

**»Mladi za napredek Maribora 2019«  
36. srečanje**

# **VPLIV KOZMETIČNIH PREPARATOV NA RAST PROPIONIBACTERIUM ACNES**

Raziskovalno področje INTERDISCIPLINARNO ( ZDRAVSTVO, BIOLOGIJA)

**Raziskovalna naloga**

PROSTOR ZA NALEPKO

**Avtor: NEJC ŽALER**

**Mentor: MAŠA KOROŠEC, MARINKA TREHTAR, ANDREJA GOLE**

**Šola: SREDNJA ZDRAVSTVENA IN KOZMETIČNA ŠOLA MARIBOR**

**Število točk: 144**

**Mesto: 5**

**Priznanje: srebrno**

**Maribor, 2019**

## Vsebina

1. UVOD .....	6
1.1. CILJI RAZISKOVALNE NALOGE .....	6
1.2. HIPOTEZA.....	6
2. TEORETIČNE OSNOVE .....	7
2.1. <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> .....	7
2.2. OSTALI FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA MOZOLJAVOST .....	8
3. METODE DELA .....	10
3.1. POSTOPEK IN IZVEDBA DELA V LABORATORIJU.....	10
3.1.1. IZVEDBA DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA: .....	14
5. PREGLED REZULTATOV .....	16
6. RAZPRAVA .....	19
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	20
8. ZAKLJUČEK.....	21
9. VIRI .....	22

## Kazalo slik

Slika 1 – Določanje morfologije bakterijskih kolonij ( lastni vir) .....	7
Slika 2 – Bakterijska gojišča ( lastni vir).....	9
Slika 3 - Laminarij ( lastni vir).....	10
Slika 4 - Izolirana – čista kultura <i>P. acnes</i> ( lastni vir).....	11
Slika 5 - Bakterijska gojišča E testov in Difuzijskega antibiograma ( lastni vir).....	12
Slika 6 – Delovni prostor v laboratoriju ( lastni vir) .....	12
Slika 7 – Priprava antibiograma ( lastni vir) .....	14
Slika 8 – Merjenje inhibicijske cone z kljunastim merilom ( lastni vir) .....	14
Slika 9 - Merjenje inhibicijske cone z kljunastim merilom ( lastni vir).....	15
Slika 10 – Anaerobni antibiogram ( E test) Klindamicin in Azitromicin ( lastni vir) ....	15
Slika 11 - Antibiogram Klindamicin in Azitromicin ( lastni vir).....	15
Slika 12 - Merjenje inhibicijske cone z kljunastim merilom ( lastni vir).....	17

## **Kazalo grafov**

Graf 1 - Difuzijski antibiogram - Toniki/preparati.....	16
Graf 2 - Anaerobni antibiogram ( E test) Klindamicin in Azitromicin .....	16

## **Kazalo Tabela**

Tabela 1- Difuzijski antibiogram - Toniki/preparati .....	16
Tabela 2- Anaerobni antibiogram ( E test) Klindamicin in Azitromicin .....	16
Tabela 3- Rezultati anaerobnih E testov .....	20

# 1. UVOD

Med mladimi pa je vedno pogostejša težava mozoljavost in velikokrat mi kdo zastavi vprašanje, kako se znebiti aken. Ker je to področje še precej neraziskano, sem se odločil, da preizkusim učinkovitost nekaterih tonikov, ki pomagajo pri aknavosti ter, da preizkusim tudi učinkovitost dveh najpogosteje uporabljenih antibiotikov, ki jih sodobna medicina uporablja za zdravljenje aken. Marsikdo se posluži tudi naravnih metod, zato sem se odločil, da testiram tudi učinkovitost kamilic. S pomočjo mikrobiološke preiskave ugotovim, kateri kozmetični preparati najbolj učinkujejo in zavirajo rast bakteriji, ki povzroča mozolje (*propionibacterium acnes*). Odvzel sem bris sebuma iz iztisnjene mozolja in ga nanese na gojišče, ter izvedel difuzijski antibiogram in e teste z različnimi kozmetičnimi in naravnimi preparati (toniki in mazili) in na podlagi tega določil uspešnost različnih preparatov. Cilj je bil izbrati preparat, ki bo najbolj zaviral rast bakterije *propionibacterium acnes*.

## 1.1. CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

- Izbrati najučinkovitejši tonik oziroma kozmetični preparat
- Preveriti odpornost mikroorganizmov na antibiotike
- Preveriti odpornost mikroorganizmov na tonike in kozmetične preparate
- Izbrati najučinkovitejši antibiotik

## 1.2. HIPOTEZA

Hipoteza 1: Kamilice bodo delovale antibakterijsko

Hipoteza 2: Toniki bodo vsi tvorili zaviralni obroč (inhibicijsko cono)

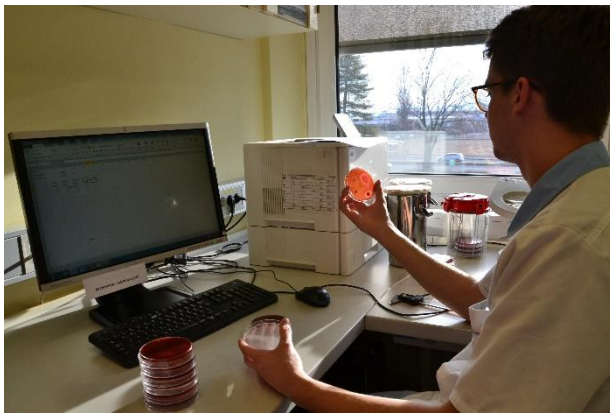
Hipoteza 3: Pri bakterijah ne bo rezistence na antibiotike

Hipoteza 4: Pri bakterijah ne bo rezistence na tonike in ostale kozmetične preparate

## 2. TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1. *PROPIONIBACTERIUM ACNES*

Povzročitelji mozoljev so večinoma *Propionibacterium acnes* ali *Cutibacterium Acnes*. Čeprav je z nastankom mozoljavosti povezanih več faktorjev je okužba pore z mikroorganizmi oziroma *Propionibacterium acnes* najpogostejši razlog za nastanek mozolja.



Slika 1– Določanje morfologije bakterijskih kolonij ( lastni vir)

*Propionibacterium acnes* so aerotoleranten anaeroben mikroorganizem, ki se pozitivno barva po gramu. Je del normalne mikrobne flore na koži človeka, vendar če so ji dani ustrezni pogoji za rast npr. odprta pora napolnjena z sebumom, hitro povzročijo okužbo, ki se kaže v obliki mozoljev.

*Propionibacterium acnes* lahko povzroči tudi vnetje očesne veznice, vendar je takšna okužba redkejša. Bakterijo najdemo globlje v kožnih foliklih in porah, ki so večinoma napolnjene z sebatično tekočino ali sebumom, pogovorno se bomo rečemo tudi loj.

*Propionibacterium acnes* so znane tudi po izločanju propionične kisline, ki tudi poškoduje epiteljske celice povrhnjice naše kože in posledično tudi povzroči vnetje.

## 2.2. OSTALI FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA MOZOLJAVOST

V večini mozoljavost povzroča *P. acnes*, vendar so tukaj tudi drugi dejavniki, ki vplivajo na nastanek mozoljev.

Aknavost se večinoma pojavlja pri mladostnikih, zaradi povečanega izločanja androgenih hormonov, ki vplivajo na uravnavanje izločanja sebuma ter mastenje obraza in tudi razširitev por ali lojnic. Ti dejavniki pa vplivajo na ustreznost pogojev za rast in razmnoževanje bakterij.

Akne nastanejo, ko se pore zamašijo s čepki iz loja in epitelnih celic povrhnjice (epidermisa). Čepki ovirajo odvajanje loja in pore se izbočijo. Tako nastanejo komedoni (ogrci). V zamašene lojnice se naselijo bakterije (*Propionibacterium acnes*). Aknavost lahko poteka v vnetni ali nevnetni obliki. Odvisno je torej, če je v foliklu prisotna bakterija, takrat govorimo o vnetni obliki.

Komedoni so primer nevnetnih aken. Izvodilo lojnice se zamaši in loj se ne more izločati, ter se zato kopiči v lasnem mešičku.

Primeri vnetih aken so papule in ciste. Papule nastanejo, ko encimi lipaze, ki jih izloča *Propionibacterium acnes* razgradijo kompleksne maščobe na proste maščobne kisline. Te maščobne kisline dražijo steno por in sprožijo vnetje.

Pustule nastanejo, ko bakterija povzroči vnetje v celotnem mešičku oziroma pori.

## 2.3. SIMPTOMI IN ZNAKI AKNAVOSTI

Nekatere akne so lahko boleče. Akne so lahko tudi izvor čustvenega stresa in nezadovoljstva.

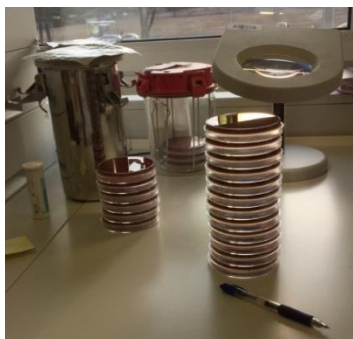
Papule so rdeče bunkice velike 2–6 mm. Pri obeh oblikah sprememb je epiteljska plast kožnih mešičkov poškodovana zaradi kopičenja celic imunskega sistema nevtrofilnih granulocitov in limfocitov. Ko epitelij počni, vsebina komedonov sproži buren imunski odziv v koži, natančneje *dermisu*, ali usnjici kože. Papule nastanejo, kadar je vnetje globoko, če pa je bolj na površini (superficielno), nastanejo pustule.



Ciste so gnojni vozli, napolnjeni s sebatično tekočino. Redkeje se lahko tudi okužijo in tvorijo abscese (ognojke). Dolgotrajne ciste lahko za sabo pustijo tudi velike brazgotine, ki so lahko vidne za celo življenje.

*Acne conglobata* (konglobirane akne) so najhujša oblika aken. Pojavljajo se abscesi ali ognojki. Lahko so prizadeti obraz, lasišče, vrat, hrbet, prsni koš, trebuh ali roke.

*Acne neonatorum* ali aknavost pri novorojenčkih lahko nastane zaradi prehajanja materinih spolnih hormonov skozi posteljico v otrokovo kri. Izginejo v prvem letu otrokove starosti



Slika 2 – Bakterijska gojišča (lastni vir)

### 3. METODE DE LA

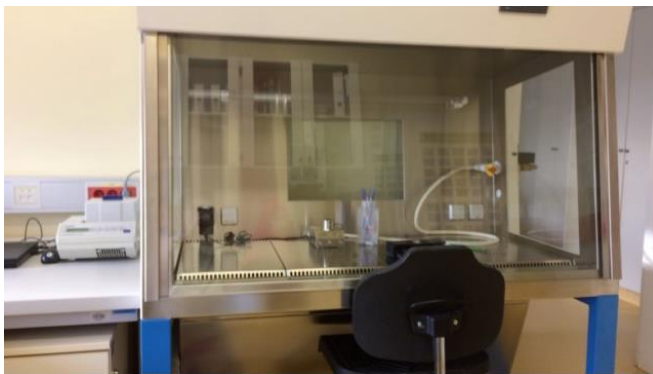
#### 3.1. POSTOPEK IN IZVEDBA DE LA V LABORATORIJU

##### 1. Odvzem brisa sebatične tekočine:

Dvanajstim naključno izbranim dijakom z aknavo kožo smo odvzeli brise sebuma. S sterilnimi rokavicami smo iztisnili sebum iz mozolja in ga obrisali z vatirano palčko iz transportnega gojišča. Transportno gojišče je epruvetka, napolnjena s posebnim gelom (agariose), ki vsebuje hranilne snovi za zagotovitev potrebnih pogojev za preživetje bakterij ob transportu do laboratorija.

Delo je bilo izvedeno aseptično, torej s preprečevanjem kontaminacije kože in gojišča.

POSTOPEK: Predel okrog mozolja smo obrisali z alkoholnim zložencem in pustili predel kože, da se posuši. Pravilno ter po aseptičnem postopku smo si naredili sterilne rokavice in iztisnili sebum iz mozolja ter ga takoj obrisali z vatirano palčko iz transportnega gojišča ter gojišče zaprli. Postopek smo ponovili pri vseh 12 dijakih.



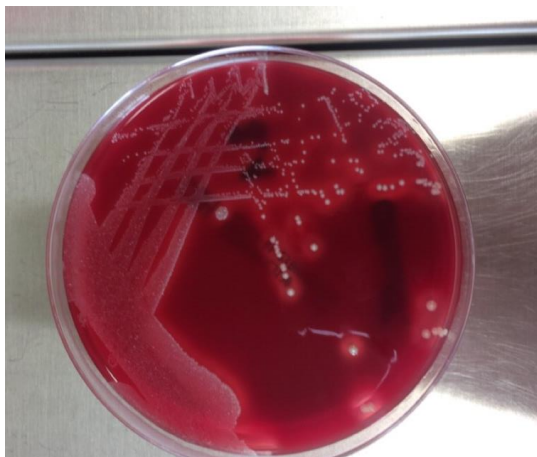
*Slika 3 - Laminarij (lastni vir)*

##### 2. Izolacija čiste kulture

Vse vzorce iz transportnih gojišč smo v laboratoriju suspendirali v posebnih tekočih gojiščih Natrijevega tioglikolata (Sodium thioglycolate). Pravtako smo kulturo nacepili tudi na trdo gojišče COH, krvni agar, sest. iz goveje ali konjske krvi ter aditivi.

Nacepljena gojišča so bila inkubirana v CO<sub>2</sub> inkubatorju (trda gojišča). Preostali del gojišč smo inkubirali pod anaerobnimi pogoji, torej s pomočjo sistema GenBox-anaer

(v posebnem anaerobnem loncu). Po dveh dneh inkubacije smo postopek ponovili ... Precepljali smo seve, dokler nismo dobili čiste kulture *Propionibacterium acnes*.



Slika 4- Izolirana – čista kultura *P. acnes* (lastni vir)

### 3. Določitev čiste kulture in genska identifikacija s sistemom Bruker

Ko smo kulture precepili, smo dobili čiste precepljene seve, ki jih je bilo potrebno identificirati zaradi relevantnosti podatkov. Ker v laboratoriju uporabljajo bakteriološko identifikacijsko metodo s pomočjo aparata Bruker, smo identifikacijo bakterij izvedli po tej poti.

Iz trdega gojišča smo s sterilno cepilno zanko (ezo) odvzeli vzorec ene kolonije iz zadnjega (najbolj razrečenega) kvadranta iz gojišča, tako da smo dobili vzorec posamezne bakterijske vrste. Kasneje smo vzorec namazali na posebno ploščico, ki smo jo kasneje vstavili v aparat. Na vsak razmaz vzorca smo nanесли tudi posebno fiksacijsko raztopino ter mravljično kislino, ki je esencialna za izvedbo analize. Ko so se preparati do konca posušili, smo jih s pomočjo Brukerja (bakteriološkega analizatorja) identificirali.

**BAKTERIOLOŠKI ANALIZATOR BRUKER:** Je naprava, ki nam omogoča bakteriološko specifikacijo in identifikacijo. Podobna je nekaterim PCR-jem, vendar je metoda dela z njo veliko hitrejša ter zanesljivejša pri identifikaciji mikroorganizmov v mikrobiologiji.

Sevi, ki so bili pozitivni na *Propionibacterium acnes*, so šli naprej v inkubacijo, sevi, ki pa še niso bili identificirani pozitivno, so bili precepleni za ponovno izolacijo *P. acnes*. Ko smo vsa gojišča identificirali pozitivno na rod *Propionibacterium acnes* smo se lotili izvedbe difuzijskih antibiogramov ter anaerobnih e-testov.

#### 4. Izvedba difuzijskega antibiograma s toniki



Slika 5- Bakterijska gojišča E testov in Difuzijskega antibiograma ( lastni vir)

#### PRIPRAVA MATERIALA:

Priprava materiala za antibiogram

- A. Z luknjačem smo iz filter papirja izrezali papirnate diske.
- B. Diske smo dali v steklene petrijevke in jih avtoklavirali 15 minut na 121°C
- C. Ko so se ohladili na sobno temperaturo, smo jih aseptično (ob plamenu gorilnika) namočili z različnimi pripravki za nego aknaste kože.



Slika 6– Delovni prostor v laboratoriju ( lastni vir)

Uporabili smo naslednje:

1. BIODROGA, PURAN FORMULA – koncentrat

Sestavine: voda, glicerin, koncentrat plahtice, salicilna kislina, levulinska kislina, koncentrat ognjiča, polisorbit 80, arginin, benzil alkohol, žveplo, natrijev klorid, terpentin, citronska kislina, natrijev benzoat, ekstrakt magnolije

2. BABOR, THERMAL TONING ESSENCE

Sestavine: voda, propanediol, fenoksietanol, panteol, etilheksilglicerin, kalijev sorbat, ekstrakt in sok listov *Aloe barbadensis*, dinatrijev EDTA, polyquaternium-51, bioflavonoidi, ekstrakt brokolija, citronska kislina, pantolactone

3. AFRODITA, ACNE – čistilna pena

Sestavine: voda, coco-glukozid, natrijev Laureth sulfat, natrijev Laureth 8-sulfat, magnezijev Laureth 8-sulfat, natrijev Oleth sulfat, magnezijev Oleth sulfat, glicerin oleat, propilen glikol, diazolidinil urea, citronska kislina, benzil salicilat, heksil cinamaldehyd, parfum

4. POPAREK IZ KAMILICE *Matricaria chamomilla*

- D. Petrijevke z namočenimi diski smo dali za 2 uri v suhi sterilizator na 50°C, da je odvečna tekočina izparela.
- E. Diske smo antiseptično prenesli na gojišča s čisto kulturo bakterij *P. acnes*. Preden smo diske nanegli, smo na spodnji strani petrijevke označili s črkami mesta, kamor smo položili diske.
- F. Gojišča smo inkubirali na 37,0 stopinj in po končani inkubaciji izmerili zaviralne obročje oziroma inhibicijske cone okoli diskov.

### 3.1.1. IZVEDBA DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA:

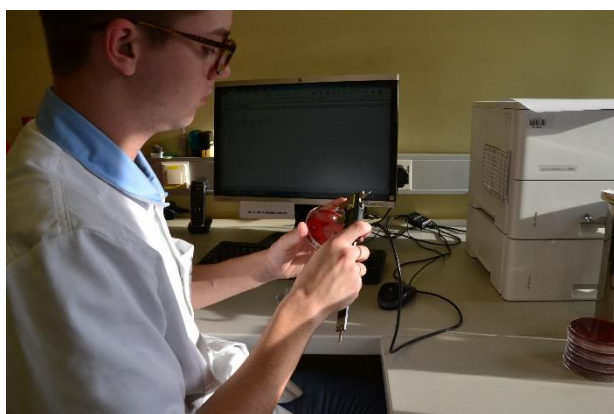
Čiste kulture *P. Acnes* sem nanesel na trda gojišča COH in nanj porazdelil diske iz filterpapirja, namočene v različne tonike. Kasneje sem vse skupaj termostatiral v inkubatorju na 37,0 stopinj Celzija. Po dveh dneh sem s kljunastim merilom izmeril inhibicijsko cono (zaviralni obroč) okrog diskov.



*Slika 7– Priprava antibiograma ( lastni vir)*



*Slika 8– Merjenje inhibicijske cone z kljunastim merilom ( lastni vir)*



*Slika 9- Merjenje inhibicijske cone z kljunastim merilom ( lastni vir)*

### 3.1.2. IZVEDBA E TESTOV ANTIBIOGRAM Z ANTIBIOTIKOMA (KLINDAMICIN IN AZITROMICIN)

Najprej sem na trda gojišča nanesele čisto kulturo *P. Acnes* vseh 12 vzorcev in nanje s posebnim vakuumskim sistemom položil testna stripa na kvadrant 1. Klindamicin in na kvadrant 2. Azitromicin. Kasneje sem vse skupaj prav tako dal v termostat na 37,0 stopinj Celzija in termostatiral dva dni. Po dveh dneh sem odčital rezultate in izmeril inhibicijo.



*Slika 10– Anaerobni antibiogram ( E test) Klindamicin in Azitromicin ( lastni vir)*



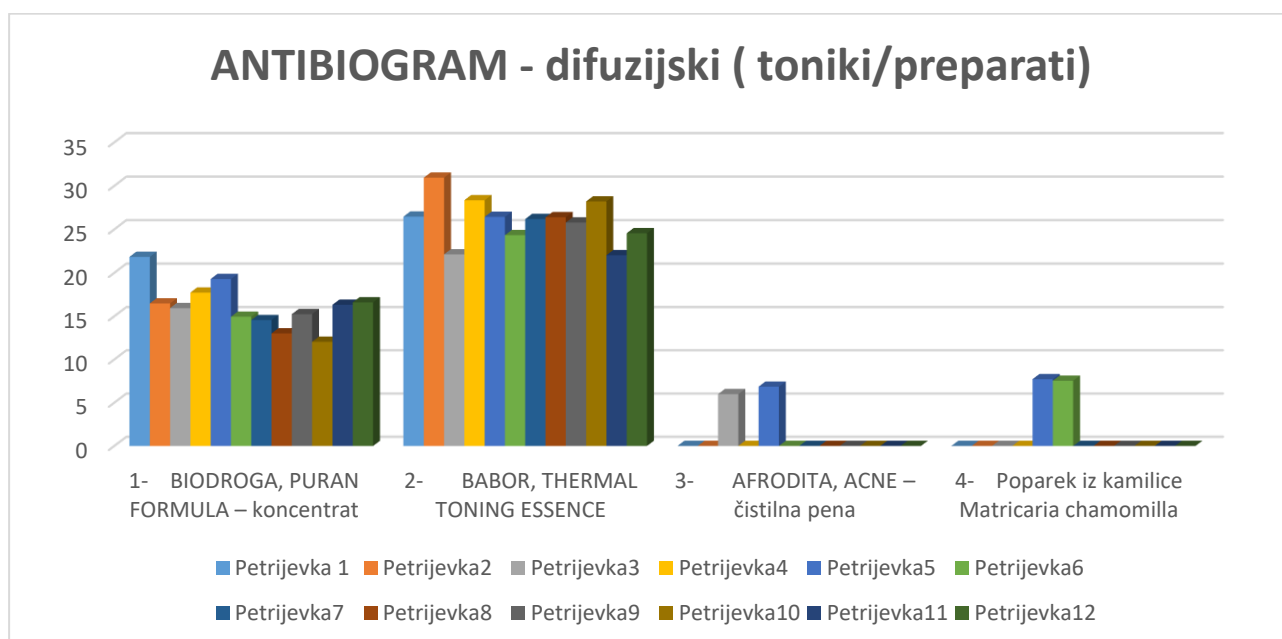
*Slika 11- Antibiogram Klindamicin in Azitromicin ( lastni vir)*



## 5. PREGLED REZULTATOV

	Petri 1	Petri 2	Petri 3	Petri 4	Petri 5	Petri 6	Petri 7	Petri 8	Petri 9	Petri 10	Petri 11	Petri 12
1- BIODROGA, PURAN FORMULA – koncentrat	21,84	16,48	15,94	17,73	19,29	14,94	14,55	13,02	15,24	12,04	16,32	16,6
2- BABOR, THERMAL TONING ESSENCE	26,46	30,94	22,12	28,35	26,43	24,33	26,19	26,39	25,78	28,21	22,03	24,55
3- AFRODITA, ACNE – čistilna pena	R	R	5,99	R	6,85	R	R	R	R	R	R	R
4- Poparek iz kamilice <i>Matricaria chamomilla</i>	R	R	R	R	7,72	7,54	R	R	R	R	R	R

Tabela 1- Difuzijski antibiogram - Toniki/preparati



Graf 1 - Difuzijski antibiogram- Toniki/preparati

Najbolje od tonikov oziroma preparatov je delovall Babor Thermal Toning Essence, saj so rezultati difuzijskega antibiograma pokazali največjo uspešnost in največjo inhibicijsko cono. Tudi tonik Biodroga Puran Formula je v vseh primerih ustvaril zaviralni obroč (inhibicijsko cono) vendar nekoliko manjši kot Babor Thermal Toning Essence, ki je pokazal najboljše rezultate.

Kot je razvidno iz grafov tonik Afrodita Acne ni bil učinkovit v večini primerov ali pa je bila inhibicijska cona minimalnega premera. Preparat iz kamilic se tudi ni najbolje obnesel, saj je bila rezistenca prisotna skoraj v vseh primerih. Kar je lepo vidno iz tabele 1 in grafa 1.

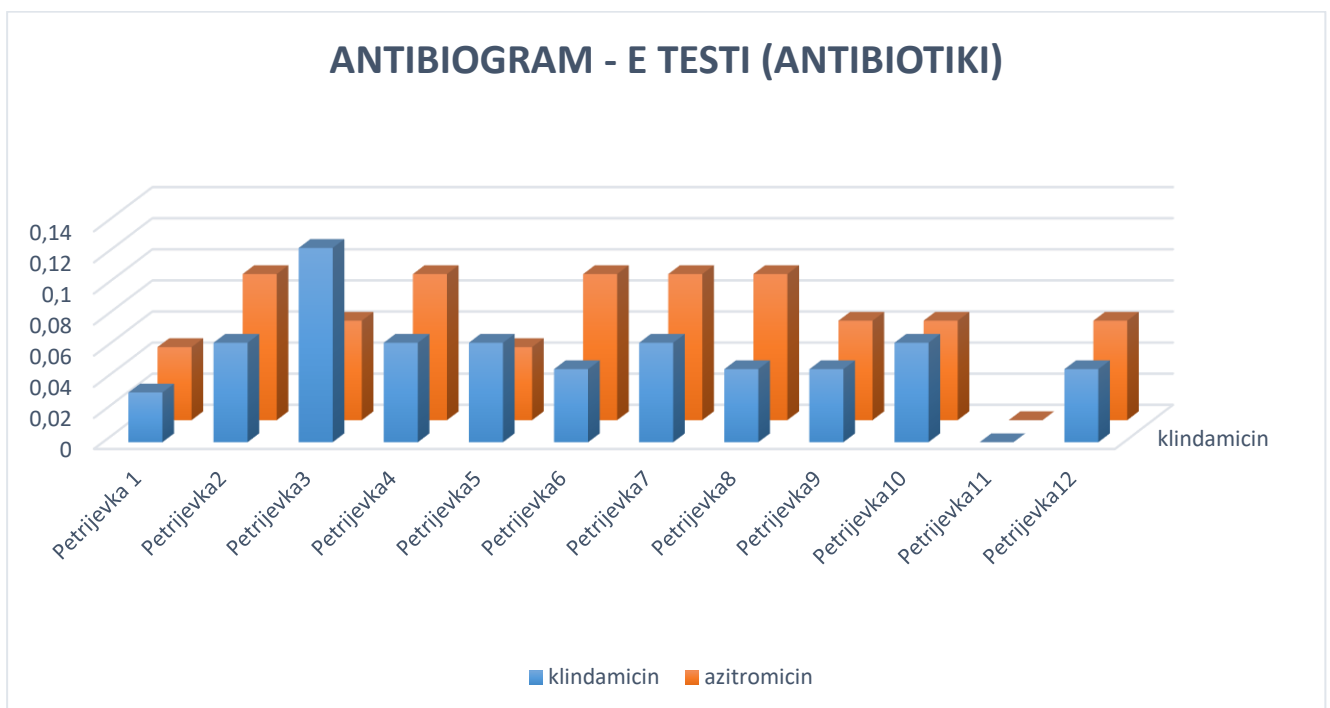




Slika 12- Merjenje inhibicijske cone z kljunastim merilom ( lastni vir)

	Petri 1	Petri 2	Petri 3	Petri 4	Petri 5	Petri 6	Petri 7	Petri 8	Petri 9	Petri 10	Petri 11	Petri 12
klindamicin	0,032	0,064	0,125	0,064	0,064	0,047	0,064	0,047	0,047	0,064	R	0,047
azitromicin	0,047	0,094	0,064	0,094	0,047	0,094	0,094	0,094	0,064	0,064	R	0,064

Tabela 2- Anaerobni antibiogram ( E test) Klindamicin in Azitromicin



Graf 2- Anaerobni antibiogram ( E test) Klindamicin in Azitromicin

Antibiotiki so po pričakovanjih pokazali uspešne rezultate, saj se je rezistenca pojavila le v enem primeru. Iz tega primera sklepam, da se je dijak, katerega sebum je bil odvzet zdravil z nekaterimi antibiotiki, saj so sevi bili odporni (rezistentni) na oba antibiotika. (klindamicin in azitromicin).

V ostalih primerih pa sta se antibiotika izkazala kot zelo učinkovita. Presenetljivo je tudi azitromicin dobro konkuriral klindamicinu, čeprav prvotno ni namenjen zdravljenju aken in se ne uporablja tako pogosto kot klindamicin.

## 6. RAZPRAVA

**Hipoteza 1:** Kamilice bodo delovale antibakterijsko.

Hipotezo smo ovrgli, saj je bila rezistenca prisotna skoraj pri vseh primerih.

**Hipoteza 2:** Toniki bodo vsi tvorili zaviralni obroč (inhibicijsko cono)

Hipotezo smo ovrgli, saj vsi toniki niso tvorili inhibicijske cone.

Najbolje se je obnesel tonik Babor Thermal Toning Essence, saj je tvoril največji zaviralni obroč oziroma inhibicijsko cono.

**Hipoteza 3:** Pri bakterijah ne bo rezistence na antibiotike

Hipotezo smo ovrgli, saj se je pri enem primeru pojavila tudi rezistenca na oba antibiotika.

**Hipoteza 4:** Pri bakterijah ne bo rezistence na tonike in ostale kozmetične preparate

Hipotezo smo ovrgli, saj se je rezistenca večkrat pojavila. To me je presenetilo, saj sem pričakoval inhibicijo pri preparatu iz kamilic, saj so kamilice znane po svojem antiseptičnem delovanju, zaradi svojih eteričnih olj. Vendar so rezultati, ki smo jih dobili le rezultati IN VITRO in ne morejo pokazati učinka na živem organizmu.

Najučinkovitejši preparat je bil Babor Thermal Toning Essence, saj je imel v vseh primerih največjo inhibicijsko cono od vseh tonikov in preparatov.

	Petri 1	Petri 2	Petri 3	Petri 4	Petri 5	Petri 6	Petri 7	Petri 8	Petri 9	Petri 10	Petri 11	Petri 12	povprečje
klindamicin	0,032	0,064	0,125	0,064	0,064	0,047	0,064	0,047	0,047	0,064	R	0,047	0,06045455
azitromicin	0,047	0,094	0,064	0,094	0,047	0,094	0,094	0,094	0,064	0,064	R	0,064	0,07454545

*Tabela 3 – Rezultati anaerobnih E testov*

Od antibiotikov je bil glede na povprečje najučinkovitejši Klindamicin, saj je bil njegov koncentracijski gradient v večini primerov nižji od azitromicina. Kar smo tudi pričakovali.

## 7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Glede na rezultat primera petrijevke 11, kjer so bili sevi rezistentni na oba antibiotika menim, da prekomerna uporaba antibiotikov tudi v primeru aknavosti ni priporočljiva, saj s tem nastaja vedno več odpornih bakterij. Pri uporabi antibiotikov je potrebno upoštevati navodila specialista dermatologa, saj se le tako izognemo neželenim posledicam nepravilne uporabe.

Tonike je prav tako potrebno uporabljati v skladu z navodili proizvajalca in farmacevta. Pomembno je tudi, da z uporabo tonikov ne pretiravamo, saj lahko prav tako kot antibiotiki negativno vplivajo na naš organizem in tudi poškodujejo povrhnjo plast kože, saj vse kar apliciramo na kožo se absorbira tudi v krvni obtok.

## 8. ZAKLJUČEK

Rezultati so se zelo razlikovali od mojih pričakovanj. Moremo pa tudi upoštevati, da rezultati IN VITRO niso enaki, kot IN VIVO torej na živem organizmu, kar je ključnega pomena pri vrednotenju teh rezultatov. Raziskoval sem samo z enim mikroorganizmom, kar je še dodatna pomanjkljivost, saj našo kožno floro sestavljajo še drugi mikroorganizmi, ki so večkrat prav tako odgovorni za nastanek mozoljev.

Za nastanek aken pa so tudi kot že omenjeno pomembni različni dejavniki kot so prehrana, izločanje sebuma, odprtost por, hormonsko ravnovesje..

Teh dejavnikov prav tako nisem mogel testirati IN VITRO, saj bi za to bil potreben preizkus na živem človeku česar pa nismo izvajali, zato so rezultati raziskav sicer pravilni vendar za takšno temo pomanjkljivi.

## 9. VIRI

- **Microbiology : a photographic atlas for the laboratory**

Alexander, Steve K.; Strete, Dennis, San Francisco: Benjamin Cummings, 2001

- [en.wikipedia.org](https://en.wikipedia.org)- 5.2.2019