

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Medicinski fakultet
Stomatološki fakultet

Ivana Orešković, Mislav Mokos, Dora Vlašić

Utjecaj psihičkog stresa na razinu prirodnog ovlaživača kože u studentskoj populaciji

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ivone Jakaša i prof. dr. sc. Branke Marinović i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

POPIS KRATICA

- AMP – antimikrobni peptidi
- APC – engl. *antigen-presenting cells*, antigen-predočne stanice
- BLMH – bleomicin hidrolaza
- BM – engl. *basal membrane*, bazalna membrana
- *cis*-UCA – engl. *cis*-urocanic acid, *cis*-urokanska kiselina
- DAD – engl. *diode array detector*, detektor s nizom dioda
- DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina
- HBD – humani β -defenzin
- HIS – histidin
- HPA – engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, osovina hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda
- IFN – interferon
- IL – interleukin
- LC – engl. *liquid chromatography*, tekućinski kromatograf
- LS – Langerhansove stanice
- NMF – engl. *natural moisturizing factor*, prirodni ovlaživač kože
- PCA – engl. *pyroglutamic acid*, piroglutaminska kiselina
- PSS – engl. *Perceived Stress Scale*, skala percepcije stresa
- ROS – engl. *reactive oxygen species*, reaktivni kisikovi spojevi
- SASP – engl. *skin-specific retroviral-like aspartic protease*, retrovirusna asparaginska proteaza specifična za kožu
- SB – *stratum basale*
- SC – *stratum corneum*
- SD – standardna devijacija
- SG – *stratum granulosum*
- SS – *stratum spinosum*
- TEWL – engl. *transepidermal water loss*, transepidermalni gubitak vode

- TNF – engl. *tumor necrosis factor*, čimbenik nekroze tumora
- *trans*-UCA – engl. *trans-urocanic acid*, *trans*-urokanska kiselina
- UV – engl. *ultraviolet*, ultraljubičasto

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kožna barijera	1
1.1.1. Struktura kožne barijere	1
1.1.2. Funkcija kožne barijere	4
<i>1.1.2.1. Zaštita od gubitka vode i elektrolita</i>	4
<i>1.1.2.2. Zaštita od mikroorganizama i imunološka zaštita</i>	4
<i>1.1.2.3. Mehanička zaštita</i>	5
<i>1.1.2.4. Zaštita od prodora toksina i ostalih kemijskih supstanci u kožu</i>	5
<i>1.1.2.5. Zaštita od ultraljubičastog svjetla</i>	5
1.1.3. Prirodni ovlaživač kože	6
1.2. Psihički stres	7
1.2.1. Utjecaj psihičkog stresa na homeostazu kožne barijere	9
1.3. Tape stripping	10
2. HIPOTEZA	11
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	11
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1. Ispitanici	12
4.2. Upitnik percepcije stresa	12
4.3. Uzorkovanje rožnatog sloja kože	13
4.4. Kemikalije	13
4.5. Određivanje sastojaka prirodnog ovlaživača kože	15
4.5.1. Ekstrakcija sastojaka prirodnog ovlaživača kože	15
4.5.2. Kromatografska analiza sastojaka prirodnog ovlaživača kože	15
4.5.3. Određivanje količine uzorkovanog rožnatog sloja	16
4.6. Obrada podataka	17
5. REZULTATI	17
5.1. Sociodemografska obilježja ispitanika	17
5.2. Indeks stresa	18
5.3. Degradacijski produkti proteina filagrina	23

6. RASPRAVA.....	31
7. ZAKLJUČCI.....	36
8. ZAHVALA.....	37
9. POPIS LITERATURE.....	38
10. SAŽETAK.....	43
11. SUMMARY.....	45
12. ŽIVOTOPIS.....	47

1. UVOD

1.1. Kožna barijera

1.1.1. Struktura kožne barijere

Koža je najveći ljudski organ koji je znatno više od mehaničke barijere prema okolišu. Naime, u koži se kontinuirano odvijaju brojni fiziološki procesi koji su posljedica utjecaja različitih vanjskih i unutarnjih čimbenika.

Koža se sastoji od epidermisa, dermisa i potkožnog masnog tkiva (Marinović, 2014). Svi slojevi kože čine kožnu barijeru u širem smislu; međutim, uvriježeno je da se kožnom barijerom u užem smislu smatra epidermalna barijera, odnosno površinski, rožnati sloj epidermisa (lat. *stratum corneum*) (Jensen i Proksch, 2009).

Epidermis čini više slojeva (lat. *stratum*) keratinocita koji su sljedećim redom poredani od najdublje do najpovršnijega: *stratum basale* (temeljni sloj), *stratum spinosum* (nazubljeni sloj), *stratum granulosum* (zrnati sloj), *stratum lucidum* (svijetli sloj) i *stratum corneum* (rožnati sloj) (Marinović, 2014) (Slika 1.).

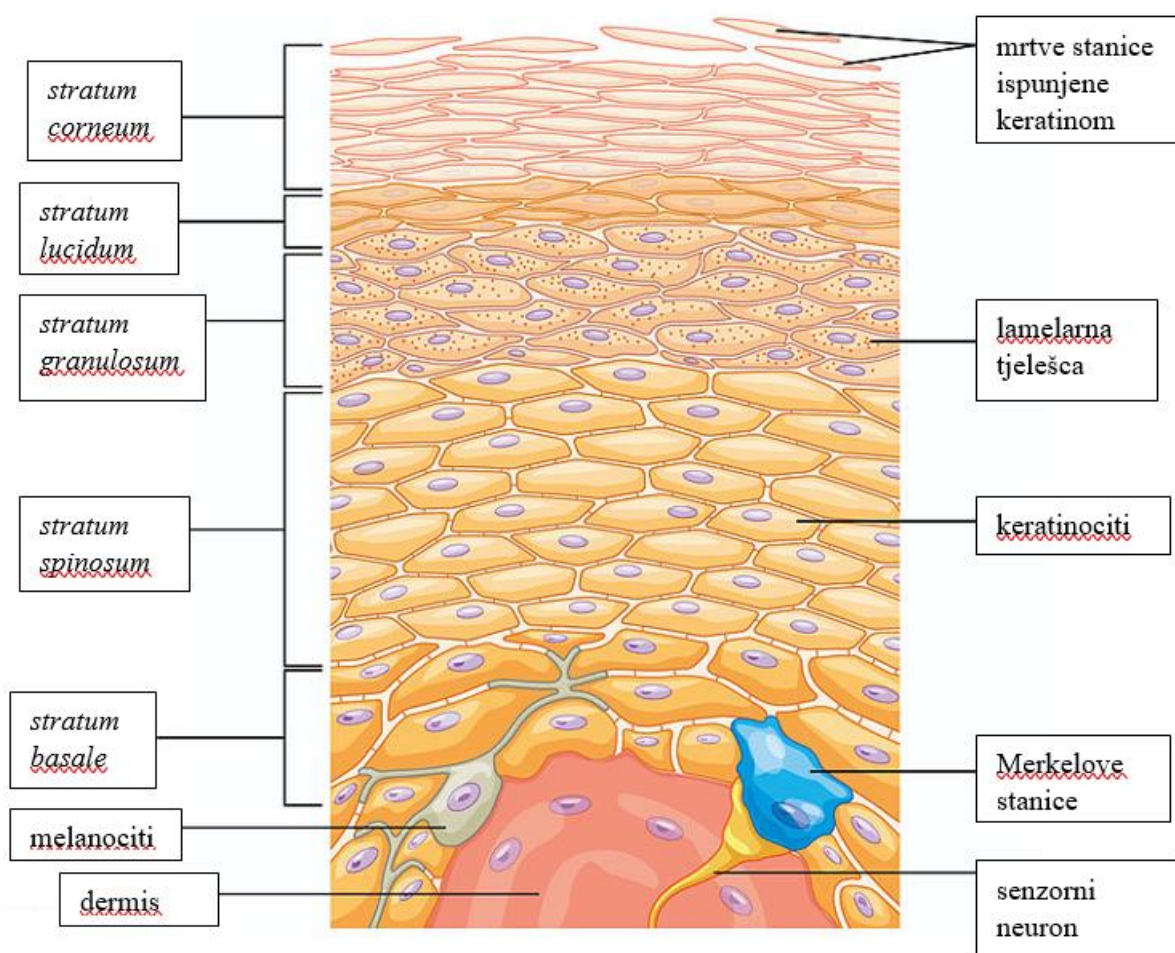
Stratum basale čini jedan red cilindričnih stanica koje sadrže veliku jezgru i oskudnu citoplazmu. Stanice temeljnog sloja međusobno su i sa stanicama nazubljenog sloja povezane dezmosomima, a s bazalnom membranom hemidezmosomima (Vandergriff i Bregstresser, 2012). Mitotskom diobom stanica temeljnog sloja nastaju ostali slojevi epidermisa, a nakon diobe slijedi proces koji se naziva orožnjenje ili keratinizacija. Osim keratinocita, u *stratum basale* nalaze se i dendritičke, nekeratinizirajuće stanice i to melanociti koji stvaraju pigment melanin, te Merkelove stanice, mehanoreceptori neophodni za osjet dodira. *Stratum spinosum* čini tri do sedam redova pločastih keratinocita. Keratinociti u ovom sloju imaju velike svijetle jezgre jer sintetiziraju mnoštvo citokeratina, keratinskih proteina intracitoplazmatskog citoskeleta, čijom agregacijom nastaju tonofibrili, proteini koji formiraju dezmosome. U *stratum spinosum* se osim keratinocita nalaze i imunološki kompetentne Langerhansove stanice (Marinović, 2014; Jensen i Proksch, 2009; Vandergriff i Bregstresser, 2012). *Stratum granulosum* čini 2 - 4 reda keratinocita koji u svojoj citoplazmi sadrže keratohijalinske granule. *Stratum lucidum* može se pronaći samo u preparatima deblje kože, poput one na dlanovima i tabanima. Ovaj sloj kože čini tri do pet slojeva odumrlih

keratinocita čije citoplazme sadržavaju veću količinu eleidina, vrste keratina specifičnog za *stratum lucidum*. Keratinociti su u *stratum lucidum* okruženi mnoštvom lipofilnih molekula koji se u ekstracelularnom matriksu nalaze kao posljedica egzocitoze lamelarnih tjelešaca (Arda i sur., 2014).

Vanjski sloj epidermisa je *stratum corneum* koji ima glavnu ulogu u epidermalnoj barijeri. Sastoji se od 15-30 slojeva denukleiranih korneocita okruženih međustaničnim lipidima, pa se stoga izgled ovog sloja uspoređuje sa zidom od cigle i cementa, pri čemu su korneociti cigle, a međustanični lipidi cement (Serge, 2006). U dubljim slojevima *stratum corneum* keratinociti su povezani korneodermosomima, dok u površinskom dijelu rožnatog sloja nema korneodezmosoma što omogućuje ljuštenje zrelih korneocita s površine kože (Matsui i Amagai, 2015). Korneociti su ispunjeni keratinom i filagrinom, a njihova ovojnica je građena od umreženih proteina, među kojima su najzastupljeniji involukrin, lorokrin i kornifin. U procesu sinteze filagrina ključnu ulogu imaju keratohijalinske granule koje se nalaze u keratinocitima zrnatog sloja. One sadrže profilagrin u fosforiliranom obliku, a procesom defosforilacije iz profilagrina nastaje filagrin. Nakon otpuštanja iz keratohijalinskih granula, filagrin se veže na filamente keratina te neke druge proteine kao što su lorikrin i involukrin, koji se nalaze u citoplazmi korneocita (Candi i sur., 2005). Konačno se filagrin razgrađuje do aminokiseline male molekularne težine te njihovih metaboličkih produkata poput *trans*-urokanske i piroglutaminske kiseline, koji su glavni sastojci tzv. prirodnog ovlaživača kože (engl. *natural moisturizing factor*, NMF) (Kezic i sur., 2008). Pa tako aminokiseline i njihovi metabolički produkti doprinose gotovo 50 % ukupnoj količini NMF-a.

Međustanični matriks rožnatog sloja čine nepolarni lipidi, uključujući kolesterol, slobodne masne kiseline i ceramide. Zbog svojih hidrofobnih svojstava ovi lipidi najznačajniji su u sprječavanju povećanog transepidermalnog gubitka vode (engl. *transepidermal water loss*, TEWL) (Vandergriff i Bregstresser, 2012) te predstavljaju permeabilnu barijeru rožnatog sloja. Lipidi međustaničnog matriksa nastaju djelovanjem hidrolitičkih enzima na njihove polarne prekursore (kolesterol-sulfat, fosfolipide i glukozil-ceramide) koji se nalaze u lamelarnim (Odlandovim) tjelešcima. Lamelarna tjelešca se formiraju u *stratum spinosum*, a u međustanični prostor rožnatog sloja isporučuju svoj sadržaj koji je temelj za stvaranje serije lipidnih lamela građenih od dvije faze, duge i kratke periodične faze (Archer, 2010).

Dermis se sastoji od dva sloja, površnijeg ili papilarnog dermisa te dubljeg ili retikularnog dermisa. Dermis je građen od mnoštva kolagenih, elastičnih i retikularnih vlakana te ekstracelularnog matriksa. U retikularnom dermisu nalaze se i dlačni folikuli, žlijezde znojnice, žlijezde lojnice, nokti i krvne žile. Papilarni dermis građen je od rahlijeg vezivnog tkiva i histološki ga karakteriziraju prstoliki izdanci prema epidermisu (papile) koji omogućuju tijesnu povezanost dermisa i epidermisa (Archer, 2010). Između dermisa i epidermisa nalazi se bazalna membrana, tanak potporni sloj retikularnih vlakana i proteina koji pruža potporu stanicama i omogućuju njihovo prianjanje, migraciju i diferencijaciju (Marinović, 2014; Vandergriff i Bregstresser, 2012).



Slika 1. Prikaz građe epidermisa (modificirano prema Betts i sur., 2013).

1.1.2. Funkcija kožne barijere

Najznačajnije funkcije kožne barijere su zaštita od utjecaja vanjskih štetnih čimbenika koji mogu biti biološki, fizikalni ili kemijski. Većina funkcija kože temelji se na očuvanoj strukturi i funkciji rožnatog sloja epidermisa.

1.1.2.1. *Zaštita od gubitka vode i elektrolita*

Intercelularni matriks rožnatog sloja sadrži ceramide, kolesterol i slobodne masne kiseline koji imaju hidrofobna svojstva, pa sprječavaju prekomjerni TEWL. Nadalje, NMF čini 20-30 % suhe tvari korneocita, te upijajući i zadržavajući vodu održava hidrataciju kože i stabilan pH, te pridonosi očuvanju integriteta rožnatog sloja (Archer, 2010).

1.1.2.2. *Zaštita od mikroorganizama i imunološka zaštita*

Zaštita od prodora mikroorganizama u kožu ostvaruje se djelovanjem brojnih čimbenika. Na površini epidermisa nalaze se sebacealni lipidi, glikofosfolipidi i slobodne masne kiseline koji imaju antibakterijska svojstva. Dodatno, u koži se sintetiziraju antimikrobni peptidi (AMP) koji imaju izravan antimikrobni učinak na širok spektar bakterija, gljiva i virusa, te djeluju imunomodulacijski u reakcijama urođene i stečene imunosti (Jensen i Proksch, 2009). Antimikrobni peptidi uključuju dvije obitelji, katelicidine i defenzine, pri čemu se razlikuju α -defenzini i β -defenzini. Primarno se katelicidini u koži nalaze u inaktivnom obliku, a djelovanjem proteinaza i neutrofilne elastaze nastaje LL37, aktivan oblik katelicidina. LL37 djeluje antimikrobno, imunomodulacijski te kemotaksijski na različite upalne stanice. Nadalje, keratinociti luče humane β -defenzine (HBD) 1-4 koji djeluju antimikrobno te potiču kemotaksiju nezrelih dendritičkih stanica i memorijskih T-limfocita što rezultira lučenjem histamina i prostoglandina D2 iz mastocita (Nguyen i sur., 2020).

Važnu imunološku funkciju u koži imaju Langerhansove stanice (LS), koje, uz mononuklearne fagocite, B-stanice i limfoidne dendritičke stanice imaju funkciju antigen-predočnih stanica (engl. *antigen-presenting cells*, APC), koje potiču antigen-specifičan T-stanični odgovor (Vandergriff i Bregstresser, 2012).

Nadalje, keratinociti mogu sintetizirati brojne citokine koji sudjeluju u imunološkim odnosno upalnim procesima, uključujući interleukine (IL) kao što su IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) - α , te interferon (IFN) - α i - β (Hänel i sur., 2013).

1.1.2.3. Mehanička zaštita

Za funkciju mehaničke zaštite kože odgovoran je *stratum corneum*, odnosno čvrsta proteinska ovojnica korneocita te korneosomi. Nadalje, u dermisu se nalaze kolagen i elastična vlakna koja štite od mehaničkih ozljeda (Jensen i Proksch, 2009; Vandergriff i Bregstresser, 2012).

1.1.2.4. Zaštita od prodora toksina i ostalih kemijskih supstanci u kožu

Očuvan *stratum corneum*, odnosno čvrsto povezani korneociti koji sadrže umreženu proteinsku ovojnica, te međustanični lipidni matriks štite kožu od prodora kemijskih supstanci koje dolaze u kontakt s kožom, uključujući potencijalno toksične tvari te lijekove. Ipak, prilagodbom fizičko-biokemijskih svojstava lokalnih lijekova može se osigurati paracelularna ili intercelularna apsorpcija lijeka, te apsorpcija kroz dlačni folikul (Madison, 2003).

1.1.2.5. Zaštita od ultraljubičastog svjetla

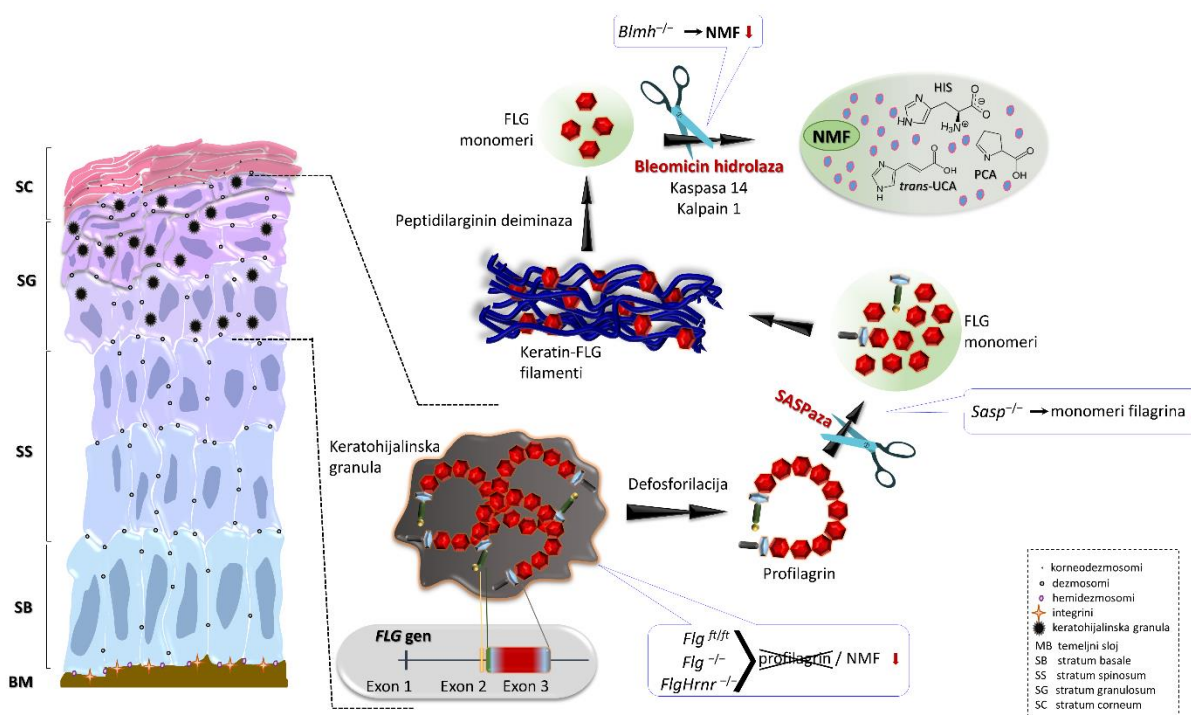
Ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*, UV) zračenje može uzrokovati oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) te samim time uzrokovati mutacije koje mogu dovesti do razvoja neoplazmi (Losquadro, 2017). Melanociti, stanice kože koje proizvode melanin, uspješno štite ostale stanice kože od UV zračenja. Naime, melanin apsorbira UV zračenje, pa se time manje UV zraka apsorbira od strane DNA. Dodatno, u rožnatom sloju se nalazi još jedan kromofor za UV zrake, a to je *trans*-urokanska kiselina koja nastaje djelovanjem histidaza na histidin. Djelovanjem UV zračenja *trans*-urokanska kiselina prelazi u *cis*-izomer. Također se pokazalo kako neki epidermalni lipidi imaju fotoprotektivni učinak (Solano, 2020).

1.1.3. Prirodni ovlaživač kože

Prirodnom ovlaživaču kože doprinose osmotski aktivne aminokiseline i peptidi (koji nastaju razgradnjom filagrina u srednjim i gornjim slojevima *stratum corneum*). Filagrin je protein molekulske mase 37 kDa čija se sinteza odvija u keratohijalinskim granulama iz prekursora profilagrina (Slika 2.). Profilagrin je veliki (> 500 kDa), visoko bazični, jako fosforiliran protein bogat histidinom koji se sastoji od 10-12 filagrinskih monomera spojenih kratkim hidrofobnim veznim peptidima. Profilagrin se sintetizira u *stratum granulosum* tijekom završnih faza epidermalne diferencijacije. Zbog ekstenzivne fosforilacije unutarnje serinske komponente profilagrin je izrazito netopljiv. Nakuplja se u keratohijalinskim granulama da bi se tijekom pretvorbe zrelog keratinocita zrnatog sloja u korneocit (u prijelaznoj zoni između *stratum granulosum* i *stratum corneum*) defosforilirao, čime nastaje filagrin (Rawlings i Harding, 2004). U tom procesu sudjeluju još nepotpuno karakterizirane proteaze uključujući SASP-azu (engl. *skin-specific retroviral-like aspartic protease*). Filagrinski monomeri se nakupljaju i izravnavaju keratinske filamente u čvrste snopove, a potom, zajedno s nekoliko drugih proteina kao što je hornerin, formiraju proteinsku mrežu koja je okružena izvanstaničnim lipidima organiziranim u lamelarne dvostruke slojeve. Filagrin je prisutan u najdubljim slojevima *stratum corneum*, a sa sazrijevanjem i progresijom korneocita prema gornjim slojevima rožnatog sloja, odvija se proteoliza filagrina u aminokiseline koje čine NMF (Slika 2). Za intracelularnu proteolizu filagrina odgovorno je nekoliko enzima, uključujući kaspazu-14, bleomicin hidrolazu (BLMH) i kalpain. Histidaza katalizira pretvorbu histidina u *trans*-urokansku kiselinu, dok iz glutamina nastaje u pirolidon-5-karboksilna kiselina (Thyssen, 2020). Ove aminokiseline i njihovi derivati održavaju kiselu pH kože, djeluju kao kromofori za UVB zrake i povećavaju hidrataciju kože zbog čega su i nazvane čimbenikom prirodne hidratacije (NMF) (Thyssen, 2020; Thyssen i Kezic 2014).

Do smanjenja razine NMF-a u koži može doći zbog poremećaja u sintezi filagrina ili njegovoj razgradnji uključujući i mutacije *FLG* gena, odnosno poremećaja njegove razgradnje, te utjecaja brojnih vanjskih čimbenika poput niske relativne vlažnosti zraka te izloženosti UV svjetlu i iritansima (Riethmüller, 2018). Hidratacija kože od velike je važnosti za funkciju kožne barijere, jer utječe ne samo na plastičnost kože, već i na aktivnosti različitih proteaza uključenih u

deskvamaciju, sintezu lipida i upalni odgovor. Stoga je smanjena razina NMF-a povezana s oštećenjem kožne barijere, odnosno povećanjem vrijednosti TEWL-a (Maarouf i sur., 2019).



Slika 2. Prikaz razgradnje poliproteina profilagrina. Razgradnja u monomere filagrina te nadalje u slobodne aminokiseline i produkte njihove ragrađnje, a koji su sastojci NMF-a (modificirano prema Thyssen i sur., 2020).

1.2. Psihički stres

Iako svi imamo subjektivno iskustvo psihičkog stresa te je taj izraz postao dio kolokvijalnog govora u kojem je uobičajeno biti „pod stresom“, pokazalo se da ga nije jednostavno precizno definirati. Danas se stres definira kao tjelesna ili mentalna napetost koju izazivaju faktori koji mijenjaju postojeću ravnotežu (Webster’s Ninth New Collegiate Dictionary, 1988, prema Hudek-Knežević i Kardum, 2006.).

Psihički stres može dovesti do promjena u organizmu putem nekoliko potencijalnih mehanizama (Rod i sur., 2012). Jedan je utjecaj na ponašanje. Psihološki stres može neizravno djelovati na

način da povećava vjerojatnost prakticanja nezdravih navika, kao što su pušenje, prekomjerna konzumacija alkohola, nedovoljna tjelesna aktivnost i debljanje (Tomiyama, 2019). Drugi je mehanizam djelovanja simpatikusa. Walter Cannon prvi je 1932. godine opisao *fight-or-flight* reakciju, karakteriziranu aktivacijom simpatikusa i naletom katekolamina. Uz pomoć autonomnih i endokrinih mehanizama, organizam je sposoban održati unutarnju stabilnost usprkos promjenama vanjske okoline. Takav proces nazivamo homeostazom (Lazarus i Folkman, 1978). Cannon jasno navodi da nedostatak prikladnog odgovora koji unutarnji okoliš vraća u stanje ravnoteže može uzrokovati ozljedu tkiva ili čak smrt. Danas znamo da je simpatički živčani sustav katabolički i aktivira se kao odgovor na obranu organizma. Adrenergički receptori nalaze se na efektornim stanicama autonomno inerviranih organa te na presinaptičkim završecima živaca (Thyssen, 2020). Sistematizirani su u dvije skupine, alfa (α_1 , α_2) i beta (β_1 , β_2 , β_3). Preko β_1 -postsinaptičkih receptora dolazi do stimulacije srca s pozitivnim kronotropnim i inotropnim učinkom. Za β_1 približno jednak afinitet pokazuju noradrenalin i adrenalin. Preko β_2 -postsinaptičkih receptora dolazi do vazodilatacije u poprečnoprugastim mišićima i koronarnim žilama, do bronhodilatacije i relaksacije uterusa. Adrenalin pokazuje veći afinitet za β_2 receptore. Preko β_3 -adrenergičnih receptora regulirani su različiti metabolički procesi u masnom (lipoliza) i ostalim tkivima. Aktivacija α_1 -postsinaptičkih receptora uzrokuje vazokonstrukciju krvnih žila kože i sluznica. Aktivacijom α_2 -presinaptičkih receptora inhibirano je oslobađanje noradrenalina i na taj način reduciran tonus simpatikusa. Većina tkiva ima i α i β receptore, od kojih je jedan tip dominantan (Linčić i sur., 2011). Treći mehanizam je aktivacija osi hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda (HPA). Rezultat aktivacije HPA osi je lučenje kortizola koji regulira velik broj fizioloških procesa, uključujući metabolizam ugljikohidrata, masti i proteina, glukoneogenezu i imunosupresivno djelovanje (Fogelman i Canli, 2018). Psihički stres je složena pojava koja uključuje i mnoge biokemijske promjene u organizmu. Moller i Cernak ispitivali su uzročno-posljedičnu vezu između kroničnog psihičkog stresa i povećane razine oksidacijskog stresa (Moller i sur., 1996; Cernak i sur., 2000). Dokazali su povećanu proizvodnju superoksida i malondialdehida, markera kojim se dokazuje oštećenje lipida uzrokovano oksidacijskim stresom. U stresnom stanju, parametri koji pokazuju oksidativno oštećenje DNA i osjetljivost na lipidnu oksidaciju, bili su veći od prosječnih mjerenja obavljenih kod osobe koja nije pod stresom. Povećana razina katekolamina u krvi, također je značajan izvor reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) nastalih autooksidacijom (Moller i sur., 1996).

1.2.1. Utjecaj psihičkog stresa na homeostazu kožne barijere

Psihički stres nepovoljno djeluje na homeostazu kožne barijere, utječući na imunološki sustav kože, brzinu cijeljenja rane, zaštitnu ulogu i otpornost na infekciju.

Akutni psihički stres, posredovan ponajviše glukokortikoidima i katekolaminima, potiče imunološki odgovor. Nasuprot tome, kronični stres inducira imunosupresiju, te dotadašnji predominantni imunološki sustav Th1 fenotipa, postaje Th2 fenotip (Denda i Tsuchiya, 2000).

Jedno od prvih istraživanja koje je potvrdilo negativan utjecaj psihičkog stresa na permeabilnost kožne barijere provedena je na miševima koji su izloženi stresu imobilizacijom. Imobilizacija je dovela do odgođenog oporavka kožne barijere koje je bilo proporcionalno s vremenom izloženosti stresu. Primjenom sedativa blokiran je utjecaj imobilizacijskog stresa na homeostazu kožne barijere, što sugerira uključenost emocionalnog stresa na proces (Denda i Tsuchiya, 2000).

Gotovo istodobno je provedena prva studija na ljudima koja je ispitivala učinak psihičkog stresa na homeostazu kožne barijere. Rezultati istraživanja su pokazali da akutni psihički stres može usporiti oporavak kožne barijere nakon njezina oštećenja. Ipak, za razliku od prethodnih animalnih studija, ovdje nije potvrđena uloga glukokortikoida, vjerojatno stoga što stresni okidač nije uzrokovao stupanj stresa koji bi potaknuo značajan porast lučenja glukokortikoida. (Altemus i sur., 2001). Druga skupina istraživača ispitivala je odnos između psihičkog stresa i kinetike oporavka kožne barijere u studentskoj populaciji u vrijeme završnih ispita. Pokazano je da je stres negativno utječe na oporavak zaštitne barijere nakon oštećenja rožnatog sloja celofanskom trakom, a intenzitet doživljenog stresa bio je proporcionalan duljini oporavka (Garg i sur., 2001). Mehanizam kojim stres potiče poremećaj permeabilnosti i oštećenje funkcije kožne barijere temelji se na djelovanju glukokortikoida. U prilog ovoj tvrdnji govore rezultati brojnih istraživanja kojima je pokazano da je psihički stres povezan s povećanom endogenom proizvodnjom glukokortikoida, a primjena sustavnih glukokortikoida poremećuje homeostazu kožne barijere i straničnu proliferaciju. Nadalje, psihički stres posredstvom glukokortikoida smanjuje proizvodnju i lučenje lamelarnih tjelešaca te smanjuje zastupljenost korneodezmosoma što narušava integritet rožnatog sloja kože (Orion i Wolf, 2012).

S obzirom na to da epidermalna lamelarna tjelešca isporučuju endogene lipide, enzime i antimikrobne peptide u međustanični prostor rožnatog sloja, smanjenje njihove proizvodnje dovodi do oštećenja antimikrobne epidermalne barijere (Aberg i sur., 2007). Povećana osjetljivost

kože na infekciju, dokazana je reaktivacijom *Herpes* virusa u stresnim situacijama. Kronični stres povećava recidiv infekcije *Herpes simplex* virusom tip 1 i 2, dok situacije koje nisu obilježene stresom, smanjuju reaktivaciju (Vanderplate i Kerrick, 1985).

1.3. Tape stripping

„*Tape stripping*“ je minimalno invazivna metoda kojom se provodi uzorkovanje rožnatog sloja kože adhezivnom trakom. Na količinu rožnatog sloja kože uklonjenu *tape stripping* tehnikom utječu brojni parametri kao što su hidratacija kože, kohezija između stanica, anatomska lokalizacija i individualne značajke testirane osobe.

Ova metoda se najčešće primjenjuje za određivanje parametara funkcije kožne barijere i lokalnog imunološkog odgovora. Također se može koristiti za procjenu oporavka kože barijere nakon mehaničkog ili kemijskog oštećenja mjerenjem TEWL-a u unaprijed određenim vremenskim razmacima. Nadalje, ovom metodom moguće je dobiti uvid u kinetiku transverzalnog transporta lokalno primijenjenih lijekova, uključujući podatke o bioraspoloživosti i bioekvivalentnosti (Robinson i sur., 2015).

Kao što je gore navedeno, brojna su istraživanja pokazala da psihički stres dovodi do usporenog oporavka kožne barijere nakon njezina oštećenja *tape stripping* metodom. U većini se istraživanja funkcija kožne barijere određivala mjerenjem TEWL. Iako je poznato da je NMF jedan od glavnih čimbenika koji sudjeluju u očuvanju permeabilnosti kožne barijere, odnosno razine TEWL, do sada nije provedeno niti jedno istraživanje na ljudima o povezanosti stresa s razinom NMF-a u koži. Nedostatak navedenih studija bio je poticaj za naše istraživanje.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da pod utjecajem psihičkog stresa dolazi do promjene u funkciji kožne barijere, specifično u razini prirodnog ovlaživača kože (INMF) u rožnatom sloju kože.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada bio je ispitati učinak psihičkog stresa na razinu NMF-a u rožnatom sloju kože.

Specifični ciljevi:

- U studenata medicine treće i šeste godine studija odrediti osobnu percepciju razine stresa u razdoblju u kojem se ne provode ispiti, a koje se smatra nestresnim razdobljem, te za vrijeme polaganja ispita, koje se smatra stresnim razdobljem i usporediti njihove međuodnose;
- U studenata medicine treće i šeste godine studija odrediti razinu NMF-a u nestresnom razdoblju i u stresnom razdoblju i usporediti njihove međuodnose;
- Ispitati kakva je povezanost razine psihičkog stresa s razinom NMF-a u rožnatom sloju kože.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na 25 studenata treće i 25 studenata šeste studijske godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu putem javnog poziva u vremenskom razdoblju od ožujka do svibnja 2022. godine. Isključni su kriteriji bili da ispitanici nemaju kožne bolesti te da u razdoblju provođenja istraživanja nemaju akutna stanja koja bi mogla utjecati na razinu biomarkera u kožnoj barijeri.

Ispitanici su pristupili uzorkovanju u dva navrata: (i) u razdoblju u kojem se ne provode ispiti (u kojem se smatra da nisu izloženi stresu povezanim s polaganjem ispita) te (ii) u razdoblju u kojem se polažu ispiti (u kojem se smatra da su izloženi stresu povezanim s polaganjem ispita). Vremensko razdoblje između dva uzorkovanja bio je veće od četiri tjedna da bi se minimizirala mogućnost da stres izazvan s polaganjem ispita ne bi utjecao na odgovore studenata u razdoblju bez stresa. U razdoblju u kojem se smatra da su ispitanici pod stresom, uzorkovanje se provelo u vremenskom razdoblju od 7 dana prije do 7 dana nakon polaganja ispita.

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom (163) koje je odobrilo nadležno Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-22-111/21, Klasa: 641-01/22-02/01). Ispitanici su prije uključivanja u istraživanje bili upoznati s detaljima istraživanja i načinom provođenja istoga te su potpisali informirani pristanak.

4.2. Upitnik percepcije stresa

Za procjenu doživljaja stresa korišten je Upitnik percepcije stresa (engl. Perceived Stress Scale, PSS; Cohen i sur., 1983). Ovom ljestvicom se trima osnovnim komponentama mjeri stupanj subjektivnog stresa putem procjena nedostatka kontrole, osjećaja zasićenosti i nepredvidljivosti života. PSS sadrži 10 čestica, a odgovori ispitanika se boduju na ljestvici procjene Likertovog tipa od pet stupnjeva (0 – nikada; 1 - gotovo nikada; 2 – ponekad; 3 - prilično često; 4 - vrlo često). Zbroj odgovora čini ukupan rezultat pri čemu veći rezultat upućuje na veću razinu

percipiranog stresa (Hudek-Knežević i sur., 1999). Pouzdanost upitnika je dobra, u rasponu od 0,84 do 0,86 (Cohen i sur., 1983).

U tablici 1 navedena su pitanja koja su uključena anketni upitnik. Ispitanici su odgovarali na pitanja u anketnom upitniku neposredno prije svakog od dva uzorkovanja. Zbroj bodova iz anketnog upitnika o nespecifičnoj osobnoj percepciji aktualne razine stresa opisan je u nastavku kao indeks stresa.

4.3. Uzorkovanje rožnatog sloja kože

Rožnati sloj kože uzorkovan je na unutarnjoj strani podlaktice pritiskanjem adhezivnih traka (površine 3,8 cm²) na površinu kože u trajanju od 10 sekundi (Dapić i sur., 2013; Keurentjes i sur., 2021). Time se postiže smanjenje varijacije količine rožnatog sloja kože. Ukupno je uzeto 10 adhezivnih traka s istog mjesta. Adhezivne trake su se individualno pohranile u mikroepruvete volumena od 2 mL na ledu radi očuvanja integriteta sastojaka, a nakon provedenog uzorkovanja mikroepruvete s uzorcima su pohranjene na -20°C do analize. Prilikom pohranjivanja adhezivnih traka u mikroepruvete, površina vrpce koja je obložena adhezivnim ljepilom okrenuta je prema unutrašnjosti.

4.4. Kemikalije

Analitički standardi L-histina, piroglutaminske kiseline, *trans*- i *cis*-urokanske kiseline nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (Saint Louis, SAD). Natrijeva sol oktilsulfonata nabavljena je od proizvođača CARLO ERBA Reagents (Val de Reuil, Francuska). Acetonitril i kalijev hidroksid su nabavljeni je od proizvođača Fisher Scientific (MA, SAD) i klorovodična kiselina od proizvođača Merck (Darmstadt, Njemačka). Fosforna kiselina (85 %), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat i bezvodni natrijev hidrogenfosfat nabavljeni su od proizvođača Kemika (Zagreb, Hrvatska). Ultra čista voda proizvedena je putem sustava za proizvodnju deionizirane vode na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Upitnik percepcije stresa.

		Nikada	Gotovo nikada	Ponekad	Prilično često	Vrlo često
STR_01	Koliko često ste se u posljednjih mjesec dana osjećali uznemireno zbog nečega neočekivanoga što se dogodilo?	0	1	2	3	4
STR_02	Koliko često ste u posljednjih mjesec dana osjećali da ne uspijevate kontrolirati važne stvari u svom životu?	0	1	2	3	4
STR_03	Koliko često ste se u posljednjih mjesec dana osjećali nervozno i "pod stresom"?	0	1	2	3	4
STR_04	Koliko često ste u posljednjih mjesec dana osjećali da ste sposobni nositi se sa svojim osobnim problemima?	0	1	2	3	4
STR_05	Koliko često ste u posljednjih mjesec dana osjećali da se stvari odvijaju u Vašu korist?	0	1	2	3	4
STR_06	Koliko često ste u posljednjih mjesec dana primijetili da se ne uspijevate nositi sa svim zadacima koji su pred Vama? toliko da ih ne možete savladavati?	0	1	2	3	4
STR_07	Koliko često ste u posljednjih mjesec dana osjećali da uspijevate kontrolirati neugodne smetnje u svom životu?	0	1	2	3	4
STR_08	Koliko često ste se u posljednjih mjesec dana osjećali da uspješno vladate situacijom?	0	1	2	3	4
STR_09	Koliko često ste se u posljednjih mjesec dana razljutili zbog stvari koje niste mogli kontrolirati?	0	1	2	3	4
STR_10	Koliko često ste u posljednjih mjesec dana osjećali da se problemi nagomilavaju?	0	1	2	3	4

4.5. Određivanje sastojaka prirodnog ovlaživača kože

4.5.1. Ekstrakcija sastojaka prirodnog ovlaživača kože

Za određivanje razine prirodnog ovlaživača kože (eng. *natural moisturizing factor*, NMF) provedena je analiza četiri najvažnija sastojka i to: histidina, piroglutaminske kiseline te *trans*- i *cis*- izomera urokanske kiseline koji su jedni od produkata razgradnje proteina filagrina u koži. Za analizu sastojaka prirodnog ovlaživača koža uzeta je 5 adhezivna traka. Ekstrakcija navedenih sastojaka provedena je na način da se uzorak prvo temperirao na sobnu temperaturu te se u mikroeprevetu s uzorkom dodalo 600 uL ultra-čiste vode. Sadržaj mikroeprevete se zatim snažno miješala kroz 30 minuta (IKA vibrax-VXR Model 2200, IKA-works Inc., Wilmington, NC, SAD) (Dapic i sur., 2013).

4.5.2. Kromatografska analiza sastojaka prirodnog ovlaživača kože

Ishodne otopine sastojaka prirodnog ovlaživača kože pripremljene su otapanjem standarda u ultra-čistoj vodi te su množinske koncentracije sastojaka u individualnim otopinama iznosile 5,5 mmol mL⁻¹, 3,25 mmol mL⁻¹, 3,44 mmol mL⁻¹ i 2,20 mmol mL⁻¹ za histidin, piroglutaminsku kiselinu, te *trans*- i *cis*-urokansku kiselinu,. Razrijeđena smjesa sastojaka sadržavala je 0,215 mmol mL⁻¹ histidina, 1,032 mmol mL⁻¹ piroglutaminske kiseline, 0,523 mmol mL⁻¹ *trans*-urokanske kiseline i 0,557 mmol mL⁻¹ *cis*-urokanske kiseline. Standardne otopine za konstruiranje baždarnog dijagrama pripremljene su razređivanjem razrijeđene smjese sastojaka u koncentracijskom području od 0,26 do 25,75 nmol mL⁻¹ za histidin, od 1,29 do 123,84 nmol mL⁻¹ za piroglutaminsku kiselinu, od 0,65 do 62,76 nmol mL⁻¹ za *trans*-urokansku kiselinu i od 0,70 do 66,90 nmol mL⁻¹ za *cis*-urokansku kiselinu. Kalibracijska krivulja konstruirana je za svaki sastojak kao ovisnost visine kromatografske krivulje o poznatoj množinskoj koncentraciji istoga. Prethodno ekstrahirani uzorci rožnatog sloja kože korišteni su kao tzv. kontrolni uzorci kvalitete (engl. *Quality control, QC samples*) za provjeru analitičkog postupka.

Za analizu sastojaka prirodnog ovlaživača kože korišten je Agilent tekućinski kromatograf (engl. *liquid chromatography*, LC) 1100 Serie u sprezi s detektorom s nizom dioda (DAD) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Za razdvajanje sastojaka korištena je stacionarna faza Synergi Polar RP 80 Å 250 mm x 3µm x ID: 4mm (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) kod protoka mobilne faze od 0,4 mL min⁻¹ pri izokratičnim uvjetima eluiranja. Mobilna faza sastojala se od 0,01 mol L⁻¹ fosforne kiseline, 1 % acetonitrila (v/v) i 0,1 mmol L⁻¹ natrijeve soli oktilsulfonata u ultra čistoj vodi. Histidin i piroglutaminska kiselina detektirani su kod valne duljine od 210 nm, dok su *trans*- i *cis*- izomeri urokanske kiseline detektirani kod valne duljine od 268 nm. Granice detekcije metode za pojedine sastojke iznosile su: 0,224 nmol mL⁻¹ za histidin, 0,518 nmol mL⁻¹ za piroglutaminsku kiselinu, 0,191 nmol mL⁻¹ za *trans*-urokansku kiselinu i 0,152 nmol mL⁻¹ *cis*-urokansku kiselinu.

4.5.3. Određivanje količine uzorkovanog rožnatog sloja

S obzirom da količina rožnatog sloja izuzetog pojedinom adhezivnom trakom varira, bilo je potrebno koncentraciju sastojaka prirodnog ovlaživača kože normalizirati za ukupnu količinu proteina rožnatog sloja kože određenu za svaki uzorak. Radi potpune ekstrakcije proteina iz rožnatog sloja, a nakon prve ekstrakcije s ultra čistom vodom, provedena je druga ekstrakcija dodatkom 600 µL 1 mol L⁻¹ pripremljene vodene otopine jake baze, kalijeva hidroksida. Sadržaj mikroeprevete se zatim snažno miješao kroz 120 minuta (IKA vibrax-VXR Model 2200, IKA-works Inc., Wilmington, NC, SAD) (Dapić i sur., 2013). Ekstrakt je ostavljen na sobnoj temperaturi preko noći, te je još jednom podvrgnut snažnom miješanju kroz 60 minuta. Za određivanje ukupnih proteina pomiješano je 50 µL vodenog ekstrakta i 50 µL KOH ekstrakta te neutralizirano na pH = 5 – 8 s vodenom otopinom 1 mol L⁻¹ klorovodične kiseline koja je sadržavala 0,003 mol L⁻¹ natrijeva hidrogenfosfata i 0,003 mol L⁻¹ natrijeva dihidrogenfosfata. Ukupna količina proteina određena je spektrofotometrijski pomoću Pierce Micro BSA esejja (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, SAD) prema uputama proizvođača na BIOTEK 800 TS čitaču mikroploča (Biotek, Winooski, VE, SAD). Razina NMF-a u rožnatom sloju kože izražena je u jedinicama mmol g⁻¹ proteina.

4.6. Obrada podataka

Za obradu analitičkih i statističkih podataka korišten je Prism 9.4 program (GraphPad, La Jolla, CA, SAD). Raspodjela podataka testirana je primjenom Shapiro-Wilks testa. Razlike u razinama prirodnog ovlaživača kože i indeksa stresa između dviju skupina ispitanika (studenata 3. godine i studenata 6. godine studija) određene su dvostranim Studentovim *t*-testom ili Mann-Whitneyevim testom u slučaju asimetrične raspodjele podataka, dok su razlike u razinama prirodnog ovlaživača kože i indeksa stresa unutar iste skupine ispitanika u razdoblju pod stresom i u razdoblju bez stresa određene primjenom dvostranog Wilcoxonovog testa ili parnog testa. Za određivanje razlike u razinama prirodnog ovlaživača kože i indeksa stresa između muških i ženskih ispitanika unutar istih skupina korišten je Mann-Whitneyevog test. Povezanost indeksa stresa i razine prirodnog ovlaživača kože ispitana je primjenom dvostranog Spearmanovog neparametrijskog testa. Vrijednost razine statističke značajnosti (*P*) postavljena je na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Sociodemografska obilježja ispitanika

U ovom istraživanju sudjelovalo je 25 studenata treće godine i 25 studenta šeste studijske godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Detaljni podaci navedeni su u tablici 2.

Tri studenta šeste studijske godine nisu se odazvala drugom uzorkovanju. Raspon dobi studenata treće godine iznosi od 21,1 do 23,6 godina, dok je raspon dobi kod studenata šeste godine bio od 23,7 do 29,8 godina.

U obje skupine studenata bila je podjednaka zastupljenost prema spolu, u skupini studenata 3. godine studija bilo je 40 % muških ispitanika, dok je u skupini 6. godine studija bilo je 52 % muških ispitanika. Ispitanici u skupini 3. godine studija u najvećem broju ne konzumiraju alkohol ili konzumiraju povremeno (25 ispitanika), za razliku od skupine 6. godine studija u kojoj 14 ispitanika ne konzumira alkohol ili konzumira povremeno, dok 11 ispitanika nije navelo podatak o konzumaciji alkohola.

U obje skupine ispitanika, u najvećem broju su bili nepušači (88 % u skupini 3. godine studija i 68 % u skupini 6. godine studija) dok je veći broj pušača bio u skupini studenata 6. godine (8 ispitanika) u odnosu na skupinu studenata 3. godine studija (2 ispitanika).

Tablica 2. Sociodemografska obilježja ispitanika.

	Studenti treće godine	Studenti šeste godine
Ukupan broj ispitanika, <i>n</i>	25	25
Starost (u godinama)		
Srednja dob \pm <i>SD</i> (raspon vrijednosti)	21,9 \pm 0,8 (21,1 – 23,6)	24,7 \pm 1,2 (23,7 – 29,8)
Spol		
Ženski, <i>n</i> , (%)	15 (60 %)	12 (48 %)
Muški, <i>n</i> , (%)	10 (40 %)	13 (52 %)
Konzumiranje alkoholnih pića		
Ne, <i>n</i> (M)	9 (3)	7 (3)
Da (povremeno), <i>n</i> (M)	16 (7)	7 (5)
Nije navedeno, <i>n</i> (M)	0	11 (5)
Pušenje		
Ne, <i>n</i> (M)	22 (8)	17 (10)
Da (povremeno), <i>n</i> (M)	1 (1)	0
Da, <i>n</i> (M)	2 (1)	8 (5)

SD → standardna devijacija, M → muški ispitanici

5.2. Indeks stresa

Ispitanici su podijeljeni u tri skupine na temelju rezultata Upitnika percepcije stresa: skupinu (i) niske razine stresa (0 do 13 bodova), (ii) srednje razine stresa (14 do 26 bodova) i (iii) visoke razine stresa (27 do 40 bodova) (Cohen i sur., 1983).

Tablica 3. Indeks stresa u ispitanika 3. godine i 6. godine studija.

	Indeks stresa					
	U razdoblju bez stresa (NS)			U razdoblju pod stresom (S)		
	Niska razina	Srednja razina	Visoka razina	Niska razina	Srednja razina	Visoka razina
3. godina studija						
<i>n</i> (M)	-	21 (9)	4 (1)	-	21 (8)	4 (2)
6. godina studija						
<i>n</i> (M)	-	23 (13)	-	-	23 (12)	2 (1)

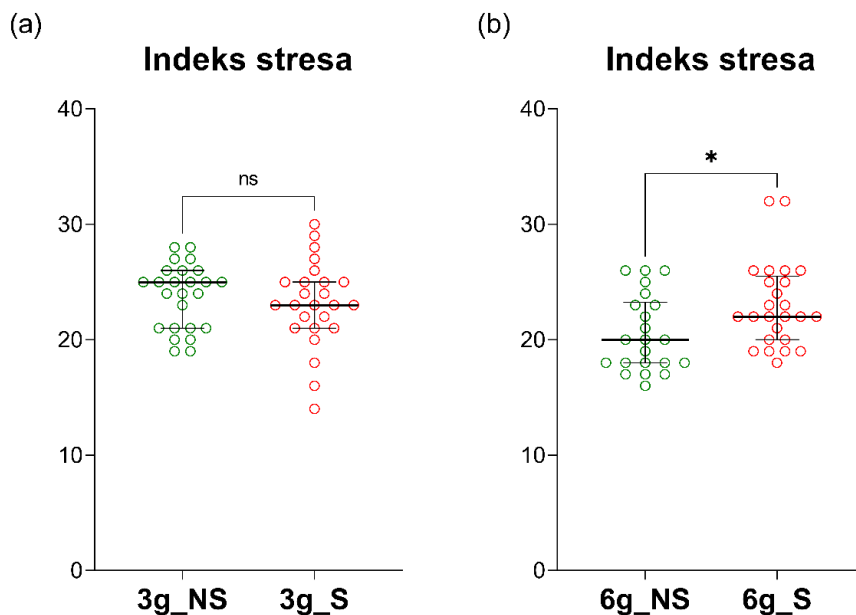
M → muški ispitanici

Najveći broj ispitanika prema indeksu stresa bio je, prema ukupnim bodovima na temelju odgovora iz anketnog upitnika, razvrstan u skupinu srednje razine stresa za obje studijske godine, dok je manji broj ispitanika razvrstan u skupinu visoke razine stresa i to bez obzira jesu li ispitanici u vrijeme uzorkovanja i ispunjavanja upitnika bili u razdoblju bez stresa ili u razdoblju pod stresom u vrijeme polaganja ispita. Detaljni podaci su prikazani u tablici 3.

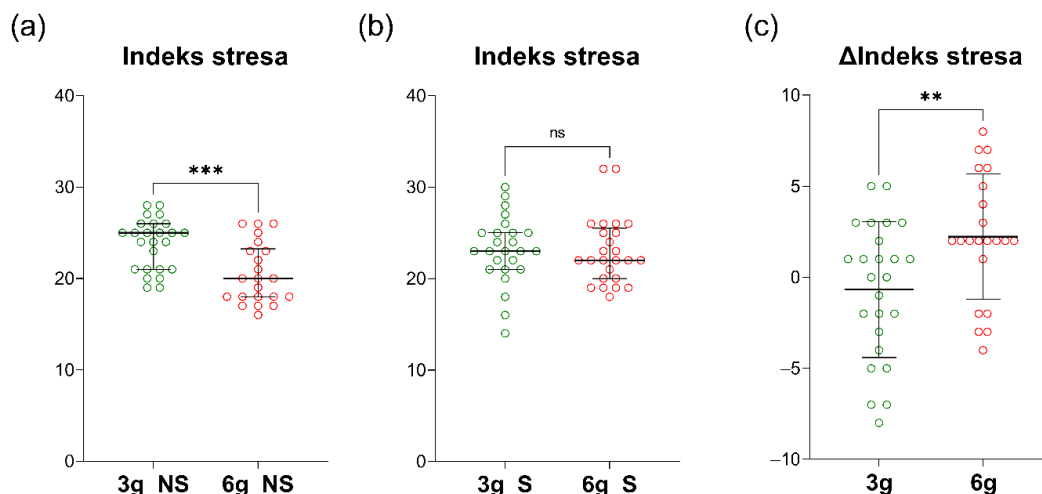
S obzirom na mali broj ispitanika koji su svrstani u skupinu visoke razine stresa, u daljnjoj statističkoj obradi podataka uzeti su u obzir svi ispitanici bez obzira na podjelu u skupine s obzirom na razinu stresa iz tablice 3.

Indeks stresa u ispitanika 3. godine studija nije se značajno razlikovao između razdoblja bez stresa i pod stresom. Za razliku od 3. godine studija, indeks stresa u ispitanika 6. godine studija u stresnom razdoblju bio je značajno viši u odnosu na nestresno razdoblje (Slika 3.).

Usporedba ispitanika 3. godine i 6. godine studija pokazala je da su ispitanici 3. godine studija pod većim stresom od ispitanika 6. godine studija u nestresnom razdoblju (Slika 4. a). Međutim, razina indeksa stresa između ispitanika dviju studijskih godina nije se značajno razlikovala u stresnom razdoblju (Slika 4. b). Rezultat toga je veća relativna promjena indeksa stresa između nestresnog i stresnog razdoblja u ispitanika 6. godine studija u odnosu na ispitanike 3. godine studija (Slika 4. c.).



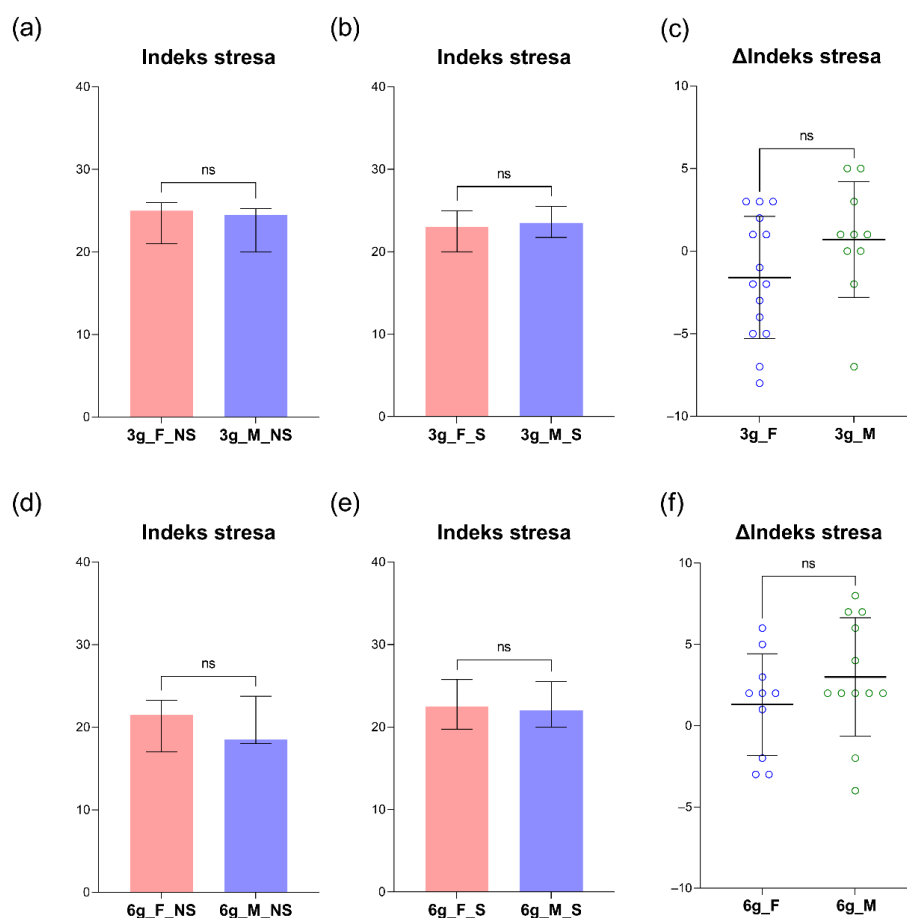
Slika 3. Razina indeksa stresa u koži (a) ispitanika 3. godine studija u razdoblju bez stresa i u razdoblju pod stresom i (b) ispitanika 6. godine studija u razdoblju bez stresa i u razdoblju pod stresom. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile. ($*P < 0,05$, ns \rightarrow nije značajno). Razlika u razini indeksa stresa u ispitanicima između nestresnog i stresnog razdoblja određena je primjenom Wilcoxonovog testa (Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom).



Slika 4. Razina indeksa stresa u koži u ispitanika 3. godine i 6. godine studija: (a) u razdoblju bez stresa, (b) u razdoblju pod stresom i (c) relativna promjena indeksa stresa između stresnog i nestresnog razdoblja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile pod (a) i (b), te kao srednja vrijednost \pm *SD* pod (c) (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns \rightarrow nije značajno). Relativna promjena indeksa stresa predstavlja razliku između ukupnog broja bodova u stresnom razdoblju i broja bodova u nestresnom razdoblju. Razlika u razini indeksa stresa između ispitanika 3. godine i 6. godine studija u nestresnom i stresnom razdoblju određena je primjenom Mann-Whitneyevog testa (pod a i b) odnosno Studentovog *t*-testa (pod c).

(Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, *SD* \rightarrow standardna devijacija).

S obzirom da je poznato da muškarci i žene mogu različito reagirati na podražaj koji izaziva stres, ispitanici su stratificirani prema spolu. Razina indeksa stresa nije se razlikovala između muških i ženskih ispitanika bez obzira na godinu studija (Slika 5. a, b i c) u oba razdoblja, bilo u razdoblju bez stresa ili u razdoblju pod stresom. Isto tako nije bilo razlike između ženskih ispitanika ili muških ispitanika u skupinama 3. godine i 6. godine studija u razdoblju bez stresa i u razdoblju pod stresom (Slika 5. d, e i f).



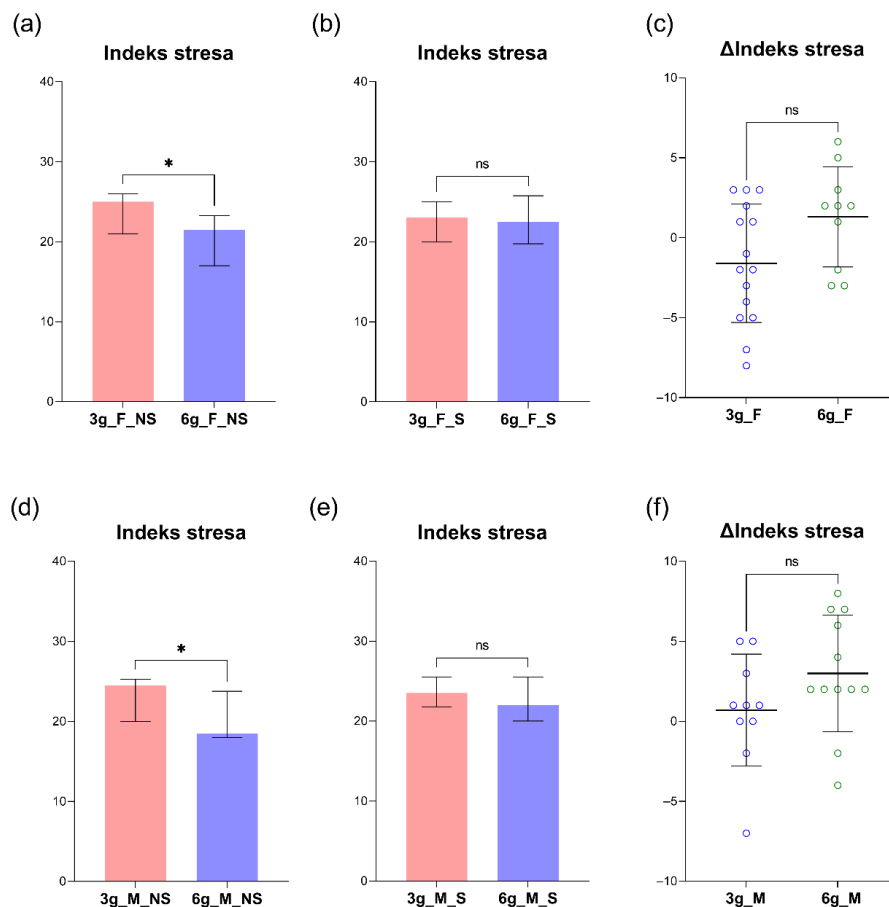
Slika 5. Razina indeksa stresa kod ženskih i muških ispitanika 3. godine studija : (a) u razdoblju bez stresa, (b) u razdoblju pod stresom i (c) relativna promjena indeksa stresa te 6. godine studija: (d) u razdoblju bez stresa, (e) u razdoblju pod stresom i (f) relativna promjena indeksa stresa. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile pod (a), (b) (d) i (e) , te kao srednja vrijednost \pm *SD* pod (c) i (f), ns \rightarrow nije značajno). Relativna promjena indeksa stresa predstavlja razliku između ukupnog broja bodova u stresnom razdoblju i broja bodova u nestresnom razdoblju. Razlika u razini indeksa stresa između ispitanika muških i ženskih ispitanika u nestresnom i stresnom razdoblju određena je primjenom Mann-Whitneyevog testa (pod a, b, d i e) odnosno Studentovog *t*-testa (pod c i f).

(Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, M \rightarrow muški ispitanici, Ž \rightarrow ženski ispitanici, *SD* \rightarrow standardna devijacija).

Usporedba ispitanika 3. godine i 6. godine studija pokazala je da su i muški i ženski ispitanici 3. godine studija pod većim stresom u odnosu na muške i ženske ispitanike 6. godine studija u nestresnom razdoblju (Slika 6. a i d). Međutim, razina indeksa stresa između ispitanika istog spola dviju studijskih godina nije se značajno razlikovala u stresnom razdoblju (Slika 6. b i e). Relativna promjena indeksa stresa kod ispitanika oba spola 6. godine studija, iako veća, nije bila značajna (Slika 6. c i f).

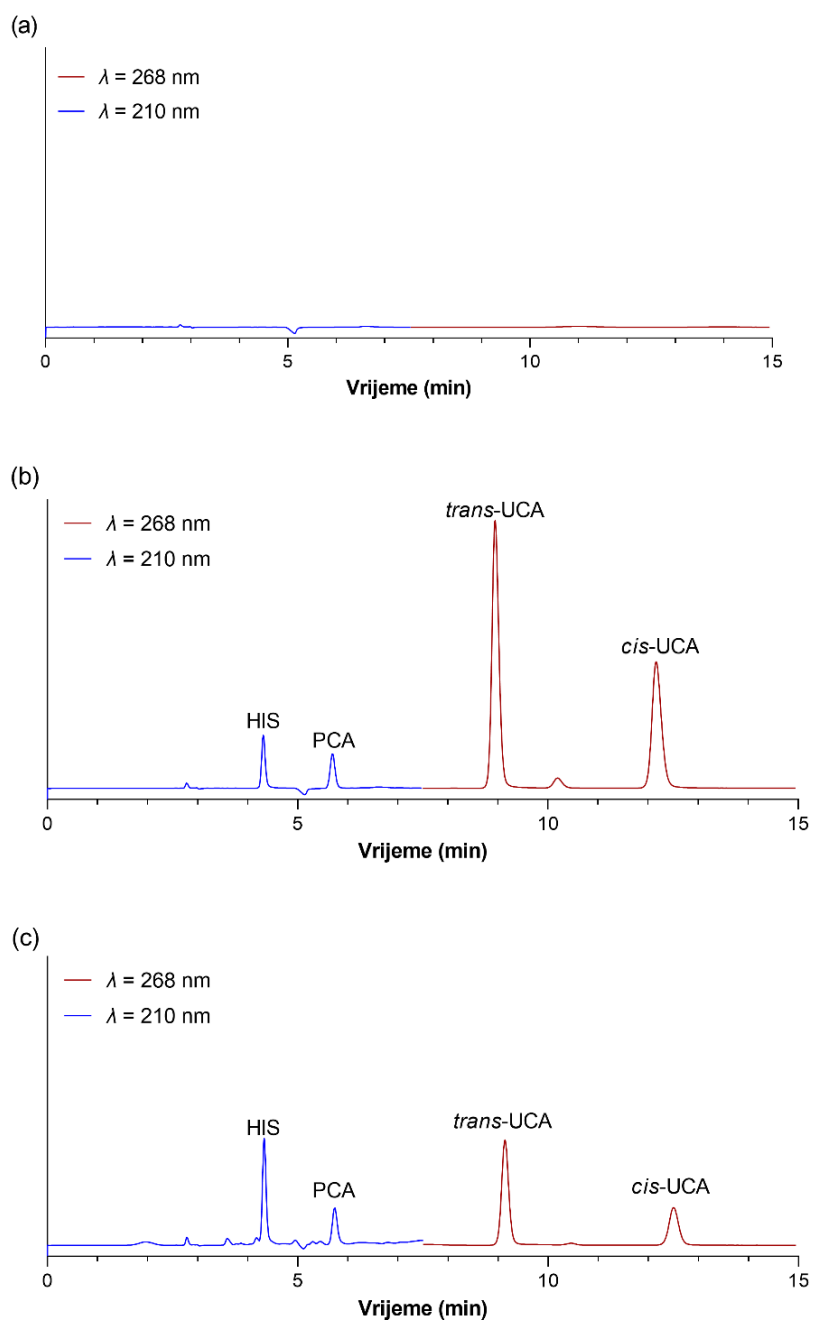
5.3. Degradacijski produkti proteina filagrina

Degradacijski produkti proteina filagrina u koži, koji su jedni od najvažnijih sastojaka prirodnog ovlaživača kože, određivani su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda nakon provedene ekstrakcije iz rožnatog sloja kože. Slika 3 prikazuje tipični kromatogram 4 određivana sastojka, histidin, piroglutaminsku kiselinu te *trans*- i *cis*-urokansku kiselinu. Kao što se može vidjeti iz kromatograma, pikovi su dobro odvojeni do bazne linije, i eluiraju kao oštri i simetrični pikovi te bez interferirajućih pikova kod svih sastojaka (Slika 7.).



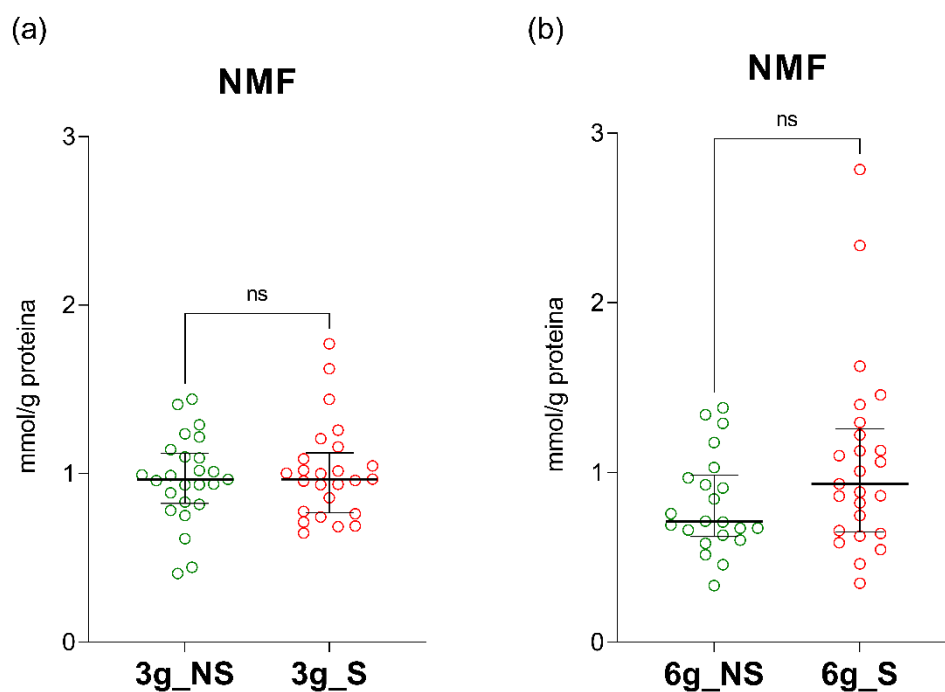
Slika 6. Razina indeksa stresa kod ženskih ispitanika 3. godine studija: (a) u razdoblju bez stresa, (b) u razdoblju pod stresom i (c) relativna promjena indeksa stresa te muških ispitanika 6. godine studija: (d) u razdoblju bez stresa, (e) u razdoblju pod stresom i (f) relativna promjena indeksa stresa. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile pod (a), (b) (d) i (e) , te kao srednja vrijednost $\pm SD$ pod (c) i (f) (ns \rightarrow nije značajno). Relativna promjena indeksa stresa predstavlja razliku između ukupnog broja bodova u stresnom razdoblju i broja bodova u nestresnom razdoblju. Razlika u razini indeksa stresa između ispitanika 3. godine i 6. godine studija prema spolu u nestresnom i stresnom razdoblju određena je primjenom Mann-Whitneyevog testa (pod a, b, d i e) odnosno Studentovog t -testa (pod c i f).

(Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, M \rightarrow muški ispitanici, Ž \rightarrow ženski ispitanici, SD \rightarrow standardna devijacija).



Slika 7. Tipični LC-DAD kromatogram histidina (HIS), piroglutaminske kiseline (PCA) te *trans*- (*trans*-UCA) i *cis*-izomera (*cis*-UCA) urokanske kiseline: (a) slijepa proba, (b) standardna otopina smjese HIS, PCA, *trans*-UCA i *cis*-UCA i (c) ekstrakt rožnatog sloja kože ispitanika 3. godine studija u stresnom razdoblju. HIS i PCA su praćeni kod valne duljine od 210 nm, a *trans*- i *cis*- izomeri UCA kod valne duljine od 268 nm.

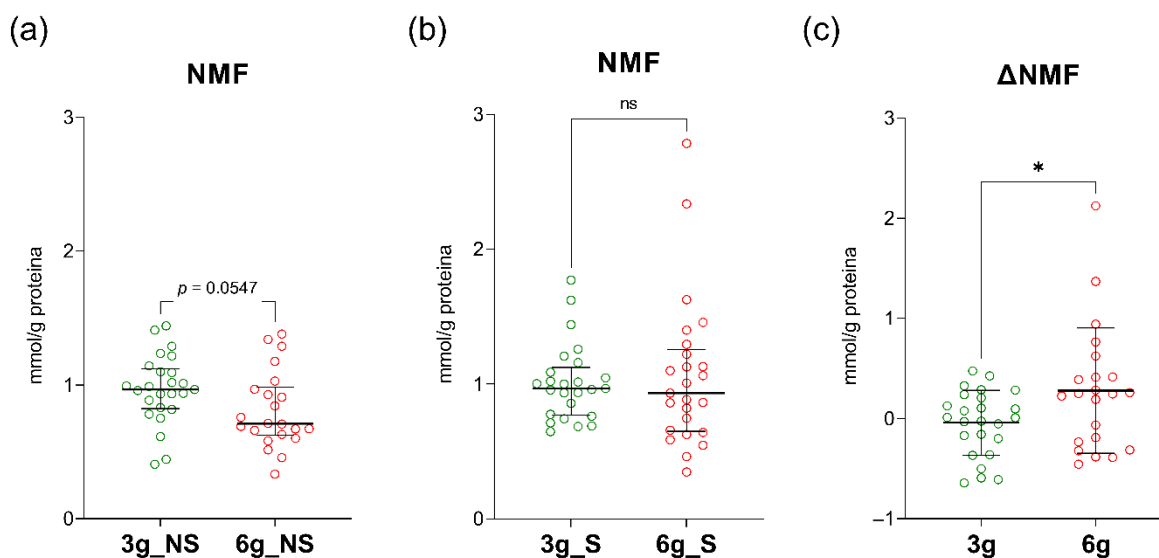
Vrijednosti NMF-a prikazane su na slikama 6. i 7. Razina NMF-a u ispitanika 3. godine studija nije se značajno razlikovala između razdoblja bez stresa i pod stresom (Slika 8. a) što je istovjetno trendu pokazanom za razinu indeksa stresa. Također, i u ispitanika 6. godine studija, razina NMF-a nije se značajno razlikovala između nestresnog i stresnog razdoblja, za razliku od razine indeksa stresa koja je bila značajno viša u stresnom razdoblju (Slika 8. b).



Slika 8. Razina NMF-a u koži (a) ispitanika 3. godine studija u razdoblju bez stresa i u razdoblju od stresom i (b) ispitanika 6. godine studija u razdoblju bez stresa i u razdoblju pod stresom. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile (ns → nije značajno). Razlika u razini NMF-a u ispitanicima između nestresnog i stresnog razdoblja određena je primjenom Wilcoxonovog testa.

(Legenda: 3g_NS → ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S → ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS → ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S → ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, NMF → natural moisturizing factor → prirodni ovlaživač kože).

Usporedbom ispitanika 3. godine i 6. godine studija pokazano je da nema razlike u razini NMF-a u koži ispitanika 3. godine studija u odnosu na ispitanike 6. godine studija u nestresnom razdoblju (Slika 9. a), međutim može se uočiti trend smanjenja razine NMF-a kod ispitanika 6. godine studija ($p = 0,0547$). Razina NMF-a između ispitanika dviju studijskih godina nije se značajno razlikovala niti u stresnom razdoblju (Slika 9. b). Međutim, relativna promjena u razini NMF-a bila je značajno viša između nestresnog i stresnog razdoblja u ispitanika 6. godine studija u odnosu na ispitanike 3. godine studija (Slika 9. c.).

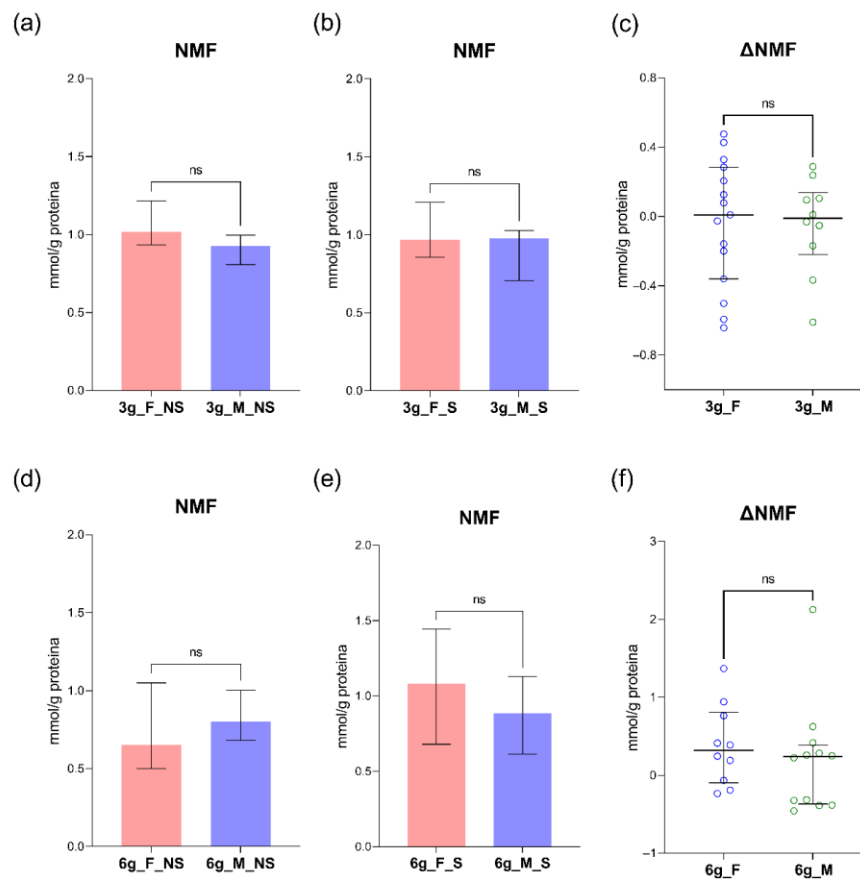


Slika 9. Razina NMF-a u koži u ispitanika 3. godine i 6. godine studija: (a) u razdoblju bez stresa, (b) u razdoblju pod stresom i (c) relativna promjena u razini NMF-a između stresnog i nestresnog razdoblja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile pod (a) i (b), te kao srednja vrijednost \pm *SD* pod (c) (* $P < 0,05$, ns \rightarrow nije značajno). Relativna promjena u razini NMF-a predstavlja razliku između ukupnog broja bodova u stresnom razdoblju i broja bodova u nestresnom razdoblju. Razlika u razini NMF-a između ispitanika 3. godine i 6. godine studija u nestresnom i stresnom razdoblju određena je primjenom Mann-Whitneyevog testa (pod a i b) odnosno Studentovog *t*-testa (pod c).

(Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, *SD* \rightarrow standardna devijacija, NMF \rightarrow natural moisturizing factor \rightarrow prirodni ovlaživač kože).

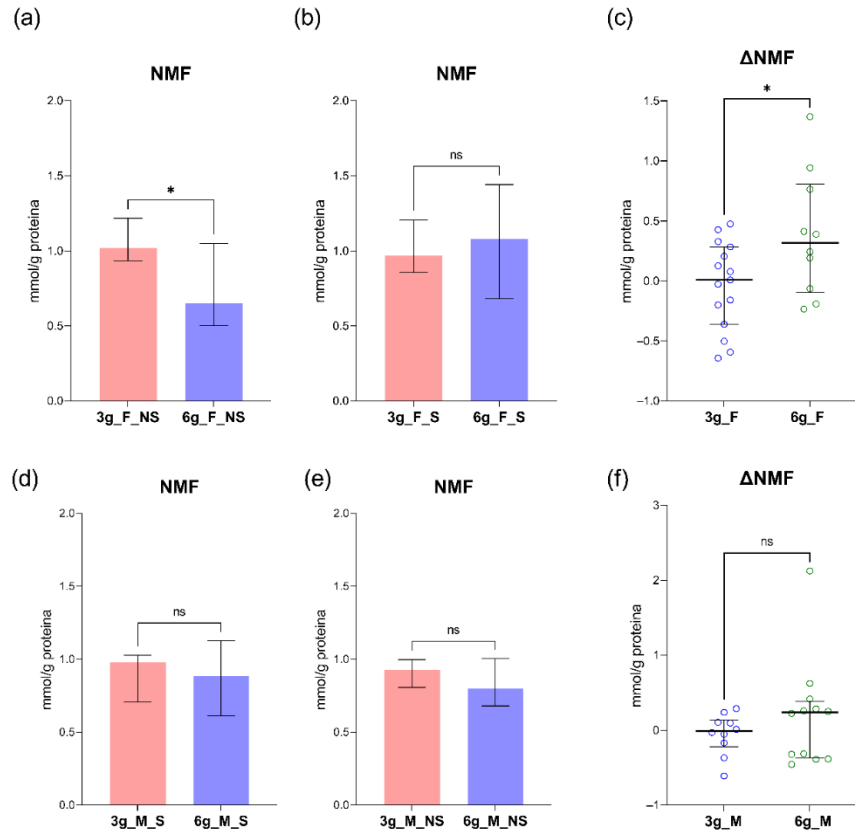
Vrijednosti NMF-a u ispitanika stratificiranim prema spolu prikazane su na slikama 10 i 11. Vrijednosti NMF-a nisu se razlikovale između muških i ženskih ispitanika bez obzira na godinu studija (Slika 9. a, b i c) u oba razdoblja, bilo u razdoblju bez stresa ili u razdoblju pod stresom. Isto tako nije bilo razlike između ženskih ispitanika ili muških ispitanika u skupinama 3. godine i 6. godine studija u razdoblju bez stresa i u razdoblju pod stresom (Slika 10. d, e i f).

Usporedba ženskih ispitanika 3. godine i 6. godine studija pokazala je da je kod ženskih ispitanika 6. godine studija smanjena razina NMF-a u odnosu na ženske ispitanike 3. godine studija u nestresnom razdoblju (Slika 11. a), što je posljedično rezultiralo i većom relativnom promjenom u razini NMF-a (Slika 11. c). Razlika u razini NMF-a između muških ispitanika 3. godine i 6. godine studija u oba razdoblja nije bilo značajna što je rezultiralo i neznačajnom razlikom u relativnoj promjeni razina NMF-a (Slika 11. c i f).



Slika 10. Razina NMF-a kod ženskih i muških ispitanika 3. godine studija: (a) u razdoblju bez stresa, (b) u razdoblju pod stresom i (c) relativna promjena u razini NMF-a te 6. godine studija: (d) u razdoblju bez stresa, (e) u razdoblju pod stresom i (f) relativna promjena u razini NMF-a. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile pod (a), (b) (d) i (e) , te kao srednja vrijednost \pm *SD* pod (c) i (f), ns \rightarrow nije značajno). Relativna promjena u razini NMF-a predstavlja razliku između ukupnog broja bodova u stresnom razdoblju i broja bodova u nestresnom razdoblju. Razlika u razini NMF-a između ispitanika muških i ženskih ispitanika u nestresnom i stresnom razdoblju određena je primjenom Mann-Whitneyevog testa (pod a, b, d i e) odnosno Studentovog *t*-testa (pod c i f).

(Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, M \rightarrow muški ispitanici, Ž \rightarrow ženski ispitanici, *SD* \rightarrow standardna devijacija, NMF \rightarrow natural moisturizing factor \rightarrow prirodni ovlaživač kože).



Slika 11. Razina NMF-a kod ženskih ispitanika 3. godine studija : (a) u razdoblju bez stresa, (b) u razdoblju pod stresom i (c) relativna promjena u razini NMF-a te muških ispitanika 6. godine studija: (d) u razdoblju bez stresa, (e) u razdoblju pod stresom i (f) relativna promjena u razini NMF-a. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile pod (a), (b) (d) i (e) , te kao srednja vrijednost \pm *SD* pod (c) i (f) (ns \rightarrow nije značajno). Relativna promjena u razini NMF-a predstavlja razliku između ukupnog broja bodova u stresnom razdoblju i broja bodova u nestresnom razdoblju. Razlika u razini indeksa stresa između ispitanika 3. godine i 6. godine studija prema spolu u nestresnom i stresnom razdoblju određena je primjenom Mann-Whitneyevog testa (pod a, b, d i e) odnosno Studentovog *t*-testa (pod c i f).

(Legenda: 3g_NS \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju bez stresa, 3g_S \rightarrow ispitanici na 3. godini studija u razdoblju pod stresom, 6g_NS \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju bez stresa, 6g_S \rightarrow ispitanici na 6. godini studija u razdoblju pod stresom, M \rightarrow muški ispitanici, Ž \rightarrow ženski ispitanici, *SD* \rightarrow standardna devijacija, NMF \rightarrow natural moisturizing factor \rightarrow prirodni ovlaživač kože).

Dodatno je učinjena Spearmanova korelacijska analiza kako bi se analizirala povezanost razine NMF-a s razinom indeksom stresa. Nije nađena značajna povezanost između ovih dviju veličina za bilo koju godinu studija za oba razdoblja, razdoblje bez stresa i razdoblje pod stresom ($p > 0,05$).

6. RASPRAVA

Tijekom studija medicine studenti se pripremaju za odgovornu karijeru tijekom koje će promicati zdravlje i osigurati odgovarajuću skrb bolesnicima. Stoga je edukacija budućih liječnika zahtjevna i povezana s velikim radnim opterećenjem i nerijetko nedostatkom sna, poglavito u vrijeme ispitnih rokova.

U naše istraživanje uključili smo studente šeste, završne godine medicine i studente treće godine medicine kojima je uzimanje uzoraka rožnatog sloja kože za mjerenje NMF-a učinjeno tijekom ispitnog roka (stresno razdoblje) te u razdoblju kada nisu imali ispite (nestresno razdoblje) istovremeno s ispunjavanjem upitnika percepcije stresa.

Sukladno opće prihvaćenom stavu među studentima medicine kako je treća godina studija prema opsegu gradiva jedna od najzahtjevnijih ili najzahtjevnija, razina stresa u nestresnom razdoblju je, prema rezultatu PSS, u studenata treće godine medicine bila veća u odnosu na studente šeste godine medicine. Međutim, razina stresa u stresnom razdoblju, u vrijeme polaganja ispita, kod obje ispitivane skupine bila je podjednaka.

Nadalje, uspoređujući razine stresa u nestresnom i stresnom razdoblju u pojedinim skupinama ispitanika, pokazano je kako je u studenata šeste godine studija razina stresa bila viša u stresnom nego u nestresnom razdoblju, dok je u studenata treće godine bila podjednaka u oba ispitivana razdoblja.

Uzimajući u obzir činjenicu da PSS procjenjuje stres, odnosno misli i osjeća u proteklih mjesec dana, može se zaključiti da su studenti treće godine izloženi dugotrajnijem stresu, dok je kod studenata šeste godine stres bio povezan s razdobljem u kojem su imali ispite, odnosno da

između ispita postoji razdoblje relaksacije. To potvrđuje i činjenica da je promjena razine stresa između nestresnog i stresnog razdoblja bila veća u studenata šeste nego u studenata treće godine studija.

Do sada su uglavnom provedena jednocentrična, presječna istraživanja o psihičkom stresu u studenata medicine; ipak, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Kanadi je pokazano kako su studenti medicine izloženi većem psihičkom stresu u odnosu na opću populaciju i populaciju iste životne dobi (Dyrbye i sur., 2006).

Rezultati naših ispitivanja u skladu su s istraživanjem Yusoffa i sur., koji su također pokazali da je godina studija bila značajan čimbenik koji je utjecao na razinu stresa u studenata medicine. Pri tome su najnižu razinu stresa imali studenti završne godine studija, dok je značajno viša razina stresa zabilježena u studenata druge i četvrte godine studija (Yusoff i sur., 2010). Niska prevalencija stresa kod studenata završne godine može biti povezana s činjenicom da su studenti tijekom studiranja stekli vještine pomoću kojih uspješnije savladavaju stres u odnosu na mlađe studente. S druge strane, autori su pretpostavili da se, s obzirom na program studija u navedenom centru, studenti druge i četvrte godine nalaze u tranzicijskom razdoblju u kojem se moraju prilagoditi zahtjevima nove faze studiranja (Yusoff i sur., 2010).

U našem istraživanju nije utvrđena povezanost spola i razine stresa, dok su podaci u literaturi oprečni. Naime, veliki broj presječnih i longitudinalnih studija nije pokazao utjecaj spola na mentalno zdravlje studenata medicine, dok neka istraživanja ukazuju na višu razinu anksioznosti u žena u odnosu na muškarce (Dyrbye i sur., 2006).

Dosadašnjim istraživanjima utvrđen je negativan utjecaj psihičkog stresa na funkciju i duljinu razdoblja oporavka kožne barijere nakon što se potaknulo njezino mehaničko oštećenje (Garg i sur., 2001, Fukuda i sur., 2015, Muizzuddin i sur., 2003, Altemus i sur., 2001). Procjena funkcije kožne temeljena je na određivanju razine transepidermalnog gubitka vode (TEWL).

Tako su Garg i sur. u svoje istraživanje uključili 27 studenata medicine, farmacije i stomatologije kojima je kojima izmjeren TEWL prije i poslije oštećenja kožne barijere u tri različita razdoblja: 1) u vrijeme povratka s višemjesečnog ljetnog odmora (nestresno razdoblje), 2) oko 4 tjedna prije završnih ispita (stresno razdoblje) te 3) 4 tjedna nakon završnih ispita, tijekom proljetnih praznika (nestresno razdoblje). Za procjenu razine stresa korištena su dva

upitnika: *Perceived Stress Scale*, kao i u našoj studiji, i *Profile of Mood States*. Utvrđeno je da je povećana razina stresa povezana s narušenom homeostazom permeabilnosti kožne barijere (povećanim TEWL) i duljim razdobljem oporavka kožne barijere (Garg i sur., 2001).

Slično prethodno navedenoj studiji, Fukuda i sur. su proveli istraživanje o utjecaju stresa na permeabilnost i kinetiku oporavka kožne barijere, u koju je uključeno 16 studentica. Utvrđeno je kako je psihički stres povezan s povećanim vrijednostima TEWL i usporenim oporavkom kožne barijere nakon mehaničkog oštećenja (Fukuda i sur., 2015).

Ipak, Muizzuddin i sur. u svojem istraživanju, koje je uključilo 28 žena izloženih stresu zbog razvoda, nisu uspjeli potvrditi utjecaj stresa na očuvanost kožne barijere, ali su pokazali odgođeni oporavak kožne barijere nakon mehaničke iritacije u odnosu na kontrolnu skupinu (Muizzuddin i sur., 2003).

Altemus i sur. su pokazali da je akutni psihosocijalni stres i stres zbog nedostatka sna povezan s usporenim oporavkom zaštitne barijere kože te da ovaj poremećaj može biti povezan s povišenim vrijednostima IL-1 beta, IL-10 i TNF-alfa (Altemus i sur., 2001).

Razina TEWL-a, koja je procjenjivana u gore navedenim studijama, procjenjuje očuvanost homeostaze permeabilnosti kožne barijere, na koju utječu tri čimbenika: lamelarni lipidi rožnatog sloja, očuvan pH kože i hidrofilne tvari koje čine NMF. Poremećaj bilo kojeg od navedena tri čimbenika, pa i NMF, može dovesti do poremećaja funkcije kožne barijere (Maarouf i sur., 2019).

S obzirom na to da dosad nisu provedena istraživanja na ljudima o utjecaju stresa na razine NMF-a, cilj našeg istraživanja je bio ispitati utjecaj psihičkog stresa na razinu NMF-a u rožnatom sloju kože ispitanika.

Razina NMF-a u obje skupine ispitanika (studenti treće godine studija i studenti šeste godine studija) nije se značajno razlikovala između razdoblja bez stresa i pod stresom iako je u studenata šeste godine studija indeks stresa bio značajno viši u stresnom razdoblju.

Usporedbom ispitanika treće i šeste godine studija, može se zamijetiti istovjetan trend kao i u razini stresa. U stresnom razdoblju nije bilo razlike u razini NMF-a između dviju navedenih skupina ispitanika. Što se tiče razdoblja bez stresa, iako nije utvrđena statistički značajna razlika u razini NMF-a između studenata treće i šeste godine studija ($p = 0,0547$), jasno se vidi trend

povišenja razine NMF-a kod ispitanika treće godine studija. Nadalje, relativna promjena u razini NMF-a bila je značajno viša između nestresnog i stresnog razdoblja u ispitanika šeste godine studija u odnosu na ispitanike treće godine studija.

U našem istraživanju također smo ispitali i povezanost spola s vrijednostima NMF-a. U oba razdoblja, bilo u razdoblju bez stresa ili u razdoblju pod stresom, vrijednosti NMF-a nisu se razlikovale između muških i ženskih ispitanika bez obzira na godinu studija. Također, nije bilo niti razlike između ženskih ispitanika ili muških ispitanika u skupinama treće godine i šeste godine studija u nestresnom i stresnom razdoblju.

Ipak, usporedbom ženskih ispitanika treće godine i šeste godine studija pokazalo se da je u ženskih ispitanika šeste godine studija smanjena razina NMF-a u odnosu na ženske ispitanike treće godine studija u razdoblju bez stresa, pa je i relativna promjena u razini NMF-a u ženskih ispitanika na šestoj godini studija bila veća. U muškaraca nije utvrđena statistički značajna razlika u razini NMF-a niti u relativnoj promjeni razine NMF-a između ispitanika treće i šeste godine studija, iako se uočio trend povećanja relativne razlike u ispitanika šeste godine.

Dakle, u našem istraživanju uočili smo porast vrijednosti NMF-a s povišenjem razine stresa.

Choi i sur. su u ispitivanju provedenom na miševima izloženim psihičkom stresu zbog insomnije pokazali da stres može potaknuti destrukciju filagrina i ostalih proteina povezanih s epidermalnom diferencijacijom, uključujući involukrin i lorikrin. Iako se radi o proteinima s dugim poluživotom, imunohistokemijska analiza je pokazala smanjenu ekspresiju navedenih proteina u epidermisu ispitivanih miševa nakon stresa (Choi i sur., 2005).

Očekuje se da će smanjenje filagrina, kao prekursora aminokiselina i peptida koje čine NMF, dovesti do smanjenja razine NMF-a. Ipak, dosad je, sukladno dostupnoj literaturi, provedeno samo jedno istraživanje o povezanosti razine filagrina i NMF-a, koju su proveli Kezic i sur. u bolesnika s atopijskim dermatitisom. Rezultati studije ukazuju da smanjenje filagrina dovodi do smanjenja razine NMF-a. Ipak, valja uzeti u obzir da je u ovo istraživanje uključena vrlo selektirana populacija, a to su bolesnici koji su imali nul-mutacije *FLG* gena (LOF *FLG*, engl. *loss of function*), koje su vrlo rijetke (Kezic i sur., 2008).

Dakle, sukladno gore navedenim istraživanjima, bilo bi očekivano da psihički stres dovodi do smanjenja razine NMF-a u koži, posredovanog smanjenjem razine filagrina. Ipak, u našem

istraživanju utvrđen je suprotan trend, odnosno povišenje razine NMF-a s povišenjem razine psihičkog stresa. Naši rezultati mogli bi se objasniti kao posljedica kompenzacijskog mehanizma bilo u koraku sinteze filagrina u kojem je povećana proizvodnja proteina filagrina iz njegova prekursora profilagrina, bilo u koraku povećane razgradnje filagrina u aminokiseline i njihove metaboličke produkte koji su sastojci NMF-a.

Drugo obrazloženje naših rezultata može se zasnivati na rezultatima jedine nama poznate studije koja je istraživala povezanost stresa i razine NMF-a u koži, a provedena je na animalnom modelu. Naime, Kitigawa i sur. su proveli istraživanje na ICR (*Institute of Cancer Research*) miševima kojima su ispitivali utjecaj ponovljenog stresa kroz 8 dana na sastav masnih kiselina i razinu NMF-a u rožnatom sloju kože. Iako je nakon 4 i 7 dana ponavljanog stresa utvrđen pad razine NMF-a, nakon inicijalnog stesa (drugi dan istraživanja) bilježila se viša razina NMF-a u skupini koja je bila izložena stresu u odnosu na kontrolnu skupinu (Kitagawa i sur., 2022). Stoga se može pretpostaviti da je povišena vrijednost NMF-a u stresnom razdoblju u našem istraživanju posljedica činjenice da je uzorkovanje rožnatog sloja kože učinjeno u razdoblju od tek nekoliko dana prije do nekoliko dana poslije polaganja ispita odnosno u ranoj fazi stresnog razdoblja. Dodatna mjerenja NMF-a tijekom nekoliko sljedećih dana mogla bi pokazati dinamiku NMF-a na ljudskom modelu, odnosno mijenja li se razina NMF-a nakon inicijalnog porasta. Naime, moguće je da u ranoj fazi odgovora na stres dolazi do masivne degradacije filagrina što dovodi do prolaznog nakupljanja razgradnih produkata filagrina koji čine NMF.

Naše istraživanje je prvo koje je provedeno na ljudima s ciljem ispitivanja povezanosti psihičkog stresa na razine NMF-a u koži. Ograničenja ovog istraživanja su relativno mali broj ispitanika, zastupljenost samo jednog centra te izostanak evaluacije okolišnih čimbenika koji bi dodatno mogli utjecati na razine NMF-a u koži.

S obzirom na gore navedene nedostatke te činjenicu da kompenzacijski mehanizmi koji su doveli do povećanja NMF-a u koži ispitanika izloženih stresu nisu razjašnjeni, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio utjecaj stresa kao neovisnog čimbenika na razinu NMF-a u koži.

7. ZAKLJUČCI

1. Pod utjecajem psihičkog stresa dolazi do porasta razine prirodnog ovlaživača kože (eng. *natural moisturizing factor NMF*) u rožnatom sloju kože.
2. Promjena razine stresa između nestresnog i stresnog razdoblja bila je veća u studenata šeste nego u studenata treće godine studija te nije utvrđena povezanost spola i razine stresa.
3. Na temelju rezultata može se zaključiti da su studenti treće godine bili izloženi dugotrajnijem stresu, dok je u studenata šeste godine stres bio povezan s razdobljem u kojem su imali ispite s postojanjem razdoblja relaksacije između ispita.
4. Razina NMF-a u obje skupine ispitanika nije se značajno razlikovala između razdoblja bez stresa i pod stresom iako je u stresnom razdoblju indeks stresa bio značajno viši u studenata šeste godine studija.
5. U stresnom razdoblju nije bilo razlike u razini NMF-a između dviju navedenih skupina ispitanika. U nestresnom razdoblju, iako nije utvrđena statistički značajna razlika u razini NMF-a između studenata treće i šeste godine studija ($p = 0,0547$), uočio se trend povišenja razine NMF-a kod ispitanika treće godine studija.
6. Relativna promjena u razini NMF-a bila je značajno viša između nestresnog i stresnog razdoblja u ispitanika šeste godine studija u odnosu na ispitanike treće godine studija.
7. U oba ispitivana razdoblja vrijednosti NMF-a nisu se razlikovale između muških i ženskih ispitanika bez obzira na godinu studija. Razina NMF-a u nestresnom razdoblju bila je veća u studentica šeste godine studija nego studentica treće godine studija, pa je i relativna promjena u razini NMF-a u studentica šeste godine studija bila veća.
8. U muškaraca nije utvrđena statistički značajna razlika u razini NMF-a niti u relativnoj promjeni razine NMF-a između ispitanika treće i šeste godine studija, iako se uočio trend povećanja relativne razlike u ispitanika šeste godine.

8. ZAHVALA

Zahvaljujemo se prof. dr. sc. Ivone Jakaša i prof. dr. sc. Branki Marinović na stručnom vodstvu, nesebičnom prijenosu znanja i iskustva, strpljenju, podršci i uloženom vremenu prilikom izrade ovog rada.

Nadalje, zahvaljujemo se Maji Mikulec na pomoći prilikom uzimanja uzoraka.

Također, hvala i mag. ing. Ines Peremin na pomoći, podršci i susretljivosti prilikom provođenja eksperimentalnog dijela ovog istraživanja.

Na kraju zahvaljujemo se Medicinskom fakultetu i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na pruženoj prilici i gostoprimstvu.

9. POPIS LITERATURE

Aberg , K. M., Radek, K. A., Choi, E. H., i sur. (2007) Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest.* **117**, 3339-3349.

Altemus, M., Rao, B., Dhabhar, F. S., Ding, W., Granstein, R. D. (2001) Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol.* **117(2)**, 309-17.

Archer, C. B. (2010) Functions of the skin. 8.izd. U: Rook's Textbook of Dermatology (Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C. ured.); Blackwell Publishing Ltd., Oxford, str. 4.1-4.11.

Arda, O., Göksügür, N., Tüzün, Y. (2014) Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* **32(1)**, 3-13.

Betts, G. J., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D. H., Poe, B., Wise, J., A., Womble, M., Young, K. A. (2013) Anatomy and Physiology, Openstax, Houston. < https://commons.wikimedia.org/wiki/File:502_Layers_of_epidermis.jpg > Pristupljeno, 27. lipnja, 2022.

Candi, E., Schmidt, R., Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6(4)**, 328-340.

Cernak, I., Savic, V., Kotur, J., Prokic, V., Kuljic, B., Grbovic, D. and Veljovic, M. (2000) Alterations in magnesium and oxidative status during chronic emotional stress, *Magnes. Res.* **13**, 29-36.

Choi, E. H., Brown, B. E., Crumrine, D., Chang, S., Man, M.Q., Elias, P.M., i sur. (2005) Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol.* **124(3)**, 587-95.

Cohen, S., Kamarck, T., Mermelstein, R. (1983) A global measure of perceived stress. *J Health Soc Behav.* **24 (4)**, 385-396.

Dapic, I., Jakasa, I., Yau, N. L. H., Kezic, S., Kammeyer, A. (2013) Evaluation of an HPLC Method for the Determination of Natural Moisturizing Factors in the Human *Stratum Corneum*. *Analytical Letters.* **46(14)**, 2133-2144.

Denda, M., Tsuchiya, T. (2000) Barrier recovery rate varies time dependently in human skin. *Br. J. Dermatol.* **142 (2000)**, 881-884.

Dyrbye, L.N., Thomas, M. R., Shanafelt, T. D. (2006) Systematic review of depression, anxiety, and other indicators of psychological distress among U.S. and Canadian medical students. *Acad Med.* **81(4)**, 354-373.

Fogelman, N., Canli, T. (2018) Early life stress and cortisol: A meta-analysis. *Horm Behav.* **98**, 63-76.

Fukuda, S., Baba, S., Akasaka, T. (2015) Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer. *Int J Cosmet Sci.* **37(1)**, 63-69.

Garg, A., Chren, M. M., Sands, L. P., Matsui, M. S., Marenus, K. D., Feingold, K.R., i sur. (2001) Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders. *Arch Dermatol.* **137(1)**, 53-59.

Hänel, K. H., Cornelissen, C., Lüscher, B., Baron, J. M. (2013) Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci.* **14(4)**, 6720-6745.

Hudek-Knežević, J., Kardum, I. (2006). Psihosocijalne odrednice tjelesnog zdravlja: 1. Stres i tjelesno zdravlje. Naklada Slap, Jastrebarsko.

Hudek-Knežević, J., Kardum, I., Lesić, R. (1999) Efekti percipiranog stresa i stilova suočavanja na tjelesne simptome. *Druš Istraž.* **8(4 (42))**, 543-561.

Jensen, J. M., Proksch, E. (2009) The skin's barrier. *G Ital Dermatolog Venereol.* **144(6)**, 689-700.

Keurentjes, A. J., Jakasa, I., Kezic, S. (2021) Research Techniques Made Simple: Stratum Corneum Tape Stripping. *Journal of Investigate Dermatology* **141**, 1129-1133.

Kezic, S., Kemperman, P. M., Koster, E. S., de Jongh, C.M., Thio, H.B., Campbell, L. E., i sur. (2008) Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* **128**, 2117-2119.

Kitagawa, Y., Hayakawa, K., Oikawa, D., Ikeda, K., Ikeda, M., Harada, D. i sur. (2022) Repeated restraint stress modifies fatty acid and amino acid metabolism in the mouse skin. *J Vet Med Sci.* **84(4)**, 511-519.

Linčir, I. i suradnice (2011) Farmakologija za stomatologe, 3. izd. Medicinska naklada, Zagreb.

Losquadro, W.D. (2017) Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin N Am.* **25(3)**, 283-289.

Maarouf, M., Maarouf, C. L., Yosipovitch, G., Shi, V. Y. (2019) The impact of stress on epidermal barrier function: an evidence-based review. *Br J Dermatol.* **181(6)**, 1129-1137.

Madison, K. C. (2003) Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* **121(2)**, 231-241.

Marinović, B. (2014) Građa i funkcija kože. U: *Dermatovenerologija* (Basta-Juzbašić A. i sur., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 6-10.

Matsui, T., Amagai, M. (2015) Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* **27(6)**, 269-280.

Moller, P., Wallin, H. and Knudsen, L.E. (1996) Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem. Biol. Interact.* **102**, 17-36.

Muizzuddin, N., Matsui, M. S., Marenus, K. D., Maes, D. H. (2003) Impact of stress of marital dissolution on skin barrier recovery: tape stripping and measurement of trans-epidermal water loss (TEWL). *Skin Res Technol.* **9(1)**, 34-8.

Nguyen, H. L. T., Trujillo-Paez, J.V., Umehara, Y., Yue, H., Peng, G., Kiatsurayanon, C., i sur. (2020) Role of antimicrobial peptides in skin barrier repair in individuals with atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* **21(20)**,7607.

Orion, E., Wolf, R. (2012) Psychological stress and epidermal barrier function. *Clin Dermatol.* **30(3)**, 280-285.

Rawlings, A. V., Harding, C. R. (2004) Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* **17**, 43-48.

Lazarus, R. S., Folkman, S. (1984) Stress appraisal and coping. Springer, New York.

Riethmüller, C. (2018) Assessing the skin barrier via corneocyte morphometry. *Exp Dermatol.* **27(8)**, 923-930.

Robinson, H., Jarrett, P., Broadbent, E. (2015) The Effect of Relaxation Before or After Skin Damage on Skin Barrier Recovery: A Preliminary Study. *Psychosom Med.* **77**, 844-852.

Rod, N. H., Grønbæk, M., Schnohr, P., Prescott, E., Kristensen, T. S. (2012) Perceived stress as a risk factor for changes in health behaviour and cardiac risk profile: a longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther.* **92(2)**, 1-2.

Segre, J. A. (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest.* **116(5)**, 1150-1158.

Solano, F. (2020) Photoprotection and skin pigmentation: melanin-related molecules and some other new agents obtained from natural sources. *Molecules.* **25(7)**, 1537.

Thyssen, J. P., Kezic, S. (2014) Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* **134(4)**, 792-799.

Thyssen, J.P., Jakasa, I., Riethmüller, C., Schön, M.P., Braun, A., Haftek, M., Fallon, P.G., Wróblewski, J., Jakubowski, H., Eckhart, L., Declercq, W., Koppes, S., Engebretsen, K.A., Bonefeld, C., Irvine, A.D., Keita-Alassane, S., Simon, M., Kawasaki, H., Kubo, A., Amagai, M., Matsui, T., Kezić, S. (2020) Filaggrin Expression and Processing Deficiencies Impair Corneocyte Surface Texture and Stiffness in Mice. *J Invest Dermatol.* **140(3)**, 615-623.

Tomiya, A. J. (2019) Stress and Obesity. *Annu Rev Psychol.* **70**, 703-718.

Vandergriff, T.W., Bergstresser, P.R. (2012) Anatomy and physiology. 3.izd.U: *Dermatology.* (Bologna, J. L., Jorizzo, J. L., Schaffer J. V., ured.) Elsevier Saunders, London, str. 43-54.

Vanderplate, C., Kerrick, G. (1985) Stress reduction treatment of severe recurrent genital herpes virus. *Biofeedback Self Regul* **10**, 181-188.

Yusoff, M. S., Abdul, Rahim, A.F, Yaacob, M.J. (2010) Prevalence and Sources of Stress among Universiti Sains Malaysia Medical Students. *Malays J Med Sci.* **17(1)**, 30-37.

10. SAŽETAK

Ivana Orešković, Mislav Mokos, Dora Vlašić

Utjecaj psihičkog stresa na razinu prirodnog ovlaživača kože u studentskoj populaciji

Tijekom studija medicine studenti se pripremaju za odgovornu karijeru liječnika, a njihova je edukacija zahtjevna i povezana s velikim radnim opterećenjem što može biti uzrok psihičkog stresa. Cilj ove studije bio je ispitati učinak psihičkog stresa na razinu prirodnog ovlaživača kože (engl. *natural moisturizing factor*, NMF) u studentskoj populaciji treće i šeste godine studija medicine na Sveučilištu u Zagrebu, uzimajući u obzir opće prihvaćeni stav studenata medicine kako je treća godina studija jedna od najzahtjevnijih. U istraživanje je uključeno 25 studenata treće i 25 studenata šeste godine studija. Ispitanici su ispunjavali standardni upitnik osobne percepcije stresa (eng. *Perceived Stress Scale*, PSS) te pristupili uzorkovanju rožnatog sloja kože u dva navrata: (i) u razdoblju u kojem se ne polažu ispiti (nestresno razdoblje) te (ii) u razdoblju u kojem se polažu ispiti (stresno razdoblje). NMF je određen u rožnatom sloju kože uzorkovanom pomoću adhezivnih traka, tzv. „*tape stripping*“ metodom. Sastojci NMF-a ekstrahirani su iz adhezivnih traka i određeni primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te je razina NMF-a normalizirana za određenu količinu proteina u rožnatom sloju. Većina ispitanika obje studijske godine svrstana je prema odgovorima u upitniku u skupinu srednje razine stresa. Rezultati su pokazali da su u nestresnom razdoblju, prema rezultatima PSS-a, studenti treće godine studija, neovisno o spolu, pod većim stresom od studenata šeste godine ($p < 0,001$), dok u stresnom razdoblju nije bilo značajne razlike između ispitanika dviju studijskih godina. Značajno viša razina stresa u stresnom razdoblju u odnosu na nestresno razdoblje bila je prisutna samo u studenata šeste godine studija. Razina stresa nije se razlikovala između muških i ženskih ispitanika unutar iste godine studija bez obzira na godinu studija u oba razdoblja. Razina NMF-a u obje studijske skupine ispitanika nije se značajno razlikovala između razdoblja bez stresa i pod stresom iako je u studenata šeste godine studija indeks stresa bio značajno viši u stresnom periodu. Usporedbom ispitanika treće i šeste godine studija može se zamijetiti istovjetan trend kao i u razini stresa. U stresnom periodu nije bilo razlike u razini NMF-a između dviju navedenih skupina ispitanika. Što se tiče razdoblja bez stresa, iako nije utvrđena statistički značajna razlika u razini NMF-a između studenata treće i šeste godine studija ($p = 0,0547$), jasno se vidi trend povišenja razine NMF-a kod ispitanika treće godine studija.

Naše istraživanje je prvo koje je provedeno na ljudima s ciljem ispitivanja povezanosti psihičkog stresa i razine NMF-a u koži. Uzevši u obzir rezultate PSS-a može se zaključiti da su studenti treće godine bili izloženi dugotrajnijem stresu, dok je u studenata šeste godine stres bio povezan s razdobljem u kojem su imali ispite s postojanjem razdoblja relaksacije između ispita. To potvrđuje i činjenica da je promjena razine stresa između nestresnog i stresnog razdoblja bila veća u studenata šeste nego u studenata treće godine studija. U našem istraživanju uočili smo trend porasta razine NMF-a s povišenjem razine stresa. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio mehanizam utjecaja stresa kao neovisnog čimbenika na razinu NMF-a u koži.

Ključne riječi: studenti, psihički stres, prirodni ovlaživač kože, kožna barijera

11. SUMMARY

Ivana Orešković, Mislav Mokos, Dora Vlašić

Influence of psychological stress on the level of natural moisturizing factor in the student population

During medical studies, students are preparing for a responsible doctoral career, and their education is demanding and associated with a work overload, which can cause psychological stress. This study aimed to examine the effect of psychological stress on the level of natural moisturizing factor (NMF) in the student population in the third and sixth year of medical studies at the University of Zagreb, taking into account the generally accepted opinion of medical students that the third year is one of the most demanding. 25 third-year students and 25 sixth-year students participated in the study. Students completed the standard Perceived Stress Scale (PSS) questionnaire, and their samples of the stratum corneum of the skin were taken on two occasions: (i) in the period in which the exams were not taken (stress-free period) and (ii) in the period in which the exams were taken (stress period). NMF was determined in the stratum corneum of the skin by using the tape stripping method. The NMF constituents were extracted from the adhesive tapes and determined using high-performance liquid chromatography, and the NMF level was normalized for the amount of proteins in the stratum corneum. According to the questionnaire answers, most students from both study years were classified in the group of medium stress levels. The results have shown that in the stress-free period, according to the PSS results, third-year students, regardless of gender, were under higher stress than sixth-year students ($p < 0.001$), while in the stressful period, there was no significant difference between the two study years. Significantly higher stress levels in the stress period compared to the stress-free period were present only in the sixth-year student group. The stress level did not differ between male and female students within the same year of study regardless of the year of study in both periods. The level of NMF in both groups did not differ significantly between the periods under stress and stress-free periods, although the sixth-year students' stress index was significantly higher in the stress period. By comparing the students of the third and sixth year of study, the trend was equal to the trend of stress level. During the stress period, there was no difference in the level of NMF between the two groups of students. Regarding the stress-free period, although no statistically

significant difference in the level of NMF was found between third and sixth-year students ($p = 0.0547$), there was a clear trend of increasing NMF levels in the third-year student group.

Our research is the first one in humans to examine the association between psychological stress and NMF levels in the skin. Considering the results of PSS, it can be concluded that the third-year students were exposed to longer-term stress, while in the sixth-year students' stress was associated with the period in which they had exams followed by a period of relaxation between exams. This is corroborated by the fact that the change in stress levels between the stress-free and stress periods was greater in sixth-year students than in third-year students. Our study observed a trend of increasing NMF levels with increasing stress levels. Further research is needed to determine the mechanism by which stress influences, as an independent factor, NMF levels in the skin.

Key words: students, psychological stress, natural moisturizing factor, skin barrier

12. ŽIVOTOPIS

Ivana Orešković rođena je 25. kolovoza 1995. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Stenjevec pohađala je od 2002. do 2009. godine. VII. Gimnaziju u Zagrebu pohađala je od 2010. do 2014. godine. Nakon završene gimnazije 2014. godine upisuje preddiplomski studij Biotehnologije Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2020. završava preddiplomski studij te upisuje diplomski studij Bioproceno inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta sveučilišta u Zagrebu. U ovoj akademskoj godini pohađa 2. godinu diplomskog studija.

Mislav Mokos rođen je 29. lipnja 1998. godine u Zagrebu. Od 2005. do 2013. godine pohađao je Osnovnu školu Remete u Zagrebu, a od 2013. do 2017. godine V. gimnaziju u Zagrebu. Godine 2017. upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem u ovoj akademskoj godini pohađa petu godinu studija. Engleski jezik poznaje na razini C2, njemački jezik na razini C1, a talijanski jezik na razini B1.

Dora Vlašić rođena je 28. lipnja 1999. godine u Dubrovniku. Osnovnu školu Ivana Gundulića u Dubrovniku pohađala je od 2006. do 2014. godine, te je u razdoblju od 2010. do 2014. godine završila osnovnu baletnu školu u Umjetničkoj školi Luke Sorkočevića. Godine 2014. upisala je Gimnaziju Dubrovnik, a 2018. godine Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem u ovoj akademskoj godini pohađa 4. godinu studija.