro udržení lokální imunity a tvorbou bariéry před působením patogenních mikroorganismů. Až z 90 % tvoří kožní mikrobiom dospělého jedince bakterie *Propionibacterium acnes*, dále jsou zde přítomny bakterie rodu *Corynebacterium* a *Staphylococcus*. Koncentrace jednotlivých druhů bakterií a ostatních mikroorganismů závisí na věku, typu kůže či množství mazových folikulů. Aby byla zachována užitečná funkce kožního mikrobiomu, je nutné udržení rovnováhy mezi jednotlivými druhy mikroorganismů. Pokud však dojde k posunu koncentrace jednoho či více mikroorganismů, může docházet k dermatologickým onemocněním (Castillo, 2019)

3.1.2. Mechanismus tvorby *acne vulgaris*

Transformace pilosebaceózního folikulu do primární léze akné, tedy **mikrokomedonu** – prekursoru pro tvorbu dalších struktur jako je komedon, papuly a pustuly, je zapříčiněna abnormálním rohovatěním folikulů (hyperkeratinizací), spjatá s nadměrnou tvorbou mazu. Samostatná zvýšená tvorba mazu není příčinou tvorby akné, jedná se pouze o kritický faktor, který tvorbu *acne vulgaris* podporuje. Tvorba mazu se zvyšuje v období adolescence a je z části

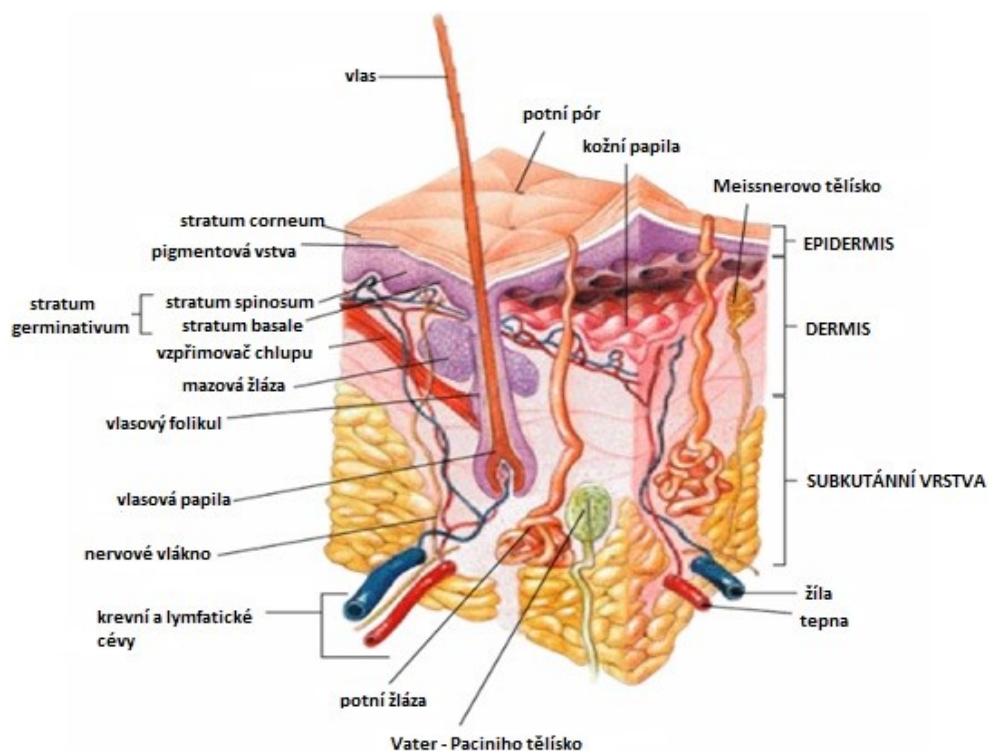
regulována androgenními hormony, především **testosteronem** a **dihydrotestosteronem**. Receptory pro tvorbu těchto hormonů jsou uloženy v bazální vrstvě mazových žláz. Složení mazu je specifické pro každého člověka, nicméně obsahuje **triacylglyceridy** (cca 41 %), **voskové estery** (cca 26 %), **skvalen** (cca 12 %) a **volné mastné kyseliny** (cca 16 %). Skvalen a volné mastné kyseliny jsou specifické pouze pro maz a nevyskytují se v žádné jiné části lidského těla. U osob postižených akné bylo prokázáno, že maz obsahuje vyšší množství skvalenu, má sníženou hladinu kyseliny linolové a rozdílné složení lipidů.

S nadměrnou tvorbou mazu souvisí hyperkeratinizace, tedy zanesení vlasového folikulu kožními buňkami, které se nadměrně reprodukuje, rostou a akumulují ve vlasovém folikulu. Nadbytek kožního mazu a nahromadění kožních buněk ve vlasovém kanálku může způsobit ucpání pilosebaceózní jednotky. Na normální pokožce vystupují odumřelé kožní buňky na povrch kůže a opouští vlasový folikul, čímž nedojde k tvorbě akné.

Během procesu tvorby komedonu se *P. acnes* často zachycuje ve vrstvách korneocytů (diferenciované keratinocyty) a kožního mazu, čímž kolonizuje komedonální jádro. Zanesená pilosebaceózní jednotka vytváří anaerobní prostředí, které podporuje množení *P. acnes* a vytvoření biofilmu. Tímto způsobem se vytvoří **mikrokomedon**, což je struktura pouhým okem neviditelná. Z mikrokomedonů se mohou utvářet struktury větší a viditelnější, takzvané **komedony**. Ty mohou být buď **uzavřené** nebo **otevřené** (tzv. „černé tečky“) (Melnik, 2018; Shannon, 2020).

P. acnes produkuje enzymy – lipázy, které způsobují hydrolýzu triacylglyceridů v mazu na volné mastné kyseliny. Nahromadění volných mastných kyselin bylo zezáчатку považováno za příčinu prasknutí linie komedonu. Nyní se však předpokládá, že za rupturu komedonu mohou samotné látky produkované *P. acnes*. Bakterie vylučuje polypeptidy – extracelulární enzymy, jakými jsou hyaluronidázy, proteázy, které se podílí na permeabilizaci epitelu a volné mastné kyseliny způsobují zánětlivou reakci (Bhatia, 2004)

Zánětlivá reakce vede ke zvýšené produkci prozánětlivých mediátorů, především interleukinů IL-1 α a IL-8, TNF α (tumor necrosis factor – alfa), které přitahují makrofágy, neutrofilů a Th-1 buňky do pilosebaceózní jednotky, což vede taktéž k prasknutí komedonu (Shannon, 2020).



Obrázek 2. Schéma lidské kůže, převzato a upraveno z Shannon, 2020

3.1.3. Laboratorní diagnostika pomocí MALDI TOF MS

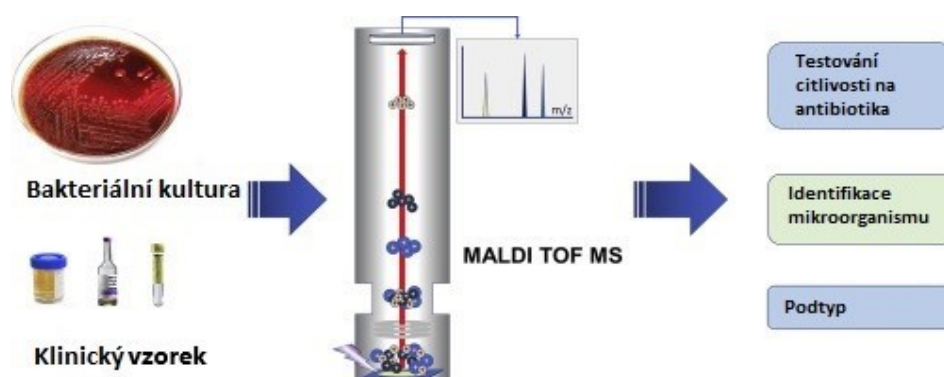
„Hmotnostní spektrometrie (MS) je typ analýzy používané k určení, jaké molekuly tvoří vzorek, na základě hmotnostního spektra, které vytvářejí ionty.“ (Hou a kol., 2019)

Hmotnostní spektrofotometrie funguje na principu analýzy poměru hmotnosti k náboji molekulárních iontů (m/z). V klinické mikrobiologii se využívá hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací a časem letu pomocí matrice k rychlé identifikaci rodu a druhu bakterií. Přístroj identifikuje bakterii na základě generace charakteristického hmotnostního spektra (především ribozomálních proteinů) a jeho porovnáním s poměrně širokou databází spekter bakterií. Metoda hmotnostní spektrometrie představuje vhodnou metodu k identifikaci bakteriálních kmenů, plísní i kvasinek z důvodu rychlého vyhodnocení výsledku, vysoké účinnosti i finanční dostupnosti. Výsledek může být vyhodnocen v řádech desítek minut namísto 24–48 hodin. Další výhodou, kterou MALDI TOF MS přináší je detekce citlivosti bakterií na léčiva (Wieser a kol., 2016).

Příprava vzorku k analýze je poměrně jednoduchá. Odběr lidské mikrobioty se provádí různými způsoby. Mezi nejčastější metody patří výtěr, seškrab či kožní biopsie.

Punčové biopsie neboli děrování se při diagnostice *P. acnes* využívá nejčastěji, jelikož se tato bakterie nachází až v hlubších vrstvách kůže a klasický výtěr či seškrab by v tomto případě nebyl efektivní. Před samostatnou biopsií je nutná lokální anestezie v místě odběru. Nejčastěji je využívána látka *Lignocain*. Samostatný postup biopsie náleží v kolmém natáhnutí pokožky na ostatní linie kůže. Speciální nástroj, tzv. punč s rázem 4 mm, je rotačním pohybem zasouván do kůže, dokud nedojde k narazení do subkutánní vrstvy. Ranka po biopsii může být zašita nebo ponechána volně. Pokožka obličeje se hojí poměrně rychle s minimálním vznikem jizev (Nischal, 2008).

Po vykultivování bakterií na pevném agarovém médiu se vybere jedna kolonie, která se rozetře tenkou vrstvou na komerčně dodávanou destičku MALDI. Případně se dá využít přímé identifikace mikroorganismu z biologických vzorků bez předchozí kultivace. Na nátěr se po zaschnutí kolonie nakape 1 μ l HCCA matricového roztoku. Takto připravená destička se vloží do ionizační komory přístroje, kde laser ozáří směs kolonie a HCCA matrice nanosekundovým pulsem, kdy přítomná matrice pohlcuje energii pulsu a tepelný rozklad matrice ionizuje molekuly (především peptidové a proteinové povahy) přítomné ve vzorku. Ionizované molekuly se urychlují do iontovému detektoru, k němuž se nejprve dostávají menší molekuly. Generuje se již zmíněné hmotnostní spektrum ve formě píků, které představuje počet iontů dané hmoty dopadající na iontový detektor v čase (Hou a kol., 2019; Patel a kol., 2015).



Obrázek 3. Schéma vyšetření pomocí MALDI – TOF MS, převzato a upraveno z Hou a kol., 2019

3.2. Infekční endokarditida

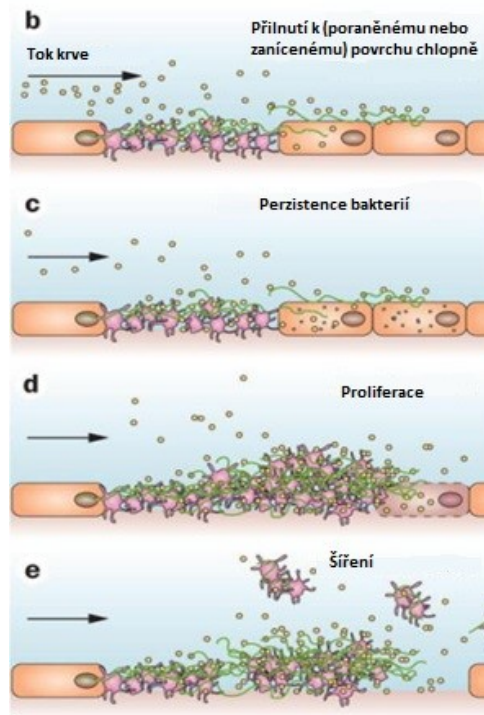
Infekční endokarditida (IE) představuje multisystémové onemocnění, které je způsobené mikrobiální infekcí, nejčastěji bakteriální, postihující vnitřní povrch srdce tzv. endokard. Nejčastěji bývají postiženy srdeční chlopně, jedná se tedy o tzv. valvulitidu. Rizikovými faktory pro vytvoření bakteriální infekce jsou především protetiké chlopně a srdeční zařízení jako jsou kardiostimulátory či by-passy a taktéž vrozené srdeční vady s příkladem hypertrofické kardiomyopatie či mitrálního kolapsu. Náchylnější k tomuto onemocnění jsou především starší lidé převážně mužského pohlaví a oslabení jedinci se závažnými onemocněními, kterými může být *Diabetes Mellitus* či jaterní cirhóza. Rizikovou skupinu taktéž představují uživatelé drog s nitrožilní aplikací.

K tomu, aby došlo k rozvoji infekční endokarditidy musí dojít ke změně endotelu chlopně, který je v normálním případě rezistentní vůči bakteriální kolonizaci. V krvi musí být přítomny bakterie (bakteriémie), které jsou schopné kolonizovat pozměněný endotel chlopně. Pokud dojde ke kolonizaci, dochází k vazbě s trombocyty a fibrinovými vlákny. Dále dochází k pomnožení bakterií, čím se vytvoří infekční vegetace, která se po utržení z chlopně může přenášet krví jako tzv. trombus do dalších částí těla a způsobovat ucpání tepen, čímž znemožní prokrvení příslušných orgánů s následným odumřením orgánu či tkáně. Typickým příkladem je cévní mozková příhoda (Holland, 2016).

Propionibacterium acnes se řadí mezi anaerobní bakterie, které způsobují IE v 2–16 % celkových případů. Spolu s aerofilními streptokoky a *Bacteroides fragilis* patří mezi nejčastější anaerobní původce IE. Vzhledem ke skutečnosti, že *Propionibacterium acnes* je bakterie kolonizující lidskou kůži, dochází k bakteriémii spojenou s rozvojem infekční endokarditidy nejčastěji intraoperační kontaminací. Jedná se tedy o exogenní infekci, která způsobuje 20 % případů IE. Dávka bakterií, která musí být v krvi přítomna, aby došlo k rozvoji infekční endokarditidy není přesně známa, předpokládá se, že se jedná o hodnotu 10^5 – 10^8 CFU/ml (Linhartová, 2016).

Mechanismus adheze *Propionibacterium acnes* na endoteliální buňky chlopní je podobný mechanismům kožních bakterií rodu *Staphylococcus* či *Streptococcus*. Bakterie *P. acnes* obsahuje geny, které jsou schopny kódovat povrchové proteiny. Tyto povrchové složky, označované jako MSCRAMMs (mikrobiální adhezivní složky rozpoznávající molekuly adhezivní matrice), specificky rozpoznávají složky – proteiny – extracelulární matrice, která tvoří podklad epiteliálních buněk. Tento mechanismus podporuje adheze *P. acnes*

k endoteliálním buňkám, čímž dochází ke kolonizaci a iniciaci bakteriální infekce. Díky studii P. A. Grangeho publikované roku 2016 bylo zjištěno, že povrchovým proteinem je glykoprotein s molekulovou hmotností 58 kDa, který specificky rozpoznává fibrinogen přítomný v ECM endotelových buněk (Grange, 2017; Holland, 2016).



Obrázek 4. Mechanismu adheze *P. acnes* na povrch poškozené srdeční chlopně, převzato a upraveno z Holland a kol., 2016

Mezi typické příznaky IE patří horečka a třesavka, mohou se objevit srdeční šelesty či hemoragické Janewayovy skvrny, což jsou nebolestivé hematomy nacházející se na dlaních či ploskách nohou. Z hlediska laboratorní diagnostiky se v krvi může zvyšovat počet leukocytů, a to zejména nezralých leukocytů, koncentrace CRP, prokalcitoninu a markerů svědčících o poruše funkce konkrétních orgánů. Jedná se pouze o doprovodné změny neidentifikující přítomnost infekční endokarditidy (Linhartová, 2016).

Pro diagnózu IE vzniklé působením *P. acnes* je nutné odebrání krve na **hemokultivační vyšetření**. Po odebrání vzorku krve do hemokultivační nádoby je využito automatizovaných systémů, jenž detekují množství vzniklého oxidu uhličitého fotometrickým měřením v časovém úseku každých 10 – 20 minut. Ve fázi největší produkce oxidu uhličitého, na kterou upozorní analyzátor, je možné ze vzorku krve připravit preparát pro barvení dle Grama, a tím předběžně

před samostatným vyhodnocením přístrojem identifikovat tvar a grampozitivitu či gramnegativitu. Běžně dochází k vyhodnocení po časovém úseku 18–36 hodin, ale v případě pomalého růstu *P. acnes* se tato doba prodlužuje na 5 až 7 dní. Při potvrzení IE vlivem působení *P. acnes* se přednostně využívá léčby antibiotiky, v těžších případech a při nedostatečné antibiotické léčbě se přechází k chirurgickému zákroku (Liesman, 2017).

3.3. Sarkoidóza

Sarkoidóza je systémové **granulomatózní onemocnění**. Granulomy se nejčastěji vyskytují v očích, kůži, plicích a lymfatickém systému. Nejčastěji se toto onemocnění vyskytuje u žen ve věku 20 – 40 let. Toto onemocnění kromě organických a anorganických částic mohou vyvolat infekční agens s příkladem *Propionibacterium acnes*. Předpokládá se, že díky přítomnosti bakterie dochází k imunitní reakci a interakce T-buněk s APC (buňky prezentující antigen) vyvolává tvorbu granulomů.

Přítomnost antigenu, tedy bakterie *P. acnes*, aktivuje APC buňky, které antigen fagocytují a pomocí specifických mechanismů vystaví antigenní peptidy na povrch své buněčné membrány. Interakcí APC buněk s naivními T buňkami dochází k produkci IL-2 a následné proliferaci Th - 1 lymfocytů, které opouštějí lymfatickou uzlinu a začnou produkovat cytokin INF- γ . Tento cytokin způsobuje agregaci makrofágů, lymfocytů a fibroblastů do místa působení, přeměnu makrofágů na epiteloidní buňky, a kromě další produkce INF- γ tento cytokin vyvolává produkci i jiných cytokinů – TNF- γ a M1-P. Následně dochází k agregaci makrofágů a kolem tohoto shluku k jeho obalení epiteloidními buňkami. Vytvořený útvar splývá v jednu velkou buňku – tzv. mnohojadernou obří buňku, kterou obklopují fibroblasty, a tím vytvoří granulom. Je nutné zdůraznit, že tento granulom je nekaseifikující oproti jiných granulomatózním onemocněním (s příkladem tuberkulózy), což znamená, že součástí granulomu není nekrotická tkáň (Eishi, 2013; Sakhamuru a kol., 2020).

Jelikož se jedná o zánětlivé onemocnění, nachází se v krvi zvýšená hladina CRP a sedimentace erytrocytů. Jako velmi častým ukazatelem výskytu sarkoidózy se využívá sérové koncentrace tzv. enzym konvertujícího angiotenzinu (S-ACE), která při sarkoidóze vykazuje zvýšenou hodnotu. Tento enzym je produkován přímo granulomem, konkrétně epiteloidními buňkami, avšak není specifický pouze pro sarkoidózu, nýbrž i pro jiné granulomatózní onemocnění. Dalším ukazatelem je i sérová koncentrace receptoru pro IL-2 (sIL-2R). Kromě laboratorního vyšetření je důležité využití zobrazovacích metod – rentgen plic a výpočetní tomografie

s vysokou rozlišovací schopností při podezření na zasažení plic, magnetická rezonance při podezření výskytu neurosarkoidózy či sonografické vyšetření při podezření na postižení ledvin. Mezi další vyšetření lze zahrnout funkční vyšetření plic, bronchoskopie s bronchoalveolární laváží a případně i bioptické vyšetření.

Nejčastěji se sarkoidóza léčí kortikoidy, které se podávají po dobu 6 – 24 měsíců. Lokálně lze při postižení očí aplikovat kortikosteroidy ve formě očních kapek. U těžkých forem sarkoidózy, která by mohla pacienta ohrožovat na životě, lze využít pulsní léčby methylprednisolonem. Kontroly pacientů se provádějí v intervalech 6 – 12 měsíců, součástí je klinické vyšetření, skiagram hrudníku, funkční vyšetření plic a vyšetření ukazatele aktivity (S-ACE či sIL-2R). Je důležité, aby pacient dodržoval zásady zdravého životního stylu z důvodu častého skonu k nadváze. Úmrtnost sarkoidózy je v rozmezí 2–5 % (Kolek, 2007).

3.4. Další onemocnění spjatá s přítomností *Propionibacterium acnes*

Bakterie *Propionibacterium acnes* může způsobovat i chronická onemocnění. Nejčastějšími jsou spojovaná s tvorbou biofilmů, což může způsobovat závažné problémy, jelikož bakteriální biofilm mění fylogentyp mikrobiálních buněk a může způsobovat rezistenci na antibiotika. Biofilmu, jeho tvorbě, struktuře a patogenitě je věnována celá následující kapitola (Dolan, 2002).

3.4.1. Osteomyelitida

Osteomyelitidy (záněty kostní dřevě) jsou poměrně vzácné infekce, které se v případě působení *P. acnes* vyskytují především po chirurgickém zákroku páteře. Dochází k opožděnému nástupu příznaků, a proto je obtížné nemoc diagnostikovat (Haidar, 2010).

3.4.2. Souvislost bakterie *Propionibacterium acnes* s rakovinou prostaty

Bakterie *Propionibacterium acnes* nacházející se v prostatě je spojována s **akutním** či **chronickým zánětem prostaty** (akutní, chronické prostatitidy). Taktéž může hrát roli v rozvoji **karcinomu prostaty**. Pomnožení *P. acnes* uvnitř epiteliálních buněk žlázek prostaty způsobuje zánět, který může přispět k rozvoji karcinomu (Kakegawa a kol., 2017).

Infikované buňky produkují cytokiny a chemokiny s příkladem IL-6 a IL-8 vlivem působení transkripčních faktorů NF- κ B a STAT3. K aktivaci těchto faktorů dochází vlivem infekce

bakterií *P. acnes*. Tímto nepřímým způsobem bakterie mění buněčnou proliferaci a podporuje růst infikovaných epiteliálních buněk bez jejich ukotvení (Fassi-Fehri, 2011; Henrik, 2018).

4 Tvorba biofilmu

„Biofilm je soubor mikrobiálních buněk asociovaných s povrchem, který je uzavřen v matici extracelulární polymerní látky.“ (Dolan, 2002)

4.1. Historie

Objevení biofilmu je připisováno Antonovi Van Leeuwenhoekovi, který jako první tuto strukturu pozoroval na povrchu zubů (dentální plak) jednoduchým mikroskopickým zařízením. Následně vědci Heller a Heukelekian pozorovali tvorbu biofilmu mořských mikroorganismů na skleněné lahvi (Heller a Heukelekian, 1940). Podrobnější zkoumání biofilmu bylo možné s příchodem elektronové mikroskopie, kdy Jones a kolektiv použili skenovací a transmisní elektronovou mikroskopii ke studiu biofilmu na filtrech čistíren odpadních vod (Jones, 1969). Díky speciálnímu barvení Rhutenium Red ve spojení s fixací oxidem osmičelým tyto vědci prokázali, že látka obklopující buňky je polysacharid. Roku 1973 díky studii vědce Charačliklise se ukázalo, že mikrobiální biofilm je velice odolný vůči dezinfekcím a antimikrobiálním prostředkům (Charačlikls, 1973). Roku 1978 Costerton a kolektiv vysvětlili mechanismy adheze mikroorganismů na živých i neživých materiálech (Costerton, 1978). Nové poznatky umožnilo využití skenovací laserové konfokální mikroskopie a zkoumání genů zapojených do adheze a tvorby biofilmu (Dolan, 2002).

4.2. Proces vytváření biofilmu

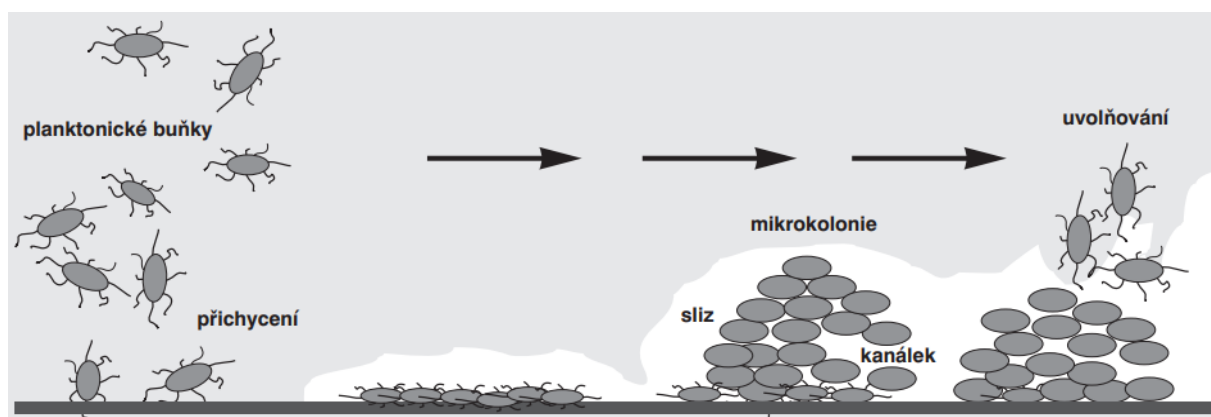
Rozhraní mezi pevnou látkou a kapalinou vytváří ideální prostředí pro vytvoření biofilmu. Pokud jsou planktonické buňky málo vyživené, adherují se svými aktivními molekulami – adheziny na povrch, který je schopný buňky lépe vyživovat. Jakmile dojde k adhezi buněk na povrch, dochází ke změně jejich fenotypu, buňky začnou produkovat velké množství polysacharidu, z něhož vzniká hlenová matrice držící buňky pohromadě a vytváří vhodné prostředí k množení buněk, čímž se tvoří **mikrokolonie**. Taktéž může docházet k uvolňování buněk z mikrokolonií na určitý impuls. Tyto volné buňky dále mohou kolonizovat další část povrchu.

Pokud bychom se procesem vytváření biofilmu zabývali dopodrobna, dalo by se říci, že se vyznačuje 5 fázemi. **První fází** je tedy již zmiňované připojení buněk na pevný povrch. Tato fáze může trvat pouze pár sekund a s největší pravděpodobností je aktivována signály z okolí,

kterými mohou být změny pH, teploty, koncentrace kyslíku, či změny koncentrace živin. Tato fáze je reverzibilní, může docházet k odtržení buněk. Rychlost růstu buněk je logaritmická.

Několik minut po první fázi nastává **fáze druhá**, která je již nevratná. Během ní se bakterie začnou množit a vysílají chemické signály do okolí, čímž mezi sebou buňky komunikují. Jakmile tyto signály překročí určitou hodnotu aktivují se genetické mechanismy, čímž dochází ke změně bakteriálního fylogenu a mikrobiální buňka začne produkovat polysacharidy, které zachycují volné bakterie a vytváří sliz – hlenovou matici, která je schopna držet buňky pohromadě. Pohyblivost buněk se v této fázi výrazně snižuje, buňky se postupně vrství a jakmile vrstva biofilmu přesáhne hodnotu 10 μm , začíná fáze třetí neboli **fáze prvního zrání**.

Když výška biofilmu dosáhne své maximální hodnoty, která bývá zpravidla větší než 100 μm , nastává čtvrtá fáze neboli **fáze druhého zrání**. Několik dní po čtvrté fázi může docházet k uvolňování mikrobiálních buněk z biofilmu, tedy k **páté fázi**. Tyto fylogeny pozměněné buňky se mohou usazovat na další části povrchu a vytvářet nový biofilm.



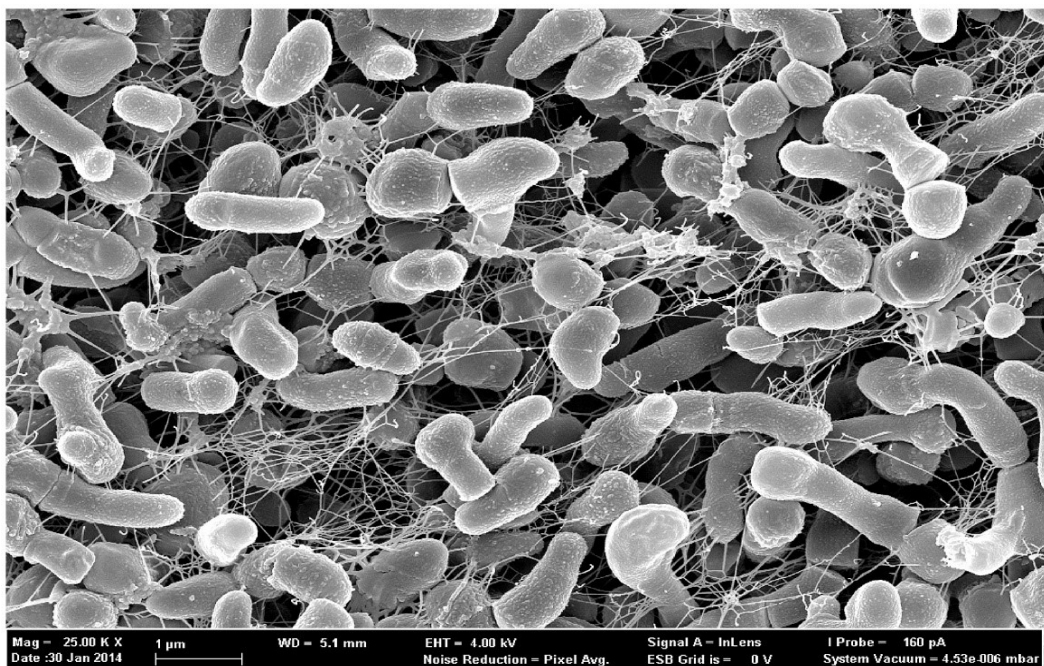
Obrázek 5. Schéma procesu tvorby biofilmu, převzato z Schindler, 2001

Existují určité složky, které jsou společné pro všechny biofilmy, avšak příspěvek hostitele – tedy povrchu na který se buňky přichycují, může mít vliv na specifické vlastnosti biofilmu. Proto je pro přichycení buněk důležitá charakteristika povrchu, na kterém dochází ke tvorbě biofilmu. Bylo prokázáno, že drsnější povrch zvyšuje šanci přichycení buněk díky vyšší povrchové ploše a snížení smykových sil. Zásadní vliv na tvorbu biofilmu mají i fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu, na hydrofobních materiálech dochází k rychlejšímu a pevnějšímu uchycení buněk. Těmito materiály jsou nejčastěji plasty s příkladem teflonu. Na hydrofilní materiály, jakými jsou sklo či kovy, dochází k horšímu uchycení mikrobiálních buněk.

Mezi povrchem a buňkami však musí docházet k hydrofobní interakci, která pomáhá překovat povrchové síly a tím i možnost buňky adherovat se na povrch (Schindler, 2001; Jahns, 2016).

4.3. Struktura

Tloušťka biofilmu je proměnlivá. Závisí na dostupnosti živin a taktéž na tom, zda je tvořen pouze jedním či více bakteriálními druhy. Struktura tvořena pouze jedním bakteriálním druhem je jednodušší, než struktura biofilmu tvořena více bakteriálními druhy. Matrix biofilmu je až z 50 % tvořena polysacharidy, dále jsou zde přítomny proteiny a DNA. Struktura není homogenní, nacházejí se zde dutiny, póry a propojené kanálky různého tvaru. Póry, vyskytujícími se především na povrchu, je biofilm vyživován živinami přítomnými v kapalině omývající povrch biofilmu. Pomocí kanálků se živiny dostávají do hlubších vrstev biofilmu. Tímto způsobem dochází k výživě všech buněk tvořící biofilm. Podle koncentrace živin v okolním prostředí jsou buňky více či méně vyživovány, což souvisí i s jejich životností. Kanálky jsou zde taktéž přítomny, aby nedocházelo k nahromadění toxických metabolitů, které mikrobiální buňka produkuje (Jahns, 2016).



Obrázek 6. Biofilm *Propionibacterium acnes*, převzato z Jahns, 2016

4.4. Patogenita biofilmu

Je známo několik mechanismů, které způsobují patogenitu biofilmu. Jsou jimi především produkce vysokých koncentrací toxinů, výměna genů mezi bakteriemi, což může způsobit vyšší virulenci a rezistenci na antimikrobiální léčbu. Dále se bakterie snaží množit v co největším množství, aby zvyšovaly svoji hustotu. Taktéž jedním s patogenních mechanismů je pátá fáze procesu tvorby biofilmu, tedy uvolňování fyto typově pozměněných bakterií, které na další části povrchu mohou vytvářet nový biofilm. Často dochází k uvolňování antigenních látek, na které lidský organismus reaguje tvorbou protilátek. Ty však nejsou účinné vůči bakteriálnímu biofilmu, avšak mohou působit na imunitní komplex okolní tkáně, a tím tuto tkáň poškozují (Dolan, 2002).

4.5. Studie bakteriální kolonizace *Propionibacterium acnes* na kardiostimulátorech in vitro

P. acnes je příčinou pozdních **chronických infekčních onemocnění**, málokdy způsobuje akutní infekce. Tyto chronické infekce jsou spojeny s tvorbou biofilmu na zdravotnických prostředcích, jakými jsou například katétry, umělé chlopně či kardiostimulátory. Roku 2018 byla představena studie K. I. Okudy a kol. zabývající se bakteriální kolonizací *Propionibacterium acnes* na operačně odstraněných kardiostimulátorech.

Po operačním odstranění kardiostimulátorů následovalo jejich otisknutí na agar Anaero Columbia s obsahem 2,5 % králičí krve. Po dobu 7 dní při teplotě 37 °C byly vzorky inkubovány v anaerostatu. Jednotlivé kolonie byly kultivovány anaerobně v bujónu Gif Anaerobic Media (GAM) při 37 °C po dobu tří dnů.

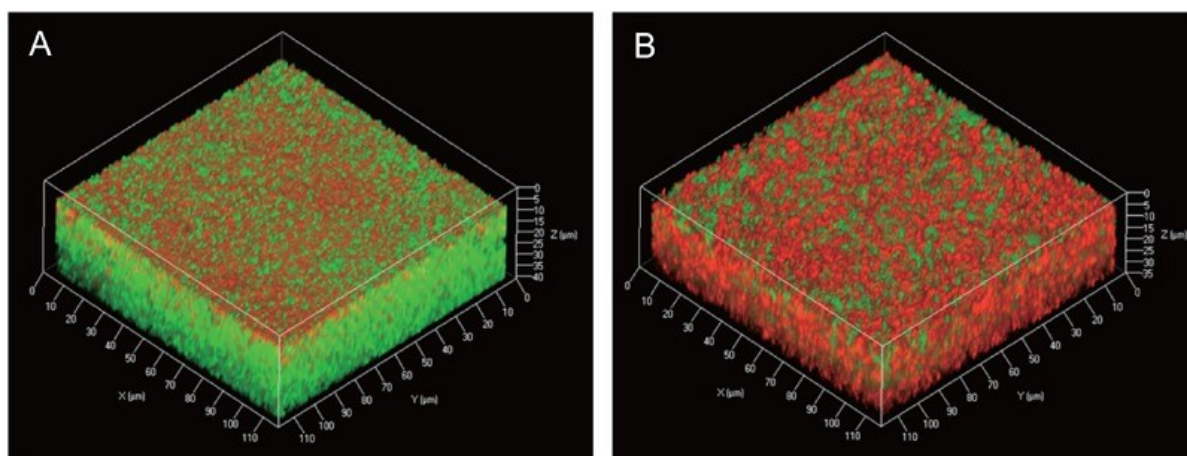
Narostlé kolonie byly zředěny GAM bujónem s přidavkem 1% glukózy. Suspenze byla napipetována do 96 jamkové polystyrenové destičky a anaerobně inkubována po dobu tří dnů při teplotě 37 °C. Následovalo měření absorbance při vlnové délce 595 nm. Po odstranění supernatantu byl biofilm utvořený na dně jamek obarven 0,1% krystalovou violetí. Po promytí fosfátovým pufrům (PBS) a extrakci ethanolem byla opět proměřena absorbance při 595 nm.

I přes to, že nebyly vykazovány žádné známky infekce bylo z celkového počtu 31 odebraných srdečních kardiostimulátorů 8 pozitivních výsledků. K identifikaci kmenů bylo využito 16 S rRNA sekvencování. Nakonec byla provedena MLST typizace k určení fylo typů *P. acnes*. Z 8 pozitivních vzorků bylo pomocí 16 S rRNA sekvence zjištěno, že se v sedmi případech

jedná o *P. acnes* a v jednom případě o *P. granulosum*. U jednoho vzorku nebylo možné určit fylogyp.

Pomocí skenovací laserové konfokální mikroskopie (CLSM) byla pozorována 3D struktura obarveného biofilmu ze dvou izolátů *P. acnes*. Tyto biofilmy měly hladký povrch a tloušťku cca 30 μm . Živé buňky byly zbarvené zeleně, mrtvé červeně. V prvním biofilmu z izolátu *P. acnes* (s označením JK 12.2) byly hlavní populací především živé buňky (**Obrázek 7, A**), naopak ve druhém (z izolátu s označením JK 17.1) většinu buněčné populace tvořily mrtvé buňky (**Obrázek 7, B**).

Po odebrání planktonických buněk (buněk volných) z výchozích kultur, a po jejich následném obarvení, kvůli identifikaci živých/mrtvých buněk, bylo zjištěno, že převážnou část u obou izolátů (JK 12.2 i JK 17.1) tvoří buňky živé. Bylo prokázáno, že uvolňování cytoplazmatických složek při lýze bakteriálních buněk podporuje tvorbu biofilmu (Okuda a kol., 2018).



Obrázek 7. Zobrazení mrtvých a živých buněk ve struktuře biofilmu, převzato z Okuda a kol., 2018

4.6. Antibiotická léčba

Antibiotická léčba se především zaměřuje na zabíjení či zastavení růstu a tím i množení bakterií, které jsou v planktonickém stavu, avšak bakterie, které jsou přítomny v rámci biofilmu tyto látky nejsou schopny zahubit. Proto se příznaky bakteriální infekce způsobené biofilmem po léčbě antibiotiky vrací do té doby, dokud není biofilm chirurgicky odstraněn z organismu. Existuje několik důvodů, proč antimikrobiální léčba není účinná na bakteriální biofilm. Tím prvním je fakt, že antibiotikum nemusí pronikat do hlubších vrstev biofilmu, a tak bakterie v těchto vrstvách nejsou usmrceny. Dalším důvodem může být nedostatečná výživa bakterií,

která zpomaluje jejich růst, čímž buňky ztrácí citlivost na mnohé antibakteriální látky (Aparna, 2008).

4.7. Vyhodnocení přítomnosti biofilmu

4.7.1. Metoda tkáňové kultury (TPC)

Tento test patří mezi nejvyužívanější metody k detekci přítomnosti tvorby biofilmu. Bakterie se pěstují v 96 jamkových polystyrenových mikrodestičkách pro tkáňové kultury po dobu 24 hodin a po promytí, fixací 2% octanem sodným a obarvení 0,1% krystalovou violetí je tvorba biofilmu detekována měřením optické hustoty metodou *ELISA*.

4.7.2. Metoda trubice

Bakterie se kultivují ve zkumavkách v sójovém bujónu obohaceném tryptikázou a 1% glukózou po dobu 24 hodin. Po kultivaci se promyjí PBS a obarví 0,1% krystalovou violetí. Po promytí a vysušení se kvalitativně hodnotí tvorba biofilmu – pokud se na dně či a na stěnách zkumavky vytvoří viditelná peleta buněk, jedná se o pozitivní výsledek.

4.7.3. Metoda červeného agaru (CRA)

Jedná se o metody, kdy po kultivaci na BHI agaru obohaceném 5% sacharózou a přísadkou barviva Kongo červeně dochází v pozitivním případě, tedy při tvorbě biofilmu, k nárůstu černých krystalických kolonií (Aparna, 2008).

5 Léčba

Léčbu infekcí způsobené bakterií *Propionibacterium acnes* lze rozdělit do několika skupin – **lokální léčba** (lokální antibiotika, benzoxyperoxid, kyselina azelaová), **systémová léčba** (orální antibiotika, isotretinol) a **fyzikální léčba** (modré světlo a ostatní světelné zdroje).

V minulosti se v České republice k léčbě *acne vulgaris* hojně využívalo **imunoterapie**, konkrétně autovakcinace pomocí tepelně inaktivované bakterie *P. acnes*. Vakcína, vyrobená přímo na míru pro pacienta z jeho vlastního vzorku, se aplikovala perorálně díky své nenáročnosti. Jednalo se o vcelku účinnou metodu, která své uplatnění v dnešní době má pouze v krajních případech, kdy některá z předcházejících metod nenajde své uplatnění. (Viktorinová a Koukalová, 2007) V budoucnu se uvažuje o pasivní vakcinaci proti *acne vulgaris*, avšak tento druh prevence a léčby není ještě zdaleka probádán (Nakatsuji, 2008).

Dalším možnou budoucí léčbou infekcí způsobenou *P. acnes* se zdá být **bakteriofágová léčba**, která je však taktéž ve stadiu výzkumu (Castillo, 2019).

5.1. Léčba antibiotiky

V případě onemocnění *acne vulgaris* se využívá lokální léčby antibiotiky **klindamycin** a **erytromycin**. Pokud však léčba selže, lze využít i systémové léčby orálními antibiotiky s příkladem **tetracyklinových antibiotik**. U jiných infekcí způsobených touto bakterií využíváme pouze léčbu systémovými antibiotiky.

Lokální antibiotika klindamycin a erytromycin jsou pouze bakteriostatická, což znamená, že bakteriální kmen neusmrtí, pouze zastaví jejich růst a množení. Léčení probíhá 4–6 týdnů. Problémem je rezistence bakterie *P. acnes* na tyto antibiotika. Pokud léčba těmito antibiotiky nezabírá, přechází se k nasazení orálních antibiotik jako **tetracyklinů**, **minocyklinu**, či **doxyciklinu** (Nguyen, 2010).

5.1.1. Rezistence na antibiotika

Antibiotická rezistence patří mezi nejčastější příčiny selhání léčby *acne vulgaris* způsobené bakterií *P. acnes*. Taktéž dlouhodobá indikace antibiotik může vést k vytvoření bakteriálního biofilmu, který chrání bakterie před vlivem dalšího působení antibiotik, proto se doporučuje kombinace antibiotik se současnou indikací benzoxyperoxidu či retinoidů. Bakteriální

rezistence může nastat jedním ze dvou důvodů – genetickou mutací (častější příčina) či kódováním cizí DNA přenesením genů.

Ze studie Alvarez-Sánchez a kol. (Alvarez-Sánchez a kol., 2016) vyplývá, že anaerobní bakterie, do kterých spadá i bakterie *P. acnes*, mají zvýšenou rezistenci vůči lokálním antibiotikům erytromycinu a klindamycinu. Tyto antibiotika mají sice rozdílnou chemickou strukturu, ale svým účinkem jsou si velice podobná. Používají se především k léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi.

- **Erytromycin** je antibiotikum spadající do kategorie makrolidů, jejichž chemická struktura je tvořena z 2-amino nebo neutrálních cukrů spojených laktonovým kruhem. V případě erytromycinu se jedná o 14členný laktonový kruh.
- **Klindamycin** je látka patřící do skupiny linkosamidových antibiotik, jejichž mechanismem účinku je vazba na 50 S podjednotku ribozomů, čímž dochází k inhibici proteosyntézy bakterií. Tento mechanismus využívá i antibiotikum erytromycin (Leclercq, 2002).

Bakterie demonstrují svoji odolnost vůči erytromycinu a klindamycinu třemi způsoby. První je modifikace cílového místa, a to methylovací nebo mutací, která zabraňuje vazbě antibiotika na ribozom. Druhým možným způsobem je eflux antibiotika. Třetí variantou je inaktivace léčiva. Nejčastěji se však jedná o rezistenci v důsledku methylování cílového místa na ribozomu. Některé bakterie *Propionibacterium acnes* ve svém genomu obsahují tzv. ERM (erytromycin-ribosom methyláza) geny, které jsou zodpovědné za rezistenci. Tyto geny proteinové povahy dimethylenují adenin z 23 S rRNA, která je součástí 50 S podjednotky. 23 S rRNA je cílové místo vazby na výše popsaná antibiotika, ale jelikož geny ERM dochází k pozměnění struktury, dochází i k neschopnosti vazby antibiotik na 50 S podjednotku ribozomu (Tally, 1984).

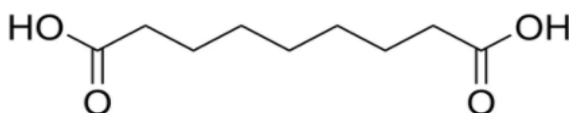
5.2. Lokální antimikrobiální látky

5.2.1. Kyselina azelaová

Kyselina azelaová je přirozeně se vyskytující látka, které se kromě léčbě *acne vulgaris* využívá i při léčbě růžovky, kožní hyperpigmentace či melanomu. Jedná se o nasycenou dikarboxylovou kyselinu, která ve svém řetězci obsahuje devět atomů uhlíku. Svůj název získala kvůli původnímu způsobu získávání, tedy oxidací kyseliny olejové kyselinou dusičnou (AZ = azote = dusík, elaoi = olej) (Nazzaro-Porro, 1987).

Většinou je tato látka součástí krémů v 20% koncentraci. Kyselina azelaová má antibakteriální účinky – narušuje intracelulární pH a metabolismus *P. acnes*, čímž dochází k usmrcení bakterií. Taktéž vykazuje protizánětlivý účinek, která spočívá v inhibici nukleárních transkripčních faktorů.

I přes to, že se jedná o vcelku účinnou látku v boji proti *acne vulgaris*, má i některé nevýhody – konkrétně nízkou rozpustnost ve vodě, špatná absorpce kůží a časté vedlejší účinky s příkladem lokálního podráždění či začervenání kůže. Z tohoto důvodu se v současné době uvažuje o využití monoesteru pegylované kyseliny azelaové (PEG-AzA), který vykazuje lepší rozpustnost ve vodě a nižší riziko vzniku nežádoucích účinků se stejnou mírou antibakteriálních a protizánětlivých účinků (Wang a kol., 2021).



Obrázek 8. Strukturální vzorec kyseliny azelaové, převzato z Blaskovich a kol., 2019

5.2.2. Benzoylperoxid

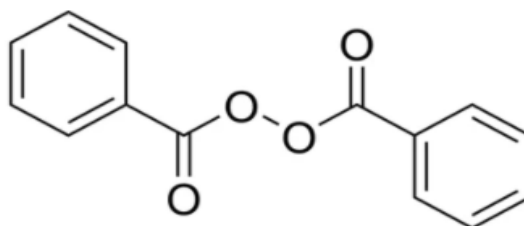
„**Benzoylperoxid (BPO)** je baktericidní látka se schopností redukovat populaci *P. acnes* v mazových folikulech.“ (Anjali Mahto, 2017). Bakterie vůči němu neprokazuje rezistenci, proto je v případě mikrobiální kolonizace *P. acnes* velice výhodným lokálním léčivem (Nguyen, 2010).

Benzoylperoxid je organický peroxid, který kromě antimikrobiálních účinků má i účinky protizánětlivé a keratolytické. Taktéž se podílí na hojení ranek (Tuchayi, 2015).

Poté, co je BPO vstřebán kůží, se přemění na kyselinu benzoovou. Ta je cysteinem metabolizována za uvolnění kyslíkových radikálů, což vede k oxidaci bakteriálních proteinů. Takto je metabolizováno přibližně 95 % kyseliny benzoové, zbytek je z organismu vyloučen ledvinami.

Benzoylperoxid se vyskytuje v běžně dostupných přípravcích jako jsou mycí gely, krémy, pleťové vody či masky, které jsou k dostání bez lékařského předpisu, ale i v gelech, ke kterým je lékařský předpis potřeba. Účinné koncentrace se pohybují v rozmezí 2,5 – 5 % v případě obličeje, z případě hrudníku a zad je možná vyšší koncentrace 5 – 10 %. Látka má mírné bělicí

účinky, může docházet k odbarvení chloupků na obličeji, proto se nedoporučuje nanášet léčivo na obočí či do vlasů. Pacient by se taktéž měl vyhnout slunečnímu záření a používat krémy s vysokou UV ochranou (SPF minimálně 30), aby se snížilo riziko fototoxicity a podráždění pokožky. Doporučuje se léčivo nanášet bodově, 1× denně a vyhnout se okolí očí, nosu, úst, sliznic a otevřených ran, kde nejčastěji dochází k silnému podráždění (Matin a Goodman, 2021).



Obrázek 9. Strukturální vzorec benzoylperoxidu, převzato z Blaskovich a kol., 2019

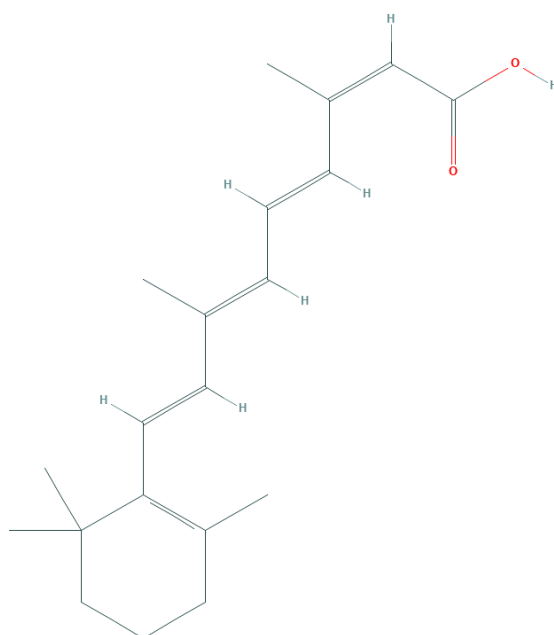
5.3. Systémové antimikrobiální látky

5.3.1. Isotretionin

U středně těžkého a těžkého průběhu *acne vulgaris* nereagujících na žádnou jinou formu léčby zůstává nejúčinnějším léčivem perorální **isotretionin**. Isotretionin, neboli kyselina 13-cis-retinová, je derivát vitamínu A. Pro léčbu *acne vulgaris* byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) již roku 1982. Tato látka má protizánětlivé účinky, jelikož snižuje chemotaxi monocytů. Dále snižuje produkci kožního mazu a ovlivňuje komedogenezi. Přímé antimikrobiální účinky nemá, ovlivňuje však mikroprostředí v pilasebaceózní jednotce, což má nepříznivý účinek na kolonizaci bakterií *P. acnes* (Bagatin a kol., 2020).

Začíná se s dávkováním 0,5 mg/kg/den a postupně podle snášenlivosti jedince se dávka může zvyšovat. Dětem do 12 let se nedoporučuje izotretinoin podávat (Layton, 2014).

Léčba isotretinoinem by měla trvat po dobu 4 – 6 měsíců. Během této doby dojde ke zhojení až 90 % projevů *acne vulgaris*. K vysazení léku by mělo docházet postupným snižováním dávky v průběhu 4 – 8 týdnů (Machovcová, 2011).



Obrázek 10. Strukturní vzorec isotretioninu, převzato z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isotretinoin>

5.4. Fyzikální terapie modrým světlem a jiné zdroje světelné terapie

Z důvodu časté rezistence bakterie *P. acnes* na některé druhy antibiotik a smíšených výsledků léčení *acne vulgaris* léčbou retinoidy v kombinaci antibiotické léčby se vyvinuly nové terapeutické metody na světelné bázi. Tyto metody vycházejí z faktu, že vlivem slunečního záření dochází ke zlepšení stavu aknézní pleti. *Propionibacterium acnes*, respektive porfyriny této bakterie, absorbují světlo v rozmezí vlnových délek **400–700 nm**, přičemž nejlépe absorbované je právě modré světlo s vlnovou délkou **415 nm**.

Po absorpci světla porfyrinovými složkami dochází k fotoexcitaci, která vede k uvolnění volných reaktivních radikálů a singletového kyslíku – látek s vysokým bakteriocidním účinkem na bakteriální buňku *P. acnes*. Modré světlo taktéž vykazuje protizánětlivé účinky v keratinocytech.

Bakteriocidní účinek vykazuje i **červené světlo**, je však hůře absorbovatelné, ale proniká hlouběji do kůže, kde působí na mazové žlázy a ovlivňuje makrofágy skrze uvolňování cytokinů, čímž působí protizánětlivě. Využitím **infračerveného světla**, **titanofosfátových a draslíkových laserů** či **fotodynamické terapie (PDT)** může docházet k fototoxickým a fototermálním poškození mazových žláz, což má za následek jejich zmenšení a následnou sníženou produkci kožního mazu. I tyto zdroje světla mohou působit bakteriocidně, protože vlivem jejich působení dochází k uvolňování volných reaktivních radikálů.

Světelná terapie stejně jako antibiotická léčba nemusí být vždy účinná, jelikož i k terapii modrým světlem mohou některé bakterie *P. acnes* vykazovat rezistenci. Z hlediska rezistence můžeme bakterii rozdělit do čtyř skupin: vysoce citlivé, citlivé, slabě citlivé a odolné (Tsoukas, 2015; Utilization of 440 nm blue light, 2017).

5.5. Bakteriofágová léčba

V důsledku zvyšujících se případů snížení citlivosti a úplné bakteriální rezistence na antibiotickou léčbu z důvodu časté indikace antibiotik se zkoumají další metody léčby bakteriálních infekcí. Kromě využití antimikrobiálních peptidů a upravených protilátek se nabízí využití bakteriofágů. Jejich výhoda spočívá ve specifčnosti bakteriofágů k hostitelům, jednoduchost izolace a produkce.

Bakteriofág (zkráceně fág) je všudypřítomný vir klasifikovaný jako intracelulární parazit bakterií a jeho distribuce tedy závisí na organismu hostitele. Uvádí se, že existuje více než 6000 známých bakteriofágů, jejichž výskyt je až 3x častější než výskyt bakterií. Lze je také nalézt ve formě profágů vložených do genomu bakterií.

Bakteriofágy mají 4 fáze životního cyklu: **lytický** a **lysogenní** – označující se jako hlavní, a dále **pseudo-lysogenní** a **chronický**. Aby mohlo dojít k přechodu mezi těmito fázemi, musí nejprve dojít k navázání na bakteriální buňku čehož je dosaženo pomocí bakteriálních receptorů, které jsou rodově či dokonce druhově specifické. Po navázání aplikuje bakteriofág vstříknutím svůj genetický materiál do bakteriální buňky. Po aplikaci genetického materiálu může fág přecházet do jakéhokoliv životního cyklu, avšak nejčastěji dochází k přechodu na lytickou fázi. Na konci této fáze částice fágů exprimují kasetu tvořící látky lysin a holin. Ve vnitřní membráně dochází působením holinu k vytvoření póru, kterým do buňky vstupuje lysin, který degraduje peptidoglykan. Tímto mechanismem dochází k lýze buněk a uvolnění další generace fágů. Bakteriofágy nacházející se v této lytické fázi jsou nejčastěji využívány díky přirozené schopnosti usmrcení bakterií.

Lysogenní bakteriofágy (v klidové fázi, někdy označované jako „spící“ bakteriofágy) jsou schopné vyvolat transdukcii, která může být spíše přínosem pro bakterie, jelikož se mohou přenášet geny ke snížení citlivosti či úplnou rezistenci na antibiotika. Schopnost přechodu do lysogenní fáze mají pouze některé fágy na rozdíl od lytické fáze, do které mohou vstoupit všechny fágy (Castillo, 2019; Weber-Dabrowska, 2016).

5.5.1. Bakteriofágy bakterie *Propionibacterium acnes*

První identifikace těchto bakteriofágů je připisována biochemikovi Miroslavu Brzlinovi (Brzlin, 1964).

Roku 1968 Zierdt a kolektiv (Zierdt a kol., 1974). prvně izolovali **bakteriofág *P. acnes*** s označení **174**, avšak k jeho prozkoumání nedošlo a tyto organismy byly použity k detailnějšímu popisu bakterií rodu *Propionibacterium* a *Corynebacterium*. Objev bakteriofágu 174 přispěl k odlišení *Propionibacterium acnes* od bakterií *Corynebacterium granulosum* a *Corynebacterium avidum*, které na rozdíl od *P. acnes* nevykazovaly fágovou citlivost.

Většina bakteriofágů této bakterie má sifovirovou morfologii, která se vyznačuje izometrickou hlavou a dlouhým ohebným ocasem. Obecně se rozměry hlavy pohybují okolo 67 nm a ocasy s délkou 130 nm. Konkrétní rozměry se však odlišovaly, některé studie uvádí menší fágy s velikostí hlavy 42–44 nm a velikostí ocasu 130 nm (Zierdt a kol., 1974) či větší s velikostí hlavy 90 nm a 175 nm dlouhým ocasem (Webster a Cummins, 1978). Doposud není jasné, co způsobilo rozdíly v morfologii – mohlo se jednat o technické důvody při zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii, avšak nevylučuje se ani existence větších fágů. Výskyt bakteriofágů koreluje s přítomností bakterie *P. acnes* – nejčastěji jsou tedy přítomny v pilosebaceózních jednotkách, dále v dutině ústní či na sliznici GIT.

Roku 2006 byla použita bakteriofágová terapie u lidí na několik typů infekcí a přinesla velice pozitivní výsledky. Samotná léčba akné způsobená bakterií *P. acnes* nebyla testována na lidech. Brown a kolektiv však vyzkoušeli terapeutické účinky fágů na *P. acnes* in vitro s použitím agarových kultivačních destiček s přítomností této bakterie. Bylo použito deset různých bakteriofágů a pro každý z nich byla vytvořena suspenze s koncentrací $2,59 \times 10^{-8}$ PFU/g v krému *Cetomakrogolu*. Bakteriofágy účinně lyzovaly *P. acnes* a v krému zůstaly aktivní až po dobu 90 dní při skladování při teplotě 4 °C a v temnotě. Fágy vykazovaly velkou specifitu – působily pouze na bakterie *P. acnes* a ostatní bakterie rodu *Propionibacterium* nelyzovaly (Brown, 2016).

Další alternativou je využití **fágových endolysinů** namísto celého bakteriofága. Fágové endolysiny mají schopnost degradace buněčné stěny bakterií. Z výzkumu Marinelli a kol. (Marinelli a kol., 2012) vyplývá, že využití endolysinů je ještě mnohem účinnější než samotná fágová terapie, jelikož rezistence vůči endolysinům nebyla zatím hlášena na rozdíl od fágové rezistence, kde bylo pár případů potvrzeno (Weber-Dabrowska, 2016; Brüggemann, 2013).

Kombinací antibiotik s koktejlem fágů lze tedy snížit rezistenci na antibiotika, taktéž fágová terapie vykazuje výhody pouze místního působení bez usmrcení dalších pozitivně působících bakterií lidského organismu, dále snižování tvorby biofilmu a nižší náklady než náklady na ATB léčbu. Je však ale nutné mít na paměti, že mohou být využity pouze fágy v lyzující fázi jejich životního cyklu, jelikož v lysogenní bakteriofágy jsou schopné transdukce, což by mohlo vést ku prospěchu bakterií, a ne jejich usmrcením (Castillo, 2019).

ZÁVĚR

Propionibacterium acnes (dnes již pod názvem *Cutibacterium acnes*) je součástí běžné mikroflóry lidské pokožky. Dojde-li však k narušení rovnováhy mezi jednotlivými mikroorganismy kožního mikrobiomu, hraje hlavní roli v rozvoji zánětlivého kožního onemocnění – *acne vulgaris*, které patří mezi nejčastější kožní choroby. Ačkoliv se jedná o somatické onemocnění, může přispívat k rozvoji psychických onemocnění s příkladem úzkostí či depresí. *Propionibacterium acnes* však nezpůsobuje pouze onemocnění *acne vulgaris*, podílí se i na rozvoji sarkoidózy, infekční endokarditidy a předpokládá se, že má spojitost s rozvojem rakoviny prostaty.

První část bakalářské práce je soustředěna na celý rod *Propionibacterium* – jeho historii, rozdělení do jednotlivých skupin, metabolismus a biosyntézu prospěšných látek vitamínu B₁₂ a kyseliny propionové, díky jejíž produkci získal rod *Propionibacterium* svůj název.

Hlavní část bakalářské práce se především zabývá onemocněním *acne vulgaris*. Zanesená pilosebaceózní jednotka, tedy vlasový folikul s přidruženými mazovými žlázami, mazem a keratocyty tvoří ideální anaerobní prostředí pro množení bakterie *Propionibacterium acnes*. Tato bakterie produkuje látky vedoucí k zánětlivé reakci a následnému prasknutí komedonu. Hlavním faktorem virulence této bakterie je tvorba biofilmu, který zesiluje patogenitu tím, že mění fylogentyp bakterií, které jsou prakticky neléčitelné systémovými antibiotiky a musí tak docházet k jejich chirurgickému odstranění. S tvorbou biofilmu souvisí onemocnění infekční karditida, jelikož *Propionibacterium acnes* mají tendenci přichytávat se na protetické materiály (v tomto případě na umělé chlopně) s následnou tvorbou bakteriálního biofilmu.

Poslední kapitola demonstruje možnosti léčby onemocnění s příkladem nových, dosud ne zcela vědecky probádaných metod, jejichž uplatnění budeme moci pozorovat v následujících letech. Léčbu je možno rozdělit do tří skupin – systémovou, lokální a fyzikální. V případě *acne vulgaris* se především využívá lokální léčby jak antibiotickými preparáty, jakými jsou klindamycin a erytromycin, tak i dalšími antimikrobiálními látkami s příkladem benzoylperoxidu či kyseliny azelaové. Může být i využita léčba fyzikální, a to konkrétně terapie modrým světlem vlnové délky 415 nm, které taktéž působí antimikrobiálně. Pokud tyto metody léčby nezabírají, své uplatnění nachází systémová léčba antibiotiky či systémovými retinoidy. V případě ostatních nemocí se volí systémová léčba antibiotiky a v případě vytvoření bakteriálního biofilmu jeho chirurgické odstranění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AHMADI, N., AMIR, D., DARANI, K. K. a MORTAZAVIAN, A. M. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electronic Journal of Biotechnology* (online). 2017, (28), s. 67-75. [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/j.ejbt.2017.04.004
2. ALEXEYEV, O. A. a JAHNS, A. C. Sampling and detection of skin Propionibacterium acnes: Current status. *Anaerobe* (online). 2012, **18**(5), s. 479-483 [cit. 2020-06-02]. ISSN 10759964. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.07.001
3. ALVAREZ-SÁNCHEZ, M., RODRÍGUEZ-AYALA, E., PONCE-OLIVERA, R. M., TIRADO-SÁNCHEZ, A. a ARELLANO-MENDOZA, M. I. Bacterial resistance in acne? A meta-analysis of the controversy. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)* (online). 2016, **84**(3), s. 190-195 [cit. 2020-06-02]. ISSN 24440507. DOI: 10.1016/j.circen.2016.04.003
4. APARNA, M. S. a YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* (online). 2008, **12**(6), s. 526-530 [cit. 2020-03-16]. ISSN 1413-8670. DOI:10.1590/S1413-86702008000600016
5. AUBIN, G. G., PORTILLO, M. E., TRAMPUZ, A. a CORVEC, S. Propionibacterium acnes, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine et Maladies Infectieuses* (online). 2014, **44**(6), s. 241-250, [cit. 2020-06-02]. DOI: 10.1016/j.medmal.2014.02.004
6. BAGATIN, E., COSTA, C. S., DIAS DA ROCHA, M. A., PICOSSE, F. R., KAMAMOTO, C. S. L., PIRMEZ, R., IANHEZ, M. a MIOT, H. A. Consensus on the use of oral isotretinoin in dermatology - Brazilian Society of Dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia* (online). 2020, **95**, s. 19-38 [cit. 2021-3-25]. ISSN 03650596. DOI: 10.1016/j.abd.2020.09.001
7. BHATIA, A., MAISONNEUVE, J. F. a PERSING, D. H. The Infectious Etiology of Chronic Diseases. *Forum on Microbial Threats* (online). 2004, [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.17226/11026
8. BLASKOVICH, M., ALYSHA, A. T., ELLIOTT, G., KAVANAGH, A. M., RAMU, S. a COOPER, M. A. In vitro Antimicrobial Activity of Acne Drugs Against Skin-Associated Bacteria. *Scientific Reports* (online). 2019, **9**(1) [cit. 2021-2-20]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-019-50746-4
9. BROWN, T. L., PETROVSKI, S., DYSON, Z. A., SEVIOUR, R., TUCCI, J. a MCDOWELL, A. The Formulation of Bacteriophage in a Semi Solid Preparation for Control of Propionibacterium acnes Growth. *PLOS ONE* (online). 2016, **11**(3) [cit. 2020-06-23]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0151184
10. BRÜGGEMANN, H., LOOD, R., CHENG, K.-J., MARCELIN, A.-G., CALVEZ, V. a DUPIN, N. Bacteriophages Infecting Propionibacterium acnes: Microbial Life on Surfaces. *BioMed Research*

- International* (online). 2013, **2013**(4), s. 1-10 [cit. 2020-05-27]. ISSN 2314-6133. DOI: 10.1155/2013/705741
11. BRZIN, B., GEESEY, G. G., CHENG, K.-J., MARCELIN, A.-G., CALVEZ, V. a DUPIN, N. Studies on the *Corynebacterium acnes*: Microbial Life on Surfaces. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* (online). 1964, **60**(4), s. 599-608 [cit. 2020-05-16]. ISSN 03655555. DOI: 10.1111/apm.1964.60.4.599
 12. BURGESS, C. M., SMID, E. J. a VAN SINDEREN, D. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *International Journal of Food Microbiology* (online). 2009, (133), s. 1-7 [cit. 2020-02-02]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012
 13. CASTILLO D.E, NANDA, S. a KERI, J. E. Propionibacterium (*Cutibacterium*) acnes Bacteriophage Therapy in Acne: Current Evidence and Future Perspectives. *Dermatol Ther (Heidelb)* (online). 2019, (9), s. 19-31, [cit. 2020-05-27]. DOI: 10.1007/s13555-018-0275-9
 14. COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., CHENG, K.-J., MARCELIN, A.-G., CALVEZ, V. a DUPIN, N. How Bacteria Stick: Microbial Life on Surfaces. *Scientific American* (online). 1978, **238**(1), s. 86-95 [cit. 2020-05-16]. ISSN 0036-8733. DOI: 10.1038/scientificamerican0178-86
 15. COUSIN, F. J., JOUAN-LANHOUE, S., THÉRET, N., BRENNER, C., JOUAN, E., LE MOIGNE-MULLER, G., DIMANCHE-BOITREL, M.-T. a JAN, G. The probiotic *Propionibacterium freudenreichii* as a new adjuvant for TRAIL-based therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* (online). 2016, **7**(6), s. 7161-7178 [cit. 2020-02-02]. ISSN 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.6881
 16. ČERMÁKOVÁ, M. *Klinická biochemie: 2. díl*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005, s. 164. ISBN 9788070134245.
 17. DEPTULA, P., KYLLI, P., CHAMLAGAIN, B., HOLM, L., KOSTIAINEN, R., PIIRONEN, V., SAVIJOKI, K. a VARMANEN, P. BluB/CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. *Microb Cell Fact* (online). 2015, **14**(186), s. 1-12, [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1186/s12934-015-0363-9
 18. DONLAN, R. M., RAINGEAUD, J., MORELLE, W., MARCELIN, A.-G., CALVEZ, V. a DUPIN, N. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* (online). 2002, **8**(9), s. 881-890 [cit. 2020-03-16]. ISSN 1080-6040. DOI: 10.3201/eid0809.020063
 19. EISHI, Y. Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respiratory Investigation* (online). 2013, **51**(2), s. 56-68 [cit. 2021-02-15]. ISSN 22125345. DOI: 10.1016/j.resinv.2013.01.001
 20. FASSI-FEHRI, L., MAK, T. N., LAUBE, B. a kol. Prevalence of *Propionibacterium acnes* in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology* (online). 2011, **301**(1), s. 69-78 [cit. 2020-06-24]. ISSN 14384221. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.08.014

21. GAUTIER, M. PROPIONIBACTERIUM. *Encyclopedia of Food Microbiology*. France (Rennes): Academic Press, 1999, s. 1850-1857. ISBN 978-0-12-227070-3.
22. GRANGE, P. A., RAINGEAUD, J., MORELLE, W., MARCELIN, A.-G., CALVEZ, V. a DUPIN, N. Characterization of a Propionibacterium acnes Surface Protein as a Fibrinogen-Binding Protein. *Scientific Reports* (online). 2017, **7**(1) [cit. 2020-03-02]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-06940-3
23. HAIDAR, R., DER BOGHOSSIAN, A. a ATIYEH, B. Duration of post-surgical antibiotics in chronic osteomyelitis: empiric or evidence-based? *International Journal of Infectious Diseases* (online). 2010, **14**(9), s. 752-758 [cit. 2020-06-02]. ISSN 12019712. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.01.005
24. HENRIK, U., CARLSSON, J., FALL, K., ANDÉN, O. a DAVIDSSON, S. The influence of prostatic Cutibacterium acnes infection on serum levels of IL6 and CXCL8 in prostate cancer patients. *Infectious Agents and Cancer* (online). 2018, **13**(34), s. 1-7 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1186/s13027-018-0204-7
25. HEUKELEKIAN, H. a HELLER, A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *J Bacteriol.* 1940, **40**, s. 547–580 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1128/JB.40.4.547-558.1940
26. HOLLAND, T. L., BADDOUR, L. M., BAYER, A. S., HOEN, B., MIRO, J. M. a FOWLER, V. G. Infective endocarditis. *Nature Reviews Disease Primers* (online). 2016, **2**(1) [cit. 2020-04-22]. ISSN 2056-676X. DOI: 10.1038/nrdp.2016.59.
27. HOU, T.-Y., CHIANG-NI, CH. a TENG, S.-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis* (online). 2019, **27**(2), s. 404-414 [cit. 2020-09-14]. ISSN 10219498. DOI: 10.1016/j.jfda.2019.01.001
28. CHARACKLIS, W. G. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.* 1973, **7**, s. 1249–1258 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/0043-1354(73)90002-X
29. JAHNS, A. C., EILERS, H. a ALEXEYEV, O. A. Transcriptomic analysis of Propionibacterium acnes biofilms in vitro. *Anaerobe* (online). 2016, (42), s. 111-118. [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2016.10.001
30. JONES, H. C., ROTH, I. L. a Saunders, W. M. III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol.* 1969, **99**, s. 316–325 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1128/JB.99.1.316-325.1969
31. KAKEGAWA, T., BAE, Y., ITO, T., UCHIDA, K., SEKINE, M. a NAKAJIMA, Y. Frequency of Propionibacterium acnes Infection in Prostate Glands with Negative Biopsy Results Is an Independent Risk Factor for Prostate Cancer in Patients with Increased Serum PSA Titers. *PLOS ONE* (online). 2017, **12**(1) [cit. 2020-06-24]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0169984
32. KINATPAPAN, P. a MUROOKA, Y. Genetic manipulation system in propionibacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (online). 2002, **93**(1), s. 1-8 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80045-7

33. KNOBLER S. L., O'CONNOR, S., LEMON, S. M. a kol., Propionibacterium acnes and chronic diseases. The Infectious Etiology of Chronic Diseases: Defining the Relationship, Enhancing the Research, and Mitigating the Effects: Workshop Summary. Washington (DC): *National Academies Press*. [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.17226/11026
34. KOLEK, V. Sarkoidóza – Dosud nepoznaná (2). *Interní medicína pro praxi* (online). 2007, **9** (7-8), s. 10-31 [cit. 2021-01-15]. Dostupné z <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2007/07/02.pdf>
35. LAYTON, A. The use of isotretinoin in acne. *Dermato-Endocrinology* (online). 2014, **1**(3), s. 162-169 [cit. 2021-3-25]. ISSN 1938-1980. DOI: 10.4161/derm.1.3.9364
36. LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases* (online). 2002, **34**(4), s. 482-492 [cit. 2020-06-02]. ISSN 1058-4838. DOI: 10.1086/324626
37. LIESMAN, R. M. a kol. Laboratory Diagnosis of Infective Endocarditis. *Journal of clinical microbiology* (online). 2017, **55**(9), s. 2599-2608. [cit. 2020-4-22]. DOI: 10.1128/JCM.00635-17
38. LINHARTOVÁ, K. Guidelines for the management of infective endocarditis. Summary document prepared by the Czech Society of Cardiology, *Cor et Vasa*, (online). 2016; (58) s. 107–128, [cit. 2020-4-22]. DOI: 10.1016/j.crvasa.2015.12.004
39. MAHTO, A. Acne vulgaris. *MEDICINE* (online). 2017, **45**(6), s. 386-389 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.03.003
40. MACHOVCOVÁ, A. Celkově podávaný isotretinoin v léčbě akné. *Pediatric pro praxi* (online). 2011, **12**(6), s. 394-397 [cit. 2021-3-25]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/06/05.pdf>
41. MARINELLI, L. J., FITZ-GIBBON, S., HAYES, C. a kol. Propionibacterium acnes Bacteriophages Display Limited Genetic Diversity and Broad Killing Activity against Bacterial Skin Isolates. *MBio* (online). 2012, **3**(5) [cit. 2020-06-23]. ISSN 2150-7511. DOI: 10.1128/mBio.00279-12
42. MATIN T. a GOODMAN, M. B. Benzoyl Peroxide. *StatPearls* (online). 2021 [cit. 2021-3-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537220/>
43. MELNIK, B. C. Acne vulgaris: The metabolic syndrome of the pilosebaceous follicle. *Clinics in Dermatology* (online). 2018, **36**(1), s. 29-40 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.006
44. NAKATSUJI, T., LIU, Y.-T., HUANG, C.-P., GALLO, R. L. a HUANG, C.-M. Antibodies Elicited by Inactivated Propionibacterium acnes-Based Vaccines Exert Protective Immunity and Attenuate the IL-8 Production in Human Sebocytes: Relevance to Therapy for Acne Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology* (online). 2008, **128**(10), s. 2451-2457 [cit. 2021-5-20]. ISSN 0022202X. DOI: 10.1038/jid.2008.117

45. NAVONE, L., MCCUBBIN, T. a kol. Genome-scale model guided design of *Propionibacterium* for enhanced propionic acid production. *Metabolic Engineering Communications* (online). 2018, (6), s. 1-12 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1016/j.meteno.2017.11.001
46. NAZZARO-PORRO, M., MAKRANTONAKI, E., GANCEVICIENE, R., DESSINIOTI, C., FELDMAN, S. R. a ZOUBOULIS, CH. C. Azelaic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology* (online). 1987, 17(6), s. 1033-1041 [cit. 2021-5-20]. ISSN 01909622. DOI: 10.1016/S0190-9622(87)70294-1
47. NGUYEN, R. a SU, J. Treatment of acne vulgaris. *Paediatrics and child health. Elsevier* (online). 2010, 21(3), s. 119-125 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.paed.2010.09.012
48. NISCHAL, U., NISCHAL, K. C. a KHOPKAR, U. Techniques of skin biopsy and practical considerations. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* (online). 2008, 1(2) [cit. 2020-06-16]. ISSN 0974-2077. DOI: 10.4103/0974-2077.44174
49. OKUDA K. I., NAGAHORI, R., YAMADA, S. a kol. The Composition and Structure of Biofilms Developed by *Propionibacterium acnes* Isolated from Cardiac Pacemaker Devices. *Front Microbiol* (online). 2018, 9(182) [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.0018
50. PATEL, R., UMEMURA, H. a NAKAYAMA, T. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry* (online). 2015, 61(1), s. 100-111 [cit. 2020-09-14]. ISSN 0009-9147. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
51. PIWOWAREK, K., LIPÍŃSKA, E., HAĆ-SZYMAŃCZUK, E., KIELISZEK, M. a ŚCIBISZ, I. *Propionibacterium* spp. —source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Appl Microbiol Biotechnol* (online). 2018, (102), s. 515-538 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1007/s002253-017-8616-7
52. SAKHAMURU, S., KAMBAMPATI, S., WASIM, S., KUKKAR, V. a MALIK, B. H. The Role of *Propionibacterium acnes* in the Pathogenesis of Sarcoidosis and Ulcerative Colitis: How This Connection May Inspire Novel Management of These Conditions. *Cureus* (online). 2020, 12(10) [cit. 2021-03-15]. ISSN 2168-8184. DOI: 10.7759/cureus.10812
53. SHANNON, J. F. Why do humans get acne? A hypothesis. *Medical Hypotheses*. 2020, (134), s. 1-7. [cit. 2020-03-15]. ISSN 0306-9877. DOI: 10.1016/j.mehy.2019.109412
54. SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm: Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí? *Vesmír*. 2001, 80(4), s. 203-206 [cit. 2020-03-02]. ISSN 1214-4029.
55. TALLY, F. P, CUCHURAL, G. J., BIELUCH, V. M., JACOBUS, N. V. a MALAMY, M. H. Clindamycin resistance in anaerobic bacteria. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1984, 43, s. 34-43 [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/4459949>

56. TSOUKAS, M., ADY, K., INAMADAR, A. a PEI, S. Light-based therapies in acne treatment. *Indian Dermatology Online Journal* (online). 2015, **6**(3) [cit. 2020-06-05]. ISSN 2229-5178. DOI: 10.4103/2229-5178.156379
57. TSUCHIDA, S., UMEMURA, H. a NAKAYAMA, T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules* (online). 2020, **25**(20) [cit. 2020-09-14]. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules25204775
58. TUCHAYI, S. M., MAKRANTONAKI, E., GANCEVICIENE, R., DESSINIOTI, C., FELDMAN, S. R. a ZOUBOULIS, C. C. Acne vulgaris. *Nature Reviews Disease Primers* (online). 2015, **1**(1) [cit. 2021-2-20]. ISSN 2056-676X. DOI: 10.1038/nrdp.2015.29
59. Utilization of 440 nm blue light to target Propionibacterium acnes for treating acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology* (online). 2017, **76**(6) [cit. 2020-06-09]. ISSN 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.04.1079
60. VIKTORINOVÁ, M. a KOUKALOVÁ, D. Bakteriální imunomodulátory využitelné v léčbě chronických dermatóz. *Dermatologie pro praxi* (online). 2007, **2**, s. 60-63 [cit. 2021-2-20]. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2007/02/03.pdf>
61. WANG, Z., XIANG, H., DONG, P., ZHANG, T, LU, C., JIN, T. a CHAI, K. Y. Pegylated azelaic acid: Synthesis, tyrosinase inhibitory activity, antibacterial activity and cytotoxic studies. *Journal of Molecular Structure* (online). 2021, **1224**(6), s. 1033-1041 [cit. 2021-3-01]. ISSN 00222860. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.129234
62. WEBER-DABROWSKA, B., Jończyk-Matysiak, E., ŻACZEK, M., ŁOBOCKA, M., LUSIAK-SZELACHOWSKA, M. a GÓRSKY, A. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Frontiers in microbiology*, (online) 2016, (7), s. 1177 [cit. 2020-05-27]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01177
63. WEBSTER, G. F a CUMMINS, C. S. Use of bacteriophage typing to distinguish Propionibacterium acnes types I and II. *J. Clin. Microbiol.* 1978, **7**, s. 84-90 [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/624772/>
64. WIESER, A. a SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS entering the microbiological diagnostic laboratory – from fast identification to resistance testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (online). 2016, **84**, s. 80-87 [cit. 2020-09-14]. ISSN 01659936. DOI: 10.1016/j.trac.2016.05.013
65. ZHANG, N., ZHANG, L. U. a YING, M. A. Draft genome sequences of three multidrug-resistant Cutibacterium (formerly Propionibacterium) acnes strains isolated from acne patients, China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (online). 2017, (11), s. 114-115 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.10.008

66. ZIERDT, C. H. Properties of *Corynebacterium acnes* bacteriophage and description of an interference phenomenon. *J.Virol.* 1974, **14**, s. 1268-1273 [cit. 2020-05-27]. DOI: 10.1128/JVI.14.5.1268-1273.1974