Učinkovitost hidrolizata kolagena u prevenciji i usporavanju starenja kože

Gudelj Plazanić, Marija

Professional thesis / Završni specijalistički

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:640723

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marija Gudelj Plazanić

UČINKOVITOST HIDROLIZATA KOLAGENA U PREVENCIJI I USPORAVANJU STARENJA KOŽE

Specijalistički rad

mentor: prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo

Zagreb, 2022.

Poslijediplomski specijalistički studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo

Specijalistički rad obranjen je dana 26.09.2022. na Farmaceutsko - biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Donatella Verbanac

   Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. prof.dr.sc. Dubravka Vitali Čepo

   Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. prof.dr.sc. Ivana Čepelak, professor emerita

Rad ima 95 listova.

PREDGOVOR

Ovaj je specijalistički rad prijavljen i izrađen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Vitali Čepo na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade specijalističkog rada.

Rad posvećujem svojim roditeljima, obitelji, mom Marinku, Roku i Karlu.

SAŽETAK

Cilj istraživanja. Brojne znanstvene studije pokazuju da suplementacija pojedinim nutrijentima ima potencijalnu ulogu u modulaciji starenja kože, među njima i kolagen, odnosno njegovi hidrolizati. Glavni cilj predloženog specijalističkog rada je iznjeti sustavni pregled dostupnih kliničkih istraživanja o učincima oralne suplementacije hidroliziranim kolagenom u svrhu poboljšanja znakova starenja kože. Dodatni ciljevi rada su dati cjelovit prikaz osobina i svojstava hidroliziranog kolagena te dostupnih istraživanja o mehanizmima njegovog djelovanja i biodostupnosti.

Metode. Za izradu ovog teorijskog rada korišteni su znanstveni i stručni radovi dostupni putem baze PubMed.

Rezultati. Istraživanja pokazuju da *per os* primjena hidroliziranog kolagena poboljšava kliničke manifestacije zdravlja kože, kroz djelovanje na različite aspekte građe i funkcije kože. Kao rezultat pregleda dostupne literature nameće se zaključak da nisu u potpunosti istraženi mehanizmi djelovanja hidroliziranog kolagena u koži, kao i važnost formulacije kolagena u pripravku.

Zaključak. Potrebna su i daljna istraživanja kojima bi se definirale smjernice za doziranje i duljinu trajanja primjene hidroliziranog kolagena u svrhu postizanja optimalnog učinka.

SUMMARY

Objectives. Numerous studies show that supplementing certain nutrients, including collagen and its hydrolysates, can play a significant role in modulating the process of skin ageing. The main goal of this study was to conduct a systematic review of available clinical research on the anti-age effects of oral supplementation with hydrolyzed collagen Additional goals were to provide a comprehensive overview of the features and characteristics of available hydrolyzed collagen formulations and highlight the current knowledge of its mechanism of action and oral bioavailability.

Methods. Scientific and professional papers available through the PubMed database were used to prepare this theoretical paper.

Results. Research shows that *per os* application of hydrolyzed collagen improves clinical manifestations of skin health, by affecting various aspects of skin structure or function. However, mechanism of the action of hydrolyzed collagen in the skin have not been completely elucidated and neither was the importance of particular collagen formulations in products available in the market.

Conclusions. Additional research is needed to define guidelines for the optimal dosage and duration of hydrolyzed collagen administration in order to achieve an clinically significant anti-age effect.

SADRŽAJ

PREDGOVOR iv
SAŽETAK v
SUMMARY vi
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
1.1 Građa kože 3
1.1. Starenje kože 5
1.2. Utjecaj starenja na građu i funkcionalnost pojedinih sastavnica kože 7
1.2.1. Utjecaj povećane aktivnosti matriksnih metaloproteaza (MMP) na starenje kože 8
1.2.2. Utjecaj reaktivnih kisikovih spojeva na starenje kože 9
1.2.3. Utjecaj oštećene signalizacije transformirajućeg faktora rasta β na proces starenja kože 10
1.2.4. Važnost interakcija između fibroblasta i ECM-a u procesu starenja kože 11
1.3. Uloga i građa kolagena 11
1.3.1. Građa kolagena 14
1.3.2. Sinteza kolagena 15
1.3.3. Poremećaji sazrijevanja kolagena 17
1.3.3.1. Važnost vitamina C 17
1.3.3.2. Ostali genetski poremećaji izgradnje funkcionalnog kolagena 18
1.4. Hidrolizirani kolagen 18
1.4.1. Svojstva i dobivanje hidroliziranog kolagena 18
1.4.2. Ekstrakcija hidroliziranog kolagena 19
1.4.3. Analitičke tehnike određivanja molekularne mase hidroliziranog kolagena 21
1.4.4. Svojstva hidroliziranog kolagena 22
1.4.5. Izvori kolagena 24
1.4.5.1. Kolagen goveđeg podrijetla 25
1.4.5.2. Kolagen svinjskog podrijetla 26
1.4.5.3. Kolagen morskog podrijetla 26
1.4.5.4. Alternativni izvori HC 27
1.4.5.5. Načini izolacije i metode obrade morskog kolagena 28
1.4.6. Primjena kolagena 30
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 33
3. MATERIJALI I METODE 34
4. RASPRAVA 35
4.1. Mehanizmi djelovanja hidrolizata kolagena 37

4.1.1. Biodostupnost hidrolizata kolagena 38
4.1.2. Učinci hidrolizata kolagena na kožu - rezultati in vitro studija 42
4.1.3. Učinci hidrolizata kolagena – rezultati istraživanja na animalnim modelima 43
4.1.4. Učinkovitost hidrolizata kolagena – rezultati kliničkih istraživanja 45
4.1.5. Ostale indikacije za primjenu hidrolizata kolagena 53
4.1.6. Kvaliteta hidrolizata kolagena 55
4.1.7. Pregled dodataka prehrani s hidrolizatima kolagena na hrvatskom tržištu 56
4.1.8. Prikazi sastava dostupnih dodataka prehrani s hidrolizatima kolagenana hrvatskom ljekarničkom tržištu 57
5. ZAKLJUČAK 67
6. LITERATURA 70
7. ŽIVOTOPIS 93
8. POPIS KRATICA 95

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Starenje kože je proces koji započinje već u drugom desetljeću života. U početku nezamjetne, u trećem desetljeću života strukturne i funkcionalne promjene u koži postaju značajnije i vidljivije.

Koža je najveći ljudski organ, jedini organ koji je stalno izložen utjecajima okoliša te predstavlja zaštitu cijelog organizma i unutarnjih organa od njegovih negativnih utjecaja. Veliki utjecaj na kožu iz okoliša ima ultraljubičasto (UV) zračenje (1).

Starenjem, dijelovi tijela koji su više izloženi sunčevu zračenju kao što su lice, vrat, brada, nadlaktice i ruke pokazuju značajnije promjene nego dijelovi tijela zaštićeni odjećom. Ovo je osobito izraženo kod osoba svijetle puti zato što kožni pigment (melanin) kod tamnijih osoba pruža veću zaštitu od akutnog UV zračenja (2).

Izgled kože je vizualno primarni pokazatelj starosti pojedinca, ali može ukazivati i na opće zdravstveno stanje i životni stil po ujednačenosti i boji, čvrstoći i teksturi kože (3).

Starenjem se smanjuje elastičnost kože, na pregibima se koža neprimjetno stanjuje i suši te se stvaraju bore (4).

Svi slojevi kože tijekom starenja prolaze kroz različite degenerativne promjene, no dermis kože je tim promjenama najviše zahvaćen. Starenje kože može se podijeliti na intrinzično (kronološko) te ekstrinzično (vanjsko). Kronološko starenje karakterizira stvaranje plićih bora i stanjivanje epidermisa kako osoba stari, dok je posljedica ekstrinzičnog starenja stvaranje dubljih bora, opuštenost kože i pojava hiperpigmentacija, uglavnom kao posljedica kronične izloženosti kože UV zračenju (fotostarenje). Neovisno o vrsti starenja, pojava bora i smanjenje elastičnosti su glavni znakovi starenja kože i rezultat progresivne atrofije dermisa. Smatra se

da je za atrofiju dermisa odgovorno smanjenje količine izvanstaničnog matriksa i kolagena u dermisu (5).

Kolagenska vlakna jako su zastupljena u ljudskom organizmu, osobito u dermisu kože gdje su odgovorna za čvrstoću, hidrataciju i mehanička svojstva kože (6).

Budući da se količina kolagena i elastina smanjuje s godinama, a osobito izlaganjem sunčevoj svjetlosti, farmaceutska industrija nastoji pronaći rješenja kojima se može poboljšati izgled kože, osobito u području lica i vrata (7).

Kolagen je lako dostupan i može se izolirati iz različitih životinjskih ili morskih izvora te je važna sirovina u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji zbog dobrih tehnoloških svojstava kao i potencijalnih učinaka koje ima na vezivna tkiva, kožu, tetive, hrskavicu i zube. Kolagenski peptidi koriste se kao dodaci prehrani kod malnutricije te drugih degenerativnih bolesti gdje je potrebno ojačati gustoću kostiju (6).

Hidrolizirani kolagen bogat je aminokiselinama poput glicina i prolina koji se, poslije unosa, akumuliraju u koži i hrskavici doprinoseći njihovoj strukturi i obnovi.

Kako bi djelovali u dubljim slojevima kože, peptidi kolagena moraju najprije preživjeti prolaz kroz probavni trakt, a zatim prijeći intestinalnu barijeru i ući u cirkulaciju.

Mnoge studije pokazuju da se nakon *per os* unosa, peptidi kolagena pojavljuju u sistemskoj cirkulaciji te pokazuju kemotaksijska svojstva prema fibroblastima pomažući proces obnove kože (6).

Cilj rada je prikazati svojstva, djelovanje i upotrebu hidroliziranog kolagena za održavanje zdravlja i dobrog izgleda kože te prevenciju stvaranja bora.

1.1 Građa kože

Koža (grč. *dermis,* lat. *cutis*) s prosječnom površinom od oko 1,5 - 1,8 m^2 kod muškaraca, a kod žena od 1,1 m^2, najveći je organ ljudskog tijela. U području funkcionalnih otvora organizma prelazi u sluznicu (ili polusluznicu), a vezivnim tkivom pričvršćena je za podlogu. U području tabana i dlanova ta veza je čvrsta, dok je na nekim izrazito rahla te se stvaraju nabori koji se zbog svojstva elastičnosti izravnavaju, osim u starosti gdje trajno ostaju bore.

Morfološki gledano, koža je građena od tri sloja: epidermis, dermis i subcutis (potkožno masno tkivo) (4).

Epidermis predstavlja orožnjeli mnogoslojni pločasti epitel koji se može podijeliti u 5 slojeva: *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum i stratum corneum. Stratum corneum* sastoji se od orožnjalih stanica koje nemaju jezgru i ovaj sloj se neprestano troši (izmijenjuje) u obliku sitnog ljuštenja (4). Svi slojevi epidermisa sadržavaju keratinocite koji stvaraju roževine (keratin), međufilamente koji osiguravaju mehaničku stabilnost. Keratinociti kontinuirano prolaze kroz terminalnu diferencijaciju, proces koji rezultira stvaranjem najudaljenije zaštitne barijere (rožnati sloj ili *stratum corneum*) (8).

Osim keratinocita u epidermisu prisutne su i nekeratinizirajuće stanice: melanociti, Langerhansove (imunokompetentne) i Merkelove stanice.

Zadaća melanocita je sinteza melanina, pigmenta važnog za zaštitu kože od negativnog utjecaja sunčeva svjetla. Langerhansove stanice imaju funkciju monocita i makrofaga, tj. antigen-predočnih stanica i smještene su suprabazalno. Zbog ovih stanica epidermis je, gledano imunološki, mjesto za stanične imunoreakcije (4).

Dermis se uglavnom sastoji od gustog ekstracelularnog matriksa (ECM) bogatog kolagenom. Dermalni kolagen predstavlja daleko najzastupljeniji ECM - protein i čini glavninu kože (90%

suhe mase) (8). Kolagen dermalnog vezivnog tkiva odgovoran je za vlačnu čvrstoću i mehanička svojstva kože. U dermisu ljudske kože dermalni fibroblasti sintetiziraju, organiziraju i održavaju ECM bogat kolagenom (9).

U ljudskoj koži, kolagen tip I čini 80 - 90 % ukupnog kolagena, tip III čini 8 – 12 %, a kolagena tip V je manje od 5 % (5). Dublje u dermisu vlakna kolagena su veća (5).

Elastična vlakna su još jedan gradivni element ECM. Odgovorna su za svojstvo elastičnosti kože te vraćanje u prvobitni položaj nakon istezanja ili deformacije kože. Ostale komponente ECM su proteoglikani (PG) i glikozaminoglikani (GAG) koji su amorfni te okružuju i omeđuju fibrozne i stanične elemente u dermisu. Iako čine samo 0,2 % suhe mase dermisa, apsorbiraju vodu do 1000 puta njihovog volumena i imaju ulogu u regulaciji vezanja i zadržavanja vode (5).

Stalne stanice dermisa jesu fibroblasti, makrofagi, metakromatske stanice - mastociti te stanice imunološkog sustava: limfociti, plazma-stanice, neutrofili i eozinofili.

Histološki se u dermisu razlikuje površinski sloj (*stratum papillare*) i dublji sloj (*stratum reticulare*).

Epidermo - dermalna granica je područje između epidermisa i dermisa kože koje se svjetlosnim mikroskopom vidi kao homogena nit debljine 50 - 100 nm. Elektronskom mikroskopijom odgovara području bazalne membrane (BM) u kojoj se razlikuje svijetli dio (*lamina lucida*) koji sadrži citokeratinski poludezmosomski kompleks (poludezmosomi) stanica temeljnog sloja epidermisa i tamni dio (*lamina densa*) građen od kolagena tip IV, nidogena i laminina. Bazalna membrana je poludezmosomima vezana uz bazalni sloj epidermisa, a ukorijenjenim vlakancima (anchoring fibrils) vezana je uz dermis.

Funkcije BM su potpora stanicama epitela, endotela i parenhima, povezivanje epitela ili endotela s podlogom, filtracijska barijera za makromolekule, sprečavanje dehidracije organizma, gubitak elektrolita te zaštita kože od prodora mikroorganizama (4).

Fibroblasti su stalne i najbrojnije stanice vezivnog tkiva koje nastaju diferencijacijom iz matičnih stanica. Odgovorne su za sintezu kolagena, elastina, glikozaminoglikana, proteoglikana te ostalih proteina ekstracelularnog matriksa. Njihova funkcija i interakcija s okolinom važni su za razumijevanje molekularnog mehanizma starenja kože (5).

Budući da dermis kroz krvne žile osigurava važne nutrijente za zdravlje kože te pruža strukturnu potporu epidermi, nužno je održati strukturu dermisa za pravilno funkcioniranje stanica kože (10).

1.1.Starenje kože

Starenje kože predmet je brojnih istraživanja čiji je cilj što bolje razumijeti i objasniti molekularne mehanizme starenja kože, kao i glavne čimbenike koji mu doprinose.

Ono što je dosada poznato je da je starenje kombinacija intrinzičnih i ekstrinzičnih faktora. Intrinzično starenje uključuje nasljedne čimbenike povezane s dobi, dok je ekstrinzično starenje rezultat utjecaja vanjskih čimbenika kao što su izlaganje ultraljubičastom A (UVA) i ultraljubičastom B (UVB) zračenju, zagađenje okoliša i proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u koži (11).

Dermalne strukture podliježu prirodnom, kronološkom starenju tijekom kojeg „ostarjeli“ fibroblasti sintetiziraju manje kolagena (13).

Kumulativna izloženost štetnim podražajima iz okoliša uzrokuje pojavu oksidacijskog i hemodinamskog stresa u koži što se povezuje s pojavom oksidativnih oštećenja, oslabljenom angiogenezom i disfunkcijom endotela (12).

Ultraljubičasto zračenje stvara ROS koji aktiviraju enzime, metaloproteaze matriksa (MMP), utječući na proizvodnju kolagena kroz neokolagenezu, što dovodi do promjene omjera tipa I i III kolagena. To rezultira razgradnjom izvanstaničnog matriksa i fotostarenjem kože (1).

Zbog smanjenja količine kolagena u koži i pojave fenomena elastoze, koji uzrokuje neorganizirano nakupljanje proteina elastina, u dermisu dolazi do dermalne atrofije što rezultira starijim izgledom kože (14).

Proces elastoze događa se osobito na područjima tijela izloženim sunčevom zračenju. Kao posljedica ovog fenomena, aktivnost fibroblasta i mehanička napetost kože smanjuju se što dovodi do razgradnje postojećih kolagenskih vlakana. Zbog povećanog stupnja razgradnje kolagena u dermisu i smanjenja njegove sinteze, pojavljuju se fine linije na koži (1).

Dermis se intenzivnije mijenja kod pušača uslijed oksidativnog stresa, a kronični stres koji djeluje na cirkadijalni kortizol/kortikosteronski ritam također, mijenja sintezu i razgradnju kolagena. Kao posljedica izlaganja suncu, koža postaje suha, opuštena i pojavljujuju se bore. Tijekom procesa starenja bore se produbljuju i povećava se opuštenost kože (15).

Sve navedene promjene u dermalnom sloju kože, izmjene i modifikacije izvanstaničnog matriksa, kao i povećane vrijednosti upalnih markera i smanjen protok krvi, dovode do starenja kože (10).

Dakle, starenje kože složen je proces na koji utječu i unutarnji i vanjski čimbenici djelujući na strukturu i funkciju epiderme i dermisa.

Histološki gledano, starija koža obično pokazuje epidermalnu atrofiju zbog smanjenog broja stanica. Dermis starije kože pokazuje smanjeni broj mastocita i fibroblasta. Starenjem, fibroblasti ispoljavaju sekretorni fenotip povezan sa starenjem, kojeg karakterizira smanjena proliferacija, što ometa oslobađanje esencijalnih čimbenika rasta i pojačava razgradnju ECM putem aktivacije MMP. Nekoliko predloženih molekularnih mehanizama utječe na starenje kože uključujući skraćivanje telomera, oksidativni stres i MMP, citokine, autofagičnu kontrolu, mikroRNA i utjecaj mikrobioma (16).

1.2.Utjecaj starenja na građu i funkcionalnost pojedinih sastavnica kože

Ljudska koža uglavnom je sastavljena od vezivnog tkiva bogatog kolagenom koje je odgovorno za pružanje strukturne i funkcionalne potpore, a proizvode ga, organiziraju i održavaju dermalni fibroblasti. Tijekom starenja, dermalna kolagenska vlakna podliježu progresivnom gubitku strukture i fragmentaciji što narušava strukturu i funkciju kože. Osim kliničkih manifestacija koje se očituju u estetskom izgledu pojedinca, ovakvim promjenama stvara se mikrookruženje koje potiče razvoj kožnih bolesti povezanih sa starenjem, kao što su na primjer odgođeno cijeljenje rana ili povećana incidencija pojave raka kože (9).

Kolagen, koji je glavna komponenta ECM-a, tijekom vremena postaje fragmentiran i grubo raspoređen, a njegova ukupna količina se smanjuje. Razlog ovih promjena uglavnom je povećana aktivnost MMP i poremećena signalizacija transformirajućeg faktora rasta-β (TGF-β) inducirana s ROS koje nastaju tijekom starenja (5).

Smanjenje količine kolagena otežava mehaničku interakciju između fibroblasta i ECM te posljedično dovodi do pogoršanja funkcije fibroblasta i daljnjeg smanjenja količine dermalnog kolagena (5).

Ostale komponente ECM, uključujući elastična vlakna, GAG i PG, također se mijenjaju tijekom starenja, što u konačnici dovodi do smanjenja količine funkcionalnih komponenti dermisa. Udio elastičnih vlakna smanjuje se u intrinzično ostarjeloj koži, dok se u fotoostarjeloj koži prekomjerno nakupljaju. Promjene u vrijednostima GAG i PG vrlo su različite, a rezultati znanstvenih istraživanja često su proturječni. Smanjenje koncentracije funkcionalnih dermalnih komponenti rezultira pojavom kliničkih značajki starenja kao što su bore i smanjena elastičnost kože (5).

1.2.1. Utjecaj povećane aktivnosti matriksnih metaloproteaza (MMP) na starenje kože

Enzimi koji razgrađuju kolagen i druge proteine izvanstničnog matriksa, povišeni su u prirodno ostarjeloj ljudskoj koži i nazivamo ih MMP (17).

MMP mogu se kategorizirati u pet glavnih podskupina:

1. kolagenaze (MMP-1, MMP-8 i MMP-13)
2. želatinaze (MMP-2 i MMP-9)
3. stromelizini (MMP-3, MMP-10 i MMP-11)
4. matrilizini (MMP-7 i MMP-26)
5. MMP membranskog tipa (MT) (MMP-14, MMP-15 i MMP-16) (18).

MMP-1 glavna je proteaza koja pokreće fragmentaciju kolagenih vlakana koja su pretežno tipa I i III u ljudskoj koži. U idućem koraku, kolagen se može dalje razgraditi pomoću enzima MMP-3 i MMP-9 (19, 20).

Glavni izvor MMP u ljudskoj koži epidermalni su keratinociti i dermalni fibroblasti, iako endotelne stanice i imunociti mogu također proizvoditi MMP (21). U fiziološkim uvjetima,

MMP regulirane su specifičnim endogenim tkivnim inhibitorima metaloproteinaza (TIMP): TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 (22).

U starijoj koži povećane aktivnosti MMP nije popraćeno odgovarajućim povećanjem vrijednosti endogenih inhibitora MMP (TIMP) (23). U fotoostarjeloj i intrinzično ostarjeloj koži količina TIMP može se čak i smanjiti, čime će ova neravnoteža ubrzati progresivnu fragmentaciju kolagena u dermisu i posljedično ubrzati starenje kože (24).

Dermalna kolagenska vlakna stabilizirana su poprečnim vezama koje su vrlo otporne na proteolitičko cijepanje. Stoga se smatra da pojačano i neregulirano djelovanje MMP tijekom desetljeća dovodi do nakupljanja umreženih fragmenata kolagena koji narušavaju strukturu i funkciju dermalnog ECM-a (17).

1.2.2. Utjecaj reaktivnih kisikovih spojeva na starenje kože

Za ROS se smatra da su najvećim dijelom odgovorni za povećanje vrijednosti/aktivnosti MMP u starijoj koži (9). Stvaraju se u koži kao normalan produkt fizioloških procesa, ali i dodatno na podražaj čimbenika okoliša kao što je npr. ultraljubičasto zračenje.

Reaktivni kisikovi spojevi koji nastaju tijekom procesa starenja aktiviraju protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) i induciraju čimbenike transkripcije, uključujući aktivatorski protein 1 (AP-1) i nuklearni faktor-κB (NF-κB). Ova aktivacija povećava ekspresiju MMP i inhibira signalizaciju TGF-β, što dovodi do fragmentacije kolagena i smanjene biosinteze kolagena. To ometa mehaničku interakciju između fibroblasta i ECM te posljedično smanjuje veličinu dermalnih fibroblasta. Ostarjeli fibroblasti proizvode veću količinu ROS koji dodatno povećavaju ekspresiju MMP i inhibira TGF-β signalizaciju, stvarajući pozitivnu povratnu petlju

koja ubrzava dermalno starenje. MMP-12 izlučen iz fibroblasta i makrofaga igra ključnu ulogu u razvoju solarne elastoze i smanjenju nastajanja funkcionalnih elastičnih vlakana (5).

Općenito se smatra da je oksidativno oštećenje očitije kod fotoostarjele kože, što objašnjava izraženije značajke fotostarenja poput dubokih bora. Dok su primarni izvor MMP u intrinzičnom starenju dermalni fibroblasti, značajne količine MMP u procesu fotostarenja proizvode epidermalni keratinociti (18, 25).

1.2.3. Utjecaj oštećene signalizacije transformirajućeg faktora rasta β na proces starenja kože

Glavni regulator biosinteze ECM je TGF-β (26). On kontrolira homeostazu kolagena regulirajući proizvodnju i razgradnju kolagena putem Smad signalnog puta (27).

U početku, TGF-β se veže na TGF-β tip II receptor (TβRII), koji regrutira i fosforilira TGF-β tip I receptor (TβRI). Ova fosforilacija TβRI dovodi do aktivacije faktora transkripcije Smad2 i Smad3. Aktivirani Smad2 ili Smad3 se kombinira sa Smad4 kako bi tvorio heteromerne Smad komplekse.

Ovi aktivirani Smad kompleksi translociraju se u jezgru i stupaju u interakciju sa Smad-vezujućim elementima (SBE) u promotorskim regijama TGF-β ciljnih gena (28, 29, 30).

Sinteza kolagena, fibronektina, dekorina i versikana izravno je regulirana TGF-β/Smad signalizacijom pri čemu Smad signalna mreža smanjuje ekspresiju MMP, a potiče aktivnost TIMP. Sve ovo sugerira da je signalni put TGF-β/Smad kritičan za održavanje strukturnog i mehaničkog integriteta dermalnog vezivnog tkiva i povećanje proizvodnje ECM i inhibiranje

njegove degradacije (5). Dakle, poremećaj TGF-β signalizacije dovest će do smanjene sinteze neokolagena što će rezultirati smanjenjem neto količine kolagena u dermisu.

1.2.4. Važnost interakcija između fibroblasta i ECM-a u procesu starenja kože

U mladoj koži fibroblasti prianjaju za okolni netaknuti ECM, koji se uglavnom sastoji od kolagena tipa I (13, 31).

Ovim prianjanjem fibroblasti ostvaruju mehanički pritisak na okolni ECM te se šire i održavaju normalan izduženi oblik. U starijoj koži, vezanje fibroblasta poremećeno je zbog progresivne degradacije ECM , što rezultira smanjenjem pritiska i posljedično smanjenjem veličine fibroblasta i kolapsom njihove morfologije (32, 13, 23).

Smanjena veličina ključna je značajka senescentnih fibroblasta i povezana je sa smanjenom proizvodnjom komponenti ECM (23).

Zanimljivo je da su fibroblasti u starijoj koži povratili svoj izgled i funkciju kada su bili u kontaktu s netaknutim ECM (33) što implicira da je mikrookolina ECM glavni čimbenik u starenju fibroblasta (5).

1.3.Uloga i građa kolagena

Kolagen je glavni strukturni protein koji se nalazi u koži, tetivama i kostima. Riječ kolagen potječe od grčke riječi *kola* koja znači guma te *gen* što znači proizvodnja. Kolagen se smatra jednim od najkorisnijih biomaterijala. Zbog svoje niske imunogenosti i visoke

biokompatibilnosti, opsežno je proučavan kao polimer za upotrebu u mnogim biomedicinskim proizvodima kao što su kozmetički i farmaceutski proizvodi (34).

Kolagen je jedan od najzastupljenijih proteina u mnogim živim organizmima jer ima ulogu veziva u brojnim biološkim strukturama. Također je najzastupljeniji protein u ECM. ECM je nestanična komponenta unutar svih tkiva i organa i strukturna je „skela“ koja može usmjeravati staničnu adheziju i migraciju te regulirati stanični rast i metabolizam (35). Budući da je kolagen glavna sastavnica većine vezivnih tkiva, on čini više od 25 % ukupne proteinske mase u ljudskom tijelu.

Uz druge vlaknaste proteine, poput keratina i miozina, kolagen predstavlja izvor strukturne čvrstoće stanica i tkiva. Čvrstoća i rastezljivost kože posljedica je umreženog načina povezivanja kolagenskih i keratinskih vlakana, dok kosti i zube podupire mreža kolagenskih vlakana slično kao mreža čelika u armiranom betonu (37).

Postoje četiri strukturne razine proteina kolagena uključujući primarnu strukturu (triplet aminokiselina), sekundarnu strukturu (α-heliks), tercijarnu strukturu (trostruki heliks) i kvarternu strukturu (vlakna) (36).

Različiti tipovi kolagena razlikuju se ovisno o sastavu α lanca, ovisno o ponavljanju i duljini ponavljanja aminokiselinskog slijeda, Gly–X–Y, s i bez prekida, kao i zauzimanjem položaja X i Y, prolinom ili njegovim hidroksiliranim oblikom, hidroksiprolinom (41). Do danas je identificirano najmanje 28 vrsta kolagena koji se sastoje od više od 30 različitih polipeptidnih lanaca (od kojih je svaki kodiran posebnim genom) (37).

Preko 90 % kolagena u ljudskom tijelu je kolagen tipa I zbog njegove široke prevalencije u gotovo svim vezivnim tkivima. Tip I kolagena je i najopsežnije proučeni kolagen u znanstvenoj literaturi (36).

Najzastupljeniji je u koži, kostima, zubima, tetivama, ligamentima i mnogim organima (38).

Glavna je komponenta kalcificiranog tkiva zuba i kostiju i prisutan je u koži, tetivama, krvožilnom sustavu, plućima i srcu. Može biti ligand za signalizaciju posredovanu receptorima kao što su integrini, OSCAR, GPVI, G6b-B, DDR1 i 2, i LAIR-1 kompleksa receptora leukocita (38).

Kolagen tip II prisutan je u hrskavici i povezan je s mnogim bolestima kao što su skeletne displazije, reumatoidni artritis i osteoartritis (39), dok je kolagen tipa III pronađen u koži, mišićima, krvnim žilama. Tip IV prisutan je u epitelnom sloju BM i bazalne lamine. Kolagen tipa V jedan je od glavnih komponenti staničnih površina i posteljice (36, 40).

Na temelju struktura koje tvore, kolageni mogu biti razvrstani u različite skupine kao što su kolageni koji tvore fibrile, kolageni koji tvore mrežu, FACIT kolageni (kolageni povezani s fibrilom s prekinutim trostrukim heliksima), MACIT kolageni (kolageni povezani s membranom s prekinutim trostrukim heliksima) i MULTIPLEXIN kolageni (višestruke domene i prekidi trostrukog heliksa) (42, 43).

Fibrilarni kolagen najzastupljeniji je kolagen u kralježnjaka i ima strukturnu ulogu jer doprinosi molekularnoj arhitekturi, obliku i mehaničkim svojstvima tkiva kao što su čvrstoća kože i otpornost na istezanje ligamenata (kolageni tipa I, II, III, V, XI, XXIV i XXVII) (44, 45, 46).

FACIT kolageni ne tvore fibrile sami po sebi, ali su povezani s površinom kolagenskih fibrila. FACIT kolageni imaju trostruku uzvojnicu prekinutu ne-kolagenskim domenama koje mogu djelovati kao spojevi (36).

Obitelj kolagena MULTIPLEXIN uključuje tipove XV i XVIII. Kolageni tipovi XV i XVIII predstavljaju molekulu BM . Kolagen XV nalazi se u skeletnim i srčanim mišićima, a kolagen tipa XVIII je komponenta u jetri (47).

MACIT kolageni imaju brojne prekide u trostrukom heliksu, ne udružuju se sami u fibrile i imaju ulogu u prijanjanju stanica i staničnoj signalizaciji. Ostali tipovi kolagena su u vrlo niskoj koncentraciji i u specifičnim su organima smješteni u tijelu (47).

1.3.1. Građa kolagena

Kolagen je najvećim dijelom izgrađen od aminokiselina glicina (33 %), prolina i hidroksiprolina (22 %) (primarna struktura) u trostrukoj uzvojnici izgrađenoj od 3 *alfa* lanca.

Sve vrste kolagena imaju strukturu trostruke uzvojnice, bilo da je cijela molekula trostruka uzvojnica ili je samo dio strukture kolagena u obliku uzvojnice (36, 41).

Kolagen tip I sadržava približno 1000 aminokiselina gdje je svaka polipeptidna podjedinica u obliku lijeve uzvojnice s tri ostatka po zaokretu. Tri kolagenske uzvojnice zatim se uvijaju u desnu superuzvojnicu, oblikujući molekulu nalik na štap ili prut, promjera 1,4 nm i dugačku oko 300 nm. Kolagen karakterizira pojavnost aminokiseline glicina na svakom trećem položaju trostruke uzvojnice jer je dovoljno mala molekula da se smjesti u ograničeni prostor raspoloživ uz središnju jezgru trostruke uzvojnice (37).

Preduvjet za stvaranje trostruke uzvojnice je ponavljajuća struktura aminokiselinskog slijeda (Gly-X-Y) gdje je otprilike svaka stota aminokiselina s položaja X-prolin, a s položaja Y-hidroksiprolin. Te aminokiseline daju krutost molekuli kolagena. Hidroksiprolin nastaje posttranslacijskom hidroksilacijom prolinskih ostataka peptida koju katalizira enzim prolil-hidroksilaza, uz kofaktore askorbinsku kiselinu i alfa-ketoglutarat. Lizin u Y položaju postranslacijski se hidroksilira u hidroksilizin djelovanjem lizil-hidroksilaze, enzima sa sličnim kofaktorima. Neki se od tih hidroksilizina dalje modificiraju stvarajući O-glikozidnu vezu s galaktozom ili galaktozil-glukozom na glikozilacijskom mjestu jedinstvenom za kolagen (37).

Tipovi kolagena koji tvore dugačka vlakna u tkivima nalik na štap nakupljaju se lateralnim udruživanjem tih trostrukih uzvojnica u četvrtinu razmaknut poredak na način da se svaka longitudinalno premješta od susjedne za malo manje od četvrtine svoje dužine. Takav raspored rezultira zavojitim izgledom tih vlakana u vezivnom tkivu. Kolagenska vlakna se dalje stabiliziraju stvaranjem kovalentnih poprečnih veza unutar i između jedinica trostruke uzvojnice. Za stvaranje poprečnih veza potreban je enzim ovisan o bakru, lizil-oksidaza koji oksidacijski deaminira Ɛ-amino skupine određenih lizina i hidroksilizina, stvarajući aldehide. Oni stvaraju kondenzacijske produkte indole s ostalim aldehidima nastalim iz lizina ili hidroksilizina ili tvore Schiffove baze s Ɛ-amino skupinama neoksidiranih lizina ili hidroksilizina. Te reakcije nakon daljnih kemijskih pregradnji stvaraju stabilne poprječne kovalentne veze koje su važne za svojstvo otpornosti vlakana na istezanje (37).

1.3.2. Sinteza kolagena

Kao i većina proteina, kolagen, prije nego postane dio zrelog izvanstaničnog kolagenskog vlakna, prolazi kroz proces prosttranslacijske modifikacije tijekom kojeg se kidaju ili stvaraju (ili oboje) kovalentne veze. Mnogi su polipeptidi početno sintetizirani kao veći prethodnici, pro-proteini pa se i kolagen u početku sintetizira kao veliki prethodnik polipeptida- prokolagen (37).

Kao i većina sekrecijskih proteina, kolagen se sintetizira na ribosomima u obliku preteče preprokolagena. On sadržava vodeću ili signalnu sekvencu koja usmjerava polipeptidni lanac u lumen endoplazmatske mrežice. Ulaskom u endoplazmatsku mrežicu, vodeća sekvenca se uklanja djelovanjem enzima, hidroksiliraju se ostaci prolina i lizina te glikozilira hidroksilizin. Prokolagenska molekula na amino i karboksilnim krajevima sadržava polipeptide za

produljenje lanca (*engl. extension peptide*) od 20 do 35 kDa koji sadržavaju ostatke cisteina. Amino-terminalni propeptid tvori dislufidne veze samo unutar lanca, dok karboksilni terminalni propeptidi tvore veze i unutar i između lanaca. Upravo stvaranje tih dislufidnih veze pomaže u prepoznavanju triju molekula kolagena kako bi se stvorila trostruka uzvojnica, koja se uvija od karboksilnog završetka. Nakon stvaranja trostruke uzvojnice, hidroksilacija prolina ili lizina kao i glikozilacija hidroksilizina ne mogu se dalje obavljati (37).

Nakon izlučivanja iz stanice putem Golgijevog aparata, izvanstanični enzimi prokolagenska aminoproteinaza i prokolagenska karboksiproteinaza uklanjaju peptide za produljenje lanca na amino i karboksilnim završecima. To uklanjanje propeptida može nastati unutar kripti ili pregiba u staničnoj membrani. Nakon toga se trostruke uzvojnice molekula kolagena, koje sadržavaju otprilike 1000 aminokiselina po lancu, spontano nakupljaju u kolagenska vlakna. Djelovanjem enzima lizil-oksidaze vlakna se dalje stabiliziraju stvaranjem izvanlančanih i međulančanih poprečnih veza (37).

Nakon završetka procesa sinteze, kolagen je metabolički relativno stabilan. Povećana razgradnja kolagena prisutna je tijekom gladovanja i različitih upalnih stanja, dok se pretjerana proizvodnja kolagena javlja, primjerice, tijekom ciroze jetre (37).

1.3.3. Poremećaji sazrijevanja kolagena

1.3.3.1.Važnost vitamina C

Najviše istražena pogreška u biosintezi kolagena je bolest skorbut koja je rezultat nedostatka askorbinske kiseline (vitamina C), nužnog za aktivnost enzima prolil-hidroksilaze i lizil-hidroksilaze. Posljedično pomankanje hidroksiprolinskih i hidroksilizinskih ostataka ugrožava konformacijsku stabilnost kolagenskih vlakana (37). Simptomi skorbuta obuhvaćaju oštećenja kože i krhkost krvnih žila, krvarenja desni, ispadanje zubi i infekcije periodonta. Desni su najosjetljivije na manjak vitamina C jer se u njima zbiva brza izmjena kolagena (48).

Prolil-hiroksilaza katalizira sintezu 4-hidroksiprolina, aminokiseline koja je obvezni sastojak kolagena. Pri toj sintezi dolazi do hidroksiliranja prolinskih ostataka na amino-strani glicinskih ostataka kolagenskih lanaca u nastajanju. Jedan atom kisika iz O_2 veže se za C4 na prolinu, dok se drugi atom kisika veže uz α-ketoglutarat koji se pretvara u sukcinat. Ova je reakcija katalizirana prolil-hidroksilazom, dioksigenazom koja treba ion Fe^{2+} za aktivaciju O_2. Taj enzim također katalizira pretvorbu α-ketoglutarata u sukcinat, bez hidroksiliranja prolina. U toj parcijalnoj rekaciji dolazi do stvaranja oksidiranog željezovog kompleksa koji inaktivira enzim. Do obnove aktivnog enzima dolazi uz pomoć askorbata (vitamin C) koji reducira feri-ion neaktivnog enzima. Tijekom oporavka dolazi do oksidacije askorbata u dehidroaskorbinsku kiselinu. Tako askorbat ovdje djeluje poput specifičnog antioksidansa (48).

Kolagen koji se izgrađuje bez askorbata manje je postojan od normalnog proteina (48).

1.3.3.2.Ostali genetski poremećaji izgradnje funkcionalnog kolagena

Menkesov sindrom, karakteriziran kovrčavom kosom i usporenim rastom, uzrokovan je nedostatkom bakra u prehrani koji je potreban za aktivnost enzima lizil-oksidaze koji katalizira ključni korak u stvaranju kovalentnih veza koje ojačavaju kolagenske niti (37).

Genetski poremećaji u biosintezi kolagena odnose se i na nekoliko oblika bolesti *osteogenesis imperfecta*, karakteriziranih lomljivim kostima (37).

Kod Ehlers-Danlosovog sindroma, skupine poremećaja vezivnog tkiva koji se odnose na oštećenu cjelovitost potporne strukture, pogreške u genima koji kodiraju α-kolagen I, prokolagen-N-peptidazu ili lizil-hidroksilazu rezultiraju nestabilnim zglobovima i nepravilnostima kože (37).

1.4.Hidrolizirani kolagen

1.4.1. Svojstva i dobivanje hidroliziranog kolagena

Proteini kolagena u svom prirodnom obliku slabo su topljivi u vodi zbog velike molekularne mase od približno 300 kDa. Ova prirodna svojstva predstavljaju poteškoće u njihovoj primjeni za kozmetiku i dodatke prehrani (51).

Međutim, razgradnjom kolagena nastaje hidrolizirani kolagen (HC) koji se sastoji od segmenata niske molekulske mase između 1 kDa i 10 kDa (52).

Kolagen se pretvara u hidrolizat ekstrakcijom iz različitih izvora djelovanjem soli, kiseline i enzima koji uzrokuju denaturaciju proteina i hidrolizu prirodnih peptida.

Ukratko, nakon denaturacije nativnog kolagena slijedi enzimski proces koji razlaže proteinske lance na male peptide cijepajući kolagen na specifičnim amidnim vezama (53).

Vrsta sirovine, način obrade i tretiranja biološkog materijala, karakteristike procesa denaturacije i enzimske hidrolize glavni su čimbenici koji određuju konačne karakteristike HC kao što su molekularna masa, sastav aminokiselina i molekularna struktura (54).

HC ima raznoliku i široku primjenu u različitim industrijama, uključujući prehrambenu, farmaceutsku, kozmetičku, biomedicinsku i kožarsku industriju (55).

1.4.2. Ekstrakcija hidroliziranog kolagena

Denaturacijom nativnog kolagena, pri termičkoj obradi iznad 40 °C nastaju tri α lanca u njihovom nasumično namotanom obliku.

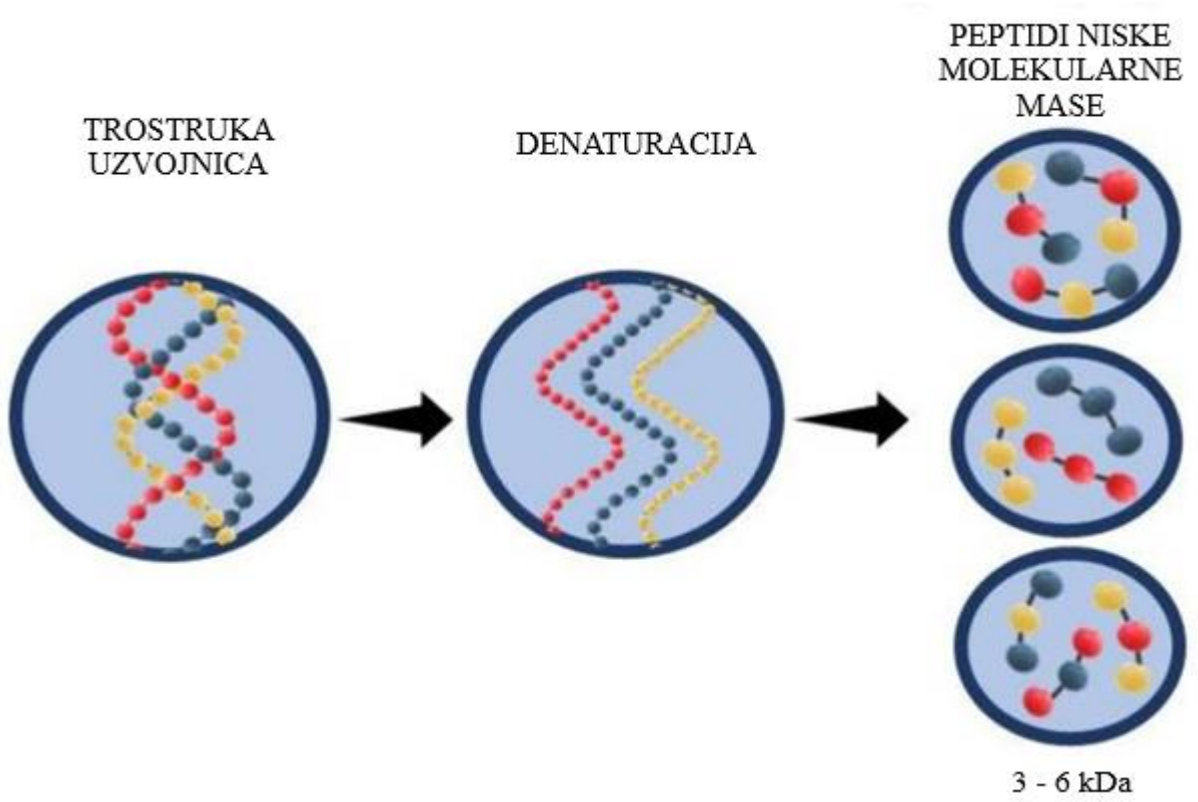
Nakon što se lanci razdvoje, hidroliza se provodi djelovanjem proteolitičkih enzima (alkalaza, papain, pepsin...) te se time dobiva hidrolizirani kolagen (HC) koji se sastoji od malih peptida niske molekularne mase 3 - 6 kDa (56). Na slici 1 prikazana je denaturacija nativnog kolagena u male peptide niske molekularne mase.

Njegova topljivost i funkcionalna aktivnost (antioksidativna, antimikrobna) povezani su s vrstom i stupnjem hidrolize, kao i s vrstom enzima koji se koristi u ovom postupku (57).

Druga vrsta hidrolize je upotrebom kemijskih spojeva u kiselim (octena kiselina, klorovodična kiselina i fosforna kiselina) ili alkalnim medijima. Ove dvije vrste ekstrakcije su jako korozivne i proizvode visoku koncentraciju soli u konačnom proizvodu nakon neutralizacije (58).

Alternativne metode ekstrakcije provode se termičkom obradom, odnosno primjenom visoke temperature i tlaka na protein koristeći subkritičnu razinu vode koja postoji pri temperaturi između 100 i 374 °C i tlaku manjem od 22 MPa (59).

Osim ovih dviju konvencionalnih metoda za dobivanje kolagen hidrolizata, nedavna literatura izvještava i o njihovoj kombinaciji (kemijska i enzimska hidroliza) za ekstrakciju HC (60).



Slika 1. Denaturacija nativnog kolagena u male peptide niske molekularne mase (adaptirano prema (55)).

1.4.3. Analitičke tehnike određivanja molekularne mase hidroliziranog kolagena

Određivanje molekularne mase HC težak je zadatak zbog niske molekularne mase koja se kreće između 3 i 6 KDa. Najčešća tehnika koja se koristi je SDS-PAGE (elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s natrijevim dodecil sulfatom) koja može razdvojiti proteine u rasponu masa od 1 do 100 KDa. Molekule se razdvajaju prema svom naboju jer je brzina kretanja povezana s nabojem molekule. Ova metoda koristi poliakrilamidne gelove (PAGE-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu) u prisutnosti anionskog deterdženta natrijevog dodecil sulfata (SDS). Polimerizacija gela monomera akrilamida proizvodi linearne lance. Uključivanjem bisakrilamida nastaje trodimenzionalna matrica gela. Veličina nastalih pora ovisi o koncentraciji akrilamida i stupnju umrežavanja. Mijenjanje koncentracije akrilamida i bisakrilamida u pripravku gela rezultira različitim stupnjevima poroznosti, a time i različitim intervalima razdvajanja proteina (61, 62, 63).

Masena spektrometrija laserske desorpcije/ionizacije uz pomoć matrice (MALDI-TOF MS) još je jedna tehnika koja pomaže u otkrivanju molekula u velikom rasponu molekularnih težina. To je tehnika u kojoj se peptidi prvo pomiješaju s velikim molarnim viškom spoja matriksa, kao što je DHB (2,5-dihidroksibenzojeva kiselina), kako bi se peptidi niske molekularne mase ionizirali, a zatim se matrica, koja nosi peptide, isparava laserskim zračenjem, a masa isparljivih peptida određuje se iz ionskog vremena leta. Ograničenje ove tehnike je da se neki vrhovi peptida ne mogu razriješiti u jednoj matrici (64, 65, 66).

HPLC-MS/MS moćan je alat ne samo za identifikaciju, već i za kvantificiranje peptida i proteina, međutim mogućnosti kvantifikacije odabranih peptida od biološke važnosti, poput kolagena prilično su ograničene. Kvantifikacija tipova kolagena obično se provodi analizom aminokiselina (67, 68).

1.4.4. Svojstva hidroliziranog kolagena

Svojstva nativnog kolagena razlikuju se od svojstava hidoliziranog kolagena, razlike među nekima od njihovih svojstava prikazuje tablica 1.

Tablica 1. Svojstva nativnog i hidroliziranog kolagena (prema (55)

SVOJSTVO	NATIVNI KOLAGEN	HIDROLIZIRANI KOLAGEN
MOLEKULARNA TEŽINA	~300 kDa	3 - 6 kDa
IZOELEKTRIČNATOČKA (pI)	7,0 – 8,3	3,68 – 5,7
VISKOZNOST	visoka	niska
FORMIRANJE FILMOVA	da	ne

Viskoznost je jedno od važnih fizikalno-kemijskih svojstava kolagena. Nativni oblik kolagena ima veću viskoznost zbog jačeg elektrostatičkog odbijanja među lancima čak i pri niskim koncentracijama otopine kolagena. Međutim, njegov hidrolizirani oblik pokazuje vrlo nisku viskoznost bez obzira na koncentraciju zbog niske molekularne mase malih lanaca (69).

Izoelektrična točka (pI), važan je parametar kvalitete proteina koji se odnosi na udio kiselinskih i baznih aminoostataka u molekuli. Kolagen je amfoterna makromolekula koja ima vrijednost pI između 7 i 8. U procesu hidrolize vrijednost pI se pomiče na niže vrijednosti između 3,68 i 5,7. Ova promjena ovisit će o aminokiselinskom slijedu i raspodjeli aminokiselinskih ostataka prema vrsti ili vremenu hidrolize (68, 70, 71, 72).

Vrsta i stupanj hidrolize kolagena čimbenici su koji povećavaju funkcionalna svojstva poput antioksidativnog kapaciteta, antimikrobnog djelovanja i veće bioraspoloživosti. Ta su svojstva uglavnom povezana s vrijednošću molekularne mase. To omogućuje hidroliziranom kolagenu da djeluje kao elektron-donor za proizvodnju stabilnijih spojeva u reakciji sa slobodnim radikalima (73, 74).

HC je vrlo topljiv u vodi, ali ne može sam stvarati filmove, zato ga je potrebno kombinirati s drugim biopolimerima (75).

Dobivanje HC relativno je jednostavno (proces ekstrakcije moguće je provesti u jednom koraku), a dobiveni produkt pokazuje nekoliko prednosti u odnosu na prirodni kolagen: dobra probavljivost, poboljšane stope apsorpcije i distribucije nakon *per os* unosa (75, 76).

Osim toga, hidrolizirani kolagen ima manju viskoznost, neutralni miris, bezbojan je i proziran. Pokazuje svojstva emulgiranja i stabilizacije, stvaranje pjene, stvaranje filma, nisku alergenost, mogućnost komprimiranja u prah te dobra svojstva nosača (77). HC pomaže smanjiti ili spriječiti oštećenja u stanicama i tkivima tijekom smrzavanja, stoga postoji mogućnost njegove uporabe kao krioprotektora u hrani koja zahtijeva skladištenje na niskim temperaturama (82).

Peptidi kolagena mogu se koristiti kao sastojak funkcionalnih dodataka prehrani jer pokazuju antioksidativno i antimikrobno djelovanje (78).

Leon Lopez i suradnici (83) zaključili su da antioksidativna svojstva HC ovise o veličini molekula; što je manja molekularna težina peptida, to je veća sposobnost doniranja elektrona ili vodika za stabilizaciju radikala. Najbolji rezultati uočeni su kada je HC dobiven nakon četiri sata enzimske hidrolize s prosječnom molekularnom težinom od 5 kDa.

Mendis i suradnici (84) pokazali su da je antioksidativna moć HC uglavnom posljedica prisutnosti hidrofobnih aminokiselina u peptidu. Ovi rezultati pokazuju da peptidi dobiveni iz proteina morske ribe imaju veća antioksidativna svojstva u različitim oksidacijskim sustavima.

Međutim, točan mehanizam peptida koji djeluju kao antioksidansi nije jasno poznat, ali je pretpostavka da neke aromatske aminokiseline i histidin igraju važnu ulogu u aktivnosti.

1.4.5. Izvori kolagena

Kolagen se može ekstrahirati iz različitih prirodnih izvora, tradicionalno iz kopnenih životinja te različitih morskih organizama (49).

Dugi niz godina većina dostupnog kolagena ekstrahirana je iz otpada iz industrije prerade goveda i svinja, ali tijekom posljednjih nekoliko desetljeća upotreba kolagena iz tih izvora je ograničena. Razlozi neprihvatljivosti ovih prozvoda mogu biti osobne (vjerske) naravi. Upotreba proizvoda dobivenih od goveda postala je razlog zabrinutosti za širi dio populacije tijekom kriza goveđe spongiformne encefalopatije, transmisivne spongiformne encefalopatije, slinavke i šapa koje su se dogodile tijekom posljednjih nekoliko desetljeća u svim područjima svijeta, ponajviše u Ujedinjenom Kraljevstvu i Aziji. Proizvodi dobiveni od goveda mogli bi biti prijenosnik ovih bolesti i stoga je njihova upotreba ozbiljno ograničena. Iz ovih razloga postoji potreba za pronalaženjem novih alternativnih izvora kolagena (85).

Kako bi se izbjegli problemi poput varijabilnosti sastava i kvalitete različitih serija proizvoda i moguća transmisije bolesti prirodnog kolagena, on se može dobiti i sintetskim putem. KOD je komercijalni naziv sintetski dobivenog kolagena.

Sastoji se od 36 aminokiselina koje se sastavljaju u nanovlakna s trostrukom spiralom i hidrogelove; oponaša prirodni kolagen i mogao bi predstavljati poboljšanje u odnosu na komercijalne spužve ili terapije temeljene na prirodno dobivenom kolagenu. Slijed peptida je (Pro-Lys-Gly) (Pro-Hyp-Gly) (Asp-Hyp- Gly), a u skraćenicama za aminokiseline (P-**K**-G) (P-**O**- G) **(D**-O-G), dajući mu naziv KOD.

Ovaj materijal predstavlja analog prirodnom kolagenu s obzirom na primarnu strukturu i način savijanja proteina, kao i prisutnost prokoagulacijskih frakcija koje bi mogle potaknuti aktivaciju trombocita i adheziju. Mogao bi se koristiti kao sredstvo za zgrušavanje zahvaljujući svojoj sposobnosti vezanja crvenih krvnih stanica za zaustavljanje krvarenja. Također, veže i aktivira trombocite za stvaranje ugrušaka i pospješivanje zacjeljivanja bez poticanja upale (86).

Iz opisanih razloga ograničenja upotrebe tradicionalnih svinjskih i goveđih izvora kolagena, u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji prednost se sve više daje upotrebi kolagena morskog podrijetla (87).

1.4.5.1.Kolagen goveđeg podrijetla

HC se može ekstrahirati iz goveđe Ahilove tetive upotrebom različitih enzima kao što su alkalaza, pepsin, tripsin i kolagenaza koje proizvodi *Penicillium aurantiogriseum*. Pokazuje antihipertenzivno, antioksidativno i antimikrobno djelovanje (88, 89).

HC iz goveđih pluća pokazao je antioksidativno i protuupalno djelovanje (90).

HC iz nuhalnog ligamenta goveda djelovanjem enzima papaina mogao bi se koristiti kao obećavajući prekursor inhibitornih peptida angiotenzin-I-konvertirajućih enzima (ACE) (91).

Želatina dobre kvalitete ekstrahira se iz goveđe kosti, čiji peptidi djeluju na metabolizam kostiju, korisni su u liječenju osteoartritisa i usporavaju gubitak koštane mase. No, zbog pojave goveđe spongiformne encefalopatije, uporaba ove vrste želatine ograničena je pa se zato sve više istražuju novi izvori kolagena (6).

1.4.5.2.Kolagen svinjskog podrijetla

Drugi tradicionalni izvor HC je svinjska koža, a dobiveni peptidi imaju težinu oko 1 - 10 kDa. Proizvodi se hidrotermalnim postupkom i frakcionira membranama za ultrafiltraciju te pokazuje antioksidativna svojstva, usporava starenje kože, ima dobra svojstva permeacije (92) i ispoljava hipotenzivni učinak (93).

1.4.5.3.Kolagen morskog podrijetla

Morske, a i neke slatkovodne životinje predstavljaju dobre i sigurne prirodne alternativne izvore dobivanja kolagena.

Kao izvori kolagena uglavnom se koriste kosti, koža, peraje, škrge slatkovodnih i morskih riba, morske zvijezde, meduze, spužve, ježa, hobotnice, lignje, sipe, morske anemone i kozice, koje imaju brojne prednosti u odnosu na kopnene životinjske izvore kao što su veća apsorpcija zbog niske molekularne težine, gotovo zanemariva prisutnost bioloških kontaminanata i toksina, nizak upalni odgovor. Neki od značajnih izvora morskog kolagena prikazani su u tablici 2. Za morski kolagen smatra se da nema rizika od prenošenja bolesti, ima status GRAS (*Generally Recognized As Safe,* općenito priznat kao siguran) od strane FDA te predstavlja jeftinu sirovinu (49).

Tablica 2. Morski izvori kolagena i vrste pogodne za ekstrakciju (prilagođena prema (49)

IZVOR	TKIVO
RIBA	koža, kosti, peraje i ljuske spp - baltički bakalar kolagen tip I
MORSKA SPUŽVA	organske komponente spužve spp - Geodia cydonium, Speriditae, Icinia fusca kolagen tip I i IV
MEDUZA	spp - Rhopilema asamushi, Stomolophus meleagris, Catostylus tagi, Rhizostoma pulmo kolagen tip IV, V i II

Hidrolizirani kolagen iz *Prionace glauca* dobiven hidrolizom pomoću enzima alkalaze sadrži peptide molekulske mase manje od 20 KDa, s nutraceutskim učinkom (94).

Ljuskice ribe nilske tilapije (*Oreochromis niloticus*) korištene su za proizvodnju HC visoke kvalitete i niske molekularne mase (95).

Ostali morski izvori za pripremu HC dobiveni su iz hidrolizata proteina bakalara (*Gadus morhua*) (96), aljaške kolje (97) i hrskavice jedne vrste morskog psa *Mustelus griseus.* Rezultati ekstrahiranih biomaterijala bili su niske molekularne mase (3 - 5 KDa) i s antioksidativnim djelovanjem (98).

1.4.5.4.Alternativni izvori HC

Neki alternativni izvori za dobivanje HC pokazuju jako dobra svojstva kolagena koji se iz njih izolira. HC ekstrahiran iz pilećih nogu djelovanjem enima proteaze (99) i HC iz kože *Rana*

chensinensis dobiven kiselom hidrolizom (100) pokazali su veliku topljivost, inhibiciju enzima koji konvertira angiotenzin i antioksidativno djelovanje. Pileća stopala tretirana enzimima papaina na različitim temperaturama (4, 30 i 56 °C) i različitim vremenima ekstrakcije (20, 24 i 28 h) pokazala su funkcionalna svojstva kao što su sposobnost zadržavanja vode i ulja, kao i svojstva emulgiranja i pjene (101, 102).

1.4.5.5.Načini izolacije i metode obrade morskog kolagena

Budući da se znatna količina mase ribe (oko 75 %) u obliku kože, kostiju, peraja, glava, crijeva i ljuski odbacuje, iz tih ostataka moguće je dobiti kolagen, uz značajno povećanje ekonomske vrijednosti nusproizvoda (103).

Iz kože, tetiva, kostiju i mišića dobiva se pretežno kolagen tipa I, a iz riblje hrskavice kolagen tipa II (87).

Topljivost kolagena ovisi o starosti životinje iz koje se dobiva. Kolageno tkivo starijih životinja je teže topljivo od onog dobivenog od mlade životinje jer kolagena tkiva starijih životinja imaju veći broj umreživača, što ih čini teže topljivim od kolagenih tkiva mladih životinja (104) .

Ishrana životinja utječe na količinu proizvedenog kolagena, tako izgladnjele ribe proizvode više kolagena od dobro uhranjene ribe.

Ovisno o izvoru kolagena, predložene su različite tehnike za njegovo dobivanje (87).

Priprema dijelova ribe uključuje čišćenje, razdvajanje životinjskih dijelova, smanjenje veličine rezanjem ili mljevenjem uzoraka i prethodnu kemijsku obradu za uklanjanje nekolagenih proteina, pigmenata ili masti. Kod meduza se odvajaju krakovi od središnjeg dijela meduze (105).

Ribe se razdvajaju na kožice, ljuske, peraje i riblje kosti, jer je zbog mineralizacije njihov sastav različit, stoga primijenjena metodologija za ekstrakciju kolagena mora imati druge korake pripreme. Smanjenje veličine ovih dijelova ribe također je važna za olakšavanje djelovanja kiseline. Uobičajena metoda za uklanjanje nekolagenih proteina je uporaba natrijevog hidroksida, dok se masti i pigmenti mogu ukloniti upotrebom alkohola ili vodikovog peroksida (106).

U svrhu demineralizacije, za uzorke kostiju, hrskavice i ljuskica preporuča se upotreba etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) zbog njezinog kelirajućeg učinka na ione kalcija (106).

U fazi ekstrakcije, kiselina se koristi za otapanje kolagena. Skierka i Sadowska (107) testirali su utjecaj različitih kiselina na ekstrakciju kolagena iz kože bakalara, uključujući klorovodičnu, limunsku, octenu i mliječnu kiselinu. Pokazalo se da primjena octene i mliječne kiseline rezultira većim prinosima.

Prinosi ekstrakcije obično su mali. Iz tog razloga sve češće se u ekstrakciji primjenjuju enzimski tretmani koji koriste proteolitičke enzima nespecifične za kolagen (kao što su tripsin, pankreatin, bromelain, papain ili pepsin) kako bi pomogli u procesu solubilizacije. U tom smislu najviše se primjenjuje pepsin (106, 108).

Kolagen dobiven primjenom pepsina naziva se pepsin-topljivi-kolagen ili atelo-kolagen. Ovaj postupak je vrlo koristan, jer specifično cijepa peptide u telopeptidnoj regiji kolagena te tako hidroliziranjem nekih nekolagenih proteina povećava čistoću kolagena. Rezultat je mnogo učinkovitija ekstrakcija kolagena, jer čini uzorak topljivijim, a istovremeno smanjuje antigenost uzrokovanu telopeptidima (109, 110).

U idućem koraku ekstrakcije kolagen se mora istaložiti, što se općenito postiže dodavanjem NaCl do konačne koncentracije koja može varirati između 2,3 M i 2,6 M u Tris-HCl (pH 7,5).

Dobiveni precipitat skupi se centrifugiranjem, otopi u 0,5 M octenoj kiselini, dijalizira i osuši smrzavanjem, čime se dobije kolagen topljiv u kiselini i pepsinu (87).

Metodologija dobivanja kolagena iz morskih spužvi je različita, budući da kolagen spužve nije topljiv u kiselim otopinama (115).

Ovisno o specifičnoj primjeni i željenoj formulaciji, mogu se slijediti različite strategije za preradu kolagena morskog podrijetla. Metodologije obrade morskih kolagena mogu biti slične metodama dobivanja kolagena iz kopnenih životinja, no primijenjenu metodu je uvijek potrebno prilagoditi karakteristikama vrste koja se obrađuje (87).

1.4.6. Primjena kolagena

Morski kolagen zbog svog biološkog učinka ima velik potencijal upotrebe u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Zbog svojih funkcionalnih svojstva sastojak je krema i gelova s visokim hidratantnim djelovanjem, prevencijom stvaranja bora ili zaštitom od UV zračenja (111).

Morski kolagen također se primjenjuje u zacjeljivanju rana uzrokovanih različitim traumama (opekotine, presađivanje, ulceracije, itd.) pri čemu se materijali na bazi kolagena koriste uglavnom za sprječavanje gubitka vlage i topline iz ranjenog tkiva, istovremeno osiguravajući dobru mikrobno infiltracijsku barijeru (112).

Koristi se i u sustavima za dostavu lijekova: kolagen štitnici u oftalmologiji, mini pelete i tablete za isporuku proteina, materijal za transdermalnu dostavu, u izradi nanočestica (112, 113, 114, 115).

Zbog antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja HC se može koristiti kao funkcionalni sastojak u dodacima prehrani (116). Hidrolizati kolagena mogu vezati ione kalcija, poboljšavajući na taj način njegovu bioraspoloživost, stoga se HC može koristiti u funkcionalnoj hrani obogaćenoj kalcijem (79).

HC djeluje kao antikoagulans jer pomaže u smanjenju oštećenja stanica i tkiva uzrokovanih niskim temperaturama, stoga bi mogao biti koristan u hrani koja zahtijeva skladištenje na niskim ili temperaturama smrzavanja (117).

HC ne utječe na senzorna svojstva hrane pa se koristi u pripremi različitih prehrambenih proizvoda (mesni proizvodi, juhe, napitci) kako bi se poboljšala njihova fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva (55).

HC ne može sam tvoriti filmove zbog niske molekularne težine peptida, ali se može miješati s drugim biopolimerima kao što su celuloza i kitozan.

Filmovi pripremljeni mješavinom celuloze i HC pokazali su dobru prozirnost, dobru apsorpciju ultraljubičastog zračenja i izvrsnu potporu za staničnu adheziju i proliferaciju. Visoka biokompatibilnost nalaže da bi ovi filmovi mogli imati obećavajuću primjenu u području biomaterijala (118).

Razvoj biomaterijala HC mogao bi biti koristan za liječenje poremećaja kostiju i zglobova zbog niske molekularne težine HC i sastava aminokiselina. Biodostupniji je i potiče bolju osteointegraciju promicanjem sinteze kolagena (119).

Alternativni biomaterijali s HC su kitozanske spužve. Pripremljeni su metodologijom sol-gel prijelaza koja pokazuje poroznu morfologiju, poboljšanu biostabilnost, dobar kapacitet upijanja vode, izvrsnu biokompatibilnost i antimikrobno djelovanje uz prisutnost HC (75) .

Hidrogelovi pripremljeni s kitozanom i ribljim HC pokazali su antibakterijsko djelovanje na *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, proliferaciju i migraciju stanica te učinkovitost zacjeljivanja rana (120).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kolagen daje čvrstoću, oblik, otpornost, mehaničku potporu i stabilnost svim tkivima u organizmu. Utvrđeno je da se kolagenska vlakna s vremenom oštećuju, gube debljinu i čvrstoću, što je usko povezano s fenomenom starenja kože. Zbog važne uloge u organizmu, izravno proporcionalne veze sa starenjem kože i dostupnosti sirovina za njegovo dobivanje, intenzivno se istražuju mogućnosti primjene kolagena u razvoju *per os* i topikalnih anti-age preparata.

Gubitak kolagena u tijelu počinje u dobi od 18 do 29 godina, nakon četrdesete godine tijelo gubi oko 1% kolagena godišnje, a oko osamdesete godine proizvodnja kolagena u tijelu može se smanjiti za 75% ukupno u odnosu na mlade odrasle osobe.

S obzirom da je na temelju brojnih istraživanja prepoznata važnost i uloga kolagena u održavanju mladolikog, njegovanog i zdravog izgleda kože, oralna suplementacija hidroliziranim kolagenom posljednih se godina nameće kao veliki trend na području prevencije starenja kože.

Na koji način i u kojoj mjeri oralna suplementacija hidroliziranim kolagenom utječe na funkcionalnost dermisa i utječe na fiziologiju i izgled kože još uvijek nije u potpunosti istraženo. Usprkos tome, na tržištu je trenutno prisutan velik broj različitih formulacija proizvoda s hidroliziranim kolagenom koji se značajno razlikuju po kvaliteti i sastavu. Još uvijek ne postoje smjernice za odabir preparata ili optimizaciju terapijskih režima peroralne primjene.

Stoga su glavni ciljevi ovog istraživanja dati sustavni pregled rezultata znanstvenih istraživanja o kliničkoj učinkovitosti peroralne primjene hidrolizata kolagena u prevenciji i usporavanju starenja kože s posebnim osvrtom na fizikalno-kemijske/tehnološke karakteristike dostupnih preparata te preoporučene doze i trajanje suplementacije.

3. MATERIJALI I METODE

Za izradu ovog specijalističkog rada pregledana je i korištena znanstvena literatura u znanstvenoj bazi podataka PubMed, stručnim časopisima i udžbenicima u tiskanom i elektroničkom obliku.

Znanstvena baza PubMed pretraživana je po ključnim riječima i njihovim kombinacijama: *hydrolyzed collagen, collagen supplementation, skin ageing* tijekom vremenskog perioda od 1. kolovoza 2021. do 1. ožujka 2022. uz odabir kriterija vremenskog perioda objavljenih radova od 2000. do 2022. godine.

4. RASPRAVA

Učinkovitost proizvoda s HC, kao oralnih suplemenata za primjenu kod usporavanja i prevencije znakova starenja kože, ispitivana je većim brojem pretkliničkih i kliničkih istraživanja.

Poznato je da HC ima brojne biološke učinke poput antioksidativnog, antihipertenzivnog, učinak sniživanja lipida i pozitivnih učinaka na kožu te se u istraživanjima nastoji objasniti mogu li se i kako oralnom primjenom HC postići blagotvorni učinci na kožu.

Cilj *in vitro* istraživanja bio je pokazati na koji način oralna suplementacija ostvaruje pozitivne učinke na kožu i kožne parametre. *In vitro* istraživanja obuhvaćene u radu pokazuju da suplementacija oralnim HC pojačava aktivnost fibroblasta, pojačava sintezu kolagena i smanjuje aktivnost metaloproteaza. Povećane razine kolagena objašnjene su kao poboljšana biosinteza kolagena djelovanjem fibroblasta, ali i kao smanjeni metabolizam kolagena tipa I zbog inhibicije aktivnosti metaloproteaza.

Različita istraživanja imala su za cilj istražiti bioraspoloživost HC nakon oralne primjene, s fokusom na apsorpciju u gastro-intestinalnom traktu i distribucijom u kožu. Istraživanja koja su se bavile ovim aspektom HC uglavnom imale su životinjske modele za proučavanje, iako su neka istraživanja provedena i na ljudima.

Rezultati pokazuju da se razine peptida dobivenih iz HC, u cirkulaciji značajno povećavaju nakon oralne primjene HC, što sugerira da se peptidi kolagena apsorbiraju te se zatim različitom brzinom distribuiraju u različita tkiva, uključujući kožu. To pokazuju istraživanja koja su koristile radiokativne markere za obilježavanje HC.

U istraživanjima su korišteni različiti farmaceutski oblici HC te HC iz različitih izvora porijekla, iako među njima dominira riblji izvor HC. Nakon oralnog unosa HC ribljeg porijekla, više od 90% hidroliziranog kolagena se unutar nekoliko sati apsorbira iz tankog crijeva u krv u obliku bioaktivnih kolagen peptida i slobodnih aminokiselina. Krvlju dolaze do ciljanih tkiva, osobito u dermis gdje se akumuliraju i zadržavaju i do 2 tjedna.

Rezultati provedenih kliničkih istraživanja potvrđuju učinkovitost HC kao anti-aging suplementa.

Ispitivanja su provedena na različitim uzorcima ispitanika, različite dobi, spola, etničke pripadnosti u različitom vremenskom trajanju gdje su pojedina ispitivanja koristile gotove komercijalne pripravke HC. U većini ispitivanja HC je bio dopunjen vitaminima, mineralima i različitim bioaktivnim supstancijama. Neovisno o razlikama među provedenim istraživanjima i njihovoj heterogenosti, sve kliničke studije u radu izvijestile su o blagotvornim učincima koje HC ostvaruje u koži. Ti učinci ostvaruju se kroz ublažavanje postojećih bora, bolju elastičnost, zategnutost i hidrataciju kože, smanjen transepidermalni gubitak vode.

Nijedno od analiziranih istraživanja u radu, tijekom primjene ispitivanog pripravka HC nije zabilježila nuspojave ni štetne događaje. Općenito se primjena hidroliziranog kolagena smatra sigurnom za ljudsku upotrebu.

Osim primjene HC u svrhu prevencije starenja kože, analizirana je upotreba HC za različita kožna stanja (bolesti) i kožne privjeske.

Rezultati kod ovih istraživana također pokazuju dobre učinke koje HC ispoljava i za ova ispitivana stanja, ali je broj provedenih ispitivanja značajno manji.

Prisutnost velikog broj formulacija s HC ukazuje na njegov obećavajući učinak kod narušenog strukturnog integriteta *dermisa* kao posjedice starenja.

Jako raširena upotreba kolagena u zdravstvenom sektoru (kozmetici, farmaceutskoj industriji, medicinskoj skrbi) i prehrambenoj industriji zbog njegovih korisnih svojstava kao nutraceutika, biomaterijala, funkcionalne hrane znače i stalno istraživanje povoljnih i odgovarajućih novih izvora izolacije kolagena.

U farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji preferirana je upotreba kolagena morskog podrijetla. Kolagen i druge bioaktivne tvari mogu se ekstrahirati iz različitih morskih organizama.

4.1. Mehanizmi djelovanja hidrolizata kolagena

Unatoč opsežnim istraživanjima djelovanja nativnog ili hidroliziranog kolagena na različite aspekte zdravlja kože, još uvijek nismo u potpunosti sigurni kojim mehanizmom/ kombinacijom mehanizama on ostvaruje svoje učinke. Predloženo je nekoliko potencijalnih mehanizama:

a) fragmenti kolagena mogu biti prekursori sinteze kolagena u koži

b) fragmenti kolagena mogu stimulirati proizvodnju kolagena i proteoglikana u koži

c) kolagen i njegov fragmenti mogu intenzivirati pregradnju kože indukcijom regulatornih T-stanica (Treg) i M2 makrofaga (121).

Sinteza proteina ima svoje specifične mehanizme i ne treba nikakav temeljni *primer* za svoj početak. Tijekom sinteze protena, tRNA imaju ključnu ulogu u pripremi specifične aminokiseline za sintezu proteina. tRNA nose samo aminokiseline, ali ne i peptide (122). Stoga je prvi mogući mehanizam za povezivanje nativnog ili hidroliziranog kolagena s parametrima zdravlja kože neprihvatljiv jer ni endogeni ni egzogeni peptidi ne mogu izravno sudjelovati u

procesu translacije proteina (121). Iako fragmenti kolagena nisu mogli izravno sudjelovati u sintezi proteina, nedavna istraživanja pokazala su da su mogući neizravni stimulatorni učinci putem djelovanja na metabolizam ekstracelularnog matriksa (123).

U procesima remodeliranja tkiva, o procesu uklanjanja *ostarjelog* fragmentiranog kolagena je dosta nepoznanica. Nedavna *in vivo* istraživanja pokazala su da je u procesima izmjene kolagena vrlo važan stanični unos posredovan receptorom te da u tom procesu ključnu ulogu imaju M2-slični makrofagi (124, 125).

Pretpostavka je da bi peptidi HC, nakon što dospiju u dermis, mogli povećati sintezu sastavnica ekstracelularnog matriksa.

Dodatno, pokazano je da kolagen i njegovi fragmenti mogu inducirati regulatorne T stanice i usmjeravati diferencijaciju makrofaga prema M2 sličnim makrofazima što dovodi do supresije imunološkog odgovora na endogeni kolagen i pojave povoljnih zdravstvenih učinaka (121).

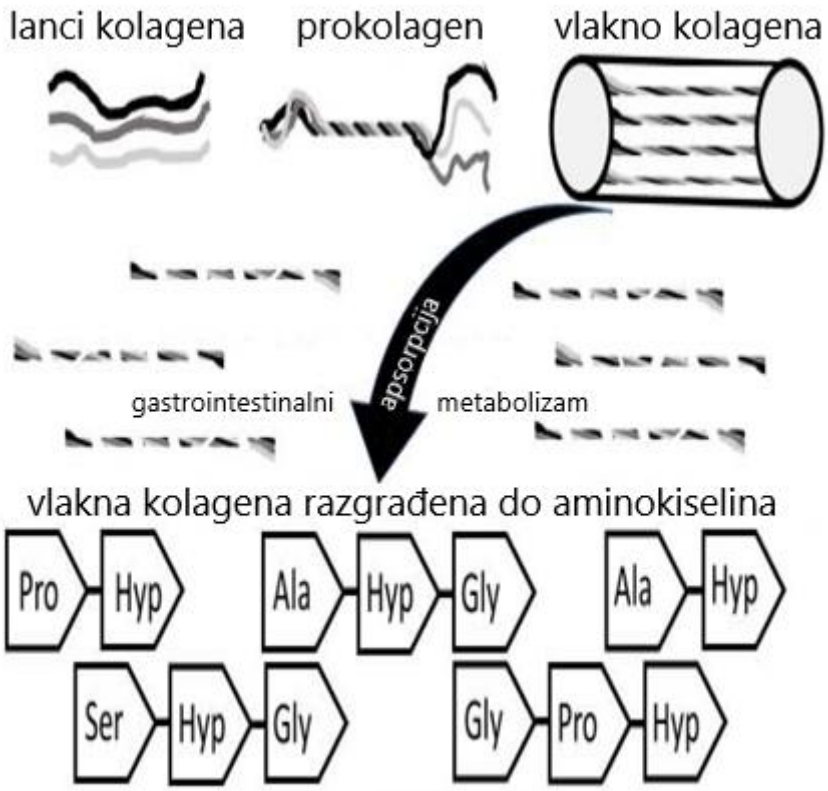
4.1.1. Biodostupnost hidrolizata kolagena

Kako bi bio aktivan u dubljim slojevima kože, hidrolizirani kolagen mora prijeći crijevnu barijeru i dospjeti u krvotok. Brzina transporta kroz crijevnu barijeru mogla bi značiti kontrolni korak koji utječe na učinkovitost ovih spojeva u koži. Stoga je važno pokazati mogu li se peptidi kolagena apsorbirati te u kojem obliku i količini, prije nego što se spekulira o njihovom mehanizmu djelovanja (126).

Hidrolizirani kolagen dugo se koristi u dodacima prehrani jer postoje klinička istraživanja koje pokazuju zadovoljavajući oralnu biodostupnost, brzu apsorpciju i prolazak u krvotok u obliku malih peptida te akumulaciju u koži 96 sati nakon uzimanja. Nakon *per os* primjene

hidroliziranog kolagena, u krvotoku su pronađene i veće koncentracije prolina i hidroksiprolina. S obzirom na malu molekularnu masu i brzu apsorpciju, peptidi kolagena se distribuiraju u različita tkiva, kao što je koža, gdje ostvaruju specifične učinke (6).

Prvi korak u probavi sastoji se od razgradnje hidroliziranog kolagena u dipeptide i tripeptide ili slobodne aminokiseline. U proces razgradnje uključeno je nekoliko proteaza (npr. proteaze gušterače, proteaze tankog crijeva, peptidaze) (126).



Slika 2. Apsorpcija i metabolizam kolagenih vlakana

ALA = alanin, HYP = hidroksiprolin, GLY = glicin, PRO = prolin i SER = serin

Slika 2. prikazuje strukturu kolagenskih vlakana, apsorpciju/metabolizam i akumulaciju u stanicama kože i dermalnim slojevima (prilagođeno prema 127, 128, 129).

Iako se do nedavno smatralo da se derivati kolagena hidroliziraju do aminokiselina u gastrointestinalnom (GI) traktu prije nego što se apsorbiraju u krvotok, nedavna istraživanja sugeriraju da peptidi također mogu izbjeći hidrolizu u probavnom traktu i apsorbirati se intaktni, putem Pept1 transportera (130, 131). Aminokiseline dobivene nakon hidrolize transportiraju se u kožu gdje se koriste kao komponente za izgradnju proteina izvanstaničnog matriksa koje proizvode fibroblasti (127, 128, 129).

Oesser i suradnici (132) pokazali su da kada su miševi hranjeni ^{14}C-obilježenim želatinskim hidrolizatom, više od 90 % radioaktivnog traga apsorbira se u GI trakt nakon 6 h, nakon 12 h radioaktivnost je dosegla maksimalne vrijednosti u koži, dok je više od 85 % radioaktivnosti nestalo iz krvne plazme nakon 24 h. Ovo istraživanje pokazalo je da su peptidi s molekularnom težinom u rasponu od 1 do 10 kDa apsorbirani u GI traktu, prebačeni u krv i deponirani u hrskavicu.

U studiji na štakorima, Watanabe-Kamiyama i suradnici (133) istraživali su primjenu hidrolizata kolagena pilećih nogu (800 Da) koji sadrži Gly-[14C]Pro-Hyp i [14C]Pro kao radioaktivne markere. Radioaktivnost u plazmi dostigla je maksimalnu vrijednost 3 h nakon oralne primjene zajedno s vršnim vrijednostima u koži u istom vremenskom intervalu. Nakon 14 dana primjene ovog tretmana, 70 % radioaktivnosti pronađeno je u koži, dok su većinom, ostala tkiva kao što su jetra, bubrezi, slezena, mozak i mišići pokazali smanjenu radioaktivnost.

Iwai i suradnici (134) otkrili su da su zdravi ljudski dobrovoljci koji su unosili 9 - 23 g hidrolizata iz svinjske kože, pilećih nogu i hrskavice nakon 12 h gladovanja pokazali maksimalnu koncentraciju od 20 do 60 nmol/mL u plazmi 1 do 2 h nakon uzimanja, koja je

smanjena na polovicu maksimalnih vrijednosti 4 h nakon ingestije. Svinjska koža i pileća stopala sastojali su se od kolagena tipa I, dok je pileća hrskavica bila kolagen tipa II.

2019. g. Skov i suradnici (135) proveli su kliničko istraživanje apsorpcije kolagena iz goveđe kosti kako bi razjasnili utjecaj egzogene enzimske hidrolize na brzinu apsorpcije i bioraspoloživost. Deset zdravih muških ispitanika uzimalo je ili 35 g enzimski hidroliziranog kolagena, neenzimski hidrolizirani kolagen ili placebo (250 mL vode) tijekom tri uzastopna dana. Studija je zaključila da su stope apsorpcije i bioraspoloživost tri određene aminokiseline (Gly, Pro i Hyp) bile značajno veće nakon oralne primjene enzimski hidroliziranog kolagena. Prikupljeni rezultati sugeriraju da uzimanje kolagena u njegovom hidroliziranom obliku potiče veću stopu apsorpcije u koncentraciji ukupnih aminokiselina u plazmi nakon obroka u usporedbi s neenzimski hidroliziranim kolagenom i placebo skupinom.

Ohara i suradnici (128) proveli su kliničku studiju na pet zdravih muškaraca, u kojoj su uspoređivali količine i strukture peptida koji sadrže hidroksiprolin u ljudskoj krvi nakon oralnog uzimanja hidrolizata želatine dobivenog iz riblje ljuske, riblje kože ili svinjske kože. Zaključili su da 30% svih otkrivenih Hyp odgovara peptidima koji sadrže Hyp u usporedbi sa slobodnim oblikom Hyp te da količina i struktura peptida koji sadrže Hyp u ljudskoj krvi nakon oralne primjene hidrolizata želatine ovise o izvoru želatine.

Iz prethodnih istraživanja razvidno je da su oralno primijenjeni hidrolizati kolagena biodostupni i dospijevaju u krvotok, bilo kao intaktni peptidi, bilo kao aminokiseline. Ipak, ostaje nejasno hoće li značajan udio tih peptida/aminokiselina dospjeti do kože kako bi tamo ostvarili svoje učinke.

Upravo zato su Yazaki i suradnici (129) u svom istraživanju na ljudima i na animalnom modelu (miševi) željeli ispitati dospijevaju li peptidi koji potječu iz kolagena u krvi u kožu. Nakon oralnog uzimanja hidrolizata kolagena kod ljudi (i miševa) tripeptidni kolagen je transportiran

u krv s posebno obogaćenim vrijednostima Gly-Pro-Hyp koje su se zatim taložile u kožu s obogaćenim koncentracijama, Pro-Hyp vjerojatno nakon hidrolize. Autori su u istraživanju zaključili da se funkcionalni peptidi mogu prenijeti na kožu oralnim dodacima koji sadrže HC.

Yamamoto i suradnici (136) demonstrirali su apsorpciju HC tripeptida (Gly-Pro-Hyp) ili dipeptida (Pro-Hyp) u krvotoku na modelu štakora. Apsorpcija se se događa već 10 minuta nakon oralne primjene. Farmakokinetika je praćena kod štakora kojima je peroralno davan Gly-[(3)H]Pro-Hyp. Uočeno je da se tripeptidi kolagena ugrađuju u tkiva poput kože, kostiju i zglobnog tkiva.

4.1.2. Učinci hidrolizata kolagena na kožu - rezultati in vitro studija

Budući da fibroblasti sintetiziraju i oslobađaju različite proteine izvanstaničnog matriksa koji poboljšavaju zdravlje kože, cilj *in vitro* studija bio je ispitati na koji način dodatak kolagena može rezultirati pozitivnim promjenama u fibroblastima koji bi u konačnici mogli poboljšati parametre zdravlja kože (137).

Postoji nekoliko *in vitro* istraživanja u kojima je pokazano da kolagen pojačava aktivnost fibroblasta, povećava sintezu kolagena i inhibira MMP.

2018. g. Zague i suradnici (131) otkrili su na kulturama ljudskih fibroblasta da peptidi kolagena moduliraju metabolizam proteina ekstracelularnog matriksa. Fibroblasti su bili izolirani iz različitih dijelova kože, zaštićenih i izloženih djelovanju sunca. *In vitro* tretman hidrolizatom kolagena povećao je prekursore dermalnog matriksa zajedno s proteinima prokolagena tipa I i kolagena tipa I. Povećane vrijednosti kolagena pripisane su poboljšanoj biosintezi kolagena fibroblastima, ali i smanjenom metabolizmu kolagena tipa I kroz inhibiciju aktivnosti metaloproteinaza (MMP 1 i MMP 2). Autori su zaključili da hidrolizati kolagena dobiveni iz

hrane poboljšavaju stanice kože i zdravlje kože povećavajući proizvodnju kolagena i inhibirajući enzime koji ga razgrađuju.

Neka *in vitro* istraživanja dokazala su antioksidativno djelovanje kolagenskih peptida te pokazala da peptidi iz hidrolizata kolagena pokazuju kemotaksijska svojstva za fibroblaste kože, što dovodi do migracije i proliferacije mišjih fibroblasta (138, 139).

4.1.3. Učinci hidrolizata kolagena – rezultati istraživanja na animalnim modelima

U ispitivanju iz 2006. g., devet zdravih svinja hranjeno je hidrolizatom kolagena dobivenog od svinjske kože (0,2 g/kg tjelesne težine) s rasponom molekularne težine od 3 do 5 kDa tijekom 62 dana. U usporedbi s kontrolnom skupinom, oralno uzimanje kolagen hidrolizata rezultiralo je značajnim povećanjem promjera i gustoće kolagenih vlakana, što sugerira da su se poboljšala mehanička svojstva kože (140).

Godine 2009. Tanaka i suradnici (141) ispitivali su na šest tjedana starim bezdlakim miševima svakodnevnu primjenu kolagenskih peptida (0,2 g/kg tjelesne težine) pripremljenih od riblje ljuske, na koži oštećenoj opetovanom izlaganju UV zračenja. Tijekom šest tjedana primjene, oralni tretman kolagenom poboljšao je hidrataciju kože oštećene UV-B zrakama, smanjena je hiperplazija epidermisa i smanjeno je opadanje razine kolagena tipa I u koži miševa. Dobiveni rezultati sugeriraju da su peptidi kolagena korisni kao dodatak prehrani za suzbijanje oštećenja kože uzrokovanih UV-B zračenjem i fotostarenjem.

Zague i suradnici (142) su na Wistar štakorima proučavali kako oralna primjena HC povećava sintezu kolagena u koži, a istovremeno smanjuje aktivnost MMP (MMP2). Dobiveni rezultati pokazuju da HC može smanjiti promjene u ekstracelularnom matriksu povezane sa starenjem putem stimuliranja anaboličkih procesa u tkivu kože.

Okawa i suradnici (143) pokazali su da oralna primjena tripeptida kolagena poboljšava suhoću i svrbež na modelu suhe kože izazvane acetonom na miševima. Oralna primjena kolagenskih peptida (80 ili 500 mg/kg tjelesne težine/dan) tijekom tri dana kod miševa značajno je smanjila transepidermalni gubitak vode i smanjila svrbež kože životinja.

Song i suradnici (144) ispitali su učinke HC iz kože šarana na fotostarenje izazvano UV zračenjem kod miševa i otkrili da peptidi niže molekularne težine imaju povoljnije učinke na razinu hijaluronske kiseline i sadržaj vlage u koži, u usporedbi s HC visoke molekularne težine.

Chen i suradnici (145) proučavali su učinak enteralne prehrane dopunjene kolagenskim peptidima dobivenim iz kože aljaške kolje na upalni odgovor nakon opekotina kod miševa. Zaključak istraživanja je da dodatak peptida kolagena enteralnoj prehrani može poboljšati ishode oporavka kod bolesnika s opekotinama.

Song i suradnici (146) ispitivali su na miševima učinke unosa HC kroz dva mjeseca (400 mg/kg tjelesne težine/dan) na biomarkere upale. Rezultati analize niza citokina otkrili su da je u koži inhibirano oslobađanje trombocita i niz faktora rasta, a u krvnoj plazmi su značajno smanjene koncentracije devet različitih citokina što upućuje na moguć širi spektar sistemskih imunomodulatornih i antiagregacijskih učinaka.

Ista skupina autora proučavala je na miševima učinak peroralne primjene HC kroz 8 tjedana na fotostarenje kože. Nakon oralne primjene goveđeg HC, uočeno je usporavanje/ublažavanje procesa starenja kože uz povećanje sinteze kolagena u koži i promjenu u omjeru kolagena tipa I i tipa III. Na temelju istraživanja autori ističu mogućnosti potencijalne primjene HC kao funkcionalne hrane u borbi protiv starenja kože u procesu kronološkog starenja (147).

4.1.4. Učinkovitost hidrolizata kolagena – rezultati kliničkih istraživanja

Matsumoto i suradnici (148) istraživali su učinke dnevnog unosa 7 g komercijalno dostupnog proizvoda koji sadrži 5 g ribljeg HC tipa I. U studiji je sudjelovalo 25 ispitanica (35 ± 5 godina starosti) koje su imale pojavu suhe i grube kožu zimi. Nakon šest tjedana tretmana, povećao se sadržaj vlage u *stratum corneum* (lice-obraz, podlaktica i stražnji dio vrata) uz poboljšanje gipkosti i elastičnosti kože, što je rezultiralo većom glatkoćom, smanjenjem bora i manje hrapavom kožom.

Godine 2007. Ohara i suradnici (128) su u istraživanju na pet zdravih dobrovoljaca (33 + 6 godina) ispitivali utjecaj unosa HC tipa I (0,385 g/kg tjelesne težine) prosječne molekularne težine od 5 kDa iz riblje ljuske, riblje kože i svinjske kože. Ispitanici su hidrolizate konzumirali nakon 12 satnog posta. Unutar 24 h nakon uzimanja, različiti peptidi koji sadrže hidroksiprolin u ljudskoj krvi su kvantificirani. Najveći sadržaj hidroksiprolina poticao je iz riblje ljuske, zatim svinjske kože te naposljetku riblje kože, što sugerira da izvor kolagena daje naznake o tome kako se te molekule apsorbiraju i transportiraju u krv.

Godine 2012. Schwartz i Park (149) istraživali su učinak dodatka prehrani koji sadrži HC tipa II pilećeg porijekla, hijaluronsku kiselinu i hondroitin sulfat na 26 ispitanica s vidljivim znakovima kronološkog starenja i fotostarenjem lica. Sve uključene ispitanice su bile zdrave osobe u rasponu starosti od 35 do 59 godina. Oralni dnevni dodatak od 1 g tijekom 12 tjedana doveo je do značajnog smanjenja suhoće kože/ljuštenja i smanjenja velikih linija/bora s uočenim povećanim sadržajem hemoglobina i kolagena, što sugerira da je dodatak kolagena pojačao mikrocirkulaciju lica i smanjio znakove starenja na licu.

Godine 2014. Proksch i suradnici (10) proveli su dvostruko slijepo, placebom kontrolirano ispitivanje na 69 žena u dobi od 35 do 55 godina koje su uzimale 2,5 ili 5,0 g kolagenskih

peptida ili placebo jednom dnevno tijekom osam tjedana (n = 23 ispitanika po skupini). Na kraju ispitivanja, elastičnost kože u obje ispitivane skupine značajno se poboljšala u odnosu na placebo skupinu, dok se vlažnost kože također poboljšala u skupinama koje su uzimale kolagen, ali nije postigla značajnost u odnosu na placebo. To sugerira da oralna suplementacija kolagenskim peptidima ima povoljan učinak na fiziologiju kože.

Osim prethodno opisanog istraživanja, Proksch i suradnici (150) ispitavali su utjecaj specifičnog bioaktivnog kolagenskog peptida na 114 žena u dobi od 45 do 65 godina koje su uzimale 2,5 g ispitivanog pripravka ili placebo (n = 57 ispitanika po skupini) jednom dnevno tijekom osam tjedana. Biopsijom kože analizirani su različiti parametri. Nakon četiri i osam tjedana primjene, došlo je do značajnog smanjenja volumena bora oko očiju a nakon osam tjedana, kvantificirane su značajno veće vrijednosti prokolagena tipa I i elastina, što sugerira da oralna primjena kolagenskih peptida smanjuje bore kože i starenje kože.

Mnoga znanstvena istraživanja pružaju dokaze da suplementacija vitaminima poput vitamina C ili E može poboljšati izgled kože jer hranjive tvari mogu imati specifična svojstva koja privlače molekule vode čime se poboljšava hidratacija kože, uklanjaju slobodni radikali ili smanjuje upala. Vitamin C je također bitan ko-faktor u biosintezi kolagena (6). Stoga, mnogi dodaci prehrani s hidroliziranim kolagenom sadrže i dodane vitamine, minerale ili njihovu kombinaciju.

U istraaživanju iz 2014. g. (151) ispitivana je učinkovitost HC u skupini od 18 žena u menopauzi. Testirani proizvod je uz kolagen sadržavao i vitamin C i hijaluronsku kiselinu. Nakon oralne primjene tijekom 9 tjedana došlo je do poboljšanja izgleda kože i značajnog smanjenja dubine bora kod ispitanika. Pritom se promatrao stupanj hidratacije, gubitak vode i elastičnost kože. Osim toga, pokazalo se da svakodnevna oralna suplementacija s 1 g ove vrste HC do 12 tjedana dovodi do značajnog smanjenja bora i suhoće kože i poboljšanja elastičnosti kože.

Borumand i Sibilla (126) proveli su veliko istraživanje usmjereno na ispitivanje učinka dodatka koji se sastoji od ribljeg HC, hijaluronske kiseline, vitamina i minerala na svojstva kože. Istraživanje je provedeno na 294 ispitanika u dobi od 18 do 74 godine. Ispitanici su uzimali jednom dnevno 50 ml ispitivanog tekućeg dodatka prehrani. Istraživanje je bilo strukturirano u tri dijela. Prvi dio istraživanja je izvijestio da je 69 % ispitanika imalo vidljivo ili značajno poboljšanje linija lica nakon 60 dana uzimanja dodatka. Ublaženi su znakovi fotostarenja lica i suhoća kože. Drugi dio je izvijestio o povećanju gustoće dermalnog kolagena. Nakon 12 tjedana uzimanja dodatka, gustoća kolagena bila je veća na licu nego na podlaktici. Treći dio pokazao je da se čvrstoća kože povećala i do 94 % kada je tretman dosegao 130 dana.

Asserin i suradnici (152) procjenjivali su učinak dnevne oralne suplementacije peptidima kolagena na hidrataciju kože i gustoću kolagena. Peptidi kolagena bile su prosječne veličine 2 - 5 kDa, ribljeg i svinjskog porijekla. Nakon četiri tjedna suplementacije, gustoća dermalnog kolagena značajno se povećala, a do osmog tjedana značajno se povećala hidratacija kože. Oba poboljšana parametra kože zadržala su se nakon 12 tjedana, a rezultati *ex vivo* pokazali su da kolagenski peptidi induciraju proizvodnju kolagena kao i GAG.

Genovese i suradnici (153) proveli su kliničku studiju učinkovitosti HC na 120 zdravih dobrovoljaca tijekom 90 dana. Polovica ispitanika je jednom dnevno unosila 50 mL multikomponentne formulacije koja je pored HC sadržavala hijaluronsku kiselinu, N-acetilglukozamin, ulje boražine, vitamine, minerale i bioaktivne sastojke poput resveratorola, acai bobica, koenzim Q10 i likopen. Druga polovica ispitanika je uzimala placebo koji se sastojao od vode, dodanih aroma, organskih kiselina i polisaharida soje. Histološka analiza pokazala je da oralna suplementacija istraživanom formulacijom dovodi do poboljšanja strukture i slojevitosti epidermalnih slojeva te poboljšanja strukturne arhitekture kolagenih vlakana unutar dermisa. Komplementarni dio ovog istraživanja bio je upitnik za samoprocjenu.

95 % ispitanika se slaže da je njihova koža više hidratizirana. Samoprocjenom su se izjasnili da im je koža elastičnija (91,6 %), jača (81,7 %) i deblja (91,7 %)

Inoue i suradnici (154) proveli su randomizirano dvostruko slijepo, placebo kontrolirano kliničko ispitivanje uzimanja dviju vrsta ribljih HC koji se sastoje od različitih količina bioaktivnih dipeptida Pro-Hyp i Hyp-Gly, kako bi istražili njihov učinak na poboljšanje stanja kože. Ispitivanje je provedeno na 85 ispitanica, a parametri, kao što su vlažnost kože, elastičnost, bore i hrapavost, uspoređeni su s placebo skupinom na početku, te 4 i 8 tjedana nakon početka ispitivanja. Hidrolizat kolagena s većim sadržajem bioaktivnih kolagenskih peptida pokazao je značajnija i veća poboljšanja od HC s nižim sadržajem bioaktivnih kolagenskih peptida i placeba. Zaključak studije je da je uporaba HC s većim sadržajem Pro-Hyp i Hyp-Gly dovela do većeg poboljšanja stanja kože lica, uključujući vlažnost kože lica, elastičnost, bore i hrapavost (154).

Sugihara i Inoue (155) su u svojoj studiji ispitivali učinke HC iz riblje ljuske i svinjske kože na UV-induciranim pigmentnim mrljama (UV mrljama) ljudske kože. U ispitavanje je bilo uključeno 39 ženskih osoba koje su svakodnevno unosile 5 g placeba, 5 g ribljeg HC ili 5 g svinjskog HC tijekom osam tjedana. Usporedba unutar ispitivanih skupina pokazala je da obje vrste preparata smanjuju površinu mrlja na koži uzrokovanih UV zračenjem, dok je svinjski hidrolizat značajno smanjio površinu UV mrlja na koži već nakon 4 tjedna kontinuiranog uzimanja.

Ito i suradnici (156) su u svom istraživanju pretpostavili bi dodatak prehrani koji sadrži kombinaciju ribljeg kolagenog peptida i ornitina (CPO) mogao poboljšati stanje kože povećanjem vrijednosti hormona rasta u plazmi i/ili inzulinu sličnog faktora rasta-1 (IGF-1). Dvadeset i dva zdrava ispitanika bila su uključena u 8-tjedno dvostruko slijepo, placebom kontrolirano pilot istraživanje. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine - CPO skupinu, koja je uzimala 30 ml dodatka koji sadržava CPO, ili placebo skupinu. Analizirano je stanje kože

uključujući elastičnost i transepidermalni gubitak vode (TEWL), kao i vrijednosti hormona rasta u plazmi i IGF-1. Elastičnost kože i TEWL značajno su poboljšani u skupini koja je primala CPO u usporedbi s placebo skupinom. Samo je skupina CPO pokazala povećane vrijednosti IGF-1 u plazmi nakon 8 tjedana suplementacije u usporedbi s početnim stanjem. Osim toga, smanjen je broj pora kože u tretmanu CPO. Istraživači ovim istraživanjem sugeriraju novi mehanizam djelovanja na kožu kroz poboljšanje stanja kože povećanjem koncentracije IGF-1.

Prednosti orto-silicijeve kiseline stabilizirane u hidroliziranom morskom kolagenu kao tretmana protiv procesa starenja kože procijenjena je u istraživanju na dvadeset dva ispitanika. Ispitanici su savjetovani da 15 minuta prije doručka uzimaju jednu kapsulu s 600 mg orto-silicijskom kiselinom i hidroliziranim morskim kolagenom. Nakon 90 dana tretmana, autori su zaključili da su degenerativne promjene ECM oporavljene, postignuta je stimulacija sinteze kolagena tipa I, poboljšana čvrstoća, tekstura i hidratacija kože (157).

Campos i suradnici istraživali su učinak proizvoda s HC kojem su dodani vitamini A, C, E i cink. U istraživanje je bilo uključeno 60 zdravih žena starosne skupine između 40 i 50 godina, koje su svakodnevno, tijekom tri mjeseca, jednom dnevno uzimale 10 g testnog proizvoda u obliku oralnog praha topljivog u vodi. Učinkovitost tretmana testirali su biofizičkim tehnikama i snimanjem kože. Na kraju istraživanja vidljivo je smanjenje bora i velikih pora, dobra elastičnost kože i bolja struktura dermisa. Zaključak studije bio je da je proizvod HC obogaćen vitaminima i cinkom učinkovit u poboljšanju uvjeta starenja kože. Zaključeno je da se kombinacijom tri vrste aminokiselina (glicin, prolin i hidroksiprolin) s vitaminima i cinkom koji djeluju antioksidativno, osigurava zaštita od ROS (158). Reaktivne vrste kisika odgovorne su za oksidativni stres koji je usko povezan i s upalnim procesom i s procesom sinteze kolagena (159) .

Kim DU i suradnici (160) su u svom istraživanju procjenjivali učinak kolagen peptida niske molekularne težine sa udjelom tripetida (Gly- XY) većeg od 15 %, uključujući 3 % Gly-Pro-Hyp. Šestdeset i četiri ispitanika nasumično su raspoređeni da uzimaju placebo ili 1000 mg niskomolekularnog kolagen peptida jednom dnevno tijekom 12 tjedana. Parametri hidratacije kože, bora i elastičnosti procijenjeni su na početku i nakon 6 i 12 tjedana. U usporedbi s placebo skupinom, vrijednosti hidratacije kože bile su značajno veće u skupini koja je primala niskomolekularni kolagen peptid nakon 6 tjedana i 12 tjedana. Nakon 12 tjedana u skupini koja je primala kolagen peptid, rezultat vizualne procjene i tri parametra bora kože značajno su poboljšani u usporedbi s placebo skupinom. Elastičnost kože je također značajno poboljšana nakon 12 tjedana u grupi koja je uzimala niskomolekularni kolagen peptid. Ovi rezultati sugeriraju da se HC može koristiti kao funkcionalni sastojak hrane za poboljšanje hidratacije i elastičnosti kože.

Czajka i suradnici (161) pretpostavili su da bi svakodnevna oralna suplementacija tekućim preparatom koji sadrži hidrolizirani riblji kolagen, vitamine, antioksidanse i druge aktivne sastojke mogla poboljšati teksturu i elastičnost kože, a uz to imati i zaštitni učinak na zdravlje zglobova. Dvostruko slijepo, randomizirano, placebom kontrolirano kliničko ispitivanje provedeno je na 120 ispitanika koji su svakodnevno konzumirali testirani proizvod ili placebo tijekom 90 dana. Ispitanici koji su konzumirali testni proizvod imali su ukupno značajno povećanje elastičnosti kože u usporedbi s placebom. Histološka analiza biopsije kože otkrila je pozitivne promjene u arhitekturi kože, uz smanjenje solarne elastoze i poboljšanje organizacije kolagenih vlakana u skupini koja je uzimala ispitivani proizvod. Ovi rezultati su potvrđeni upitnikom samoprocjene kojima je utvrđeno da je koža nakon primjene HC hidratiziranija i elastičnija.

Sažetak svih kliničkih istraživanja obuhvaćenih ovim radom, o učinkovitosti *per os* primjene hidrolizata kolagena na različite parametre zdravlja kože, prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Sažetak kliničkih studija opisanih u radu

AUTOR (GOD.)	ISPITANICI	VRIJEME TRAJANJA	INTERVENCIJA	ISHOD
Matsumoto i sur. (2006.)	25 ispitanica	6 tjedana	7 g komerijalnog pripravka/ 5 g ribljeg kolagena tip I	povećanje elastičnosti i vlažnosti kože, smanjenje bora
Ohara i sur. (2007.)	5 ispitanika	1 tjedan	hidrolizat kolagena tip I iz riblje ljuske, kože i svinjske kože	struktura i količina peptida dobivenih iz hrane u ljudskoj plazmi razlikuju se ovisno o izvoru i vrsti kolagena
Schwartz i Park (2012.)	26 ispitanica	12 tjedana	1 g oralnog dodatka prehrani BioCell collagen®	smanjenje suhoće kože i ublažavanje bora, pojačana mikrocirkulacija lica
Proksch i sur. (2014.)	69 ispitanica	8 tjedana	2,5 g ili 5 g HC	poboljšana elastičnost i vlažnost kože
Proksch i sur. (2014.)	114 ispitanica	8 tjedana	2,5 g kolagen peptida Verisol®	smanjenje volumena bora oko oka, veće razine prokolagena tipa I i elastina
Borumand i Sibilla (2014.)	18 ispitanica	9 tjedana	1 g HC,vitamin C, hijaluronska kiselina	smanjenje bora i suhoće kože, poboljšanje elastičnosti kože
Borumand i Sibilla (2014.)	294 ispitanika	12 tjedana	50 ml tekućeg dodatka prehrani Pure Gold Collagen®	ublaženi znakovi fotostarenja i suhoće kože lica, povećanje gustoće dermalnog kolagena
Asserin i sur. (2015.)	33 ispitanika 101 ispitanika	8 tjedana 12 tjedana	10 g HC ribljeg porijekla PeptanF®ili svinjskog porijekla PeptanP®	povećana hidratacija kože i povećana gustoća dermalnog matriksa
Genovese i sur.(2017.)	120 ispitanika	90 dana	50 ml Gold Collagen Forte®	značajno poboljšanje elastičnosti kože i strukture kolgenih vlakana
Inoue i sur.(2016.)	85 ispitanica	8 tjedana	5 g HC s različitim omjerom Pro-Hyp i Hyp-Gly	HC s većim sadržajem Pro-Hyp i Hyp-Gly vodi većoj vlažnosti, elastičnosti, manje bora i manje hrapava koža
Sugihara i Inoue (2012.)	39 ispitanika	8 tjedana	5 g ribljeg ili svinjskog HC	smanjenje površine mrlja na koži uzrokovanih UV zračenjem
Ito i sur. (2018.)	22 ispitanika	8 tjedana	30 mL pića(10 g ribljeg kolagen peptida, 400 mg ornitina, vitamin C)	poboljšana elastičnost kože i TEWL, povećane razine IGF-1 i hormona rasta u plazmi, smanjen broj pora kože
Petersen Vitelo Kalil i sur. (2018.)	22 ispitanika	90 dana	600 mg orto-silicijske kiseline stabilizirane morskim kolagenom	oporavljene degenerativne promjene ECM, stimulacija sinteze kolagena tipa I, poboljšanja čvrstoća, tekstura i hidratacija kože
Campos i sur. (2015.)	60 ispitanica	12 tjedana	9 g HC	poboljšanje znakova starenja kože, zaštita od ROS-a
Kim DU i sur. (2018.)	64 ispitanika	12 tjedana	1 g niskomolekularnog kolagen peptida	poboljšana elastičnost i hidratacija kože
Czajka i sur. (2018.)	120 ispitanika	90 dana	50 mL Gold Collagen Active®/4 g ribljeg HC	smanjenje solarne elastoze, poboljašanje organizacije kolagenih vlakana, hidratiziranija i elastičnija koža
Hakuta i sur. (2017.)	17 ispitanika	12 tjedana	3,9 g kolagen tripeptida ili kolagen peptida	smanjen TEWL, smanjeno nekoliko upalnih biomakera
Hexel i sur. (2017.)	25 ispitanika	24 tjedna	2,5 g kolagen peptida Verisol®	brži rast noktiju, manja učestalost lomljenja noktiju, poboljšan izgled noktiju
Nomoto i Iizaka (2020.)	39 bolničkih ležećih pacijenata	8 tjedana	10 g kolagen peptida	povećana elastičnost i hidratacija kože kod starijih ležećih, hospitaliziranih pacijenata
Choi i sur. (2014.)	8 ispitanika	4 tjedna	3 g kolagen peptida	poticanje cijeljenja rana i brži oporavak kože nakon tretmana laserom

Choi i suradnici (175) su u svom radu imali za cilj pregledati literaturu i procijeniti dostupna randomizirana kontrolirana ispitivanja koja koriste suplementaciju kolagenom u svrhu poboljšanja kvalitete kože, prevencije starenja i potencijalne primjene u medicinskoj dermatologiji. Pretraživanje literature provedeno je PubMed-om koristeći kriterije pretraživanja kolagen i dodatak ILI hrana ILI prehrana. Kriteriji uključivanja bili su randomizirana, placebom kontrolirana ispitivanja koja su koristila dodatke kolagena kod ljudi vezanih uz dermatologiju te radovi objavljeni na engleskom jeziku. Jedanaest studija s ukupno 805 pacijenata uključeno je u pregled. Osam studija koristilo je HC , 2,5 g/dan do 10 g/dnevno tijekom 8 do 24 tjedna, za liječenje dekubitusa, kseroze, starenja kože i celulita. Dvije studije koristile su kolagen tripeptid, 3 g/dan tijekom 4 do 12 tjedana, uz značajno poboljšanje elastičnosti i hidratacije kože. Jedna studija koja je koristila kolagen dipeptid sugerirala je da je učinkovitost protiv starenja kože proporcionalna sadržaju kolagen dipeptida. Zaključak analiziranih istraživanja je da oralni dodaci s HC imaju obećavajuću primjenu za zacjeljivanje rana i usporavanje starenje kože. Oralni dodaci kolagena također povećavaju elastičnost kože, hidrataciju i gustoću dermalnog kolagena. Dodatak kolagena općenito je siguran bez prijavljenih nuspojava. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnila medicinska primjena kod bolesti kožne barijere kao što je atopijski dermatitis i kako bi se odredili optimalni režim i doziranja.

Barati i suradnici (121) su kroz sustavni pregled procjenjivali literaturu o učincima dodataka kolagena na parametre zdravlja kože zdravih i bolesnih ispitanika, s posebnim naglaskom na mehanizme djelovanja HC. U prvom koraku pretraživanja u bazama podataka dobiveno je 9057 radova. Nakon uklanjanja duplikata, ostala je 6531 publikacija. Daljnji pregled po naslovu i/ili sažetku rezultirao je uklanjanjem 6500 stavki. Konačno, cjeloviti tekstovi 31 preostale stavke ocijenjeni su u pogledu prihvatljivosti, a 10 publikacija uključeno je u pregled.

Rezultati dobiveni iz ovog sustavnog pregleda pokazuju da oralna primjena netaknutog ili HC poboljšava kliničke manifestacije zdravlja kože. Gotovo sve uključene studije izvijestile su o

korisnim učincima dodatka kolagena te između studija nisu uočene nikakve nedosljednosti. U ovom sustavnom pregledu razjašnjena su tri različita potencijalna mehanizma djelovanja HC. Izravni učinci kolagenskih peptida na fibroblaste, makrofage nalik M2 i mehanizme koji se odnose na oralnu toleranciju mogući su mehanizmi za blagotvorne učinke dodatka kolagena.

De Miranda i suradnici (176) su kroz sustavni pregled i metaanalizu kliničkih istraživanja saželi dokaze o učincima HC na proces starenja kože. Nakon provedene pretrage literature u nekoliko znanstvenih baza podataka korištena su randomizirana, dvostruko slijepa i kontrolirana ispitivanja koja su procjenjivala oralnu suplementaciju s hidroliziranim kolagenom te prijavila barem jedan od sljedećih ishoda: bore kože, hidrataciju, elastičnost i čvrstoću. Nakon preuzimanja članaka iz baze podataka odabrano je 19 istraživanja s ukupno 1125 sudionika u dobi od 20 godina do 70 godina (95 % žena). U metaanalizi, analizirane studije su pokazale povoljnije rezultate korištenja HC u usporedbi s placebom, u smislu hidratacije kože, elastičnosti i bora. Na temelju rezultata, suplementacija oralnim hidroliziranim kolagenom tijekom 90 dana učinkovita je u smanjenju starenja kože jer smanjuje bore, poboljšava elastičnost i hidrataciju kože.

4.1.5. Ostale indikacije za primjenu hidrolizata kolagena

Osim u svrhu anti-aginga, odnosno poboljšnja znakova starenja kože, primjena HC ispituje se i za različita druga kožna stanja i bolesti.

U 2017. g. Hakuta i suradnici (162) proveli su kliničko istraživanje na sedamnaest pacijenata s atopijskim dermatitisom koji su nasumično raspoređeni da tijekom 12 tjedana uzimaju 3,9 g kolagena tripeptida ili normalnih kolagenskih peptida i svaki je ispitanik služio kao vlastita kontrola. Kada su analizirani njihovi keratinociti, smanjene su vrijednosti nekoliko upalnih

biomarkera te kod 13 ispitanika koji su završili studiju, transepidermalni gubitak vode značajno je smanjen, ali krvni parametri nisu poboljšani ni u jednoj liječenoj skupini.

Hexsel i suradnici (163) su na 25 ispitanika istražili učinke HC na zdravlje i rast noktiju. Ispitanici su uzimali 2,5 g preparata jednom dnevno tijekom 24 tjedna nakon čega je slijedilo razdoblje od četiri tjedna bez terapije. Tretman je povećao rast noktiju za 12 % i smanjio učestalost lomljenja noktiju za 42 %. Većina sudionika (80 %) složila se da je HC poboljšao izgled njihovih noktiju.

Nomoto i Iizaka (164) proveli su kliničko istraživanje kojem je cilj bio istražiti učinak HC na hidrataciju rožnatog sloja i elastičnost kože podlaktica hospitaliziranih starijih osoba. Jednom dnevno oralna primjena dodatka prehrani koji sadrži peptide kolagena (10,0 g) uvedena je u 39 bolničkih bolesnika u dobi od 65 godina ili starijih koji su raspoređeni u intervencijsku ili kontrolnu skupinu korištenjem blok-randomizacije. Hidratacija rožnatog sloja i elastičnost kože mjereni su na početku te 2, 4, 6 i 8 tjedana nakon početka intervencije. Prosječna hidratacija rožnatog sloja značajno je povećana s 43,7 na početku, na 51,7 u 8. tjednu nakon intervencije u intervencijskoj skupini. Razlike u elastičnosti kože u odnosu na početnu vrijednost bile su značajne u 6. i 8. tjednu nakon početka uzimanja oralnog dodatka prehrani. Zaključak istraživanja ovih autora je da oralni dodaci prehrani koji sadrže peptide kolagena mogu smanjiti ranjivost i oštećenja kože kod starijih osoba i tako spriječiti stanja koja nastaju uslijed konstantnog pritiska na kožu kod starijih ležećih bolesnika.

Choi i suradnici (165) istraživali su učinak tripeptida kolagena (3 g/dan tijekom četiri tjedna) na zacjeljivanje rana i oporavak kože nakon tretmana frakcijskom fototermolizom kod osam zdravih odraslih dobrovoljaca. Obje skupine ispitanika, i kontrolna i eksperimentalna skupina, primile su tretman frakcijskom fototermolizom, ali su u eksperimentalnoj skupini četiri ispitanika primala 3 g/dan oralnog kolagenskog peptida tijekom 4 tjedna. Uočeno je da je eritem nakon lasera brže prošao u eksperimentalnoj skupini nego u kontrolnoj skupini. Osim toga,

oporavak hidratacije kože nakon tretmana frakcijskim laserom bio je veći u eksperimentalnoj skupini nego u kontrolnoj skupini, a eksperimentalna skupina je pokazala značajno poboljšanu elastičnost kože nakon tretmana u usporedbi s kontrolnom skupinom. Oralni dodatak tripeptidima kolagena čini se učinkovitim u poticanju cijeljenja rana i oporavka kože nakon tretmana frakcijskom fototermolizom.

4.1.6. Kvaliteta hidrolizata kolagena

Hidrolizati kolagena sastoje se od bezbroj peptida i treba obratiti pozornost na njihovu kvalitetu kako bi se osigurale očekivane koristi i sigurnost.

Definirana su dva glavna parametra kvalitete za HC: peptidni profil i sigurnost primjene.

Peptidni profil (polidisperznost peptida) i veličina peptida pokazuju dosljednost proizvodnog procesa i mogu se koristiti za predviđanje oralne apsorpcije (129, 133).

Unatoč tome što se proizvodi koji sadrže HC upotrebljavaju dugi niz godina bez prijavljivanja ozbiljnih nuspojava, može se primijetiti da su na tržištu prisutne različite formulacije HC koje se teoretski mogu razlikovati po sigurnosti primjene (166, 167).

Sigurnost je bitan atribut kvalitete za dodatke prehrani. Lopez-Morales i suradnici (168) u svrhu ispitivanja sigurnosti HC predlažu korištenje nekoliko rutinskih analiza koje se uobičajno koriste za procjenu sigurnosti u farmaceutskoj industriji. Tako se dvije stanične linije koje se obično koriste u *in vitro* studijama toksičnosti: HepG2 (izvedene iz ljudske jetre) koje se koriste za ispitivanje metabolizma i toksičnosti jetre i CaCo-2 stanice (izvedene iz ljudskih kolorektalnih stanica epitela) koje se koriste za ispitivanje crijevne apsorpcije i toksičnosti, mogu primijeniti i na dodatke prehrani s HC.

Kada je kolagen sastavnica medicinskih proizvoda mora zadovoljiti testove biokompatibilnosti (kao što su primjerice ISO 10993 testovi), sukladno bitnim zahtjevima definiranim u Prilogu I. Direktive vijeća 93/42/EEC Europske unije. Osobito je važna prihvatljiva razina imunotoksičnosti i rizika od pojave alergije ili anafilakse. Navedeno je vrlo često u slučaju kolagena morskog podrijetla zbog velikih filogenetskih razlika između ljudskih i morskih vrsta (posebno morskih vrsta koje nisu sisavci (87)).

4.1.7. Pregled dodataka prehrani s hidrolizatima kolagena na hrvatskom tržištu

Usporedno s trendom rasta broja proizvoda (dodataka prehrani) s HC na svjetskom tržištu, raste popularnost i ponuda takvih proizvoda i na hrvatskom tržištu.

Hidrolizirani kolagen je dostupan u različitim farmaceutskim oblicima: tabletama, praškovima i tekućim oblicima - u obliku napitka ili pojedinačnih doza (ampula).

Ove dodatke prehrani po sastavu nalazimo kao jednokomponentne pripravke samo s HC ili višekomponentne gdje uz HC sadrže i druge sastavnice poput elastina, koenzima Q10 (Q10), vitamina B skupine, C vitamina, hijaluronske kiseline, metilsulfonilmetana (MSM), polifenola zelenog čaja, resveratrola, minerala cinka, selena i mangana.

U najvećem broju ovih proizvoda HC je morskog porijekla (riblji izvor). Od ostalih nalazimo kolagen goveđeg porijekla te jedan proizvođač s HC od slatkovodne ribe iz kontroliranog uzgoja.

4.1.8. Prikazi sastava dostupnih dodataka prehrani s hidrolizatima kolagenana hrvatskom ljekarničkom tržištu

Na tablicama 4. do 13. prikazani su sastavi dodataka prehrani s hidrolizatima kolagena na hrvatskom ljekarničkom tržištu.

Tablica 4. Proizvod 1.

Proizvod 1.	Sadržaj u preporučenoj dozi	% PU (preporučeni dnevni unos)
HIDROLIZIRANI KOLAGEN	10000 mg	-
MSM	2000 mg	-
EKSTRAKT ZELENOG ČAJA/ OD TOGA POLIFENOLI	400 mg/200 mg	-
KOENZIM Q10	20 mg	-
HIJALURONSKA KISELINA	100 mg	-
VITAMIN C	100 mg	125
VITAMIN B1	1,1 mg	100
VITAMIN B2	1,4 mg	100
VITAMIN B6	1,4 mg	100
VITAMIN B12	2,5 µg	100
FOLNA KISELINA	200 µg	100
BIOTIN	50 µg	100
PANTOTENSKA KISELINA	6 mg	100
NIACIN	16 mg	100
CINK	10 mg	100

Sadržajem kompleksan i zanimljiv tekući oblik dodatka prehrani, koji osim 10 000 mg HC ribljeg podrijela, tip I, sadrži i veliki broj drugih supstancija čije se djelovanje, u sinergiji s HC može pozitivno odraziti na izgled kože. Proizvođač kod upotrebe naglašava da se dnevna doza (5 g – 10 g HC) može prilagoditi potrebama kože, ovisno o stupnju dehidracije, umora i potrebe za nadoknadom kolagena.

Proizvođač ističe tvrdnje o nadoknadi izgubljenog kolagena, poticanju proizvodnje prirodnog kolagena i smanjenju bora na temelju kliničke studije tijekom 6- tjedne primjene HC iz sastava ovog proizvoda. Veličina molekula HC tipa I iz ovog proizvoda je manja od 2 kDa čime se osigurava izvor svih potrebnih aminokiselina.

Hijaluronska kiselina u proizvodu omogućava vezanje vode i hidrataciju svih slojeva kože te smanjuje dehidraciju kože i sprječava nastanak novih bora.

Vitamin C iz proizvoda je vrijedan dodatak samom HC budući da je potreban za pravilnu sintezu kolagena u koži. Sam vitamin C također ima antioksidativnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa te sprječava nastanak pigmentacijskih mrlja.

Vitamini B skupine i cink su u proizvodu zastupljeni u maksimalnoj preporučenoj dozi (100 % PU) čime sprečavaju perutanje kože, hrane i jačaju kosu i nokte, sprečavaju lomljenje i potiču rast kose i noktiju te osiguravaju zdravi izgled kože.

Osim samih navoda o „anti-aging“ svojstvima proizvoda, proizvođač navodi da proizvod sprečava upale, smanjuje pojavu akni, rozaceje i crvenila kože što se povezuje sa sadržajem metilsulfonilmetana u proizvodu. MSM ima dokazano protuupalno djelovanje. S dozom od 2 grama dnevno MSM može utjecati na smanjene akni i rozaceje, smanjenje stvaranja bora. Njegovo djelovanje je i da povećava stvaranje energije u tijelu, povećava sposobnost organizma da eliminira otpadne tvari te ublažava simptome alergije (169).

Polifenoli zelenog čaja imaju antioksidativno djelovanje te tako mogu neutralizirati slobodne radikale koji uzrokuju preuranjeno starenje. Mogu djelovati na sprečavanje upalnih procesa u koži te smanjenje pojave akni (170).

Koenzim Q 10 je univerzalni antioksidans koji smanjuje oštećenja stanica djelovanjem sunčeva zračenja, sprečava ragradnju kolagena i nastanak hiperpigmentacija (137, 171).

Tablica 5. Proizvod 2.

Proizvod 2	Sadržaj u preporučenoj dozi	% PU
	50 ml	
KOLAGEN	5000 mg	-
HIJALURONSKA KISELINA	100 mg	-
VITAMIN C	100 mg	125
RESVERATROL	20 mg	-

Proizvod 2 iz tablice 5. je tekući dodatak prehrani koji sadrži kombinaciju HC, hijaluronske kiseline, resveratrola te vitamina C koji dopridonosi stvaranju kolagena te štiti stanice od oksidativnog stresa.

Tablica 6. Proizvod 3.

Proizvod 3.	Sadržaj u preporučenoj dozi 25 ml	% PU
HIDROLIZIRANI KOLAGEN	10000 mg	-
HIJALURONSKA KISELINA	100 mg	-
VITAMIN C	100 mg	125
VITAMIN B1	1,1 mg	100
VITAMIN B2	1,4 mg	100
VITAMIN B6	1,4 mg	100
VITAMIN B12	2,5 µg	100
FOLNA KISELINA	200 µg	100
BIOTIN	50 µg	100
PANTOTENSKA KISELINA	6 mg	100
NIACIN	16 mg	100
MANGAN	2 mg	100

Proizvod 3 (tablica 6.) je također tekući dodatak prehrani u obliku monodozirnih ampula spremnih za upotrebu. Za razliku od prva dva prethodno opisana proizvoda pored HC ribljeg porijekla, hijaluronske kiseline, vitamina C i vitamina B skupine sadrži i mangan.

Mangan zaštićuje stanice od oksidativnog stresa i doprinosi normalnom stvaranju vezivnog tkiva.

Tablica 7. Proizvod 4.

Proizvod 4.	Na 100 g	Na porciju* (8 g)
HIDROLIZIRANI KOLAGEN NATICOL®	62,5 g	5 g
HIJALURONSKA KISELINA	125 mg	10 mg
VITAMIN C	1000 mg	80 mg (100 % PU)

Proizvod 4 (tablica 7.) je primjer dodatka prehrani s HC u prahu.

Tablica 8. Proizvod 5.

Proizvod 5.	Na 100 g	Na 10 g
HIDROLIZIRANI KOLAGEN	100 g	10 g
VITAMIN C	240 mg	24 mg (30 % PU)

Proizvod 5 (tablica 8) je dodatak prehrani s HC u prahu.

Preporučenu dnevnu količinu proizvoda (10 g) potrebno je umiješati u tekućinu (voda, sok, jogurt) kako bi se prah dobro otopio.

Tablica 9. Proizvod 6.

Proizvod 6.	U preporučenoj dnevnoj količini od 20 ml	% PU
KOLAGEN	5000 mg	
HIALURONSKA KISLINA	30 mg	
ELASTIN	100 mg	
VITAMIN C	80 mg	100 %
VITAMIN B3 (NIACIN)	16 mg	100 %
VITAMIN D3	5 µg	100 %
VITAMIN A	400 µg	50 %
VITAMIN E	12 mg	100 %
CINK	2 mg	20 %
SELEN	55 µg	100 %

Proizvod 6 (tablica 9) je tekući dodatak prehrani s HC koji pored ostalih sastojaka, do sada opisanih u prethodnim tablicama ima dodan protein elastin.

Proizvođač navodi da je veličina molekula HC u proizvodu 2 kDa, a elastina 1,4 kDa.

Vitamin C iz proizvoda je bitan za stvaranje funkcionalnog kolagena za normalnu funkciju kože. Cink, vitamin A i niacin doprinose održavanju zdrave kože. Vitamin E, C, cink i selen doprinose zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Kolagen i elastin osiguravaju koži elastičnost, strukturu i potporu.

Tablica 10. Proizvod 7.

Proizvod 7.	U preporučenoj dnevnoj dozi 3 kapsule	% PU
KOLAGEN, riblji	934,5 mg	
VITAMIN C	150 mg	188

Proizvod 7 (tablica 10) je primjer HC u kapsulama. Zbog kapaciteta same kapsule proizvođač preporučuje uzeti 3 kapsule dnevno, čime se postiže dnevni unos od 934,5 g HC što je dosta niže od uobičajnih preporuka unosa HC koji se kreću u rasponu od 5 do 10 grama dnevno.

Tablica 11. Proizvod 8.

Proizvod 8.	Sastojci u preporučenoj dnevnoj dozi (1 ampula = 25 ml)
HIDROLIZIRAN MORSKI KOLAGEN	5000 mg
HIJALURONSKA KISELINA (NATRIJEVA SOL)	40 mg
EKSTRAKT TALUSA ALGE MJEHURASTE HALUGE	180 mg
CINK	1,5 mg 15 % PU
SELEN	8,3 µg 15 % PU

Proizvod 8 (tablica 11) je tekući dodatak prehrani u obliku jednokratnih monodoza (ampula) spremnih za upotrebu. Posebnost proizvoda osim HC ribljeg (morskog) porijekla je dodatak hijaluronske kiseline, cinka, selena te ekstrakt talusa smeđe makroalge mjehuraste haluge.

Ascophyllum nodosum (mjehurasta haluga) karakteriziraju maslinasto-smeđi listovi koji se obično otkrivaju na periferiji sjevernog Atlantskog oceana. Ovaj interplimni fukoid opsežno je analiziran i proučavan zbog svog kemijskog sastava. Najvažniji sastojci su polisaharidi alginska kiselina, laminarin i fukoidan, dok su ostali značajni sastojci poput lipida, manitola, askofilana, proteina, vlakana, pigmenata i fenola, kao i vitamini, hormoni i enzimi također prisutni. Pokazalo se da ima antioksidativnu i fotoprotektivnu aktivnost dok inhibira elastazu i lipazu (174).

Tablica 12. Proizvod 9.

Proizvod 9.	Sastojci u preporučenoj dnevnoj dozi (1 ampula)
HIDROLIZIRANI KOLAGEN	5000 mg
VITAMIN C	100 mg
VITAMIN E	10 mg
HIJALURONSKA KISELINA	10 mg
VITAMIN B3	10 mg
VITAMIN B2	2 mg
CINK	5 mg

Proizvod 9 (tablica 12) tekući je dodatak prehrani u obliku monodoza-ampula HC tipa I, a dobiva se iz slatkovodne ribe iz kontroliranog uzgoja, čime je izbjegnuta mogućnost onečišćenja teškim metalima poput žive kao i visoki sadržaja natrija. Vitamini B2 i B3 zajedno sa cinkom doprinose održavanju zdrave kože. Vitamin C doprinosi normalnom stvaranju kolagena u koži, a uz vitamine B2 i E te cink doprinosi zaštiti stanica od oksidativnog stresa.

Tablica 13. Proizvod 10.

Proizvod 10.	Sastojci u preporučenoj dnevnoj dozi (1 kapsula):
ULJE LOSOSA	230 mg
ULJE MASLINE	150 mg
MORSKI KOLAGEN (RIBLJI)	150 mg
ULJE BOREČA	60 mg
VITAMIN C (L-ASKORBINSKA KISELINA)	60 mg
L-METIONIN	50 mg
L-CISTIN	50 mg
NIACIN (NIKOTINAMID)	18 mg
VITAMIN E (DL-ALFA-TOKOFERIL ACETAT)	10 mg
ŽELJEZO (ŽELJEZOV SULFAT)	7 mg
PANTOTENSKA KISELINA (KALCIJEV-D-PANTOTENAT)	5,5 mg
CINK (CINKOV OKSID)	3 mg
VITAMIN B6 (PIRIDOKSIN-HIDROKLORID)	1,8 mg
VITAMIN B2 (RIBOFLAVIN)	1,6 mg
VITAMIN B1 (TIAMIN-MONONITRAT)	1,4 mg
FOLNA KISELINA (PTEROILMONOGLUTAMINSKA KISELINA)	150 µg
BIOTIN (D-BIOTIN)	66 µg
VITAMIN B12 (CIJANOKOBALAMIN)	1 µg

Proizvod 10 (tablica 13.) primjer je dodatka prehrani u farmacetskom obliku kapsula namijenjenom održavanju zdravlja kose, kože, noktiju gdje je uz formulaciju vitamina, minerala, nezasićenih masnih kiselina iz uljnih izvora dodan i kolagen morskog, ribljeg porijekla u dozi od 150 mg po kapsuli. Iako kolagen u ovom farmaceutskom pripravku nije

hidroliziran, proizvod je naveden kao primjer formulacije vitamina za kosu, kožu i nokte novije generacije gdje se u proizvod uvrštava i kolagen.

5. ZAKLJUČAK

Proces starenja kože usko je povezan s molekularnim metabolizmom i modifikacijama ECM u dermisu, što rezultira modifikacijom strukture i funkcionalnosti kolagenih vlakana, elastina i hijaluronske kiseline. Smanjena elastičnost kože i stvaranje bora, opuštenost, lomljivost i suhoća kože su glavna obilježja starenja kao posljedica progresivne atrofije dermisa. U starijoj koži smanjuje se proizvodnja kolagena i povećava se njegova razgradnja, što dovodi do ukupnog smanjenja količine kolagena Većina pristupa protiv starenja ima za cilj preokrenuti ovaj proces.

Kolagen je glavni strukturni protein u vezivnom tkivu kao što su koža, tetive, hrskavica i kosti, te čini 25 – 30 % svih proteina u tijelu. Kolagen je sastavni dio ECM kožnog tkiva te čini 75 % njegove ukupne težine, a njegova glavna funkcija je pružanje mehaničke potpore. U kombinaciji s hijaluronskom kiselinom, retikulinom i elastinom, koja su druga vlakna koja se nalaze u ECM, kolagen tvori mrežu podrške za fibroblaste, keratinocite, melanocite i druge specijalizirane stanice imunološkog sustava kože.

Tvrdnje proizvođača su da oralna suplementacija s HC rezultira dostavom peptida kolagena u dublje slojeve kože čime se poboljšava fiziologija i izgled kože kroz povećanje hidratacije, elastičnosti, čvrstoće i smanjeno stvaranje bora.

Mnoga znanstvena istraživanja bave se proučavanjem učinkovitosti nadoknade kolagena oralnom suplementacijom. Relevantne i dostupne kliničke studije pokazuju da oralno uneseni HC imaju pozitivne učinke na kožu. Dokazano je da svakodnevna konzumacija HC u različitim dozama, iz različitih izvora može donijeti mnoge dobrobiti za poboljšanje zdravlja kože te poboljšanje parametara elastičnosti, hidratacije, smanjenja bora.

Iako rezultati provedenih istraživanja pokazuju da postoji povezanost suplementacije s HC i postizanja pozitivnih učinakana kožu, potrebno je ukazati na nekoliko važnih ograničenja do danas provedenih studija.

Dostupne studije je teško međusobno usporediti u smislu intervencije i postignutih ishoda jer se razlikuju s obzirom na veličinu uzorka, sastav korištenog suplementa, metode koje se koriste za provjeru rezultata i različite mjerne jedinice kojima se rezultat izražava.

Dodaci HC korišteni u studijama nisu usporedivi jer se razlikuju po izvoru dobivanja, dozi te prisutnosti drugih, potencijalno bioaktivnih, nutrijenata u korištenom preparatu. Naime, većina dostupnih kliničkih studija koristi komercijalno dostupne HC koji uz HC sadrže dodane vitamine, minerale, antioksidanse. Neki od dodanih nutrijenata su vitamini A, C, E, cink, hijaluronska kiselina, koenzim Q10, ekstrakt acerole, kondroitin sulfat. U studijama se pozitivni učinci suplementacije pripisuju samo HC, dok doprinos i učinak drugih nutrijenata u formulaciji nije procijenjen. Pozitivni učinci na kožu mogu nastati zahvaljujući sinergizmom ovih tvari s HC. Primjer za to je koenzim Q10 koji djeluje kao antioksidans, neutralizirajući slobodne radikale čime umanjuje i poboljšava znakove starenja kože. Vitamin C i hijaluronska kiselina, također dodavani kao nutrijenti u komercijalne pripravke s HC, sudjeluju i stimuliraju biosintezu kolagena.

U studijama često nije naveden ni objašnjen životni stil ispitanika. Pretpostavke su da će ispitanici sa zdravijim životnim stilom, uravnoteženom prehranom, manjim unosom rafiniranih ugljikohidrata i većim unosom vode, brže ispoljiti dobrobiti unosa suplemenata s HC.

Usprkos navedenim ograničenjima, na temelju do sada provedenih istraživanja može se zaključiti da dodaci prehrani s HC mogu odgoditi i poboljšati znakove starenja kože (ublažiti pojavnost bora na licu i poboljšati hidrataciju i elastičnost kože), barem za vrijeme trajanja suplementacije. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se istražili i razjasnili točni mehanizmi

djelovanja kojim HC ostvaruje svoje učinke na kožu, izdvojili preparati bolje biodostupnosti, odredile optimalne doze i trajanje suplementacije te se razjasnili mogući sinergistički učinci s drugim bioaktivnim spojevima s učincima na kožu.

6. LITERATURA

1. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. J Invest Dermatol 2003;121:231-241.

2. Kollias N, Sayre RM, Zeise L, Chedekel MR. Photoprotection by melanin. J Photochem Photobiol B 1991; 9: 135-160.

3. Kligman AM. Early destructive effect of sunlight on human skin. JAMA 1969;210: 2377-2380.

4. Lipozenčić J. i sur. Dermatovenerologija. Medicinska naklada Zagreb; 2008, str. 5–9.

5. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, Park KC. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. Int J Mol Sci 2019;20: 2126.

6. Lupu MA, Gradisteanu Pircalabioru G, Chifiriuc MC, Albulescu R, Tanase C. Beneficial effects of food supplements based on hydrolyzed collagen for skin care (Review). Exp Ther Med 2020;20:12-17.

7. Hincu M, Surdu O, Leon A, Mateescu G. Cellular and molecular alterations in skin submitted to ultraviolet radiations. Rom Biotechnol Lett Suppl 2010;15:62–69.

8. Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin. Dermatol Clin 1986;4:433-446.

9. Quan T, Fisher GJ. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. Gerontology 2015; 61:427-434.

10. Proksch E, Segger D, Degwert J, Schunck M, Zague V, Oesser S. Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. Skin Pharmacol Physiol 2014; 27:47-55.

11. Aguirre-Cruz G, León-López A, Cruz-Gómez V, Jiménez-Alvarado R Aguirre-Álvarez G. Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. Antioxidants. Basel 2020;9:181.

12. Tanase C, Popescu ID, Enciu AM, Gheorghisan-Galateanu AA, Codrici E, Mihai S, Albulescu L, Necula L, Albulescu R. Angiogenesis in cutaneous T-cell lymphoma - proteomic approaches. Oncol Lett 2019;17:4060–4067.

13. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. Arch Dermatol 2008;144:666-672.

14. Uitto J. Understanding premature skin aging. N Engl J Med 1997; 337:1463-1465.

15. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. J Eur Acad Dermatol Venereol 2011;25:873-884.

16. Lee H, Hong Y, Kim M. Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. Int J Mol Sci 2021;22:12489.

17. Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Shao Y, Cho MK, He T, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. Am J Pathol 2009;174:101-114.

18. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. Int J Mol Sci 2016;17:868.

19. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. Nature 1996;379:335-339.

20. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. Photochem Photobiol 2003;78:43-48.

21. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. Physiol Rev 2005;85:1-31.

22. Nagase H., Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res 2006;69:562-573.

23. Quan T, Little E, Quan H, Qin Z, Voorhees JJ, Fisher GJ. Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. J Invest Dermatol 2013;133:1362-1366.

24. Yokose U, Hachiya A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Visscher MO, Kitzmiller WJ, Bello A, Tsuboi R, Kitahara T, Kobinger GP, Takema Y. The endogenous protease inhibitor TIMP-1 mediates protection and recovery from cutaneous photodamage. J Invest Dermatol 2012;132:2800-2809.

25. Qin Z, Balimunkwe RM, Quan T. Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. Br J Dermatol 2017;177:1337-1348.

26. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. Biochem J 1987;247:597-604.

27. Quan T, Shao Y, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. J Invest Dermatol 2010;130:415-424.

28. Sun ZW, Hwang E, Lee HJ, Lee TY, Song HG, Park SY, Shin HS, Lee DG, Yi TH. Effects of Galla chinensis extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice. J Nat Med 2015;69:22-34.

29. Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. J Med Food 2014;17:985-995.

30. Chen B, Li R, Yan N, Chen G, Qian W, Jiang HL, Ji C, Bi ZG. Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor-β/Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1. Mol Med Rep 2015;11:3344-3348.

31. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. J Cell Commun Signal 2018;12:35-43.

32. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. Am J Pathol 2006;168:1861-1868.

33. Quan T, Wang F, Shao Y, Rittié L, Xia W, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. J Invest Dermatol 2013;133:658-667.

34. Sionkowska A, Adamiak K, Musiał K, Gadomska M. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. Materials 2020;13:4217.

35. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. Adv Drug Deliv Rev 2016;97:4-27.

36. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55:1531-1546.

37. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. Medicinska naklada Zagreb; 2011, str. 40–41, 527–531.

38. Boraschi-Diaz I, Wang J, Mort JS, Komarova SV. Collagen Type I as a Ligand for Receptor-Mediated Signaling. Front. Phys 2017;5:12.

39. Winterpacht A, Hilbert M, Schwarze U, Mundlos S, Spranger J, Zabel BU. Kniest and Stickler dysplasia phenotypes caused by collagen type II gene (COL2A1) defect. Nat Genet 1993;3:323-326.

40. Asghar A, Henrickson RL. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. Adv Food Res 1982;28:231-372.

41. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, Mullen AM, Bayon Y, Pandit A, Raghunath M, Zeugolis DI. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. Adv Mater 2019;31: e1801651.

42. Haq F, Ahmed N, Qasim M. Comparative genomic analysis of collagen gene diversity. 3 Biotech 2019;9:83.

43. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. Annu Rev Biochem 2009; 78:929-958.

44. Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a004978.

45. Purcel G, Meliţă, D, Andronescu E, Grumezescu AM. Collagen-based nanobiomaterials: Challenges in soft tissue engineering. U: Grumezescu AM, ur. Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering. Applications of Nanobiomaterials. Volume 5. William Andrew Publishing; 2016, str. 173–200.

46. Bella J, Hulmes DJS. Fibrillar Collagens. U: Parry D.A.D., Squire J.M., ur. Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms. Volume 82. Springer International Publishing; 2017, str. 457–490.

47. Fang M, Yuan J, Peng C, Li Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. Tumour Biol 2014;35:2871-2882.

48. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Školska knjiga; 2012, str. 779

49. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. J Cosmet Dermatol 2018;17:20-26.

50. Eastoe JE, Leach AA. Chemical constitution of gelatin. U: Ward AG, Courts A, ur. The Science and Technology of Gelatin. Academic Press Inc; 1977, str. 73–108.

51. Li GY, Fukunaga S, Takenouchi K, Nakamura, F. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. Int J Cosmet Sci 2005;27:101-106.

52. Oshimura E, Sakamoto K. Chapter 19—Amino Acids, Peptides, and Proteins. U: Sakamoto K, Lochhead RY, Maibach HI, Yamashita Y. ur. Cosmetic Science and Technology. Elsevier; 2017, str. 285–303.

53. Langmaier F, Mládek M, Kolomazník K, Sukop S. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. Int J Cosmet Sci 2002;24:273-279.

54. Skopinska-Wisniewska J, Olszewski K, Bajek A, Rynkiewicz A, Sionkowska A. Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2014;40:65-70.

55. León-López A, Morales-Peñaloza A, Martínez-Juárez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Álvarez G. Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications. Molecules 2019;24:4031.

56. Hong H, Chaplot S, Chalamaiah M, Roy B, Bruce H, Wu J. Removing Cross-Linked Telopeptides Enhances the Production of Low-Molecular-Weight Collagen Peptides from Spent Hens. J Agric Food Chem 2017;65:7491-7499.

57. Barzideh Z, Latiff AA, Gan CY, Abedin MZ, Alias AK. ACE Inhibitory and Antioxidant Activities of Collagen Hydrolysates from the Ribbon Jellyfish (Chrysaora sp.). Food Technol Biotechnol 2014;52:495-504.

58. Onuh JO, Girgih AT, Aluko RE, Aliani M. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. Food Chem 2014;150:366-373.

59. Powell T, Bowra S, Cooper HJ. Subcritical Water Hydrolysis of Peptides: Amino Acid Side-Chain Modifications. J Am Soc Mass Spectrom 2017;28:1775-1786.

60. Schmidt M, Dornelles R, Mello R, Kubota E, Mazutti M, Kempka A, Demiate I. Collagen extraction process. Int. Food Res. J 2016;23:913–922.

61. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.

62. Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. Nat Protoc 2006;1:16-22.

63. Haider SR, Reid HJ, Sharp BL. Tricine-sds-page. U: Kurien BT, Scofield RH, ur. Protein Electrophoresis: Methods and Protocols. Volume 869. Humana Press; 2012, str. 81–91.

64. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem 1988;60:2299-2301.

65. Hema GS, Joshy CG, Shyni K, Chatterjee NS, Ninan G, Mathew S. Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (Epinephelus malabaricus) using response surface methodology and its characterization. J Food Sci Technol 2017;54:488-496.

66. Lecchi P, Olson M, Brancia FL. The role of esterification on detection of protonated and deprotonated peptide ions in matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS). J Am Soc Mass Spectrom 2005;16:1269-1274.

67. Pataridis S, Eckhardt A, Mikulíková K, Sedláková P, Miksík I. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. J Sep Sci 2008;31:3483-3488.

68. Zhang G, Sun A, Li W, Liu T, Su Z. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type. J Chromatogr A 2006;1114:274-277.

69. Sun Pan B, En Chen HOA, Sung WC. Molecular and thermal characteristics of acid-soluble collagen from orbicular batfish: Effects of deep-sea water culturing. Int. J. Food Prop 2018;21:1080–1090.

70. Chen J, Li L, Yi R, Xu N, Gao R, Hong, B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (Oreochromis niloticus). Lwt-Food Sci. Technol 2016;66:453–459.

71. Abdollahi M, Rezaei M, Jafarpour A, Undeland I. Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (Hypophthalmichthys molitrix), a biorefinery approach. Food Chem 2018;242:568-578.

72. Kezwoń A, Chromińska I, Frączyk T, Wojciechowski K. Effect of enzymatic hydrolysis on surface activity and surface rheology of type I collagen. Colloids Surf B Biointerfaces 2016;137:60-69.

73. Wang J, Luo D, Liang M, Zhang T, Yin X, Zhang Y, Yang X, Liu W. Spectrum-Effect Relationships between High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fingerprints and the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Collagen Peptides. Molecules 2018;23:3257.

74. Wang L, Jiang Y, Wang X, Zhou J, Cui H, Xu W, He Y, Ma H, Gao R. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. J. Funct. Foods 2018;44:112–117.

75. Ramadass SK, Perumal S, Gopinath A, Nisal A, Subramanian S, Madhan B. Sol-gel assisted fabrication of collagen hydrolysate composite scaffold: a novel therapeutic alternative to the traditional collagen scaffold. ACS Appl Mater Interfaces 2014;6:15015-15025.

76. Sibilla S, Godfrey M, Brewer S, Budh-Raja A, Genovese L. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific background and clinical studies. Open Nutraceuticals J 2015;8:29–42.

77. Denis A, Brambati N, Dessauvages B, Guedj S, Ridoux C, Meffre N, Autier C. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. Food Hydrocoll 2008;22:989–994.

78. Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocoll 2011;25:1813–1827.

79. Guo L, Harnedy PA, Zhang L, Li B, Zhang Z, Hou H, Zhao X, FitzGerald RJ. In vitro assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion. J Sci Food Agric 2015;95:1514-1520.

80. Pal GK, Suresh PV. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. Innov. Food Sci. Emerg. Technol 2016;37:201–215.

81. Pei X, Yang R, Zhang Z, Gao L, Wang J, Xu Y, Zhao M, Han X, Liu Z, Li Y. Marine collagen peptide isolated from Chum Salmon (Oncorhynchus keta) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice. Food Chem 2010;118:333–340.

82. Wang J, Pei X, Liu H, Zhou D. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (Misgurnus anguillicaudatus). Int J Biol Macromol 2018;106:544-550.

83. León-López A, Fuentes-Jiménez L, Hernández-Fuentes AD, Campos-Montiel RG, Aguirre-Álvarez G. Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. Int. J. Mol. Sci 2019;20:3931.

84. Mendis E, Rajapakse N, Byun HG, Kim SK. Investigation of jumbo squid (Dosidicus gigas) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sci 2005;77:2166–2178.

85. Coppola D, Oliviero M, Vitale GA, Lauritano C, D'Ambra I, Iannace S, de Pascale D. Marine Collagen from Alternative and Sustainable Sources: Extraction, Processing and Applications. Mar Drugs 2020;18:214.

86. Kumar V, Taylor N, Jalan A, Hwang L, Wang B, Hartgerink J. Ananostructured synthetic collagen mimic for hemostasis. Biomacromol 2014;15:1484-1490.

87. Silva TH, Moreira-Silva J, Marques AL, Domingues A, Bayon Y, Reis RL. Marine origin collagens and its potential applications. Mar Drugs 2014;12:5881-5901.

88. Zhang Y, Olsen K, Grossi A, Otte J. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. Food Chem 2013;141:2343-2354.

89. Lima CA, Campos JF, Filho JL, Converti A, da Cunha MG, Porto AL. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by Penicillium aurantiogriseum URM 4622 collagenase. J Food Sci Technol 2015;52:4459-4466.

90. O'Sullivan SM, Lafarga T, Hayes M, O'Brien NM. Bioactivity of bovine lung hydrolysates prepared using papain, pepsin, and Alcalase. J. Food Biochem 2017;41:e12406.

91. Fu Y, Young JF, Løkke MM, Lametsch R, Aluko E, Therkildsen M. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on in silico and in vitro protein digestions. J. Funct. Foods 2016;24:196–206.

92. Choi D, Min SG, Jo YJ. Functionality of porcine skin hydrolysates produced by hydrothermal processing for liposomal delivery system. J. Food Biochem 2018;42:e12464.

93. O'Keeffe MB, Norris R, Alashi MA, Aluko RE, FitzGerald RJ. Peptide identification in a porcine gelatin prolyl endoproteinase hydrolysate with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and hypotensive activity. J. Funct. Foods 2017;34:77–88.

94. Sanchez A, Blanco M, Correa B, Perez-Martin RI, Sotelo CG. Effect of Fish Collagen Hydrolysates on Type I Collagen mRNA Levels of Human Dermal Fibroblast Culture. Mar Drugs 2018;16:144.

95. Chen J, Li L, Yi R, Gao R, He J. Release kinetics of Tilapia scale collagen I peptides duringtryptic hydrolysis. Food Hydrocoll 2018;77:931–936.

96. Sabeena Farvin KH, Andersen LL, Otte J, Nielsen HH, Jessen F, Jacobsen C. Antioxidant activity of cod (Gadus morhua) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. Food Chem 2016;204:409-419.

97. Liu C, Ma X, Che S, Wang C, Li B. The effect of hydrolysis with neutrase on molecular weight, functional properties, and antioxidant activities of Alaska pollock protein isolate. J. Ocean. Univ. China 2018;17:1423–1431.

98. Tao J, Zhao YQ, Chi CF, Wang B. Bioactive Peptides from Cartilage Protein Hydrolysate of Spotless Smoothhound and Their Antioxidant Activity In Vitro. Mar Drugs 2018;16:100.

99. Saiga A, Iwai K, Hayakawa T, Takahata Y, Kitamura S, Nishimura T, Morimatsu F. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. J Agric Food Chem 2008;56:9586-9591.

100. Zhao Y, Wang Z, Zhang J, Su T. Extraction and characterization ofcollagen hydrolysates from the skin of Rana chensinensis. 3 Biotech 2018;8:181.

101. Dhakal D, Koomsap P, Lamichhane A, Sadiq MB, Anal AK. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. Food Biosci 2018;23:23–30.

102. Soladoye OP, Saldo J, Peiro L, Rovira A, Mor-Mur M. Antioxidant and angiotensin 1 converting enzyme inhibitory functions from chicken collagen hydrolysates. J. Nutr. Food Sci 2015;5:1–9.

103. Senaratne LS, Park PJ, Kim SK. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (Lagocephalus gloveri) skin. Bioresour Technol 2006;97:191-197.

104. Miller AT, Karmas E, Lu MF. Age-related-changes in the collagen of bovine corium—studies on extractability, solubility and molecular-size distribution. J. Food Sci 1983;48:681–685.

105. Barzideh Z, Latiff A, Gan CY, Benjakul S, Karim A. Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (Chrysaora sp.) Int. J. Food Sci. Technol 2014;49:1490–1499.

106. Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. Food Chem 2000;68:277–281.

107. Skierka E, Sadowska M, Karwowska A. Optimization of condition for demineralization baltic cod (Gadus morhua) backbone. Food Chem 2007;105:215–218.

108. Skierka E, Sadowska M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of baltic cod (Gadus morhua). Food Chem 2007;105:1302–1306.

109. Cao H, Xu SY. Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. Food Chem 2008;108:439-445.

110. Lin YK, Liu DC. Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. Food Chem 2006;94:621–625.

111. Xhauflaire-Uhoda E, Fontaine K, Piérard GE. Kinetics of moisturizing and firming effects of cosmetic formulations. Int J Cosmet Sci 2008;30:131-138.

112. Pallela R, Venkatesan J, Bhatnagar I, Shim Y, Kim S. Applications of marine collagen-based scaffolds in bone tissue engineering. U: Kim SK, ur. Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications. CRC Press;

113. Kim SK, Ngo DH, Vo TS, Ryu B. Industry perspectives of marine-derived proteins as biomaterials. U: Kim SK, ur. Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications. CRC Press; 2013, str.737–746.

114. Swatschek D, Schatton W, Müller W, Kreuter J. Microparticles derived from marine sponge collagen (SCMPs): preparation, characterization and suitability for dermal delivery of all-trans retinol. Eur J Pharm Biopharm 2002;54:125-133.

115. Boran G, Regenstein JM. Fish gelatin. Adv Food Nutr Res 2010;60:119-143.

116. Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. Peptides 2012;33:178–185.

117. Wang W, Chen M, Wu J, Wang S. Hypothermia protection effect of antifreeze peptides from pigskin collagen on freeze-dried Streptococcus thermophiles and its possible action mechanism. Lwt-Food Sci. Technol 2015;63:878–885.

118. Pei Y, Yang J, Liu P, Xu M, Zhang X, Zhang L. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. Carbohydr Polym 2013;92:1752-1760.

119. Ficai A, Albu MG, Birsan M, Sonmez M, Ficai D, Trandafir V, Andronescu E. Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. J. Mol. Struct 2013;1037:154–159.

120. Ouyang QQ, Hu Z, Lin ZP, Quan WY, Deng YF, Li SD, Li PW, Chen Y. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing. Int J Biol Macromol 2018;112:1191-1198.

121. Barati M, Jabbari M, Navekar R, Farahmand F, Zeinalian R, Salehi-Sahlabadi A, Abbaszadeh N, Mokari-Yamchi A, Davoodi SH. Collagen supplementation for skin health: A mechanistic systematic review. J Cosmet Dermatol 2020;19:2820-2829.

122. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNAtranslation and stability by microRNAs. Annu Rev Biochem 2010;79:351-379.

123. Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, et al. Collagen-derived dipeptide,proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation andhyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. JDermatol 2010; 37:330-338.

124. Madsen DH, Leonard D, Masedunskas A, et al. M2-like macrophagesareresponsible for collagen degradation through a mannosereceptor-mediated pathway. J Cell Biol 2013;202:951-966.

125. Madsen DH, Bugge TH. Imaging collagen degradation in vivo highlightsa key role for M2-polarized macrophages in extracellular matrixdegradation. Oncoimmunology 2013;2:e27127.

126. Borumand M, Sibilla S. Daily consumption of the collagen supplement Pure Gold Collagen® reduces visible signs of aging. Clin Interv Aging 2014;9:1747-1758.

127. Richelle M, Sabatier M, Steiling H, Williamson G. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. BrJ Nutr 2006;96:227–238.

128. Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. J Agric Food Chem 2007;55:1532-1535.

129. Yazaki M, Ito Y, Yamada M, Goulas S, Teramoto S, Nakaya MA, Ohno S, Yamaguchi K. Oral Ingestion of Collagen Hydrolysate Leads to the Transportation of Highly Concentrated Gly-Pro-Hyp and Its Hydrolyzed Form of Pro-Hyp into the Bloodstream and Skin. J Agric Food Chem 2017;65:2315-2322.

130. Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P, Regenstein JM. Collagen and gelatin. Annu Rev Food Sci Technol 2015;6:527-557.

131. Zague V, do Amaral JB, Rezende Teixeira P, de Oliveira Niero EL, Lauand C, Machado-Santelli GM. Collagen peptides modulate the metabolism of extracellular matrix by human dermal fibroblasts derived from sun-protected and sun-exposed body sites. Cell Biol Int 2018;42:95-104.

132. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of (14) C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). J Nutr 1999;129:1891-1895.

133. Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. J Agric Food Chem 2010;58:835-841.

134. Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y, Ohtsuki K. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. J Agric Food Chem 2005;53:6531-6536.

135. Skov K, Oxfeldt M, Thøgersen R, Hansen M, Bertram HC. Enzymatic Hydrolysis of a Collagen Hydrolysate Enhances Postprandial Absorption Rate-A Randomized Controlled Trial. Nutrients 2019;11:1064.

136. Yamamoto S, Hayasaka F, Deguchi K, Okudera T, Furusawa T, Sakai Y. Absorption and plasma kinetics of collagen tripeptide after peroral or intraperitoneal administration in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2015;79:2026-2033.

137. Vollmer DL, West VA, Lephart ED. Enhancing Skin Health: By Oral Administration of Natural Compounds and Minerals with Implications to the Dermal Microbiome. Int J Mol Sci 2018;19:3059.

138. Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, Taira T, Park EY, Nakamura Y, Sato K. Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. J Agric Food Chem 2009;57:444-449.

139. Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, Tajima S. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. J Dermatol 2010;37:330-338.

140. Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y, Ueda H, Watanabe T, Araya T, Irie S, Takehana K. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. J Nutr Sci Vitaminol 2006;52:211-215.

141. Tanaka M, Koyama Y, Nomura Y. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. Biosci Biotechnol Biochem 2009;73:930-932.

142. Zague V, de Freitas V, da Costa Rosa M, de Castro GÁ, Jaeger RG, Machado-Santelli GM. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. J Med Food 2011;14:618-624.

143. Okawa T, Yamaguchi Y, Takada S, Sakai Y, Numata N, Nakamura F, Nagashima Y, Ikezawa Z, Aihara M. Oral administration of collagen tripeptide improves dryness and pruritus in the acetone-induced dry skin model. J Dermatol Sci 2012;66:136-143.

144. Song H, Meng M, Cheng X, Li B, Wang C. The effect of collagen hydrolysates from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) skin on UV-induced photoaging in mice: molecular weight affects skin repair. Food Funct 2017;8:1538-1546.

145. Chen Q, Hou H, Wang S, Zhao X, Li B. Effects of early enteral nutrition supplemented with collagen peptides on post-burn inflammatory responses in a mouse model. Food Funct 2017;8:1933-1941.

146. Song H, Zhang L, Luo Y, Zhang S, Li B. Effects of collagen peptides intake on skin ageing and platelet release in chronologically aged mice revealed by cytokine array analysis. J Cell Mol Med 2018;22:277-288.

147. Song H, Zhang S, Zhang L, Li B. Effect of Orally Administered Collagen Peptides from Bovine Bone on Skin Aging in Chronologically Aged Mice. Nutrients 2017;9:1209.

148. Matsumoto H, Ohara H, Itoh K, Nakamura Y, Takahashi S. Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. ITE Lett 2006;7:386–390.

149. Schwartz SR, Park J. Ingestions of BioCell Collagen (R), a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract; enhanced blood microcirculation and reduced facial aging signs. Clin Intervent Aging 2012;7:267–273.

150. Proksch E, Schunck M, Zague V, Segger D, Degwart J, Oesser S. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. Skin Pharmacol Physiol 2014;27:113–119.

151. Borumand M, Sibilla S. Effects of a nutritional supplement containing collagen peptides on skin elasticity, hydration and wrinkles. J Medical Nutrition Nutraceuticals 2015;4:47–53.

152. Asserin J, Lati E, Shioya T, Prawitt J. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. J Cosmet Dermatol 2015;14:291-301.

153. Genovese L, Corbo A, Sibilla S. An Insight into the Changes in Skin Texture and Properties following Dietary Intervention with a Nutricosmeceutical Containing a Blend of Collagen Bioactive Peptides and Antioxidants. Skin Pharmacol Physiol 2017;30:146-158.

154. Inoue N, Sugihara F, Wang X. Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhance facial skin moisture and elasticity and reduce facial ageing signs in a randomised double-blind placebo-controlled clinical study. J Sci Food Agric 2016;96:4077-4081.

155. Sugihara F, Inoue N. Clinical effects of collagen hydrolysates ingestion on UV-induced pigmented spots of human skin: A preliminary study. Health Sci 2012;28:153–156.

156. Ito N, Seki S, Ueda F. Effects of Composite Supplement Containing Collagen Peptide and Ornithine on Skin Conditions and Plasma IGF-1 Levels-A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Mar Drugs 2018;16:482.

157. Petersen Vitello Kalil CL, Campos V, Cignachi S, Favaro Izidoro J, Prieto Herman Reinehr C, Chaves C. Evaluation of cutaneous rejuvenation associated with the use of ortho-silicic acid stabilized by hydrolyzed marine collagen. J Cosmet Dermatol 2018;17:814-820.

158. Campos PMBG, Melo MO, Calixto LS, Fossa MM. An oral supplementation based on hydrolyzed collagen and vitamins improves skin elasticity and dermis echogenicity: A clinical placebo-controlled study. Clin Pharmacol Biopharm 2015;4(1000142)

159. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280:53-60.

160. Kim DU, Chung HC, Choi J, Sakai Y, Lee BY. Oral Intake of Low-Molecular-Weight Collagen Peptide Improves Hydration, Elasticity, and Wrinkling in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Nutrients 2018;10:826.

161. Czajka A, Kania EM, Genovese L, Corbo A, Merone G, Luci C, Sibilla S. Daily oral supplementation with collagen peptides combined with vitamins and other bioactive compounds improves skin elasticity and has a beneficial effect on joint and general wellbeing. Nutr Res 2018;57:97-108.

162. Hakuta A, Yamaguchi Y, Okawa T, Yamamoto S, Sakai Y, Aihara M. Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2017;88:357-364.

163. Hexsel D, Zague V, Schunck M, Siega C, Camozzato FO, Oesser S. Oral supplementation with specific bioactive collagen peptides improves nail growth and reduces symptoms of brittle nails. J Cosmet Dermatol 2017;16:520-526.

164. Nomoto T, Iizaka S. Effect of an Oral Nutrition Supplement Containing Collagen Peptides on Stratum Corneum Hydration and Skin Elasticity in Hospitalized

Older Adults: A Multicenter Open-label Randomized Controlled Study. Adv Skin Wound Care 2020;33:186-191.

165. Choi SY, Kim WG, Ko EJ, Lee YH, Kim BG, Shin HJ, Choi YS, Ahn JY, Kim BJ, Lee HJ. Effect of high advanced-collagen tripeptide on wound healing and skin recovery after fractional photothermolysis treatment. Clin Exp Dermatol 2014;39:874-880.

166. Kroes R, Renwick AG, Feron V, Galli CL, Gibney M, Greim H, Guy RH, Lhuguenot JC, van de Sandt JJ. Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients. Food Chem Toxicol 2007;45:2533-2562.

167. Kruger CL, Mann SW. Safety evaluation of functional ingredients. Food Chem Toxicol 2003;41:793-805.

168. López-Morales CA, Vázquez-Leyva S, Vallejo-Castillo L, et al. Determination of Peptide Profile Consistency and Safety of Collagen Hydrolysates as Quality - Attributes. J Food Sci 2019;84:430-439.

169. Muizzuddin N, Benjamin R. Beauty from within: Oral administration of a sulfur-containing supplement methylsulfonylmethane improves signs of skin ageing. Int J Vitam Nutr Res 2020;21:1-10.

170. Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T. A Review of the Role of Green Tea (Camellia sinensis) in Antiphotoaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. Nutrients 2019;11:474.

171. Puizina-Ivić N. Skin aging. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat 2008;17:47-54.

172. Pyo IS, Yun S, Yoon YE, Choi JW, Lee SJ. Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. Molecules 2020;25:4649.

173. Lephart ED. Resveratrol, 4' Acetoxy Resveratrol, R-equol, Racemic Equol or S-equol as Cosmeceuticals to Improve Dermal Health. Int J Mol Sci 2017;18:1193.

174. Ferreira MS, Resende DISP, Lobo JMS, Sousa E, Almeida IF. Marine Ingredients for Sensitive Skin: Market Overview. Mar Drugs 2021;19:464.

175. Choi FD, Sung CT, Juhasz ML, Mesinkovsk NA. Oral Collagen Supplementation: A Systematic Review of Dermatological Applications. J Drugs Dermatol 2019;18:9-16.

176. de Miranda RB, Weimer P, Rossi RC. Effects of hydrolyzed collagen supplementation on skin aging: a systematic review and meta-analysis. Int J Dermatol 2021;60:1449-1461.

8. POPIS KRATICA

BM – bazalna membrana

ECM – ekstracelularni matriks

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

GAG – glukozaminoglikani

GI – gastrointestinalni

Gly – glicin

HC – hidrolizirani kolagen

Hyp – hidroksiprolin

IGF-1 – inzulinu sličan faktor rasta - 1

MAPK – protein kinaze aktivirane mitogenom

MMP – matriksne metaloproteaze

Pro – prolin

PU – preporučeni unos

PG – proteoglikani

ROS – reaktivni kisikovi spojevi

TEWL – transepidermalni gubitak vode

TGF-β – transformirajući faktor rasta - β

TIMP – tkivni inhibitori metaloproteinaza