

ქრონიკული ზომიერი ფსიქოლოგიური სტრესის გავლენა კანის დაბერებაზე: კლინიკური კვლევა და უჯრედების ფუნქციონირება

მურიელ პუქოსი

სესილ შამაიუ-რობერტი

საკვანძო სიტყვები: კორტიზოლი, დნმ-ის დაზიანება, ეპინეფრინი, უჯრედგარე მატრიცა, ფსიქოლოგიური სტრესი, კანის დაბერება, კანის ბარიერი, ჭრილობების შეხორცება

აბსტრაქტი

შესავალი: კანი მუდმივად იმყოფება როგორც გარე, ისე შიდა, მათ შორის ფსიქოლოგიურ სტრესის (PS), გარემო ფაქტორების ზემოქმედების ქვეშ. დადასტურებულია, რომ ფსიქოლოგიური სტრესი, კორტიზოლისა და ეპინეფრინის გამოყოფის დახმარებით, იწვევს სხვადასხვა დერმატოლოგიური დაავადებების განვითარებას, როგორცაა ფსორიაზი, ატოპური დერმატიტი, ვიტელიგო, ალოპეცია და აკნე.

მიზანი: კლინიკურად შეგვესწავლა ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესით (PS) გამოწვეული კანის შესამჩნევი დაბერების ნიშნები ადამიანებში ზომიერი და მსუბუქი ქრონიკული სტრესის პირობებში, და გამოიკვლიოს ქრონიკული სტრესის გავლენა DNA-ის დაზიანებაზე უჯრედულ დონეზე.

მეთოდები: ჩატარდა კორტიზოლითა და ეპინეფრინით, ასევე მხოლოდ კორტიზოლით გამოწვეული სტრესის in vitro მოდელირებით, რათა შეფასებულიყო მისი გავლენა ექსტრაცელულარული მატრიქსის (ECM) სინთეზზე, ადამიანის ნორმალური კანის ფიბრობლასტებისა და კერატინოციტების ფუნქციონირებაზე, მათ შორის კანის ბარიერისა და ჭრილობის შეხორცების პროცესებზე.

შედეგები: კლინიკურ კვლევაში მონაწილე ზომიერი სტრესის ქვეშ მყოფ სუბიექტებში აღინიშნებოდა ანტიოქსიდანტური პოტენციალის მნიშვნელოვანი შემცირება და კანის ბარიერის მთლიანობის დარღვევა, ასევე კანის მიკრორელიეფის ცვლილებების (ტექსტურა და წვრილი ნაოჭები) მკვეთრი ზრდა - დაახლოებით 32.9%-ით. უჯრედულ დონეზე, სტრესული ჰორმონების გაზრდილმა დონემ იმოქმედა DNA-ს მთლიანობაზე, ECM-ის სინთეზზე, ჭრილობის შეხორცებაზე და კანის ბარიერის მახასიათებლებზე.

დასკვნა: აქ წარმოდგენილი კლინიკური კვლევები, ისევე, როგორც სტრესის ქვეშ უჯრედების ფუნქციონირების შესწავლა, ადასტურებენ, რომ ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესი მნიშვნელოვნად არღვევს კანის ჰომეოსტაზს და აჩქარებს მის დაბერებას

1. შესავალი

კანი მუდმივად ექვემდებარება გარე და შიდა ფაქტორების ზემოქმედებას, მათ შორის მზის სხივების, თამბაქოს, დაბინძურებისა და ტემპერატურული ცვლილებების, აგრეთვე კვების, მედიკამენტების, ძილის დეფიციტისა და ფსიქოლოგიურ სტრესის (PS) ზეგავლენას; ყველა ეს ფაქტორი ცნობილია, როგორც კანის დაბერების პოტენციური მაპროვოცირებელი მიზეზები [1, 2].

ფსიქოლოგიური სტრესი (PS) რთული პროცესია, რომელიც მოიცავს სხვადასხვა ბიოლოგიურ მექანიზმს, უჯრედებსა და სიგნალების გადაცემას, რამაც შეიძლება მიგვიყვანოს ჯანმრთელობის როგორც უმნიშვნელო, ისე სერიოზულ დარღვევებამდე [3-7]. სტრესის ზემოქმედების დროს ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის ღერძი (HPA) გამოყოფს ისეთ მედიატორებს, როგორცაა კორტიზოლი და ეპინეფრინი [8-10]. სხვა ორგანოების მსგავსად, კანი ასევე შეიძლება დაექვემდებაროს ამ ნივთიერებების ზემოქმედებას. დადასტურებულია, რომ ფსიქოლოგიურმა სტრესმა შესაძლოა გამოიწვიოს კანის დაავადებები, მათ შორის ფსორიაზი, ატოპური დერმატიტი, ბარიერული ფუნქციის პათოლოგიური დარღვევა და ჭრილობის შეხორცების შეფერხება [11]. ასევე შესაძლოა ის უწყობდეს ხელს იმუნური სისტემის დისფუნქციას [12, 13].

ადრეულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ფსიქოლოგიურმა სტრესმა (PS) შესაძლოა გარკვეულ პირობებში გამოიწვიოს კანის ბარიერის განვლადობის ცვლილებები, რაც განპირობებულია ენდოგენური გლუკოკორტიკოიდების დონის ზრდით, რომლებიც არღვევენ როგორც ბარიერულ ჰომეოსტაზს, ასევე რქოვანა შრის მთლიანობას [14, 15]. მიუხედავად

იმისა, რომ ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) გავლენა კანის სხვადასხვა დარღვევაზე კარგად არის ცნობილი, მისი მოლეკულური მექანიზმები ჯერ კიდევ არ არის საკმარისად შესწავლილი. ერთმა კვლევამ აჩვენა კავშირი ფსიქოლოგიურ სტატუსსა და კანის ბარიერის განვლადობას შორის, კანის სპეციფიკური მდგომარეობების მქონე ადამიანებში და შეისწავლა სტრესით გამოწვეული დარღვევების გავლენა ეპიდერმისის ფუნქციაზე, როგორც ანთებითი დერმატოზების გამომწვევი ფაქტორებისა [16].

მიუხედავად იმისა, რომ ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) მრავალი ბიოლოგიური მარკერის გავლენა იმუნურ ფუნქციასა და ანთებით მარკერებზე უკვე აღწერილია, ჯერ კიდევ ცოტაა ინფორმაცია იმაზე, თუ როგორ იწვევს ეს პროცესები სახის დაბერების ხილულ ნიშნებს [17-19]. ამჟამად, მხოლოდ ერთი პუბლიკაცია ეხება PS-ის შედეგად განვითარებულ ხილულ დაბერების ნიშნებს. აღნიშნული კვლევა ჩატარდა სუბიექტებზე, რომლებიც ექვემდებარებოდნენ პროფესიული საქმიანობით გამოწვეულ სამუშაო სტრესს, ძალიან სპეციფიკურ პირობებში [20].

ამ კვლევის გლობალური მიზანი შეფასებულიყო კანში ის გაზომვადი ცვლილებები, რომლებიც ნებისმიერ ადამიანს შეიძლება განუვითარდეს ზომიერი ქრონიკული PS-დან გამომდინარე.

ამ მიზნით, ჩვენ შევასეთ ცვლილებები, რომლებმაც შესაძლოა გამოიწვიოს კანის დაბერების ნიშნების გამოვლენა ზომიერად სტრესირებულ სუბიექტებში მსუბუქად სტრესირებულებთან შედარებით, კანის ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობის, ბარიერული მთლიანობის და ზედაპირის უხეშობის შეფასების გზით. უფრო მეტიც, ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) სხვადასხვა შესაძლო მექანიზმები შეფასდა უჯრედულ დონეზე,

კორტიზოლის და ეპინეფრინის გავლენით ადამიანის ნორმალური კანის კერატინოციტებისა და ფიბრობლასტების ფუნქციონირებაზე, რადგან ორივე უკრედი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს კანის სტრუქტურაში. In vitro პირობებში კანის დაბერების ბიომარკერების შეფასებაში შედიოდა DNA-ის დაზიანება, ექსტრაცელულარული მატრიქსის (ECM) გენების ექსპრესია, ჭრილობის შეხორცების პროცესი და კანის ბარიერის მთლიანობა.

2. მასალა და მეთოდები

2.1 კლინიკური საძიებო კვლევა

კლინიკურმა ექსპლორატორულმა კვლევამ შეაფასა ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) გავლენა კანის დაბერების კლინიკურ მარკერებზე ინსტრუმენტული მარკერების დახმარებით.

2.1.1 პირობები

ეს არაინტერვენციული კვლევა დამტკიცებული იყო დამოუკიდებელი ეთიკის კომიტეტის მიერ.

ყველა მონაწილემ კვლევაში ჩართვამდე ხელი მოაწერა ინფორმირებულ თანხმობას. კვლევა ჩატარდა კარგი კლინიკური პრაქტიკის (Good Clinical Practices) წესების დაცვით და ეფუძნებოდა პელსინკის დეკლარაციის პრინციპებს.

2.1.2 სუბიექტები

კვლევაში ჩაერთო ორმოცი ქალი 35-დან 55 წლამდე ასაკობრივ ჯგუფში, რომლებიც შეფასდნენ როგორც მსუბუქი ($n = 20$) და ზომიერი ($n = 20$) ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესის მქონე, "აღქმადი სტრესის სკალის" (Perceived Stress Scale) კითხვარის მიხედვით [21]. ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესი განისაზღვრა როგორც ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში მუდმივად განცდილი გადატვირთულობისა და ბენოლის შეგრძნება.

ყველა მონაწილე უნდა ყოფილიყო არამწვევლი, არ უნდა ყოფილიყვნენ ალკოჰოლის მომხმარებლები, არ უნდა ემუშავათ შენობაში, კარგად უნდა სძინებოდათ და არ უნდა ყოფილიყვნენ მზის ჭარბი ზემოქმედების ქვეშ. გარდა ამისა, ყველა სუბიექტი უნდა ყოფილიყო სტანდარტულ დიეტაზე და არ უნდა ფოთილიყვნენ კალორიულ შემადგენელ ან რაიმე განსაკუთრებულ კვებით რეჟიმზე.

2.1.3 შეფასებები

კანის მთლიანი ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობა გაზომეს FRAP ტესტის გამოყენებით კანის ზედაპირის ნიმუშებზე (skin stripping samples) [22]. კანის ნიმუშები აღებულ იქნა Corneofix ფოლგების (Courage-Khazaka, გერმანია) საშუალებით.

კანის ზედაპირის ტექსტურის პარამეტრებში შედიოდა "ბატკნის ფრთების" შეფასება რეალური 3D მიკროტოპოგრაფიის სისტემის გამოყენებით (Primoslite GF Messtechnik GmbH, გერმანია). კანის ზედაპირი რეკონსტრუქტირდა ალგორითმის მეშვეობით, რომელმაც შექმნა 3D გამოსახულებები. შეფასდა შემდეგი პარამეტრები: R3z (სანყისი უხეშობა), Rt (სრული უხეშობა), Rp (პროფილის მწვერვალის სიმაღლე), RSm (უხეშობის საშუალო ამპლიტუდა) და S (პიკის ამპლიტუდის საშუალო).

ტრანსეპიდერმული წყლის დანაკარგი (TEWL) შეფასდა Tewameter 300-ის (Courage+Khazaka, electronic GmbH) გამოყენებით.

2.1.4 სტატისტიკური ანალიზი

რიცხვობრივი ცვლადები აღწერილი იყო საშუალო მნიშვნელობებითა და სტანდარტული გადახრით. სტატისტიკურად მნიშვნელოვანად მიიჩნეოდა შედეგები, როცა p მნიშვნელობა იყო ნაკლები 0.05-ზე ($p < 0.05$). ყველა გამოთვლა შესრულდა Microsoft Excel 2013-ის (ვერსია 15.0.4893.1002; Microsoft, USA) ცხრილში, რომელიც მუშაობდა Microsoft

Windows 8.1 Professional-ის (Microsoft, USA) ოპერაციულ სისტემაზე.

მონაცემები შეფასდა ორი მიმართულების სტიუდენტის t -ტესტით შეწყვილებული მონაცემებისთვის, ან Mann-Whitney-ის U -ტესტით, მონაცემების ნორმალურობის ვარაუდის მიხედვით. სტატისტიკური ანალიზი განხორციელდა NCSS 10 Professional პროგრამის გამოყენებით (ვერსია 10.0.12; NCSS 10 Statistical Software, NCSS, LLC, ქეისვილი, იუტა, აშშ), რომელიც მუშაობდა Microsoft Windows Server 2008 R2 Standard ოპერაციულ სისტემაზე (Microsoft, USA).

2.1.5 ინ ვიტრო ტესტები

ინ ვიტრო ტესტები ჩატარდა მოლეკულურ დონეზე, რათა შეფასებულიყო კორტიზოლისა და ეპინეფრინის გავლენა კანის დაბერების მაჩვენებლებზე.

2.1.6 უკრედილი კულტურა

ნორმალური ადამიანური კერატინოციტები (Biopredic International, საფრანგეთი) იყო "keratinocytes-SFM" მედიუმში შენახული, რომელიც გამდიდრებული იყო ღორის ჰიპოფიზის ექსტრაქტით (30 მკგ/მლ) და რეკომბინირებული ეპიდერმისული ზრდის ფაქტორით (rEGF, 0.2 ნგ/მლ). ნორმალური ადამიანური ფიბრობლასტები (Promocell Human Centered Science, გერმანია) შენახული იყო DMEM მედიუმში, რომელიც გამდიდრებული იყო ხარის ნაყოფის შრატით (10%). კულტივაცია მიმდინარეობდა 37°C ტემპერატურაზე, ნესტიან ინკუბატორში, 5%-იანი CO_2 -ის ატმოსფეროში.

2.1.7 დნმ-ის დაზიანება

სტანდარტული ტუტე კომეტის ტესტი ჩატარდა Singh და სხვების მიერ აღწერილი მეთოდის მიხედვით [23]. ტესტის სენსიტივობის გასაუმჯობესებლად გამოყენებულ იქნა მოდიფიცირებული პროტოკოლი, რომელიც მოიცავდა სპეციფიკურ ფერმენტს - ფორმამიდოპირიმიდინის დნმ გლიკოზილაზას (FPG). ეს ფერმენტი უზრუნველყოფს 8-ოქსოგვანინისა და სხვა პურინული ოქსიდაციური პროდუქტების დეტექციას, რომლებიც წარმოიქმნება უკრედის ბირთვების ოქსიდაციური სტრესიას. FPG სპეციფიკურად ცნობს დაჟანგულ დნმ ბაზებს და გარდაქმნის მათ ჯაჭვის ფრაგმენტებად [24].

ნორმალური ადამიანური კერატინოციტები და ფიბრობლასტები მუშავდებოდა კორტიზოლის ან ეპინეფრინის ხსნარებით 24 საათის განმავლობაში. ამის შემდეგ უკრედები ტრიპსინიზდა, დაითესა აგაროზში და გადატანილ იქნა მიკროსკოპის შუშებზე. ლიზის ხსნარში დამუშავების შემდეგ შუშები გარეცხეს BSA-ის ფერმენტული ბუფერით და დაამუშავეს FPG ფერმენტით 30 წუთის განმავლობაში 37°C ტემპერატურაზე. ელექტროფორეზი ჩატარდა 20 წუთის განმავლობაში, 25V ძაბვითა და 300mA დენით. შემდეგ შუშები გარეცხეს Tris ბუფერით (pH 7.5), გაუნყლოეს 100%-იან მეთანოლში და გააშრეს. თითოეული შუშა შეიღება ეთიდიუმის ბრომიდით. ანალიზი ჩატარდა 250-ჯერადი გადიდებით ფლოუორესცენციური მიკროსკოპის საშუალებით (Olympus Optical Co., ტოკიო, იაპონია), რომელიც აღჭურვილი იყო U-MWG2 ტიპის დიქრომული სარკით (ბენდი-პასის ფილტრი: 510-550 ნმ; ლონგ-პასის ფილტრი: 590 ნმ). გამოსახულებების ანალიზი ჩატარდა Komet პროგრამით (ვერსია 6.0, Andor Technology, ბელფასტი, ჩრდილოეთ ირლანდია). თითო შუშაზე ანალიზს ექვემდებარებოდა 50 შემთხვევით შერჩეული უკრედი Fenestra Komet 6.0 გამოსახულების ანალიზის პროგრამით (Andor Technology, ბელფასტი, ჩრდილოეთ ირლანდია). დნმ-ის დაზიანება გამოიხატებოდა Olive Tail Moment-ით (OTM; პირობითი ერთეულებით);

თითოეულ ნიმუშზე განისაზღვრა 100 OTM მნიშვნელობა — თითო 50 ორ დამოუკიდებელ შუამზე. OTM მნიშვნელობები განანიღდა კლასებად მინიმალურ და მაქსიმალურ მნიშვნელობებს შორის. OTM-ს დისტრიბუციის სიხშირეებზე შესრულდა არანწყვეტიერი რეგრესიული ანალიზი χ^2 ფუნქციის გამოყენებით TableCurve 2D პროგრამით (ვერსია 5.0; Jandel Scientific Software, სან რაფაელ, კალიფორნია). ამ ფუნქციისათვის გამოთვლილი თავისუფალი ხარისხების რაოდენობა (n) წარმოადგენდა რაოდენობრივ მაჩვენებელს დნმ-ის დაზიანებისთვის ნიმუშში [25]. n-ს უწოდეს „chi-2 OTM“ და გამოიყენებოდა როგორც ერთადერთი პარამეტრი დნმ-ის დაზიანების დონეების შეფასებისთვის. მნიშვნელოვნების შესაფასებლად, სტუდენტის t-ტესტის გამოყენებით განისაზღვრა განსხვავებები chi-2 OTM მნიშვნელობებს შორის დაუმუშავებელ უჯრედებსა და კორტიზოლით ან ეპინეფრინით დამუშავებულ უჯრედებს შორის.

2.1.8 უჯრედგარე მატრიქსის სინთეზი

ადამიანის ნორმალური კანის ფიბრობლასტები კულტივირებული იყო კორტიზოლის (Sigma Aldrich, Merck KGaA, დარმშტადი, გერმანია) 0.1 და 1 მიკრომოლარულ კონცენტრაციაში დამატებული კულტურის საშუალებაში (DMEM) 48 საათის განმავლობაში. რიბონუკლეინმჟავა (RNA) მთლიანად ამოიღეს Pure RNA Tissue კიტის (ThermoFisher, სტრასბურგი, საფრანგეთი) გამოყენებით და გამოითვალეს სპექტროფოტომეტრით 260 ნმ-ზე. შემდეგ სინთეზირდა cDNA-ის პირველი ჯაჭვი High-Capacity cDNA Reverse Transcription კიტით. რეალურ დროში რევერსული ტრანსკრიპტის ჯაჭვის პოლიმერაზული რეაქციები (RT-PCR) ჩატარდა 7300 Real Time PCR System-ის გამოყენებით, TaqMan პრაიმერებისა და პრობების (Applied Biosystems, უოლტჰემი, მასაჩუსეტსი, აშშ) გამოყენებით, რომლებიც სპეციფიკურია თითოეული გენისთვის. გენების ექსპრესიის ურთიერთობილი ცვლილებები (RQ) გამოითვალეს $2^{-\Delta\Delta CT}$ მეთოდის მიხედვით, 18S RNA-ის გამოყენებით როგორც შინამომხმარებელი გენით (housekeeping gene). შედეგები შეადარეს სტუდენტის t-ტესტის გამოყენებით; $p < 0.05$ მნიშვნელოვნად ითვლებოდა სტატისტიკურად.

2.1.9 ჭრილობის შეხორცება

ადამიანის ნორმალური კანის ფიბრობლასტები და კერატინოციტები გაჟღენთეს 35 მმ დიამეტრის პეტრის ზეთში, რომელიც შეიცავდა კულტურის

ინსერტებს და ინკუბირებოდნენ 37°C ტემპერატურაზე 5%-იანი CO₂ გარემოში შესაბამისი კულტურის საშუალებით, რათა მიიღონ კონფლუენტური მონოლაიერი. უჯრედების პროლიფერაციის ინჰიბირების მიზნით, დაემატა მიტომიცინ C 2 საათის განმავლობაში და ამოღებული იქნა ფოსფატ-ბუფერული ფიზიოლოგიური ხსნარით (PBS) გარეცხვით. შემდეგ კულტურის ინსერტი ამოიღეს პეტრის ლაბორატორიული ფინჯარიდან. უჯრედები კულტივირებული იყო კორტიზოლის (Sigma Aldrich, Merck KGaA, დარმშტადი, გერმანია) 0.1 და 1 მიკრომოლარულ კონცენტრაციებში დამატებულ კულტურის საშუალებაში. ინკუბაციის განმავლობაში უჯრედების კულტურის გამოსახულებები რეგულარულად იქნა აღბეჭდილი უჯრედების რეალურ დროში მონიტორინგის სისტემით (Cytonote, Iprasense, საფრანგეთი), რომელიც დაკავშირებული იყო Horus პროგრამასთან (Iprasense, საფრანგეთი). გაიზომა ჭრილობის ფართობი (უჯრედებისგან თავისუფალი ფართობი) და გამოითვალა უჯრედების მიგრაციის სიჩქარე [(ჭრილობის ფართობი t=0-ზე - ჭრილობის ფართობი t=ბოლოზე) / მიგრაციის ხანგრძლივობის დრო].

2.1.10 კანის ბარიერის მთლიანობა

რეკონსტრუირებული ადამიანის ეპიდერმისი (RHE) კულტივირებული იქნა 2.5 ან 5µM კორტიზოლის შემცველი ზრდის გარემოში 8 დღის განმავლობაში, გარემო ყოველდღიურად იცვლებოდა. მკურნალობის დასრულებისას, RHE დაფიქსირდა 4%-იან ბუფერულ ფორმალდეჰიდში და პარაფინში. პარაფინი ამოიღეს ქსილენში და შემდეგ რეჰიდრატაცია ჩატარდა თანდათანობით დაბალი კონცენტრაციის ალკოჰოლებში. ანტიგენის ამოღება შესრულდა ციტრატის ბუფერში, ხოლო არსპეციფიკური ადგილები დაბლოკილი იყო თხის შრატით. სექციები გარეცხეს PBS ხსნარში და დააინკუბირეს სპეციფიკურ პირველად ანტისხეულებთან (Filaggrin Ref: ab218395, Abcam; Loricrin Ref: ab85679, Abcam, კემბრიჯი, UK). შემდეგ, სექციები კვლავ გარეცხეს PBS-Tween-ით და გამოყენეს მეორადი ანტისხეულები AlexaFluor 488 და AlexaFluor 350. ბირთვები შეღებილი იყო პროპიდიუმ იოდიდით (Sigma Aldrich, Merck KGaA, დარმშტადი, გერმანია). სექციები მოთავსებულ იქნა Gel Mount-ში. ფილაგრინის და ლორიცინის შეღებვის ზედაპირის ფართობი შეფასდა გამოსახულების ანალიზის პროგრამით (ZEN 2 blue edition, Zeiss, იენა, გერმანია) და ნორმალიზებული იქნა RHE-ს საერთო ზედაპირთან მიმართებით.

ცხრილი 1. კანის ზედაპირის ტექსტურის პარამეტრების საშუალო მნიშვნელობები მსუბუქი ან ზომიერი სტრესის მქონე პირებში.

პარამეტრი	მსუბუქი PS (n=18)	ზომიერი PS (n=18)	p ^a
R _{max} , მაქსიმალური უხეშობა (µm)	467.73±25.12	550.16±37.12 (+17.6%)	0.0373
R _{3z} , სანყისი უხეშობა (µm)	130.95±5.42	145.36±6.37 (+11.0%)	0.0471
R _t , სრული უხეშობა (µm)	0.5018±0.0268	0.5893±0.0393 (+17.4%)	0.0372
R _p , პროფილის პიკის სიმაღლე (µm)	207.15±13.76	275.23±20.32 (+32.9%)	0.0045
R _{Sm} , უხეშობის ამპლიტუდა (µm)	1.69±0.05	1.88±0.08 (+11.2%)	0.0274
S, პიკების ამპლიტუდა (µm)	442.20±6.26	460.41±4.47 (+4.1%)	0.0119

3 შედეგები

3.1 კლინიკური ექსპლორაციული კვლევა

სულ 36 მონაწილემ დაასრულა კვლევა - 18 ქალი მსუბუქი ფსიქოლოგიური სტრესით (PS) და 18 ქალი

სტრესის საშუალო დონით. მსუბუქი და საშუალო სტრესის ჯგუფებში მონაწილეთა საშუალო ასაკი იყო შესაბამისად 50.2 ± 0.9 და 49.7 ± 1.1 წელი. PSS ქულები მნიშვნელოვნად ($p = 0.001$) დაბალი იყო მსუბუქი სტრესის ჯგუფში (12.0 ± 0.4), ვიდრე საშუალო სტრესის ჯგუფში (23.1 ± 0.6), რაც ადასტურებს ორ ჯგუფს შორის არსებულ განსხვავებას. FRAP ტესტის შედეგებმა აჩვენა, რომ

საშუალო სტრესის მქონე ქალებს მნიშვნელოვნად დაბალი ანტიოქსიდანტური უნარი ჰქონდათ ($119.7 \pm 7.5 \mu\text{MFe}^{2+}$; საშუალო სხვაობა: 12.2%; $p = 0.04$), ვიდრე მსუბუქი სტრესის მქონე ქალებს ($163.3 \pm 5.5 \mu\text{MFe}^{2+}$). სტატისტიკური განსხვავება (ყველა $p < 0.05$) დაფიქსირდა ორივე ჯგუფის ქალებს შორის ყველა პარამეტრის სიხისტის მიხედვით (ცხრილი 1). Rp პროფილის პიკის სიმაღლის 32.9%-იანი ზრდა ადასტურებს მიკრორელიეფის ცვლილებას, რაც გამოიხატება წვრილი ხაზების მატებაში და ტექსტურის ცვლილებაში საშუალო სტრესის მქონე პირებში მსუბუქი სტრესის მქონეებთან შედარებით. სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი განსხვავება (14.4%; $p < 0.033$) დაფიქსირდა TEWL-ის საშუალო მნიშვნელობებში- საშუალო სტრესის ჯგუფში TEWL იყო უფრო მაღალი (12.4 გ/სთ/მ²), ვიდრე მსუბუქი სტრესის ჯგუფში (10.8 გ/სთ/მ²).

3.2 ინ ვიტრო ანალიზები

3.2.1 დნმ-ის დაზიანება

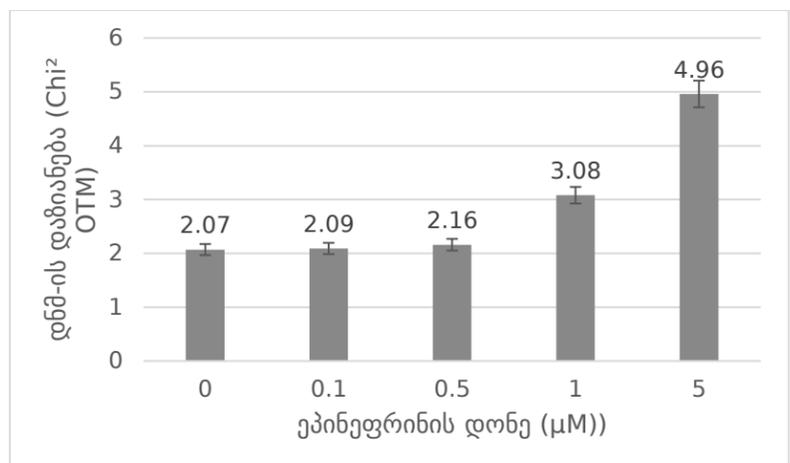
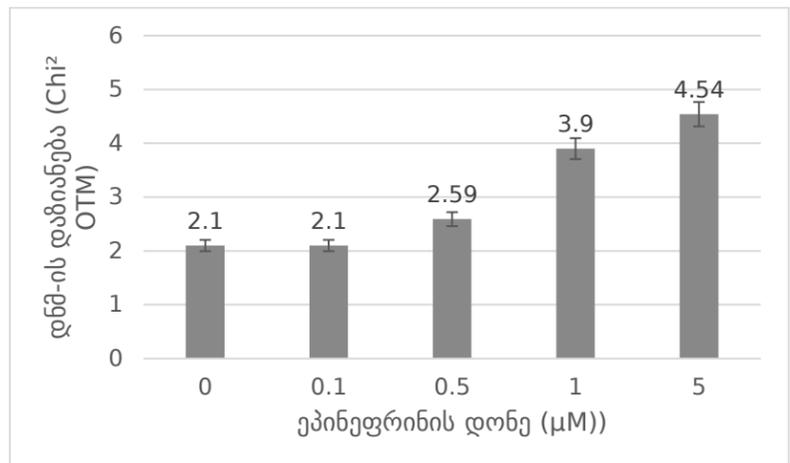
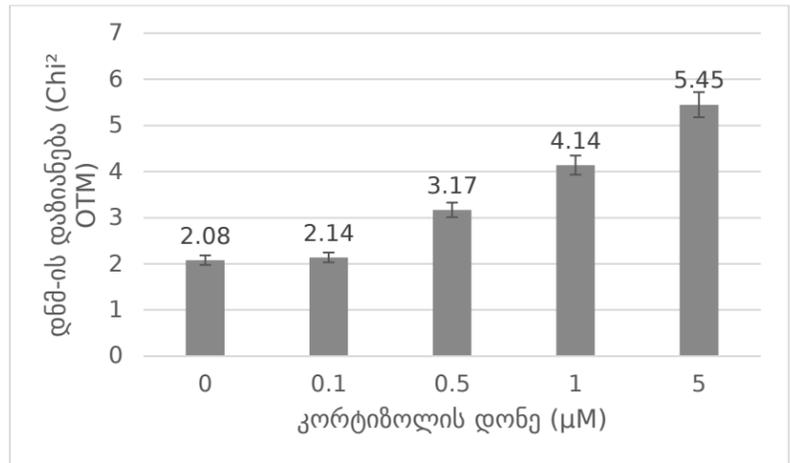
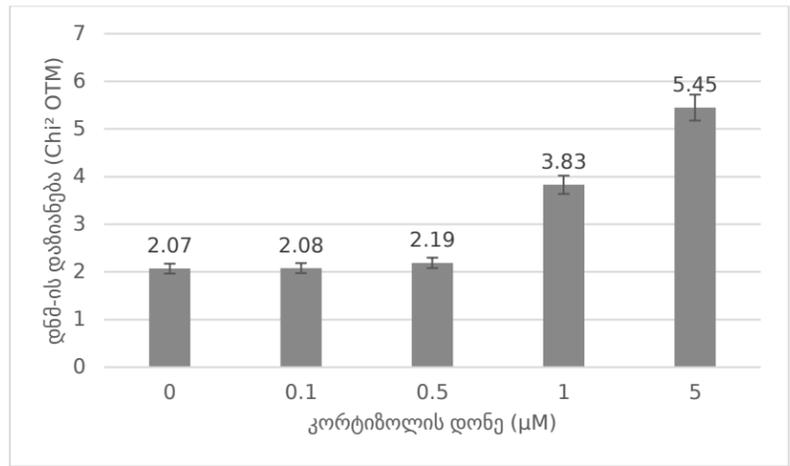
კორტიზოლით მკურნალობამ გამოიწვია დოზაზე დამოკიდებული დნმ-ის ოქსიდაციური დაზიანების, როგორცაა 8-ოქსოგუანინი, მატება. კერატინოციტებში მნიშვნელოვნად გამოხატული დაზიანება დაფიქსირდა 1 μM დოზაზე (OTM მედიანა = 2.27, Chi2OTM = 3.83, $p < 0.001$), ხოლო ფიბრობლასტებში - უკვე 0.5 μM დოზაზე (OTM მედიანა = 1.67, Chi2OTM = 3.17, $p < 0.001$). ეპინეფრინმა დნმ-ის მნიშვნელოვანი დაზიანება გამოიწვია როგორც კერატინოციტებში, ისე ფიბრობლასტებში - 0.5 μM დოზაზე (OTM მედიანა = 1.08, Chi2OTM = 2.59, $p < 0.001$) და 1 μM დოზაზე (OTM მედიანა = 1.23, Chi2OTM = 3.08, $p < 0.001$), შესაბამისად. შედეგები მოცემულია გრაფიკ 1-ზე.

3.2.2 უჯრედგარე მატრიქსის სინთეზი

კორტიზოლის ორივე დოზით მკურნალობის შედეგად, მნიშვნელოვნად ($p < 0.05$) შემცირდა კოლაგენი ტიპი I, კოლაგენი ტიპი III და HSP47-ის ექსპრესია, ასევე მეტალოპროტეინაზების ქსოვილური ინჰიბიტორის TIMP1-ის დონე. LOXL1-ის mRNA შემცირდა 27%-ით კორტიზოლის მაქსიმალური დოზით, რაც შეიძლება მიუთითებდეს კანის ელასტინური ბადის დაზიანების რისკზე. ასევე შემცირდა ორი გენის, HAS2 და CD44 ექსპრესია, რომლებიც დაკავშირებული იყვნენ ჰიალურონის მუჯავის შემცველობასთან (სურათი 2). მნიშვნელოვანი ($p < 0.05$) დაქვეითება დაფიქსირდა ფიბრობლასტური ზრდის ფაქტორის 7-ისა (FGF7) და პერიოსტინის (POSTN) გენის ექსპრესიაში, დაფიქსირდა POSTN-ის ექსპრესიის შემცირება დაახლოებით 80%-ით (სურათი 2).

3.2.3 ჭრილობის შეხორცების დარღვევა

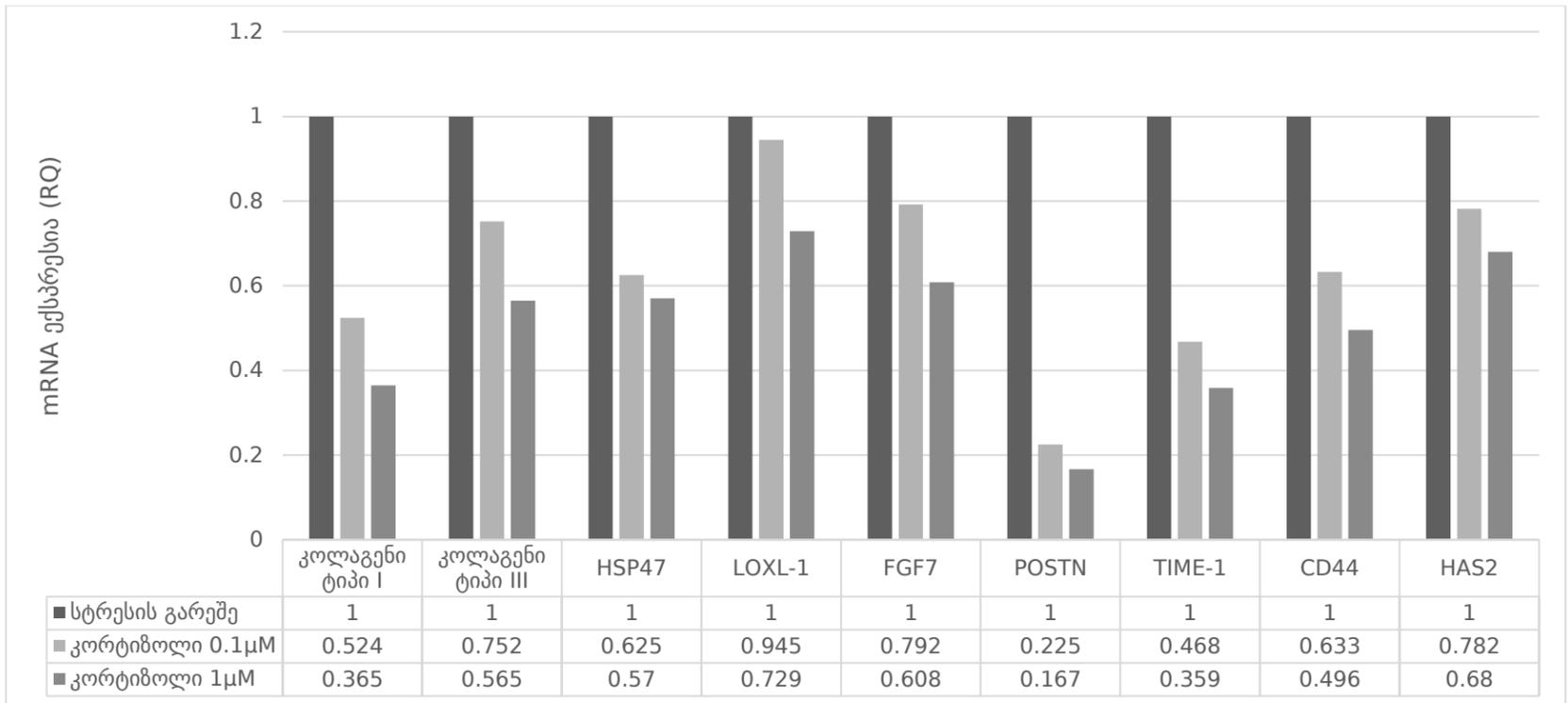
კორტიზოლით გამოწვეულმა სტრესმა დააზიანა როგორც კერატინოციტების ჭრილობის შეხორცების სიჩქარე, ასევე მათი მიგრაციის უნარი. როგორც ნაჩვენებია სურათზე 3, არასტრესულ კერატინოციტებში ჭრილობის ფართობი (უჯრედებისგან თავისუფალი ზონა) თითქმის სრულად დაიხურა 72 საათში (ჭრილობის ფართობი = 6%), მაშინ როდესაც კორტიზოლის ზემოქმედებით 0.1 μM დოზით ფართობი იყო 13%, ხოლო 1 μM დოზით — 28%. ანალოგიურად, “დასტრესილ კანში” კერატინოციტების მიგრაციის სიჩქარე შემცირდა 19%-მდე 1 μM კორტიზოლის პირობებში. ნორმალურ ადამიანურ ფიბრობლასტებში, არასტრესულ ნიმუშებში ჭრილობის ფართობი შეადგენდა 55%-ს (სურათი 3), ხოლო 1 μM კორტიზოლის ზემოქმედებით 72 საათში გაიზარდა 86%-მდე. უჯრედების მიგრაციის სიჩქარე მნიშვნელოვნად ($p < 0.05$) შემცირდა 73%-ით.



გრაფიკი 1. დნმ-ის დაზიანება (საშუალო ± სტანდარტული სიდიდე, n=100). კორტიზოლით გამოწვეული ოქსიდაციური დაზიანებები (ა) ნორმალურ ადამიანის კერატინოციტებში და (ბ) ნორმალურ ადამიანის ფიბრობლასტებში. ეპინეფრინით გამოწვეული ოქსიდაციური დაზიანებები (გ) ნორმალურ ადამიანის კერატინოციტებსა და (დ) ნორმალურ ადამიანის ფიბრობლასტებში. *მნიშვნელოვანია არასტრესულ უჯრედებთან შედარებით ($p < 0.001$).

3.2.4 კანის ბარიერის დაზიანება

ნორმალურ პირობებში კულტივირებული RHE-ის, რომელიც კორტიზოლის ზემოქმედების გარეშე იყო, გრანულარულ შრეში დაფიქსირდა ფილაგრინისა და ლორიცინის მკაფიო შეღებვა (სურათი 4). კორტიზოლის არსებობის შემთხვევაში, ფილაგრინის სინთეზი მნიშვნელოვნად მცირდებოდა - 32%-ით 2.5 μM დოზაზე და 26%-ით 5 μM დოზაზე. ასევე დაფიქსირდა ლორიცინის 20%-იანი შემცირება კორტიზოლის უმაღლესი დოზით. სრული შედეგებისთვის იხილეთ სურათი 5.



გრაფიკი 2. უჯრედგარე მატრიქსის გენის ექსპრესია ნორმალურ ადამიანის ფიბრობლასტებზე, რომლებიც დამუშავებულნი არიან კორტიზოლით 0.1 და 1 μM დოზით (საშუალო ± SEM, n=5). *მნიშვნელოვნად განსხვავდება არასტრესული უჯრედებისგან (p<0.05).

4 დისკუსია

ამ კვლევამ დაადასტურა ქრონიკული ზომიერი ფსიქოლოგიური სტრესის გავლენა კანის დაბერების მაჩვენებლებზე, მათ შორის ანტიოქსიდანტურ შესაძლებლობებზე, კანის ტექსტურაზე და ბარიერების მთლიანობაზე.

ამ კვლევამ ასევე წარმოადგინა მტკიცებულებები, რომ უჯრედულ დონეზე სტრესის "ჰორმონებს" - კორტიზოლი და ეპინეფრინი - მნიშვნელოვანი გავლენა აქვთ ჭრილობის შეხორცებაზე და დნმ-ის მთლიანობაზე, აგრეთვე გარე უჯრედულ მატრიქსის (ECM) სინთეზსა და ეპიდერმისული ბარიერის სინთეზის ცვლილებებზე.

FRAP ტესტის მიხედვით, ზომიერი ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) მქონე პირებმა მნიშვნელოვნად (p=0.04) დაბალი ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობა აჩვენეს მსუბუქი სტრესის მქონე პირებთან შედარებით, საშუალო განსხვავებით 12%. გარდა ამისა, საშუალო სტრესის ჯგუფში მნიშვნელოვნად გაიზარდა კანის სიხისტის

პერიოსტინის (POSTN) გენის აქტიურობის 80%-იან კლებასთან. დნმ-ის დაზიანება მნიშვნელოვნად (p < 0.001) გაიზარდა კორტიზოლისა და ეპინეფრინის დოზების ზრდასთან ერთად. გარდა ამისა, მნიშვნელოვნად შემცირდა კოლაგენი ტიპი I,

მჟავასთან დაკავშირებული გენების - HAS2 და CD44 -ექსპრესია.

გარდა ამისა, კორტიზოლის არსებობისას მცირდებოდა ფილაგრინის სინთეზი 32%-ით 2.5 μM დოზაზე და 26%-ით 5 μM დოზაზე, ხოლო ლორიცინი შემცირდა 20%-ით უმაღლესი კორტიზოლის დოზის ზემოქმედების შემდეგ, რაც ადასტურებს, რომ კორტიზოლი აზიანებს კანის მთლიანობას. ეს შედეგები ადასტურებს ჰიპოთეზას, რომ ფსიქოლოგიური სტრესი, რომელიც ცნობილია კორტიზოლისა და ეპინეფრინის გამოყოფის მიზეზად, აზიანებს კანის ჰომეოსტაზს და სავარაუდოდ წვლილი შეაქვს კანის გადამეტებულ დაბერებაში [2]. აღნიშნული უკვე დასტურდა 2020 წელს De Tollenaere და კოლეგების მიერ, რომლებმაც შეისწავლეს კანის ჰომეოსტაზი მრავალჯერადი სტრესის პირობებში [27]. სხვა კვლევებმა ასევე დაადასტურეს, რომ ლოკალური აქტივაციის შემდეგ

პარამეტრები მსუბუქი სტრესის ჯგუფთან შედარებით, რაც აისახა წვრილი ხაზებისა და სიხისტის 32.9%-იანი ზრდით საშუალო სტრესის ჯგუფში. როგორც კანის რელიეფის ცვლილებები, ისე ანტიოქსიდანტური პოტენციურობის დაქვეითება მნიშვნელოვან წვლილს ასრულებს დაბერების პირველ ხილულ ნიშნებში.

საშუალო ფსიქოლოგიური სტრესის გავლენა კანის ბარიერის მთლიანობაზე დაადასტურდა TEWL-ის ზრდით ზომიერი სტრესის მქონე პირებში. TEWL-ის ამ მატებას ახასიათებს კანის ბარიერის დაქვეითებული ფუნქცია, რაც ზრდის კანის ჰომეოსტაზზე გარე ფაქტორების ზემოქმედების მგრძობელობას.

უჯრედულმა ტესტებმა დაადასტურა, რომ კორტიზოლისა და ეპინეფრინის მომატებული დონეები, რომლებიც ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) ბიომარკერები არიან, აზიანებენ კანის ფუნქციონირებას როგორც კერატინოციტებში, ისე ფიბრობლასტებში. ჭრილობის შეხორცების პროცესი შენედა, რაც დაკავშირებული იყო ფიბრობლასტების ზრდის ფაქტორი 7-ის (FGF7) მნიშვნელოვნად შემცირებულ ექსპრესიასა და

კოლაგენი ტიპი III და HSP47-ის ექსპრესია. მსგავსი დაქვეითება დაფიქსირდა მეტალოპროტეინაზების ქსოვილური ინჰიბიტორის (TIMP1) და LOXL1 mRNA-ის დონეზე, რაც მიუთითებს კანის ელასტინის ბადის შესაძლო დაზიანებაზე, ასევე შემცირდა ჰიალურონის

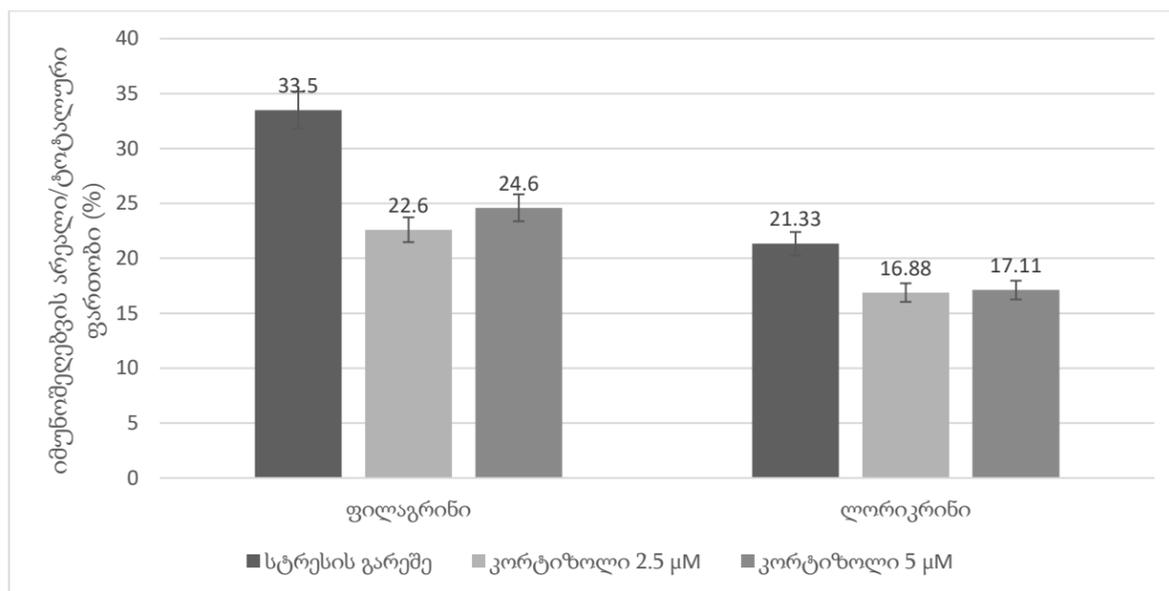
კორტიზოლი გამომუშავდება ეპიდერმისში და დერმალურ ფიბრობლასტებში, რაც კიდევ უფრო ადასტურებს ჩვენს შედეგებს კორტიზოლის, კანის კომპონენტების, უჯრედების გამრავლებას, ჭრილობის შეხორცებას, ანთებასა და დაბერებას შორის კავშირის შესახებ [28].

კვლევამ უჩვენა ახალი პერსპექტივა ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესის (PS) კანის დაბერების ექსპონომად განსახილველად, ჩატარებულ in vitro კვლევასთან ერთად [2, 9, 29].

საბოლოოდ, ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესი (PS) მოქმედებს კანის ბიოლოგიაზე სხვადასხვა გზებით: დნმ-ის დაზიანებიდან დაწყებული გენის ექსპრესიის ცვლილებებით, რაც აისახება კანის მიკრორელიეფის შეცვლასა და საბოლოოდ ნაოჭების წარმოქმნაზე, ბუნებრივი ანტიოქსიდანტური და ფიზიკური ბარიერის დარღვევით.

ფსიქოლოგიური სტრესი ჩვენს ყოველდღიურ ცხოვრებაში სულ უფრო მნიშვნელოვანი საკითხი ხდება — ის გავლენას ახდენს არა მხოლოდ მენტალურ კეთილდღეობაზე, არამედ ფიზიკურ მთლიანობაზე, მათ შორის კანის მდგომარეობაზეც. მიმდინარე კვლევებმა დაადასტურეს, რომ

ქრონიკული ფსიქოლოგიური სტრესი ისახება კანის გარეგნობაზე სტრესის ჰორმონების — კორტიზოლისა და ეპინეფრინის — საშუალებით. თუმცა, საჭიროა დამატებითი კვლევები ამ შედეგების დასადასტურებლად.



გრაფიკი 3. ფილაგრინისა და ლორიკრინის რაოდენობრივი განსაზღვრა კორტიზოლით დამუშავებულ RHE-ზე (საშუალო ± სტანდარტული შეფასება, n=3). *მნიშვნელოვანია არასტრესულ უჯრედებთან შედარებით (p<0.05).

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Z. Celebi Sözen, L. Cevhertas, K. Nadeau, M. Akdis, and C. A. Akdis, "Environmental Factors in Epithelial Barrier Dysfunction," *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145, no. 6 (2020): 1517-1528.
2. J. Krutmann, A. Bouloc, G. Sore, B. A. Bernard, and T. Passeron, "The Skin Aging Exposome," *Journal of Dermatological Science* 85, no. 3 (2017): 152-161.
3. K. M. Harris, D. L. Jacoby, R. Lampert, R. J. Soucier, and M. M. Burg, "Psychological Stress in Heart Failure: A Potentially Actionable Disease Modifier," *Heart Failure Reviews* 26, no. 3 (2021): 561-575.
4. M. Iwata, K. T. Ota, and R. S. Duman, "The Inflammasome: Pathways Linking Psychological Stress, Depression, and Systemic Illnesses," *Brain, Behavior, and Immunity* 31 (2013): 105-114.
5. A. J. Tomiyama, "Stress and Obesity," *Annual Review of Psychology* 70 (2019): 703-718.
6. A. V. Ushakov, V. S. Ivanchenko, and A. A. Gagarina, "Psychological Stress in Pathogenesis of Essential Hypertension," *Current Hypertension Reviews* 12, no. 3 (2016): 203-214.
7. K. Azuma, Y. Adachi, H. Hayashi, and K. Y. Kubo, "Chronic Psychological Stress as a Risk Factor of Osteoporosis," *Journal of UOEH* 37, no. 4 (2015): 245-253.
8. N. C. Nicolaides, E. Kyrtzi, A. Lamprokostopoulou, G. P. Chrousos, and E. Charmandari, "Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids," *Neuroimmunomodulation* 22, no. 1-2 (2015): 6-19.
9. Y. Chen and J. Lyga, "Brain-Skin Connection: Stress, Inflammation and Skin Aging," *Inflammation & Allergy Drug Targets* 13, no. 3 (2014): 177-190.
10. L. Boyanova, "Stress Hormone Epinephrine (Adrenaline) and Norepinephrine (Noradrenaline) Effects on the Anaerobic Bacteria," *Anaerobe* 44 (2017): 13-19.
11. M. Jafferany, B. R. Ferreira, A. Abdelmaksoud, and R. Mkhoyan, "Management of Psychocutaneous Disorders: A Practical Approach for Dermatologists," *Dermatologic Therapy* 33, no. 6 (2020): e13969.
12. B. Poljšak and R. Dahmane, "Free Radicals and Extrinsic Skin Aging," *Dermatology Research and Practice* 2012 (2012): 135206.
13. J. Lin and E. Epel, "Stress and Telomere Shortening: Insights From Cellular Mechanisms," *Ageing Research Reviews* 73 (2022): 101507.
14. T. J. Smith, M. A. Wilson, J. P. Karl, et al., "Impact of Sleep Restriction on Local Immune Response and Skin Barrier Restoration With and Without "Multinutrient" Nutrition Intervention," *Journal of Applied Physiology* 124, no. 1 (2018): 190-200.
15. S. J. Choe, D. Kim, E. J. Kim, et al., "Psychological Stress Deteriorates Skin Barrier Function by Activating 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 and the HPA Axis," *Scientific Reports* 8, no. 1 (2018): 6334.
16. A. Garg, M. M. Chren, L. P. Sands, et al., "Psychological Stress Perturbs Epidermal Permeability Barrier Homeostasis: Implications for the Pathogenesis of Stress-Associated Skin Disorders," *Archives of Dermatology* 137, no. 1 (2001): 53-59.
17. P. H. Wirtz and R. von Känel, "Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease," *Current Cardiology Reports* 19, no. 11 (2017): 111.
18. A. P. Allen, P. J. Kennedy, J. F. Cryan, T. G. Dinan, and G. Clarke, "Biological and Psychological Markers of Stress in Humans: Focus on the Trier Social Stress Test," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 38 (2014): 94-124.

19. M. T. Bailey, "Psychological Stress, Immunity, and the Effects on Indigenous Microflora," *Advances in Experimental Medicine and Biology* 874 (2016): 225-246.
20. O. M. Zanaty, S. El Metainy, R. Abdelmaksoud, H. Demerdash, D. A. Aliaa, and H. A. El Wafa, "Occupational Stress of Anesthesia: Effects on Aging," *Journal of Clinical Anesthesia* 39 (2017): 159-164.
21. S. Cohen, T. Kamarck, and R. Mermelstein, "A Global Measure of Perceived Stress," *Journal of Health and Social Behavior* 24, no. 4 (1983): 385-396.
22. V. Ribet, V. Nobile, and A. B. Rossi, "In Situ Antioxidant Activity of a Dermo-Cosmetic Product: A Randomized Controlled Clinical Study," *Experimental Dermatology* 28, no. 11 (2019): 1219-1226.
23. A. Azqueta, L. Arbillaga, A. López de Cerain, and A. Collins, "Enhancing the Sensitivity of the Comet Assay as a Genotoxicity Test, by Combining It With Bacterial Repair Enzyme FPG," *Mutagenesis* 28, no. 3 (2013): 271-277.
24. E. Bauer, R. D. Recknagel, U. Fiedler, L. Wollweber, C. Bock, and K. O. Greulich, "The Distribution of the Tail Moments in Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay) Obeys a Chi-Square (chi²) not a Gaussian Distribution," *Mutation Research* 398, no. 1-2 (1998): 101-110.
25. H. Schoenfelder, Y. Liu, and D. J. Lunter, "Systematic Investigation of Factors, Such as the Impact of Emulsifiers, Which Influence the Measurement of Skin Barrier Integrity by In-Vitro Trans-Epidermal Water Loss (TEWL)," *International Journal of Pharmaceutics* 638 (2023): 122930.
26. M. De Tollenaere, M. Meunier, A. Scandolera, et al., "Well-Aging: A New Strategy for Skin Homeostasis Under Multi-Stressed Conditions," *Journal of Cosmetic Dermatology* 19, no. 2 (2020): 444-455.
27. M. Terao and I. Katayama, "Local Cortisol/Corticosterone Activation in Skin Physiology and Pathology," *Journal of Dermatological Science* 84, no. 1 (2016): 11-16.
28. C. M. Lee, R. E. B. Watson, and C. E. Kleyn, "The Impact of Perceived Stress on Skin Ageing," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 34, no. 1 (2020): 54-58.