

# Učinak oralno primijenjenoga kolagena na znakove starenja kože

---

**Tomić, Martina**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2023**

*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:163:276479>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI  
FAKULTET

Martina Tomić

UČINAK ORALNO PRIMIJENJENOGA  
KOLAGENA NA ZNAKOVE STARENJA  
KOŽE

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI  
FAKULTET

Martina Tomić

UČINAK ORALNO PRIMIJENJENOGA  
KOLAGENA NA ZNAKOVE STARENJA  
KOŽE

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

Poslijediplomski specijalistički studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

Specijalistički rad obranjen je dana 7.9.2023. godine na Zavodu za farmakognoziju pred Povjerenstvom za obranu završnog specijalističkog rada u sastavu:

1. prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

2. izv. prof. dr. sc. Biljana Blažeković

3. prim. dr. sc. Ines Sjerobabski Masnec

Rad ima 53 lista.

## PREDGOVOR

Ovaj je specijalistički rad prijavljen na Farmaceutsko–biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta IP-2018-01-6504 koji je financirala Hrvatska zaklada za znanost.

Zahvaljujem svojoj mentorici na stručnoj pomoći prilikom izrade ovog specijalističkog rada. Ujedno sam i izrazito ponosna što mi je prihvatila mentorstvo.

## SAŽETAK

### Cilj istraživanja

Starenjem dolazi do strukturnih promjena kože koje utječu na izgled i fiziološke funkcije kože. Dolazi do dezorganizacije kolagenih vlakana te razgradnje i smanjene proizvodnje kolagena, najvažnije komponente dermisa. Gubitku kolagena pridonose okolišni čimbenici (UV zračenje) i životni stil (nedovoljna prehrana, pušenje, alkohol i manjak sna). Da bismo usporili starenje kože možemo djelovati na kolagen oralnim unosom kolagenih peptida. Oni se kao oralni dodatak prehrani koriste za prevenciju starenja kože jer povećavaju sadržaj kolagena i hijaluronske kiseline u dermisu. Na tržištu su dostupni oralni pripravci kolagena koji se razlikuju po veličini, izvoru te količini kolagenih peptida. Cilj ovog specijalističkog rada je napraviti sveobuhvatan pregled studija u kojima je ispitan učinak oralnih kolagenih pripravaka na starenje kože kako bi se stekao uvid u znanstvena saznanja vezana za njihovu učinkovitost i sigurnost primjene.

### Materijal i metode

Za potrebe pisanja specijalističkog rada pretražene su elektroničke baze podataka Pubmed, ACS Journal, National Center for Biotechnology Information i Google Scholar. Radovi su obrađeni neovisno o datumu njihove objave ukoliko su odgovarali odabranim kriterijima. To su učinak na hidrataciju i elastičnost kože, bore, morfološku strukturu kože te sintezu kolagena i elastina.

### Rezultati

Oralno primijenjeni kolageni peptidi bili su lako probavljivi, dobro su se apsorbirali te su dolazili do sistemske cirkulacije otkuda su dostupni za pohranu u koži. U kliničkim studijama na ljudima oralni unos kolagenih peptida smanjio je transepidermalni gubitak vode, broj kožnih pora te dubinu i područje bora. Povećani su elastičnost kože, vlažnost i gustoća, sadržaj elastina i fibrilina te prosječni rast noktiju. Kako bi se ostvarili navedeni rezultati potrebni dnevni unos koji su ispitanici uzimali je 10 g peptida prosječne molekulske mase 3-6 kDa tijekom najmanje 8 tjedana.

## Zaključak

Oralnim unosom kolagenih peptida kod ljudi dolazi do smanjenja znakova kronološkog i ekstrinzičnog starenja kože. Učinak je ovisan o izvoru, dozi, trajanju primjene, veličini molekule i kemijskom sastavu kolagenih peptida.

## SUMMARY

### Objectives

Aging brings structural changes in skin that affect the appearance and physiological function of the skin. Collagen fibers, the most important component of the dermis, become degraded and disorganized, while collagen production reduces. Environmental factors, such as-UV radiation, as well as lifestyle factors such as insufficient nutrition, smoking, alcohol and lack of sleep, contribute to collagen loss. In order to reduce skin aging and collagen loss, collagen peptides can be orally ingested. They are used as an oral dietary supplements to prevent skin aging because they increase content of collagen and hyaluronic acid in the dermis. Oral preparations of collagen available on the market differ in the size, the source and the amount of collagen peptides. The aim of this postgraduate thesis is to make a comprehensive overview of studies examining the effect of oral collagen preparations on skin aging in order to gain insight into scientific knowledge related to their effectiveness and safety of application.

### Material and Methods

For the purposes of writing this thesis, the electronic databases Pubmed, ACS Journal, National Center for Biotechnology Information and Google Scholar were searched. The papers have been processed regardless of the date of their publication if they corresponded to the selected criteria. Those are the effect on hydration and elasticity of the skin, wrinkles, morphological structure of the skin and synthesis of collagen and elastin.



## Results

Collagen peptides are easily digestible and absorbed to the circulatory system from where they are available to store in the skin. In clinical studies in humans, oral intake of collagen peptides has reduced transepidermal water loss, the number of skin pores, and the depth and area of wrinkles. Skin elasticity, humidity and density have increased, as well as elastin and fibrilin content and average nail growth. These effects can be achieved by the oral ingestion of dietary supplements containing collagen peptides. In order for these changes to appear, subjects were taking 10 g collagen peptides of average molecular weight of 3-6 kDa daily for a minimum of 8 weeks.

## Conclusion

Oral intake of collagen peptides in human reduces the signs of chronological and extrinsic skin aging. The effect depends on source, dosage, duration of application, size and chemical composition of collagen peptides.

# Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	2
1.1. KOŽA I PROCES STARENJA KOŽE .....	2
1.2. OSNOVNE ZNAČAJKE KOLAGENA.....	5
1.3. KOLAGENI HIDROLIZATI .....	7
1.4. ORALNI PRIPRAVCI KOLAGENA .....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJAL I METODE .....	11
3.1. PRETRAŽIVANJE BAZA PODATAKA .....	11
3.2. SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	11
3.2.1. Bioraspoloživost kolagenih hidrolizata.....	11
3.2.2. <i>In vitro</i> studije učinkovitosti .....	15
3.2.3. <i>In vivo</i> studije učinkovitosti .....	18
3.2.4. Kliničke studije .....	25
4. RASPRAVA .....	32
5. ZAKLJUČAK .....	38
6. LITERATURA .....	39
7. ŽIVOTOPIS .....	45

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. KOŽA I PROCES STARENJA KOŽE

Koža je najveći organ ljudskog tijela, djeluje kao barijera te štiti tijelo od vanjskih oštećenja. Sastoji se od 3 sloja, epidermisa, dermisa i hipodermisa. Vezivno tkivo dermisa sadrži proteine kolagen i elastin, važne komponente za održavanje mladog izgleda kože. Kolagena vlakna pridonose većini mase kože i najvećem dijelu njene vlačne čvrstoće, dok vlakna elastina osiguravaju elastičnost i otpornost (1). Kolagen čini 30 % proteina ljudskog tijela te je glavni protein vezivnog tkiva. Zajedno sa elastinom, hijaluronskom kiselinom (engl. hyaluronic acid, HA) i drugim glikozaminoglikanima (engl. glycosaminoglycans, GAG) čini ekstracelularni matriks koji omogućuje funkcioniranje i stabilizaciju stanica. Proteini ekstracelularnog matriksa se razgrađuju tokom starenja i nakupljaju se proizvodi glikozilacije te se time pogoršava struktura kože. Stara koža je karakterizirana borama, povećanom opuštenosti, smeđim pjegama, zadebljanjima i povećanom suhoćom. Starenje kože dodatno potiču oksidativni stres i reaktivni kisikovi spojevi uzrokovani UV zračenjem (2). UV zračenje potiče i aktivaciju matriksnih metaloproteinaza (engl. matrix metalloproteinases, MMP), enzima koji razgrađuju kolagen i smanjuju njegovu sintezu (3). Postepeno se stanjuju svi slojevi kože te se smanjuju sadržaj lipida i vode u koži. S godinama povezane promjene u sastavu aminokiselina smanjuju količinu prirodnih faktora vlaženja kože pa se time smanjuje i sposobnost kože da veže vodu. Smanjenje sadržaja dermalnog kolagena i elastina čini većinu smanjenja debljine kože. Permeabilna barijera kože postaje osjetljivija te je proces oporavka kože nakon ozljede usporeniji (1). Koža je jedini organ ljudskog tijela stalno izložen okolišu. Površinski sloj kože, epidermis, se sastoji većinom od keratinocita i melanocita. Srednji sloj, dermis, je gust i nepravilan sloj vezivnog tkiva koji obuhvaća većinu debljine kože. Sadrži strukturne proteine elastin i

kolagen, krvne žile, živčana vlakna, senzorne receptore te komponente koje vežu vodu, GAG-ove, od kojih je najčešća HA. Treći sloj je potkožno masno tkivo ili hipodermis.

Funkcije kože su zaštita od vanjskih štetnih čimbenika okoliša, regulacija temperature tijela, sprečavanje gubitka tekućine, elektrolita i proteina te osjetilna funkcija. Fiziološke promjene ostarjele kože uključuju promjene u biokemiji, permeabilnosti, vaskularizaciji i termoregulaciji. Promijenjen je odgovor na iritacije, imunološki odgovor, kapacitet obnavljanja, odgovor na ozljede, neurosenzorna percepcija te su prisutne promjene na razini genoma (1).

Starenje kože je kontrolirano genetičkim nasljeđem i okolišnim čimbenicima. Životni stil- pušenje, alkohol, stres, manjak sna i dermatološki poremećaji pridonose starenju kože. Kronični stres dovodi do disregulacije cirkadijanog kortizol/kortikosteron ritma pri čemu se višak glukokortikoida otpušta iz adrenalnog korteksa. To utječe na gotovo sva tkiva te ubrzava proces starenja. UV zračenje i stanični metabolizam proizvode slobodne radikale koji dovode do strukturnih promjena u kožnim stanicama. One su također jedan od pokazatelja starenja kože (4).

Debljina kože raste do 20-e godine života, a nakon toga se počinje progresivno stanjivati. Smanjuje se površina dodirivanja epidermisa i dermisa kao posljedica smanjenja sadržaja kolagena i elastinskih vlakana. Smanjenje površine epidermis-dermis doprinosi povećanju fragilnosti kože te također uzrokuje smanjenu izmjenu nutrijenata između dermalnog i epidermalnog sloja. Gubitak dermalnog kolagena i elastina čini većinu smanjenja debljine kože kod starijih osoba. Sadržaj vode i HA u koži se također smanjuje starenjem. Smanjuje se i broj melanocita što rezultira nejednakom pigmentacijom ostarjele kože (1). Dermis i hipodermis atrofiraju starenjem te se smanjuje sadržaj određenih GAG-ova i adipoznog tkiva u hipodermisu. Navedena smanjenja vode ka stvaranju bora. S druge strane, hipertrofija elastičnog tkiva vodi ka nakupljanju velikih količina elastičnog tkiva. Atrofija dermalnog kolagena koja je još više izražena ispod bora, zajedno sa abnormalnim elastozama u dermisu povećavaju veličinu i dubinu bora. Formiranje bora pojavljuje se istovremeno s brojnim modifikacijama u različitim strukturama kože te se one mogu međusobno pojačavati (5).

U epidermisu se smanjuje ekspresija filagrina, transglutaminaze I i dezmozoplakina te diferencijacija keratinocita. Promijenjen je proces ljuštenja kože, a vanjski dio epidermisa, rožnati sloj, je često zadebljao kao rezultat akumulacije korneocita (6). Elastin postaje kalcificiraniji, a elastinska vlakna razgrađena. Smanjen je promjer kolagenih vlakana te snopovi kolagenih vlakana postaju neorganiziraniji (1).

Izlaganjem UV zračenju povećava se aktivnost aktivator proteina-1 (engl. *activator protein-1*, AP-1). AP-1 aktivira gene MMP-ova koji potiču produkciju kolagenaza i želatinaza. UV zračenje aktivira receptore citokina i faktora rasta na površini stanica te već nekoliko sati nakon izlaganja UV zračenju dolazi do povećane proizvodnje MMP-ova. Ponavljano izlaganje UV zračenju kroz godine ili desetljeća utječe na regulaciju rada MMP-ova i uzrokuje značajno oštećenje matriksa kože. U fotooštećenoj koži je puno veća količina fragmenata kolagena nego u koži koja je bila zaštićena od sunca. Fotoostarjela koža za razliku od kronološki ostarjele kože ima jače izražene bore, veću suhoću kože i nepravilne pigmentacije (7). Također se pojavljuju i teleangiektazije, sitne proširene vene i premaligne lezije kao što su aktiničke keratoze (8).

Prirodni proces razgradnje kolagena tipa I putem enzima je u zdravoj mladoj koži vrlo spor jer je vrlo niska razina MMP-ova. Stoga je kolagen tipa I vrlo stabilan te mu treba otprilike 30 godina da prođe zamjenu. Starenjem MMP-ovi uzrokuju fragmentaciju dermalnog kolagenog matriksa i time oštećuju strukturni integritet dermisa. Nakupljeni kolageni fragmenti ne mogu biti popravljani niti ukorporirani u novonastala kolagena vlakna i zato uzrokuju greške u trodimenzionalnoj mreži kolagenskog matriksa. Na takav fragmentirani kolagen fibroblasti se ne mogu vezati. Time fibroblasti ne dobivaju mehaničku napetost od kolagena te im je narušena funkcija. Takvi fibroblasti proizvode manje količine kolagena, a veće količine kolagenaza. Ta neravnoteža potiče proces starenja te je to beskrajni štetni krug (9).

## 1.2. OSNOVNE ZNAČAJKE KOLAGENA

Kolagen je glavni strukturni protein različitih vezivnih tkiva te je rasprostranjen po cijelom tijelu. Nalazi se u vlaknastim tkivima kao što su tetive i ligamenti te u rožnici, hrskavici, kostima, krvnim žilama, crijevima i međupršljenskim diskovima. Glavni je netopljivi, vlaknasti protein ekstracelularnog matriksa kože zajedno s elastinom i HA (4).

Molekulu kolagena tvore tri polipeptida nazvana alfa lanci. Ti lanci mogu biti identični ili mogu biti dva ili više različitih lanaca. Oni čine trostruku uzvojnica nazvanu prokolagen. Kolagen većinom sintetiziraju fibroblasti, stanice vezivnog tkiva u dermisu koje su odgovorne za stvaranje i organiziranje kolagenog matriksa. Također različite epitelne stanice tvore različite tipove kolagena. Na svakoj trećoj poziciji polipeptidnog lanca nalazi se glicin (Gly), što daje ponovljenu strukturu Gly-X-Y. Alfa lanci su sastavljeni oko centralne osovine tako da je Gly uvijek pozicioniran u centru trostruke uzvojnice. X i Y pozicije često zauzimaju prolin (Pro) i hidroksiprolin (Hyp). Sadržaj 4-Hyp-a je nužan za stvaranje intramolekulskih vodikovih veza i doprinosi stabilnosti trostruke uzvojnice (10). Trostruka uzvojnica čini kolagen rezistentnim prema većini proteaza kao što su pepsin, tripsin i kimotripsin. Međutim, može biti razgrađena matriks metaloproteinazama. Duljina trostruke uzvojnice ovisi o tipu kolagena, a identificirano je 28 tipova kolagena. S obzirom na strukturu, obitelj kolagena čine kolageni koji čine vlakna, s vlaknima povezani kolageni, kolageni koji stvaraju mreže, vlakna za sidrenje, transmembranski kolageni, kolageni bazalnih membrana i ostali sa jedinstvenim funkcijama (4).

Različite vrste kolagena karakterizira izrazita složenost i raznolikost u njihovoj strukturi, njihove varijante spajanja, prisutnost dodatnih, ne-helikalnih domena, njihov sastav i funkcija. Kolagen u koži se uglavnom sastoji od kolagena tipa I i tipa III. Proizvodnja kolagena i omjer kolagena tipa I prema tipu III smanjuju se postupno s godinama. Kolagen tipa I je glavni i najzastupljeniji protein kože te koži daje potporu i čvrstoću. To je najobilniji tip kolagena. Tvori 90 % organske mase kosti i glavni je kolagen ligamenata, tetiva, rožnice te mnogih vezivnih tkiva. Obično se sastoji od dva identična  $\alpha 1$  lanca i jednog  $\alpha 2$  lanca. Kolagen tipa I čini

80 %, a tip III 15 % dermalnog kolagena u koži mladih ljudi. Kolagen tipa III je drugi vlaknasti kolagen prisutan u koži te je najviše zastupljen u tkivu fetusa (10).

Kolagena vlakna tvore gustu mrežu u dermisu i time daju strukturalni integritet koži. Glavna funkcija mreže kolagena je pružiti strukturnu podršku epidermisu. Ta je mreža organizirana i održavana pomoću dinamičkih mehaničkih tenzija koje osiguravaju fibroblasti. Fibroblasti su osjetljivi na kemijske i fizičke stimulacije koje mogu potaknuti njihovu proliferaciju i aktivaciju. Aktivacijom fibroblasta se povećava produkcija kolagena (4). Napetost koju osiguravaju fibroblasti ima ključnu ulogu u održavanju kolagenskog matriksa. Vezanjem fibroblasta na kolagen dolazi do rastezanja koje održava ravnotežu između sinteze kolagena i sinteze enzima koji razgrađuju kolagen, kolagenaza. Povećane mehaničke tenzije razvlače fibroblaste koji onda povećavaju proizvodnju kolagena a smanjuju proizvodnju kolagenaza (9).

Biosinteza kolagena je regulirana transformirajućim faktorima rasta-beta (engl. *transforming growth factor*- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) kroz Smad signalizirajući put. TGF- $\beta$  su obitelj citokina koji imaju sposobnost stimulatornog učinka na sintezu kolagena, akumulaciju ekstracelularnog matriksa i proliferaciju fibroblasta kroz stanični Smad signalizirajući put. Smad su serija proteina koji obavljaju funkcije preko receptora serin/treonin kinaze u obitelji TGF- $\beta$ , čime se signali šire u jezgru. TGF- $\beta$ /Smad signalizirajući put direktno potiče mRNA ekspresiju tip I prokolagen gena (COL1A2) i tip III prokolagen gena (COL3A1) (11).

U interakciji sa kolagenima posreduju specifični receptori kao što su integrini, glikoproteini i proteoglikanski receptori. Signalizacijom putem tih receptora dolazi do adhezije, diferencijacije, rasta, stanične reaktivnosti te preživljavanja stanica. Kolagen doprinosi isporuci faktora rasta čime sudjeluje u razvoju organa te zarastanju i obnovi tkiva. Također je zaslužan za pohranu i otpuštanje staničnih medijatora kao što su faktori rasta (10).

U prošlosti su goveđi i svinjski kolagen bili najdostupniji izvor kolagena. Zadnjih nekoliko desetljeća korištenje kolagena iz tih izvora je ograničeno zbog različitih režima prehrane i vjerskih ograničenja. Korištenje govedeg kolagena postala je briga široke populacije za vrijeme govede spongioformne

encefalopatije, a svinjskog zbog svinjske gripe. S obzirom na to, morski organizmi su postali sve češći izvor kolagena jer nemaju ograničenja. Visoki sadržaj kolagena imaju koža i kosti riba i morskih pasa te otpad morskog ježinca, meduze i zvjezdače. Prehrambena vrijednost kolagena je niska jer je bogat neesencijalnim aminokiselinama (12).

Ljudski organizam ima sposobnost sinteze kolagena, koji je stalno potreban zbog rasta i zamjene istrošenih tkiva te zacjeljivanja i obnove ozlijeđenog tkiva. Kapacitet sinteze kolagena se smanjuje zbog procesa starenja, trajnog opterećenja organizma (fizička aktivnost) i autoimunih bolesti. U mladosti se gubitak kolagena brzo nadomješta, ali se s godinama sposobnost obnove kolagena smanjuje za 1,5 % godišnje (4). Također dolazi do oštećenja kolagena koje je uzrokovano razgradnjom MMP-ovima. Ti enzimi razgrađuju proteine matriksa, a otpuštaju ih epidermalni keratinociti i dermalni fibroblasti (13). Nakon razgradnje kolagena kolagenazama, razmotani lanac dalje razgrađuju matriks metaloproteinaze. Njihova razina u koži raste starenjem te kao odgovor na UV zračenje. S obzirom da UV zračenje potiče aktivnost MMP-ova, a smanjuje produkciju kolagena, fotostarenje zapravo predstavlja ubrzano kronološko starenje. U koži se također stvaraju prirodni inhibitori MMP-ova, tkivni inhibitori matriksnih metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*, TIMP-1), koji usporavaju razgradnju kolagena (9).

### 1.3. KOLAGENI HIDROLIZATI

Kolageni hidrolizati (engl. *collagen hydrolysates*, CH) se sastoje od malih peptida veličine 0,3-8 kDa. Termalnom hidrolizom i denaturacijom kolagena dobiva se prvi derivat, želatina, koja je veličine 100 kDa. Pri tome se djelomično razdvajaju lanci uništavanjem međusobnih poprečnih veza. Zatim slijedi ekstrakcija uporabom odgovarajućeg otapala, temperature, vremena i pH vrijednosti. To ima važan utjecaj na dužinu polipeptidnih lanaca, a tako i na funkcionalna svojstva želatine. Potom se želatina podvrgava enzimskoj hidrolizi pri čemu nastaju CH-ovi, odnosno kolageni peptidi (engl. *collagen peptides*, CP). Koriste se enzimi koji imaju aktivnost cijepanja, proteinaze.



Hidrolizirani kolagen je obogaćen specifičnim aminokiselinama Gly, Pro i Hyp. Distribucija molekulske mase, struktura i sastav, kao i posljedično funkcionalna svojstva, ovise o uvjetima obrade kao i o sirovini i posebnosti enzima koji se rabi.

Nakon oralne primjene, CP-ovi se hidroliziraju u gastrointestinalnom (engl. *gastrointestinal*, GI) traktu do di i tri peptida i slobodnih aminokiselina. Zatim se probavljaju u crijevima, prelaze crijevnu barijeru te ulaze u cirkulaciju. Tada su raspoloživi za metaboličke procese u ciljnim tkivima, a većinom dolaze u dermis gdje je dokazano da mogu ostati do 14 dana. U dermisu CH-ovi imaju dva mehanizma djelovanja. Slobodne aminokiseline se koriste za formiranje kolagenih i elastinskih vlakana, a kolageni oligopeptidi djeluju kao ligandi koji se vežu za receptore koji su na membranama fibroblasta i stimuliraju proizvodnju novog kolagena, elastina i HA.

Tri su mehanizma transporta peptida kroz crijeva. Dipeptidi i tripeptidi se prenose pomoću transportera PEPT1 koji omogućuje transport kroz stanicu. Makromolekule kao što su proteini se prenose kroz citosol, a peptidi se još mogu apsorbirati intracelularnim pasivnim transportom. Zbog različitih mehanizama crijevnog transporta molekula različite veličine, crijevna propustljivost je drugačija za čestice male molekulske mase od one za velike molekule (4).

Ukoliko se CP-ovi unose zajedno sa hranom, hrana može utjecati na apsorpciju peptida. PEPT1 ima određeni kapacitet transporta te prenosi i hranu. Stoga ako se hrana unosi zajedno sa peptidima, dolazi do kompeticije za transportere. Neke prehrabene aminokiseline i proteini mogu promijeniti ekspresiju transportera na način da povećaju kapacitet intestinalne apsorpcije transporterima i olakšaju apsorpciju peptida. Međutim flavini, polimerni katehini, negativno reguliraju ekspresiju PEPT1 te na taj način ograničavaju transport dipeptida. Ugljikohidrati povećavaju sintezu crijevnog tkiva time što omogućuju da se više peptida ugradi u crijevne stanice a manje se ispušta u cirkulaciju. Nasuprot tome, unosom vlakana se povećava sistemska dostupnost dipeptida i tripeptida. Osim hrane, na apsorpciju malih peptida također može utjecati zdravlje pojedinca tako što povećava ili smanjuje ekspresiju PEPT1 (14).

Najčešći dipeptid dobiven iz kolagena koji nalazimo u plazmi je Pro-Hyp. Taj dipeptid značajno povećava rast fibroblasta te stimulira staničnu proliferaciju više od drugih peptida (4). Pro-Hyp je jako otporan na hidrolizu i ne može se probaviti pomoću proteaza u ljudskoj krvi (15).

Svjetska zdravstvena organizacija i europska komisija za zaštitu potrošača su potvrdile da je hidrolizirani kolagen sigurna supstanca. Rijetko može doći do manjih nuspojava kao što su mučnina, nadutost ili dispepsija nakon oralne primjene CP-ova kod ljudi (4). Kolagen je molekula slabe imunogenosti, što smanjuje mogućnost odbacivanja nakon što je unesen u različite organizme (12). S obzirom na malu molekulsku masu, prednosti hidroliziranog naspram prirodnom kolagenu su visoka razgradivost te laka apsorpcija i distribucija po ljudskom tijelu (1).

#### 1.4. ORALNI PRIPRAVCI KOLAGENA

U Hrvatskoj dostupni pripravci CP-ova koji se mogu kupiti u ljekarnama većinom sadrže hidrolizirani morski kolagen u dnevnim dozama 5 g ili 10 g. Dnevnom unosom takvog pripravka unosi se 100 ili 200 mg/kg tjelesne težine za osobu koja ima 50 kg. U sastavu tih pripravaka nije navedena veličina hidrolizata. Na tržištu su dostupni oralni dodaci prehrani koji uz kolagen sadrže i HA, resveratrol, vitamine, minerale, koenzim Q10 i MSM. Ti sastojci povećavaju sintezu i apsorpciju kolagena u tijelu, djeluju kao hidratacijske tvari, antioksidansi te pridonose očuvanju zdrave kože, kose i noktiju. Na pripravku koji sadrži dnevnu dozu od 5 g CH-ova je tvrdnja da je nakon 8 tjedana svakodnevnog unosa pripravka manja vidljivost bora te je veća zategnutost kože. Na pripravku koji sadrži dnevnu dozu od 10 g CH-ova, tvrdnja je da se isti rezultati postižu nakon 6 tjedana svakodnevnog unosa.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Okolišnim čimbenicima, kronološkim starenjem, te načinom života uzrokovana sve veća razgradnja i manja proizvodnja kolagena u dermisu, dovode do starenja kože. Na tržištu prisutni razni pripravci koji preveniraju starenje kože, dovode njihove korisnike u pitanje što izabrati. Među tim pripravcima je i sve veći broj dodataka prehrani koji sadržavaju CH-ove, a koji se promoviraju kao sredstva koja smanjuju starenje kože te održavaju zdrav izgled kože. Cilj rada je napraviti sveobuhvatan pregled studija u kojima je ispitan učinak oralnih kolagenih pripravaka na starenje kože kako bi se stekao uvid u znanstvena saznanja vezana za njihovu učinkovitost i sigurnost primjene.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. PRETRAŽIVANJE BAZA PODATAKA

Pretraživanje literature obavljeno je elektroničkim putem, a pretražene su baze podataka Pubmed, ACS Journal, National Center for Biotechnology Information i Google Scholar. Ključne riječi za pronalazak znanstvenih studija na temu starenja kože i oralnih kolagenih dodataka prehrani bile su kolagen (engl. *collagen*), peptid kolagena (engl. *collagen peptide*), dodatak prehrani (engl. *supplement*), koža (engl. *skin*) i starenje kože (engl. *skin aging*). Radovi su obrađeni neovisno o datumu njihove objave ukoliko odgovaraju odabranim kriterijima. To su učinak na hidrataciju i elastičnost kože, bore, morfološku strukturu kože te sintezu kolagena i elastina. Na temelju proučavanih znanstvenih radova izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike.

#### 3.2. SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

##### 3.2.1. Bioraspoloživost kolagenih hidrolizata

U studiji na 6 mjeseci starim štakorima uspoređivana je bioraspoloživost Hyp i kolagena nakon oralnog unosa. Štakori su podijeljeni u 5 grupa, pri čemu je prva grupa dobivala oralno kolagen koji sadrži 10 % Hyp (4000 mg/kg), a druga grupa je dobivala Hyp (400 mg/kg). Te grupe su dobivale jednake količine Hyp. Treća grupa je dobivala Hyp intravenozno (i.v.) (400 mg/kg), četvrta grupa je dobivala fiziološku otopinu oralno te peta grupa fiziološku otopinu i.v.. Kolagen je dobiven iz kože nilske tilapije (*Oreochromis niloticus* L., Cichlidae). Nakon oralnog unosa kolagena, sadržaj Hyp je porastao i dosegnoo maksimum koncentracije nakon 2 sata. Zatim slijedi blagi pad koncentracije te je nakon 24 sata ostalo 14,7 % Hyp u plazmi. Nakon oralnog unosa samog Hyp, maksimum koncentracije je dosegnut prije i bio je viši, ali je i poluvrijeme eliminacije bilo kraće. Kod intravenozno unešenog Hyp poluvrijeme eliminacije je bilo najkraće. Nakon oralnog unosa kolagena svim se slobodnim i peptidno vezanim aminokiselinama povisila koncentracija. Više od 63,4 % aminokiselina je apsorbirano u obliku peptida. Apsorbirana količina aminokiselina je ovisila o njihovom sadržaju u kolagenu. Hyp je bio najbliži korelacijskoj krivulji koja je uspoređivala sadržaj aminokiselina u kolagenu sa sadržajem aminokiselina u plazmi nakon oralne ingestije.

Zbog toga se bioraspoloživost kolagena određivala prema bioraspoloživosti Hyp. Relativna i apsolutna bioraspoloživost kolagena su bile 57,8 % i 49,6 % što je niže od bioraspoloživosti životinjskih proteina (kazeina, proteina mlijeka, jaja, goveda, proteina sirutke) te je sličnije bioraspoloživosti proteina žitarica (pšenice, kukuruza, riže, zob). CP-ovi u plazmi su identificirani te podijeljeni u 3 frakcije prema njihovoj veličini (F1, F2, F3). F1 je sadržavala visoko molekularne peptide (>500 Da), F2 male peptide i F3 su bile slobodne aminokiseline. Poluživoti peptida Ala-Tyr, Gly-Tyr, Ala-Gln, Gly-Gln, N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, i Pyr-His-Pro-NH<sub>2</sub> u krvi su bili manji od 10 minuta. To potvrđuje činjenicu da su oligopeptidi nekad razgrađeni putem peptidaza u krvi. S druge strane, visoki postotak (63,4 %) CP-ova u plazmi 2 sata nakon oralnog unosa pokazuje da određeni peptidi imaju visoku rezistenciju prema razgradnji putem enzima u plazmi i GI traktu (16).

Bioraspoloživost CP-ova je ispitana i na ljudima. 5 zdravih muškaraca je oralno unosilo želatinske hidrolizate iz tri različita izvora, riblje ljuske, riblje kože i svinjske kože (0,385 g/kg). Korišten je želatinski hidrolizat tipa I. Prije unosa hidrolizata neznatne količine slobodnog Hyp su bile detektirane u plazmi muškaraca. Nakon oralnog unosa porasla je razina slobodnog Hyp kod svih te je maksimalna koncentracija postignuta nakon 1-2 sata od ingestije. Količina slobodnog Hyp je bila značajno viša nakon unosa hidrolizata iz riblje ljuske nego iz riblje kože 2 i 7 sati nakon ingestije. Iz svinjske kože je bilo više slobodnog Hyp nego iz riblje kože 2, 4 i 7 sati nakon unosa. Količina peptida koji sadrže Hyp je također prije početka ispitivanja bila prisutna u neznatnim količinama u plazmi, a nakon unosa hidrolizata maksimum koncentracije je dostignut nakon 2 sata. Najviša količina peptida koji sadrže Hyp u plazmi je bila nakon unosa hidrolizata iz riblje ljuske. Kod svih sudionika je razina peptida koji sadrže Hyp došla na početnu vrijednost 7 sati nakon oralne ingestije. U svim je skupinama Hyp u peptidima koji sadrže Hyp činio 20-30 % ukupnog Hyp. Ostatak je bio u obliku slobodne aminokiseline. Provedena je identifikacija niskomolekularnih (200-500 Da) i visokomolekularnih (>500 Da) peptida. U grupi koja je dobila hidrolizate iz riblje ljuske, Pro-Hyp je bio glavna komponenta te je činio 39 % svih peptida. U grupi riblje kože Pro-

Hyp je činio 42 % svih peptida te je u grupi svinjske kože Pro-Hyp činio 95 % svih peptida. U visokomolekularnoj frakciji peptida nije bilo peptida koji su sadržavali sekvencu kolagena (17).

U sljedećoj studiji su korišteni CP-ovi iz različitih izvora i različitog tipa kolagena. Korišten je želatinski hidrolizat iz svinjske kože i pilećih nogu koji su većinom sadržavali kolagen tipa I. Korišten je i želatinski hidrolizat iz pileće hrskavice gdje je većinu činio kolagen tipa II. U prvom su eksperimentu 5 zdravih volontera 21 do 39 godina oralno unosili želatinski hidrolizat iz svinjskog izvora, 9,3 g dnevno. Nakon ingestije je porasla razina slobodnog i peptidno vezanog Hyp-a te je maksimum koncentracije dosegnut nakon 30-60 minuta. Omjer peptidno vezanog naspram slobodnom Hyp je bio 1:3, slično kao i u prethodnoj studiji. U drugom eksperimentu je 7 zdravih volontera dobi 25 do 37 godina oralno unosilo pileći kolagen tipa I, 23 g dnevno ili tipa II, 11 g dnevno. Nakon oralne ingestije povisila se razina slobodnog i peptidno vezanog Hyp-a sa maksimumom koncentracije nakon 60 odnosno 120 minuta. Omjer peptidno vezanog prema slobodnom Hyp je opet bio 1:3. 12 sati nakon ingestije razina peptidno vezanog Hyp se smanjila na početnu vrijednost. Kolagen iz svinjskog izvora je sadržavao peptide veličine 1-2 kDa te samo neznatne količine manjih od 500 Da. Prije ispitivanja u serumu ispitanika pronađeni su visokomolekularni peptidi >5 kDa i slobodne aminokiseline. 1 sat nakon ingestije nije bilo razlike u frakciji visokomolekularnih peptida, a Hyp je bio prisutan u obliku niskomolekularnih peptida i slobodnih frakcija aminokiselina. Ispitanici koji su unosili tip I CH-ova su sadržavali Pro-Hyp kao glavni peptid te je ostalih peptida bilo svega par %. Ispitanici koji su dobili tip II CH-ova su u serumu imali 70 % Pro-Hyp te 19 % Pro-Hyp-Gly. Peptidi veći od Pro-Hyp-Gly nisu bili detektirani u nijednom slučaju iako su CH-ovi korišteni u studiji sadržavali samo neznatne količine CP-ova manjih od 500 Da. To dokazuje da su veliki CP-ovi iz želatinskih hidrolizata razgrađeni do di i tripeptida te slobodnih aminokiselina u probavnom sustavu i drugim organima. Struktura i količina peptida su ovisile o tipu i izvoru kolagena (15).

U studiji na štakorima uspoređivano je vrijeme koje se CP-ovi zadrže u plazmi i u koži nakon oralne ingestije. Wistar štakori su dobivali <sup>14</sup>C označeni CH te je mjerena radioaktivnost u različitim tkivima. Povećanje radioaktivnosti je brzo detektirano u plazmi, a doseglo je maksimalnu koncentraciju 6 sati nakon

primjene. Nakon toga se radioaktivnost smanjivala. U roku od 24 sata nakon početka eksperimenta više od 85% radioaktivnosti u plazmi je nestalo, a nakon 3 dana radioaktivnost je pala do razina blizu limita detekcije. Radioaktivnost u koži je najviše razine dosegula 12 sati nakon primjene  $^{14}\text{C}$  označenog CH-a te je, nasuprot plazmi,  $^{14}\text{C}$  aktivnost ostala relativno visoka 96 sati. 192 sata nakon, radioaktivnost je pala na 58% vršne vrijednosti. CP-ovi veličine 1-10 kDa su detektirani na seroznoj strani crijeva što pokazuje da CH-ovi mogu biti apsorbirani u visoko molekularnoj formi a ne samo u formi aminokiselina (18).

U još jednoj studiji na štakorima je ispitan učinak zdravstvenog stanja na apsorpciju CP-ova. Kod 40 tjedana starih štakora koji su imali hipertenziju, apsorpcija dipeptida je bila povećana u usporedbi sa 8 tjedana starim štakorima koji su također imali hipertenziju. Ekspresija intestinalnog PEPT1 transportera je bila značajno veća kod starijih štakora. Iako mehanizam povećane ekspresije intestinalnih transportera nije jasan, pretpostavlja se da kronična upala i hipertenzija kod starijih pojedinaca mogu biti uključeni u njihovu regulaciju (14).

U studiji u kojoj su proučavane koncentracije CH-ova u plazmi i koži nakon oralnog unosa CH-ova, korištene su dvije vrste CH-ova iz svinjske kože. Studija je provedena na ljudima i miševima. Korišten je CH koji je sadržavao veliku količinu tripeptida Gly-x-y (engl. *high tripeptide containing collagen hydrolysate*, HTC-col). Prosječna molekulska masa im je bila 1500-1800 Da. Drugom CH koji je korišten je prosječna molekulska masa bila 4500-5500 Da te je sadržavao malu količinu tripeptida (engl. *low tripeptide containing collagen hydrolysate*, LTC-col). Ispitnici, 4 muškaraca i 8 žena prosječne dobi 31 godine, je dnevno unosilo 300 mg/kg CH-ova. Ala-Hyp je postigao najveću maksimalnu koncentraciju te je bio u najvećoj količini prisutan u krvi nakon unosa oba CH-a. Gly-Pro-Hyp je postigao drugu po redu maksimalnu koncentraciju nakon unosa HTC-col. Količina Gly-Pro-Hyp detektiranog u plazmi nakon unosa HTC-col je bila 10 puta veća od početne, a nakon unosa LTC-col je bila 8 puta veća od početne. U studiji na miševima, miševi stari 5 tjedana su podijeljeni u 2 grupe. Prva je dobivala nisku dozu (900 mg/kg) HTC-col, a druga visoku (1800 mg/kg). Na kraju studije, sadržaj 17 proučavanih peptida u plazmi i koži miševa je bio povišen. To povišenje je bilo ovisno o dozi. Gly-Pro-Hyp je bio prisutan u najvećoj količini

dok je Ala-Hyp, koji je u ljudskoj krvi bio u najvećoj količini, kod miševa bio na drugom mjestu. Koncentracija Ala-Hyp u koži je bila vrlo niska, vjerojatno zato jer su peptidi u krvi bili hidrolizirani. Koncentracije peptida u koži nisu bile u korelaciji s koncentracijama u plazmi zbog njihove razgradnje u krvi. Maksimalna koncentracija Gly-Pro-Hyp u plazmi je bila 1,78 puta viša od Pro-Hyp, a u koži 0,31 puta niža od koncentracije Pro-Hyp. Maksimalna vremena (vrijeme u kojem se postigne maksimalna koncentracija) za Gly-Pro-Hyp i Pro-Hyp su u krvi bila 15 minuta, a u koži 30 i 45 minuta. U drugoj studiji na miševima, dobili su Gly-Pro-Hyp ili Pro-Hyp 0,2 mmol/kg. U svakoj skupini je bilo 5 miševa. Nakon unosa Gly-Pro-Hyp, povisila se količina Gly-Pro-Hyp i Pro-Hyp u plazmi i u koži s time da je količina Pro-Hyp u koži bila znatno veća. Nakon unosa Pro-Hyp, koncentracija tog peptida je povišena i u plazmi i u koži, a koncentracija Gly-Pro-Hyp se nije povisila (19).

U studiji u kojoj je 5 muškaraca oralno unosilo 0,385 g/kg želatinskih hidrolizata iz riblje ljuske, Pro-Hyp je bio glavni CP detektiran u krvi. Manje komponente su bili Ala-Hyp-Gly, Ser-Hyp-Gly, Ala-Hyp, Phe-Hyp, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Gly-Pro-Hyp i Pro-Hyp-Gly. Maksimalnu koncentraciju je Pro-Hyp dosegao 2 sata nakon oralne ingestije, a Ala-Hyp i Ala-Hyp-Gly nakon 1 sata. U usporedbi sa studijama koje su pratile koncentracije drugih peptida u krvi, Hyp sadržavajući peptidi postižu znatno više koncentracije u plazmi nakon oralne ingestije CP-ova (20).

### 3.2.2. *In vitro* studije učinkovitosti

U studijama na kulturi stanica ispitan je učinak CP-ova na stanicama ljudskih fibroblasta i keratinocita. Stanice su proučavane sa molekularnog i staničnog gledišta. Stanice su tretirane 0,125 %, 0,25 % i 0,5 % napitkom CP-ova ribljeg porijekla 48 sati. Kontrolna skupina je tretirana napitkom bez kolagena. Stanice fibroblasta su prethodno UVA ozračene. Korišteno je UVA zračenje jer ono ulazi dublje u dermis od UVB zračenja. UVA zračenje je smanjilo produkciju kolagena i elastina. U sve tri skupine stanica tretiranih kolagenim napitkom poboljšana je stanična proliferacija te proizvodnja kolagena i elastina u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Poboljšanje je bilo ovisno o dozi. Također je poboljšana aktivnost



mitohondrija u fibroblastima. Tretiranje 0,25 % i 0,5 % napitcima kolagena je povećalo ekspresiju gena komponenata ekstracelularnog matriksa kolagena, elastina i HA. Smanjeno je stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva te je povećana razina superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD) i katalaze (engl. *catalase*, CAT), enzima koji sudjeluju u antioksidativnoj zaštiti fibroblasta. Povećana je ekspresija gena za chaperon proteinske podjedinice (engl. *chaperonin containing TCP1 complex*, CCT) čija je uloga ispravno preklapanje proteina (2).

U drugoj biokemijskoj studiji su također korišteni CH-ovi ribljeg izvora. Dobiveni su iz kože plavog morskog psa (*Prionace glauca* L., Carcharhinidae), PGLA. Uspoređivan je njihov učinak na sintezu kolagena tipa I u ljudskim fibroblastima sa učinkom komercijalnog CH (C-CH). CH su najprije ultrafiltrirani te su dobivene propuštena i zadržana frakcija. Kod CH-ova iz plavog morskog psa (PGLA-CH) u zadržanoj frakciji pik sa najvećom molekulskom masom je iznosio 1,45 kDa, a u propuštenoj frakciji 0,57 kDa. Kod C-CH-ova najviši pik zadržane frakcije je iznosio 5,02 kDa, a najviši pik propuštene frakcije 0,77 kDa. Aminokiselinski sastav tih četiriju frakcija je bio vrlo sličan. Najveći je bio sadržaj Gly s time da ga je više bilo u propuštenoj frakciji. Nakon Gly sljedeći po sadržaju su alanin (Ala) i Pro te zatim Hyp kojega je više bilo u zadržanim frakcijama. 24 sata nakon tretiranja fibroblasta PGLA-CH-ovima nije bilo značajnog učinka na ekspresiju kolagena. Nakon 48 sati postignut je značajni učinak na sintezu mRNA kolagena pri čemu je zadržana frakcija imala veći učinak od propuštene frakcije. Nije bilo razlike u učinku s obzirom na koncentraciju CH-ova (50, 100, 500 µg/mL). Tretiranjem stanica C-CH-ovima učinak fibroblasta na sintezu mRNA kolagena je postignut nakon 24 sata tretiranja stanica te također nije bilo značajne razlike u učinku s obzirom na različite koncentracije frakcija. U obje zadržane frakcije, PGLA-CH i C-CH, sadržaj Pro-Hyp je bio viši te su te frakcije nakon 48 sati tretiranja postigle viši sadržaj mRNA kolagena tipa I u usporedbi sa propuštenim frakcijama (21).

U studiji koja je provedena na ljudskim fibroblastima i keratinocitima korišten je morski kolagen koji je sadržavao CP-ove veličine 3-7 kDa. Aktivnost proliferacije stanica je mjerena nakon 24, 36, 48 i 72 sata tretiranja stanica CP-ovima. Vijabilnost stanica fibroblasta je ovisila o koncentraciji kolagena. Između

koncentracija 3,05 i 48,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  je vijabilnost stanice rasla, a pri koncentracijama većim od 97,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  je padala. Također između 24 i 48 sati tretiranja stanica kolagenom je vijabilnost stanice rasla, a nakon 48 sati tretiranja je počela padati. Vijabilnost stanice keratinocita je između koncentracija 0,19 i 0,76  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rasla, a iznad 0,76  $\mu\text{g}/\text{mL}$  je padala. Kao i u slučaju sa fibroblastima, između 24 i 48 sati tretiranja kolagenom vijabilnost stanice je rasla, a nakon 48 sati je padala. Ekspresija mRNA kolagena tipa I je ovisila o koncentraciji kolagena na isti način kao i vijabilnost stanice. Rast vijabilnosti stanice i ekspresije mRNA kolagena tipa I između koncentracija 3,05 i 48,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  je zbog toga što su fibroblasti razgradili kolagen pri čemu su produkti razgradnje omogućili povećanje proliferacije stanice. Pad vijabilnosti stanice pri višim koncentracijama kolagena može biti posljedica stresa u okolini stanice kojeg je uzrokovao višak koncentracije te toksičnost metaboličkog otpada. Slična situacija je bila i sa keratinocitima. Kolagenaze i prokolagenaze keratinocita su razgradile kolagen te tako omogućile nutrijente potrebne za proliferaciju stanica (22).

U sljedećoj studiji ljudski dermalni fibroblasti su kultivirani u prisustvu Hyp-sadržavajućih peptida dobivenih iz kolagena. Šest dana su fibroblasti kultivirani peptidima u koncentraciji 200 nmol/mL. Proliferacija fibroblasta je značajno povećana u prisustvu Pro-Hyp, Ala-Hyp i Ala-Hyp-Gly peptida. Maksimalno povećanje proliferacije fibroblasta, za 1,5 puta, je postignuto nakon tretmana Pro-Hyp-om. Također je povećan sadržaj mRNA hijaluronan sintaze 2 (engl. *hyaluronan synthase*, HAS2) nakon tretmana Pro-Hyp-om, ali ne i nakon tretmana drugim Hyp sadržavajućim peptidima. Geni HAS1-3 reguliraju sintezu hijaluronana, pri čemu je samo HAS2 odgovoran za sintezu hijaluronana u kožnim fibroblastima. Sadržaji mRNA HAS1 i HAS3 nisu promijenjeni nakon tretmana fibroblasta Pro-Hyp-om. Maksimalna razina mRNA HAS2 je postignuta nakon 24 sata kultiviranja fibroblasta Pro-Hyp-om te je bila 2,3 puta veća od kontrole. Povećanje proliferacije i razine mRNA HAS2 je bilo o dozi ovisno pri koncentracijama 0-200 nmol/mL, ali se smanjilo pri koncentraciji 400 nmol/mL. Nakon 24 sata tretmana Pro-Hyp-om pri koncentraciji 200 nmol/mL je povećana sinteza HA 3,8 puta što je usporedivo sa povećanjem razine mRNA HAS2. Doza od 200 nmol/mL peptida je slična fiziološkim koncentracijama

peptida nakon oralnog unosa CP-ova. Količina Hyp sadržavajućih peptida u plazmi, 2 sata nakon oralnog unosa CP-ova iz riblje ljuske, otprilike iznosi 140 nmol/mL (23).

### 3.2.3. *In vivo* studije učinkovitosti

Studije na životinjama su provedene na miševima, štakorima i prašćićima. Miševi se koriste jer su genetski vrlo slični ljudima. Prema smjernicama za različite vrste miševa smatraju se srednjom dobi kada imaju 12-18 mjeseci, a stariji od toga se smatraju starima. Starost miševa ekvivalentna starosti ljudi je da su miševi stari 1 mjesec kao ljudi starosti 12 godina. Dakle, miševi starosti 6 mjeseci imaju približnu dob čovjeka starosti 30 godina, dok je 13 mjeseci života miša kao 45 godina, a 24 mjeseca kao 70 godina. Studije u kojima su postignuti uspješni rezultati na miševima, ne garantiraju uspjeh kod ljudi zbog razlike u digestiji, enzimskoj aktivnosti i metabolizmu, ali dodatno pojašnjavaju mehanizme učinka kolagena. Za razliku od miševa, kod ljudi je razvojni ciklus za intervencije protiv starenja dugotrajan (24).

U studiji na miševima ispitan je učinak CP-ova iz goveđe kosti. Miševi su podijeljeni u 6 grupa među kojima se 5 grupa sastojalo od miševa koji su bili stari 13 mjeseci dok se peta skupina, mlada kontrola sastojala od 2 mjeseca starih miševa. Stara kontrolna grupa dobivala je fiziološku otopinu, a ostale grupe su dobivale CP-ove dobivene alkalazom (ACP) u dozama od 200, 400 i 800 mg/kg te CP-ove dobivene kolagenazom (CCP) u dozi od 400 mg/kg. Jedna grupa je dobivala Pro 400 mg/kg. Te napitke su dobivali oralno jednom dnevno kroz 8 tjedana. Korišteni pripravci CP-ova dobiveni alkalazom i kolagenazom su imali sličnu distribuciju molekulskih masa te su se većinom sastojali od peptida molekulske mase manje od 500 Da (više od 50 %) te manje od 1000 Da (70 %). Sastav aminokiselina je također bio sličan te je Gly bio dominantna aminokiselina u oba tipa CP-ova. Kao jedna od karakteristika kože koje se mijenjaju starenjem, mjereno je stupanj opuštenosti kože. Kod mlade kontrolne grupe stupanj opuštenosti kože je s vremenom rastao, ali nije dosegnuo razinu stare kontrolne grupe. Kod skupina koje su dobivale CP-ove stupanj opuštenosti kože se nakon 8 tjedana smanjio u usporedbi sa početkom studije. Značajna razlika je postignuta kod grupe koja je dobivala ACP-ove 400 mg/kg nakon 6 tjedana. Stupanj opuštenosti kože svih skupina koje su dobivale ACP-ove i Pro je nakon 8 tjedana došao na razinu mlade kontrolne grupe. Nije

došlo do značajne promjene tjelesne težine skupina koje su dobivale CP-ove i Pro u usporedbi sa modelnom grupom. Indeksi slezene i timusa se također nisu značajno promijenili. To pokazuje da unos CP-ova iz goveđe kosti u dozama 200-800 mg/kg ili Pro 400 mg/kg kroz 8 tjedana nema toksičnih učinaka. Što se tiče morfološkog ispitivanja, stara kontrolna grupa je imala tanji dermis i manje lojnih žlijezda nego mlada kontrolna grupa. Nakon unosa CP-ova prostor u dermisu se smanjio a vlakna su postala gušća i organiziranija. Broj lojnih žlijezda je povećan u skupini koja je dobivala ACP-ove nakon 8 tjedana. Najveći učinak je imala ACP grupa koja je dobivala 800 mg/kg. Fragmentirana i neorganizirana vlakna su također poboljšana te je broj lojnih žlijezda porastao nakon unosa Pro 400 mg/kg kroz 8 tjedana. Unos CP-ova i Pro nije imao značajan učinak na vlažnost kože i sadržaj HA. Na povišenje sadržaja kolagena učinak CP-ova je bio značajan i o dozi ovisan, dok unos Pro nije imao taj učinak. Unos ACP-ova i Pro je imao učinak na omjer kolagena tipa I i tipa III, dok unos CCP-ova 400 mg/kg nije imao taj učinak. Sadržaj SOD-a i CAT-a je povećan, a sadržaj malondialdehida (engl. *malondialdehyde*, MDA) smanjen nakon unosa CP-ova. MDA je jedan od toksičnih produkata lipidne peroksidacije. Mjerenjem koncentracije MDA može se odrediti stupanj oksidativnog oštećenja u stanici. Unos Pro nije imao učinak na ta tri antioksidativna indikatora. Sveukupno razmatrano ACP-ovi su imali bolje učinke od CCP-ova pa je zbog toga alkalaza korisniji enzim za pripremu CP-ova sa povoljnijim učinkom na starenje kože (25).

U studiji koja je ispitivala učinak CP-ova na starenje i hidrataciju kože nakon oštećenja kože uzrokovanog UVB zračenjem korišten je CH dobiven iz ljuske tilapije. Studija je provedena na 6 tjedana starim miševima koji su izloženi UVB zračenju tri puta tjedno kroz 9 tjedana, a doza je bila malo ispod doze koja uzrokuje eritem. Za potrebe istraživanja miševi su podijeljeni u sljedeće skupine: kontrolna grupa, grupa koja je UVB ozračena, grupa koja je UVB ozračena te je dobivala 500 mg/kg CP-ova, te grupa koja je UVB ozračena te je dobivala 1000 mg/kg CP-ova. U svakoj grupi je bilo 8 miševa. Nakon 5 tjedana je transepidermalni gubitak vode (engl. *transepidermal water loss*, TEWL) u grupi koja je dobivala 1000 mg/kg CP-ova bio relativno nizak. Sadržaj HA, koji se nakon UVB zračenja smanjio, 9 tjedana nakon oralne ingestije CP-ova je povećan u obje grupe. Slični rezultati su i za razinu mRNA HAS1 i HAS2. Nakon UVB zračenja njihova

razina je pala, a nakon 9 tjedana unosa CP-ova razina se povisila, a povišenje je bilo ovisno o dozi. Razine mRNA hijaluronidaza (engl. *Hyaluronidase*, HYAL1 i HYAL2) su nakon UVB zračenja porasle, a nakon unosa CP-ova su smanjene. Ponavljano izlaganje UVB zračenju kroz 9 tjedana je smanjilo produkciju HA u dermisu. Nedostatak HA vodi do stvaranja tankih linija i bora pa je UVB zračenje uzrokovalo bore na koži. Unos CP-ova je oporavio gubitak HA kroz regulaciju hijaluronidaza i sintaza HA pa su i bore smanjene. UVB zračenje je smanjilo i barijernu funkciju kože tako što je smanjilo razinu filagrina i involucrina, strukturnih proteina rožnatog sloja kože. Ekspresija tih proteina je značajno porasla nakon unosa CP-ova (26).

U studiji na prašćićima je ispitan učinak CP-ova na morfologiju dermisa i sadržaj proteina ECM-a. 9 prašćića starosti 66 dana su podijeljeni u 3 skupine. Kontrolna grupa je dobivala hranu Superpork 80 koja sadrži 15 % proteina žitarica. Druga grupa je dobivala hranu koja sadrži CP-ove svinjskog izvora dnevno 0,2 g/kg tjelesne težine. Treća grupa je dobivala hranu koja sadrži laktalbumin 0,23 g/kg. Studija je trajala 62 dana. Nakon oralne ingestije pripravaka nije bilo značajne razlike u debljini dermisa (mm) između grupa. Gustoća fibroblasta (broj stanica //mm<sup>2</sup>) je bila značajno veća u grupi koja je unosila CP-ove. Promjer (nm) i gustoća (vlakna/μm<sup>2</sup>) kolagenih vlakana su također bili značajno veći u grupi koja je unosila CP-ove. Omjer kolagena prema ne kolagenu u ECM-u se značajno povećao u CP grupi. Nije bilo značajnih razlika u omjeru HA i dermatan sulfata među grupama. Dugotrajnim unosom CP-ova poboljšana su mehanička svojstva dermisa te je dermis postao otporniji na vanjska mehanička oštećenja tako što je pospješeno stvaranje kolagenih vlakana (27).

U sljedećoj studiji na štakorima je ispitan učinak CH-ova na debljinu i morfologiju dermisa, sintezu kolagena, ekspresiju enzima koji reguliraju razgradnju kolagena i aktivnost antioksidativnih enzima. Muški Sprague-Dawley štakori stari 4 tjedna težine 80-90 g su podijeljeni u 3 skupine po 20 jedinki: kontrolna grupa, grupa koja je dobivala 2,25 % morski CH (MCH) iz lososa i grupa koja je dobivala 4,5 % MCH. Također su vršena mjerenja na staroj kontrolnoj grupi (>18 mjeseci) i srednje staroj kontrolnoj grupi (12-18 mjeseci stari). Studija je trajala 24 mjeseca. 86,5 % peptida je bilo veličine 130-1000 Da. MCH je bio

bogat Gly > Glu > Pro > Hyp > Asp > Ala > Arg. Dugotrajni unos MCH-a nije osobito utjecao na apetit niti uzrokovao malnutriciju. Debljina dermisa kontrolne grupe srednje starih štakora (6501,10  $\mu\text{m}$ ) je bila puno veća od kontrolne grupe starih štakora (3340,52  $\mu\text{m}$ ). Debljina je određena mjerenjem udaljenosti između veze epidermis-dermis i dermis-masno tkivo te je značajno povećana u grupi koja je unosila 4,5 % MCH u usporedbi sa starom kontrolnom grupom. Za mjerenje ukupnog kolagena određivan je sadržaj Hyp-a. Sadržaj Hyp-a je bio značajno smanjen u ovisnosti o dobi. Srednje stare kontrole su sadržavale 17,98  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , a stare kontrole 12,02  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Sadržaj Hyp-a u 4,5 % MCH tretiranoj grupi je bio 1,26 puta veći nego u kontrolnoj grupi. Sveukupno povećani dermalna debljina i sadržaj kolagena pokazuju pozitivni učinak MCH-a na akumulaciju kolagena. Kolagena vlakna u dermisu stare kontrolne grupe su bila rijetka, fragmentirana i disorganizirana u usporedbi sa srednje starom kontrolnom grupom. Nakon oralne ingestije MCH-a, kolagena vlakna su postala gušća i sistematski složenija. To pokazuje da MCH ima inhibitorni učinak na fragmentaciju kolagena. mRNA razina prokolagena tipa I i tipa III u kronološki staroj koži se smanjila na 41 % i 47,8 % od srednje starih kontrola. Dugotrajna ingestija MCH-a je povećala ekspresiju kolagena tipa I i tipa III u kronološki staroj koži. Razina ekspresije MMP-1 stare kontrolne grupe je bila povećana 2 puta u usporedbi sa srednje starom kontrolnom grupom. Dugotrajna ingestija 4,5 % MCH je značajno inhibirala razinu ekspresije MMP-1. Razina TIMP-1 se nije značajno promijenila starenjem, ali nakon dugotrajne ingestije MCH-a se povećala razina ekspresije TIMP-1 u kronološki staroj koži. Oksidativni stres u kronološki staroj koži je posljedica smanjene aktivnosti SOD-a i povišene razine produkata lipidne peroksidacije (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS). Ingestijom MCH-a razina TBARS-a se u ovisnosti o dozi smanjila, značajno u 4,5 % MCH grupi. Povećala se aktivnost SOD-a, ali ne statistički značajno. S obzirom da se razina T $\beta$ RII proteina koji sudjeluje u aktivaciji Smad signalizirajućeg puta s godinama smanjuje, smanjena je i sinteza prokolagena u kožnim fibroblastima. Ingestijom MCH-a je došlo do povećanja ekspresije T $\beta$ RII proteina te je rezultat toga bio veći TGF- $\beta$  odgovor i povećanje tipa I i tipa III prokolagena u kronološki staroj koži (11).

U sljedećoj studiji na miševima ispitani su vlažnost i elastičnost kože, sadržaj kolagena, karakteristike dlake te aktivnost antioksidativnih enzima. Miševi starosti 9 mjeseci su dobivali CH-ove iz kože nilske tilapije kroz 6 mjeseci. Podijeljeni su u 5 grupa po 20. Prva grupa je bila kontrolna, druga je dobivala 10 % hidrolizate proteina sirutke, treća grupa nisko dozne CH (2,5 %), četvrta CH srednje doze (5 %) te peta grupa visoko dozne CH (10 %). Nije došlo do značajnih promjena u vlažnosti kože između grupa, ali najviši % vlažnosti je postignut u grupi koja je unosila 10 % CH. Sadržaj kolagena je značajno povišen u 5 % CH i 10 % CH grupama. Uspoređujući sa kontrolnom grupom sadržaj ne-kolagenih proteina nije porastao nakon unosa CH-ova. U 5 % CH i 10 % CH grupama je poboljšana boja, sjaj i debljina dlake te je smanjen gubitak dlake. U tim grupama je također značajno porasla elastičnost kože 33,38 % i 22,71 % te debljina dermisa. Kolagena vlakna grupa koje su dobivale CH-ove su bila gušća i sistemski složenija. Omjer kolagena tipa III prema tipu I je bio niži u 5 % i 10 % CH grupama nego u kontrolnoj grupi. To pokazuje protektivni učinak CH-ova na homeostazu kolagenog matriksa u kronološki ostarjeloj koži. Aktivnost CAT-a, SOD-a i glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GSH-Px) je povećana u svim grupama koje su dobivale CH-ove te u skupini koja je dobila proteine sirutke (28).

U studiji na 13 mjeseci starim miševima koji su oralnom ingestijom unosili CP-ove iz kože srebrnog šarana kroz 2 mjeseca (ekvivalentno 4,5 godina ljudskog života) analizirani su citokini kože. Kontrolna grupa miševa starih 13 mjeseci i mlada kontrolna grupa miševa starih 8 tjedana su unosili 0,2 mL fiziološke otopine. U grupi koja je dobivala 0,2 mL pripravka koji sadrži 400 mg/kg CP-ova razina faktora rasta placente (PIGF-2) se smanjila za 20 %. TGF- $\beta$ 1 faktor rasta koji regulira sintezu kolagena je značajno porastao. PF4 kemokin čija je uloga inhibicija kolagenaze je značajno porastao kao i aktivnost serpin-E1 citokina. Taj citokin kontrolira aktivnost MMP-1, MMP-2 i MMP-3. Aktivnosti IGFBP-2 i IGFBP-3 su značajno smanjene. IGFBP-2 inhibira ekspresiju gena za kolagen tako što blokira aktivnost inzulinu sličnog faktora rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor*, IGF-1). Sadržaj kolagena tipa I i razina mRNA je značajno porasla. Biopsijom kože i morfološkim pregledom je utvrđeno da je nakon unosa CP-ova smanjen prostor u dermisu tkiva, a vlakna su gušća (29).

U sljedećoj studiji je uspoređivan učinak CP-ova i proteina kazeina. Miševi stari 4 tjedna su oralnom ingestijom unosili 12 % CP-ove iz goveđe kosti kroz 4 tjedna. Druga skupina je unosila preparat koji je sadržavao 12 % proteina kazeina. Treća je bila kontrolna grupa. Molekulska masa CP-ova je bila između 1 i 3 kDa. Kazein je sadržavao sve aminokiseline dok CH nije sadržavao esencijalne aminokiseline te triptofan. U skupini koja je dobivala CP-ove povišena je razina kolagena tipa I i tipa IV. Smanjena je aktivnost MMP-2 koja razgrađuje kolagen tipa IV, a nije bilo učinka na aktivnost MMP-9 koja razgrađuje kolagene fragmente dobivene od kolagena tipa I. Iako CP-ovi imaju smanjeni nutritivni profil, ipak su povećali ekspresiju najvažnijeg proteina ekstracelularnog matriksa, kolagena tipa I. Učinak CP-ova je kolagen specifičan jer preparat koji je sadržavao kazein nije imao učinka na ekspresiju kolagena iako je sadržavao sve aminokiseline (30).

U studiji na 6 tjedana starim miševima je uspoređen učinak kolagena i CP-ova meduze na kožu miševa. Miševi su podijeljeni u 6 grupa. Normalna grupa (NC) i modelna grupa (MC) su oralnom ingestijom unosile fiziološku otopinu. 2 grupe su unosile kolagen meduze (engl. *jellyfish collagen*, JC1) 50 mg/kg i (JC2) 200 mg/kg te 2 grupe CH iz zvona meduze (*jellyfish collagen hydrolysate*, JCH1) 50 mg/kg i (JCH2) 200 mg/kg. Sve grupe su UV ozračene, osim NC. Studija je trajala 10 tjedana. Kolagen meduze se uglavnom sastojao od  $\alpha 1$  lanaca veličine 105 kDa, a molekulska masa CH-ova je bila manja od 5 kDa. Aminokiselinski sastav JC-a i JCH-a je bio vrlo sličan. Sadržaj vode NC grupe je bio 72,93 % a MC grupe 63,38 %. U JC1 grupi je za 26,6 % te u JCH1 za 41,15 % povišen sadržaj vode u odnosu na modelnu UV ozračenu grupu. Učinak je bio ovisan o dozi te je unos CH-ova imao veći učinak od unosa kolagena. U JC i JCH grupama je smanjeno oštećenje kože i formiranje bora uzrokovano UV zračenjem te je povećana antioksidativna aktivnost. Tkivo kože JCH2 grupe je bilo u gotovo istom stanju kao kod NC grupe. U JC i JCH grupama se povećala količina kolagena tipa I. Kod NC grupe elastična vlakna su bila izdužena, uska i homogeno raspoređena, a nakon UV zračenja su bila nakupljena, kratka, zgusnuta i uvijena. U JC i JCH grupama je došlo do poboljšanja elastičnih vlakana, pogotovo u JCH2 grupi gdje nije bilo značajne razlike s NC



grupom. Indeksi timusa i slezene, koji se koriste kao indeksi imunosti, su smanjeni u MC grupi zbog UV zračenja, a u JC i JCH grupama su ti indeksi povišeni (31).

U još jednoj studiji je ispitan učinak ingestije CP-ova na UV ozračenu kožu miševa. 2 frakcije CP-ova dobivene su iz kože bakalara, CP1 veličine 2-6 kDa te CP2 <2 kDa. 6 grupa je oralnom ingestijom unosilo CP-ove kroz 10 tjedana. A normalna grupa i B modelna grupa su unosile fiziološku otopinu, C grupa je unosila 50 mg/kg CP1, D grupa je unosila 200 mg/kg CP1, E grupa je unosila 50 mg/kg CP2 te F grupa 200 mg/kg CP2. Sve grupe su UV ozračene osim normalne grupe tokom svih 10 tjedana. CP1 i CP2 su sadržavali velike količine Gly, Glu, Arg, Hyp i Pro. Nakon UV zračenja u modelnoj grupi je došlo do poremećaja teksture kože. Brazde na koži su se proširile, a kožne bore su se produbile. Na koži su se vidjele i bore kojih kod normalne grupe nije bilo. Nakon unosa CP-ova, pogotovo CP1 200 mg/kg značajno se smanjilo stvaranje bora. Indeks slezene i timusa se značajno smanjio UV zračenjem, a nakon ingestije CP-ova su ti indeksi povećani. UV zračenje je u dermisu uzrokovalo zamjenu normalnih vlakana, abnormalnim, zapletenim, razgrađenim i nefunkcionalnim vlaknima. Gubitak punoće kože je doveo do stvaranja bora i ostarjelog izgleda kože. Nakon ingestije CP-ova značajno se smanjilo oštećenje kožne strukture. Aktivnost SOD-a je povećana nakon unosa CP-ova te je učinak bio o dozi ovisan. Razina MDA je UV zračenjem značajno povišena a nakon ingestije CP-ova je smanjena. Nije bilo razlike u antioksidativnoj aktivnosti između grupa koje su unosile CP1 i CP2. UV zračenjem se razina vode u koži značajno smanjila. Nakon ingestije CP2 200 mg/kg značajno je porastao sadržaj vode, dok nakon uzimanja 50 mg/kg CP1 i CP2 nije bilo razlike u sadržaju vode sa modelnom grupom. Sadržaj lipida je porastao nakon unosa CP-ova, pri čemu je CP1 grupa imala veći učinak od CP2 grupe. UV zračenje je potaknulo otpuštanje ceramida, ključnih signalnih molekula koje sudjeluju u mnogim biološkim funkcijama kao što su stanični rast, diferencijacija, senescencija i apoptoza. Ingestija CP-ova nije utjecala na razinu ceramida. Vlakna elastina su nakon UV zračenja bila kraća, zadebljana i uvijena, a unosom CP-ova su poboljšana (32).

### 3.2.4. Kliničke studije

Provedeno je i nekoliko kliničkih studija u kojima se ispitivao učinak oralno primijenjenih derivata kolagena. U pravilu, ispitanici nisu smjeli imati kožne bolesti niti biti na terapiji tijekom i prije same studije. Nisu smjeli unositi dodatke prehrani niti izlagati UV zračenju područje kože ispitivano u studiji osim ako to nije bilo dio studije. Šminka te sredstva za skidanje šminke su bili zabranjeni za korištenje na ispitivanim područjima kože. Nisu smjeli ići u saune i bazene niti se baviti intenzivnim sportovima za vrijeme i prije izvođenja ispitivanja. Također nisu smjeli mijenjati svoje životne i prehrambene navike (33). Ispitanici su bili žene i muškarci dobi 18 do 74 godine.

U jednoj studiji je ispitan učinak pripravka koji sadrži CP-ove u kombinaciji s ornitinom. Ispitanici (ukupno 21) bili su dobi 31 do 48 godina od kojih su 18 žena te 3 muškarca, a za potrebe ispitivanja podijeljeni su u 2 grupe: placebo grupu, te grupu koja je oralno unosila napitak koji je sadržavao 10 g CP-ova iz ljuske tilapije i 400 mg ornitina. Prosječna molekulska masa CP-ova je bila 2-3 kDa te je jedan napitak sadržavao 1100 mg Hyp. Studija je trajala 8 tjedana. TEWL i broj kožnih pora su značajno smanjeni nakon 8 tjedana. Elastičnost je povećana u CP grupi dok je u placebo grupi smanjena. Nije bilo značajnog učinka na vlažnost kože nakon 8 tjedana. S obzirom da su sa starenjem povezane promjene dijelom uzrokovane smanjenjem razine hormona rasta, analizirana je razina hormona rasta prije i nakon unosa CP-ova. Nije došlo do značajnih promjena u razini hormona rasta. Također je analizirana razina IGF-1, jer ona odražava razinu hormona rasta. Došlo je do malog povećanja razine IGF-1 u grupi koja je unosila CP-ove. S obzirom da u ovoj studiji nije procjenjivan učinak samih CP-ova, ne može se zaključiti da su poboljšanja karakteristika kože urokovana samim CP-ovima, samim ornitinom ili tim komponentama u kombinaciji (34).

U sljedećoj studiji je ispitan učinak CP-ova na bore oko očiju kod 114 žena starosti 45 do 65 godina. Podijeljene su u 2 grupe, placebo i grupu koja je unosila 2,5 g bioaktivnih kolagenih peptida (engl. *bioactive collagen peptides*, BCP) svinjskog izvora jednom dnevno kroz 8 tjedana. Prosječna molekulska masa CP-ova je bila 2 kDa. Na početku studije nije bilo značajnih promjena u volumenu bora oko očiju između placebo i BCP grupe. Nakon 4 tjedna unosa u BCP grupi je značajno smanjen volumen bora oko očiju tj.

dubina bora, točnije za 7,2 % u usporedbi sa placebo grupom. Nakon 8 tjedana smanjenje volumena bora je bilo 20,1 %. Maksimalno smanjenje bora koje je postignuto bilo je za 49,9 %. Smanjenje bora u BCP grupi 4 tjedna nakon prestanka uzimanja preparata bilo je 11,5 %. Nakon 8 tjedana unosa BCP-a sadržaj prokolagena tipa I je povećan za 65 % u usporedbi s placebo skupinom. Sadržaj elastina je porastao za 18 %, a sadržaj fibrilina, važne komponente mikrofibrila nužne za integritet elastičnih vlakana, za 6 %. (33).

U sljedećoj studiji je uspoređivan učinak CP-ova koji sadrže niski i visoki omjer slobodnih formi dipeptida na karakteristike kože. 85 žena 35 do 55 godina je podijeljeno u 3 grupe. Placebo, grupa koja je unosila CP-ove iz ribljeg izvora koji su sadržavali niski omjer slobodnih formi dipeptida Pro-Hyp i Hyp-Gly prema ostalom sadržaju pripravka, 0,1 g/kg od pripravka (L-CP) te grupa koja je unosila CP-ove koji sadrže visoki omjer dipeptida prema ostalom sadržaju, 2 g/kg od pripravka (H-CP). Dobivali su 5 g uzorka jednom dnevno kroz 8 tjedana. Vlažnost je značajno povišena i na području obraza i uglova očiju. Povišenje je bilo ovisno o dozi. Povišenje vlažnosti na obrazima je nakon 4 tjedna u L-CP grupi bilo 19,27 %, a nakon 8 tjedana 23,14 % te u H-CP grupi nakon 4 tjedna 25,67 %, a nakon 8 tjedana 30,99 %. Povišenje vlažnosti u kutevima očiju je u L-CP grupi nakon 4 tjedna iznosilo 7,77 % te nakon 8 tjedana 10,60 % te u H-CP grupi nakon 4 tjedna 13,76 %, a nakon 8 tjedana 20,87 %. Elastičnost je smanjena u placebo i u grupi L-CP. U H-CP grupi elastičnost je povećana. Na obrazima je nakon 4 tjedna povećana za 3,59 % te za 5,79 % nakon 8 tjedana. U kutevima očiju nakon 4 tjedna je povećana za 2,22 % te nakon 8 tjedana za 8,88 %. Broj bora nije smanjen ali je smanjeno područje i dubina bora kod žena koje su unosile CP-ove. Također je smanjena hrapavost kože. Analiza krvi je pokazala da su svi parametri bili unutar standardnih vrijednosti što znači da nije bilo štetnih učinaka (35).

U sljedećoj studiji je ispitan učinak CP-ova na sindrom lomljivih noktiju. To je poremećaj karakteriziran povećanom krhkošću nokatne ploče, hrapavom površinom nokta te listanjem noktiju. Pogađa 20 % populacije, više žene nego muškarce. Korišten je svinjski kolagen tipa I, prosječne molekulske mase CP-ova 2 kDa. Studija je provedena na 25 žena starosti 18 do 50 godina koje su imale barem jedan pokazatelj lomljivih noktiju. Jednom dnevno su unosile 2,5 g CP-ova kroz 6 mjeseci. Mjerenja su provedena na

početku studije, 3 mjeseca od početka, 6 mjeseci od početka studije te 4 tjedna nakon zadnjeg unosa CP-ova. Nakon 3 mjeseca broj žena koje su imale vrlo jako i umjereno listanje noktiju se prepолоvio a onih koje su imale blago se udvostručio. Nakon 3 mjeseca kod 54 % žena su nokti poboljšani, nakon 6 mjeseci 64 %, a 4 tjedna nakon prestanka uzimanja CP-ova kod 88 % žena su nokti poboljšani. Prije početka studije učestalost lomljenja noktiju bila je 10 puta mjesečno, a nakon 6 mjeseci unosa CP-ova se smanjila na 6 puta mjesečno. Prosječni rast noktiju je na početku bio 2,65 mm mjesečno, a nakon 3 mjeseca unosa CP-ova je porastao na 2,9 mm mjesečno što je rast za 10 %. Nakon 6 mjeseci je porastao na 12 % te 4 tjedna nakon prestanka unosa CP-ova na 15 %. 80 % sudionika se složilo da je oralni unos CP-ova poboljšao njihov izgled noktiju. Prema ocjeni sudionika ukupno poboljšanje noktiju je bilo 7,3 boda na skali 0-10 (36).

U sljedećoj studiji je 71 žena starosti 30-60 godina oralno unosila 3 g CP-ova iz riblje ljuske. Sve žene su imale bore na području oko očiju. Prosječna molekulska masa CP-ova je bila 3 kDa. Veličina bora na području oko očiju je smanjena nakon 12 tjedana unosa CP-ova u usporedbi sa placebo grupom. Značajno je povećana hidratacija i elastičnost kože na području obraza, također nakon 12 tjedana. CP-ovi iz ribljih ljusaka imaju specifičan aminokiselinski sastav, bogati su Gly, Pro, Hyp. Ovi pozitivni učinci na zdravlje kože vjerojatno su rezultat visokih koncentracija navedenih aminokiselina (39).

U studiji na 40 do 60 godina starim ženama koje su imale fotooštećenu kožu ispitan je učinak napitka koji sadrži CP-ove niske molekulske mase (engl. *low molecular weight collagen peptides*, LMWCP). Dnevno su unosile 1 g CP-ova kroz 12 tjedana. 53 žene su oralno unosile CP-ove dobivene iz riblje kože koji su sadržavali više od 15 % tripeptida uključujući 3 % Gly-Pro-Hyp. Placebo grupa je unosila isti napitak kao i ispitivana grupa, samo su LMWCP zamijenjeni vodom. Hidratacija kože je mjerena na području obraza. Do poboljšanja hidratacije je došlo već nakon 6 tjedana unosa LMWCP. Nakon 6 tjedana je poboljšanje bilo 7,23 puta veće nego u placebo grupi, a nakon 12 tjedana 2,9 puta. Značajno poboljšanje u izgledu bora je postignuto nakon 12 tjedana te je bilo 10,5 puta veće od placebo grupe. Elastičnost kože je također nakon 12 tjedana značajno poboljšana (38).

U sljedećoj studiji je korišten CH iz svinjskog kolagena tipa I, prosječne molekulske mase CP-ova 2 kDa. Ispitivan je učinak CH-ova na elastičnost kože, hidrataciju, TEWL i hrapavost kože nakon 8 tjedana svakodnevnog oralnog unosa. Studija je provedena na 69 žena starosti 35 do 55 godina podijeljeno u 3 skupine po 23. Prva skupina je unosila 2,3 g CH-ova, druga 5 g te treća 2,5 g placeba (maltodekstrina). Unosile su CH-ove u obliku pudera koji su otopile u vodi ili nekoj drugoj tekućini. Unutarnji dio podlaktice površine 5x5 cm je korišten kao područje testiranja. Mjerenja su provedena prije unosa CH-ova, nakon 4 i 8 tjedana unosa te 4 tjedna nakon unosa zadnje doze CH-ova. Elastičnost kože je na početku bila slična kod svih grupa. 4 i 8 tjedana nakon unosa CH-ova elastičnost se povisila u obje grupe koje su unosile CH-ove te nije bilo značajne razlike u učinku s obzirom na količinu unešenih CH-ova. Pozitivni učinak na elastičnost je bio izraženiji kod žena starijih od 50 godina. 4 tjedna nakon unosa zadnje doze CH-ova, grupa starijih žena je i dalje pokazivala značajno poboljšanje elastičnosti u usporedbi sa placebo grupom. Nije bilo statistički značajne razlike u hidrataciji kože 4 i 8 tjedana nakon unosa CH-ova između placebo i testnih skupina. Kod žena starijih od 50 godina je došlo do povećanja hidratacije za 11-14 % nakon 8 tjedana, ali ti podaci nisu bili statistički značajni. TEWL je na početku studije bio jednak među grupama. 4 i 8 tjedana nakon unosa CH-ova nije bilo statistički značajne razlike između grupa. Kod žena starijih od 50 godina isparavanje je smanjeno za 6-7 %. Nije bilo značajne razlike u hidratantnom učinku niti glatkoći kože između placebo i grupa koje su unosile CH-ove (39).

U sljedećoj studiji je ispitivan učinak CP-ova sa i bez vitamina C na 32 zdravih volontera, žena i muškaraca. Ispitan je učinak na hidrataciju, TEWL i elastičnost kože. Podijeljeni su u 4 grupe, grupa A nije unosila ništa, grupa B je unosila 3 g CP-ova, grupa C 3 g CP-ova i 500 mg vitamina C te grupa D 500 mg vitamina C kroz 12 tjedana. Hidratacija je povećana u B, C i D grupama. Razlike u hidrataciji su bile značajne između grupa A i B te A i C. Elastičnost je također povećana u B, C i D grupama. Značajna razlika u elastičnosti je bila između grupa A i B te A i C. Nije bilo značajnih razlika u te dvije karakteristike između grupa B i C, odnosno vitamin C nije značajno poboljšao hidrataciju niti elastičnost kože. TEWL je smanjen u grupama B, C i D. Najveće promjene TEWL su bile u grupi B, te nakon nje u grupi C (40).

Isto kao i u prethodnoj studiji i u sljedećoj je ispitan učinak oralnog pripravka koji sadrži CP-ove u kombinaciji sa drugim sastojcima. Pripravak je još sadržavao vitamine A, C, E i cink te je ispitan učinak na hidrataciju rožnatog sloja i elastičnost kože. Ispitanici su se sastojali od 39 hospitaliziranih osoba starijih od 65 godina koji su podijeljeni u placebo i kontrolnu skupinu. Jednom dnevno su unosili 10 g CP-ova kroz 8 tjedana. Mjerenja su provedena na području podlaktice zato što je to najčešće područje oštećenja kože uslijed malnutricije i suhoće kože. Do značajnog poboljšanja hidratacije je došlo nakon 8 tjedana, a poboljšanja elastičnosti nakon 6 tjedana unošenja pripravka (41).

Sljedeća studija je usporedila topikalnu primjenu peptida riže sa oralnom primjenom CH-ova na hidrataciju i elastičnost kože. Studija je provedena na 60 žena starosti 40 do 50 godina. Topikalni preparat koji je sadržavao peptide riže apliciran je 2 puta dnevno. Placebo (maltodekstrin) ili oralni preparat, koji je sadržavao 9 g CH-ova, vitamine A, C i E u niskim dozama i cink, unosili su se jednom dnevno. Mjerenja su provedena na periorbitalnoj, frontalnoj i nazolabijalnoj regiji lica. Nakon 28 dana tretmana topikalnim preparatom došlo je do značajnog povišenja sadržaja vode u rožnatom sloju. Do značajnog poboljšanja hidratacije kože je došlo tek 90 dana nakon oralnog unosa CH-ova. Elastičnost kože je značajno povišena nakon 90 dana primjene topikalnog pripravka u periorbitalnoj regiji. Također je nakon 90 dana unosa oralnog pripravka poboljšana elastičnost i periorbitalne i nazolabijalne regije. Morfologija dermisa je poboljšana nakon 90 dana primjene topikalnog pripravka. Kod unosa oralnog pripravka je povećana nakon 90 dana u nazolabijalnoj regiji i području čela. Učinak na smanjenje bora nakon 90 dana primjene su imala oba pripravka (42).

U još jednoj studiji je ispitan učinak CP-ova zajedno sa drugim komponentama na karakteristike kože. Studija je provedena na 5 muškaraca i 36 žena dobi 37-72 godine. Ispitanici su morali imati vidljive simptome ostarjele kože lica. Unosili su preparat u obliku kapsule koji je sadržavao morske CP-ove 570 mg, ekstrakt iz kore grožđa, koenzim Q10, luteolin i selen dva puta dnevno kroz 2 mjeseca. CP-ovi su bili veličine 10-60 Da te su obogaćeni Gly, Glu, Pro, Hyp, Asp, Ala i Arg. Ispitivane su epidermalna i dermalna debljina koje su indirektni pokazatelji sinteze i zadržavanja kolagena (dermis) i lipida (epidermis). Također

su ispitivane epidermalna i dermalna ultrazvučna gustoća koje karakteriziraju svojstva i red u epidermalnim i dermalnim strukturama. Dermalna debljina je povećana te je došlo do homogene distribucije kolagenih vlakana u dermisu kod 23 % ispitanika, a svojstva epidermisa su ostala nepromijenjena. Postignuto je vidljivo poboljšanje kože lica, koža je zategnuta i ovješeni dijelovi su uzdignuti. Povećani su elastičnost kože i produkcija sebuma, ali ne i vlažnost kože. Biološka dob mjerena na temelju ultrazvuka i mjerenja kožne fiziologije se smanjivala, ali statistički nedovoljno značajno. Unos pripravka nije imao učinka na pokazatelje metabolizma antioksidansa glutaciona kao što su ukupna razina glutaciona, te aktivnost glutation-S-transferaze i glutation peroksidaze. Sa druge strane nitriti/nitrati i razina MDA u plazmi su značajno porasli ali su i dalje bili unutar fizioloških razina. Ekstracelularna aktivnost Cu, Zn-superoksid dismutaze 3 je blago potisnuta ali ne ispod normalnih vrijednosti. Sadržaj Hyp-a u plazmi je povišen kao i sadržaj ATP-a u eritrocitima, dok se sadržaj koenzima Q10 nije promijenio. Povišene plazmatske razine Hyp-a bile su usporedive sa rezultatima studije u kojoj su jednako povišene razine Hyp-a, ali je korišten sami morski CH u puno višim dozama bez prisutnosti antioksidansa. Antiage učinak pripravka je bio vidljiv i iz povećane produkcije sebuma, jer produkcija lipida ovisi o godinama. Niska je u predpubertetnom periodu, raste sa seksualnim sazrijevanjem te pada starenjem (počevši između 46-55 godina) i UV zračenjem potaknutim starenjem kože (43).

U sljedećoj studiji ispitani su vlažnost kože i sadržaj kolagena u dermisu. Unosili su kolagen ribljeg izvora, Peptan F i svinjskog izvora, Peptan P, veličine peptida 2-5 kDa. Vlažnost kože je ispitana na ženama starosti 40-59 godina koje su imale niski sadržaj vode u koži. Ispitano je 33 žene koje su unosile 10 g placeba ili pripravka kolagena kroz 8 tjedana. Vlažnost kože je povišena za 12 % nakon 8 tjedana unosa Peptana F, za 16% nakon 4 tjedna unosa Peptana P te za 28 % nakon 8 tjedana unosa Peptana P. U placebo grupi se vlažnost nije promijenila. Nije bilo razlike u TEWL između placebo grupe i grupa koje su unosile kolagen. Gustoća kolagena u dermisu je ispitana na 101 ženi starosti 40-65 godina. Unosile su 10 g placeba ili pripravka kolagena kroz 12 tjedana. Nakon 4 tjedna unosa Peptana gustoća dermalnog kolagena je povišena značajno te nakon 12 tjedana još više, za 8,83 %. U placebo grupi gustoća kolagena nije promijenjena, a 12

tjedana nakon unosa placebo epidermis je sadržavao manje strukture kolagena nego na početku studije. Nasuprot tome, nakon 12 tjedana unosa Peptana, kolagena vlakna su bila manje fragmentirana u odnosu na placebo. Unos Peptana je smanjio fragmentaciju kolagena za 17,8 % nakon 4 tjedna te za 31,2 % nakon 12 tjedana. Za bolje razumijevanje kako je unos Peptana poboljšao hidrataciju kože te kvantitetu i kvalitetu dermalne kolagene mreže analizirana je morfologija te sadržaj GAG-ova i kolagena u ljudskim stanicama kože kao odgovor na različite koncentracije Peptana. Sadržaj GAG-ova u epidermisu je povišen inkubacijom Peptanom pri koncentracijama 0,01-0,1 mg/mL. Pri koncentraciji 1 mg/mL postignuto je zasićenje. Sadržaj dermalnog kolagena je povišen za 3 % pri koncentraciji 0,01 mg/mL te za 9 % pri koncentraciji 0,1 mg/mL Peptana. Pri koncentraciji 1 mg/mL postignuto je zasićenje i tog učinka (44).



## 4. RASPRAVA

Iz studija o bioraspoloživosti CH-ova je vidljivo da nakon oralnog unosa CH-ova dolazi do njihova probavljanja u GI traktu i krvi te se apsorbiraju u obliku slobodnih aminokiselina i peptida. Apsolutna bioraspoloživost je iznosila 49,6 %. Maksimum koncentracije u krvi dosežu nakon 1 do 2 sata od oralnog unosa. Do pada koncentracije na početnu vrijednost dolazi nakon 12 do 24 sata. Sadržaj aminokiselina i peptida u plazmi ovisi o njihovom sadržaju u kolagenu (16, 18). Neovisno o izvoru i tipu kolagena, Pro-Hyp je peptid koji je u najvećoj količini u plazmi nakon oralne ingestije CH-ova. Vrlo je otporan na razgradnju u GI traktu i krvi te se nalazi u velikim količinama u kolagenu. Prisutan je u obliku dipeptida ali i u obliku oligopeptida čijom daljnjom razgradnjom nastaje Pro-Hyp. Količina Pro-Hyp u plazmi je ovisila o izvoru CH-ova. U svim studijama Hyp je u plazmi bio u većoj količini u obliku slobodne aminokiseline nego u obliku peptida, što potvrđuje činjenicu da se peptidi razgrađuju u GI traktu i krvi. S obzirom da se CP-ovi razgrade u GI traktu, u plazmi su prisutni u veličini <500 Da (15). CP-ovi se apsorbiraju i u veličini 1-10 kDa, odnosno mogu biti apsorbirani i u visoko molekularnoj formi do određenog opsega. Nakon apsorpcije, CP-ovi se dulje zadržavaju u koži nego u plazmi. U plazmi su se zadržali maksimalno 3 dana, a u koži 8 dana (18). S obzirom da je jedan od načina apsorpcije CP-ova putem intestinalnog PEPT1 transportera, na njihov transport može utjecati zdravstveno stanje pojedinca te oralni unos CP-ova zajedno sa hranom (14, 45). Nakon oralnog unosa CH-ova koji sadrži velike količine tripeptida Gly-Pro-Hyp, dolazi do povišenja razine tog tripeptida u krvi ljudi i miševa. Ovisno o sadržaju tripeptida u CH-ovima, proporcionalan će biti porast tripeptida u plazmi, a u koži dolazi do porasta razine i Gly-Pro-Hyp i Pro-Hyp. Pri tome je Gly-Pro-Hyp u krvi hidroliziran do Pro-Hyp u određenoj količini (19).

Rezultati *in vitro* studija na stanicama fibroblasta i keratinocita dokazuju da tretiranje stanica napitkom CP-ova ribljeg izvora utječe na proces starenja kože. Smanjen je učinak oksidativnog stresa koje uzrokuje UVA zračenje, olakšana je sinteza proteina izvanstaničnog matriksa, povećane su aktivnost mitohondrija i ekspresija gena komponenata ekstracelularnog matriksa kolagena, elastina i HA te je poboljšano ispravno preklapanje proteina (2). Učinak CP-ova je u nekim studijama ovisio o primjenjenoj dozi, dok u drugima

nije bilo razlike u učinku primjenom različitih doza CP-ova. Veličina CP-ova i njihov aminokiselinski sastav su utjecali na učinak CP-ova. Peptidi veće molekulske mase potaknuli su veću sintezu mRNA kolagena tipa I i za to im je bilo potrebno manje vremena. Duljina tretiranja stanica napitkom CP-ova je također imala učinka na ekspresiju kolagena. U jednoj studiji 24 sata nije bilo dovoljno, ali nakon 48 sati je povećana ekspresija kolagena. CP-ovi koji su sadržavali veći udio Hyp i Pro su imali veći učinak na sintezu mRNA kolagena tipa I (21). Vitalnost stanica, ekspresija mRNA kolagena tipa I te stanična proliferacija fibroblasta su rasle do određene koncentracije CP-ova 3,05-48,8 µg/mL kojoj su stanice izložene, a pri višim koncentracijama >97,7 µg/mL su počele padati. Isto tako pri tretiranju stanica kroz 24 do 48 sati navedene vrijednosti rastu, a nakon 48 sati počinju padati. Kao što je i autor studije naveo, pad vrijednosti je posljedica stresa u okolini stanice kojeg je uzrokovao višak koncentracije kolagena te toksičnost metaboličkog otpada (22). Primjena samo Hyp-sadržavajućih peptida dobivenih iz kolagena potiče fibroblaste na povećanje proliferacije stanica i sintezu HA. Najveća stimulacija stanične proliferacije je postignuta nakon primjene Pro-Hyp. Pro-Hyp je peptid sa boljim učinkom na staničnu proliferaciju i sintezu hijaluronana od drugih peptida, jer je samo taj peptid povećao sintezu mRNA HAS2 (23). Iako se rezultati *in vitro* studija dobiveni na staničnim modelima ne mogu potpuno replicirati na ljude zbog njihovog probavnog sustava, pozitivni učinak može dati više detalja o učinku CP-ova na znakove starenja kože.

Oralnom ingestijom CP-ova veličine manje od 500 Da u dozi 400 mg/kg tjelesne težine kroz 6 tjedana je smanjen stupanj opuštenosti kože miševa, odnosno koža je bila više zategnuta što je karakteristika mlade kože. Poboljšana je morfologija kože tj prostor u dermisu je smanjen, a vlakna su postala gušća i organiziranija. Povećan je i broj lojnih žlijezda nakon 8 tjedana unosa CP-ova. Svi navedeni učinci su bili ovisni o dozi. Unos CP-ova je povisio sadržaj kolagena, omjer kolagena tipa I i tipa III, aktivnosti SOD-a i CAT-a te smanjio aktivnost MDA. Razlog izostanka učinka CP-ova na vlažnost kože i sadržaj HA u nekim studijama, može biti unos nedovoljne količine CP-ova ili nedovoljno dug period unosa. CP-ovi pripremljeni

enzimskom hidrolizom pomoću alkalaze imali su bolji učinak na starenje kože nego CP-ovi pripremljeni pomoću kolagenaze. Unos CP-ova nije imao toksičnih učinaka te nije bilo promjene tjelesne težine (25).

U studiji u kojoj su miševi oralno unosili CP-ove 1000 mg/kg tjelesne težine, značajno je poboljšana hidratacija kože. Već nakon 5 tjedana je značajno smanjen TEWL. Pri primjeni manje doze, 500 mg/kg tjelesne težine, nije postignut učinak na TEWL što pokazuje da je doza CP-ova vrlo bitna za njihov učinak. Sadržaj HA je nakon 9 tjedana unosa CP-ova povećan. U prilog tome ide i rezultat da su razine mRNA hijaluronidaza snižene, a mRNA sintaza HA povišene. Izgled bora je poboljšán tj bore su smanjene što je posljedica povećanja hidratacije kože. Ozračivanjem kože UV zrakama dolazi do poremećaja epidermalne barijere i hidratacije kože, a nakon oralnog unosa CP-ova te karakteristike kože su poboljšane. Unosom CP-ova dolazi do povećane ekspresije proteina filagrina i involucrina čime je poboljšana barijerna funkcija kože (26). Dugotrajnim (24 mjeseca) unosom 2,25 % i 4,5 % MCH-a veličine peptida 130-1000 Da, kod štakora je povećana ekspresija kolagena tipa I i tipa III te sinteza prokolagena tipa I i tipa III. Dugotrajnim unosom CP-ova je smanjena razina MMP-1 za 67,4 % te je povišena razina TIMP-1. Time je usporeno starenje kože jer starenjem uzrokovano povišenje razine MMP-1 dovodi do smanjenja razine kolagena. Oralnom ingestijom CP-ova povećana su antioksidativna svojstva kože. Smanjena je razina TBARS-a u ovisnosti o dozi te je povećana aktivnost SOD-a. Ingestija CP-ova je potaknula sintezu kolagena tipa I i tipa III kroz aktivaciju Smad signalizirajućeg puta i pozitivnu regulaciju razine T $\beta$ RII proteina (11). Sadržaj ne kolagenih proteina se unosom CP-ova nije povišio. To pokazuje specifičnost CP-ova prema povišenju sadržaja samo proteina kolagena. Oralnim unosom CP-ova su poboljšani boja, sjaj i debljina dlake miševa. Također su porasli elastičnost kože i debljina dermisa. To je vrlo važno jer dermis ljudske kože svakim desetljećem gubi debljinu za 7 % zbog smanjene sinteze fibroblasta te povećane sinteze enzima koji razgrađuju matriks. U nekim studijama nije poboljšana vlažnost kože nakon oralnog unosa CP-ova, iako je studija trajala čak 6 mjeseci. S obzirom da doza primijenjenih CP-ova nije bila navedena, ne može se na temelju doze zaključiti uzrok izostanka povećanja vlažnosti. Nakon oralnog unosa 2,5 %, 5 % i 10 % CP-ova kroz 6 mjeseci je povećana aktivnost antioksidativnih enzima SOD-a, CAT-a i GSH-Px-a (28).

S obzirom da je starenje kože usko povezano s citokinima uključujući faktore rasta, kemokine, upalne citokine, MMP-ove i njihove inhibitore, analizirani su citokini kože nakon oralnog unosa CP-ova. Nakon 2 mjeseca unosa 0,2 mL pripravka koji sadrži 400 mg/kg CP-ova kod miševa je značajno regulirano 6 od 54 citokina. Razina PIGF-2 faktora rasta koji potiče angiogenezu se smanjila za 20 %, a TGF- $\beta$ 1 faktor rasta, PF4 kemokina i serpin-E1 koji utječu na sintezu i razgradnju kolagena su porasli. Aktivnost IGFBP-2 i IGFBP-3, koji smanjuju sintezu kolagena, je smanjena (29).

Oralni unos 12 % CP-ova veličine 1-3 kDa kroz 4 tjedna je povećao ekspresiju kolagena tipa I, dok unos proteina kazeina koji je sastavom aminokiselina bogatiji, nije utjecao na ekspresiju kolagena. To potvrđuje kolagen specifičan učinak CH-ova. Nakon samo 4 tjedna unosa CH-ova povišena je razina kolagena tipa I i tipa IV te je smanjena aktivnost MMP-2 (30). Oralni unos kolagena i CH-ova veličine <5 kDa u dozama 50 mg/kg i 200 mg/kg kroz 10 tjedana je popravio oštećenja uzrokovana UV zračenjem. Taj je učinak bio o dozi ovisan te su CH-ovi pokazali veću bioaktivnost od kolagena. Došlo je do poboljšanja imunosti, smanjenja gubitka vlažnosti, popravljivanja elastinskih i kolagenih vlakana, povećana je antioksidativna aktivnost, smanjeno formiranje bora i povećana količina kolagena tipa I. S obzirom na te rezultate vrlo je bitno da se u oralnim pripravcima koriste CH-ovi, a ne nehidrolizirani oblik kolagena (31).

UV zračenjem dolazi do mnogih promjena u koži miševa. Uzrokovana je imunotoksičnost, oksidativno oštećenje, smanjenje razine vlažnosti i sadržaja lipida te promjene elastičnih i kolagenih vlakana. Bez lipidne barijere koža je suha, gruba i naborana. Ingestija CP-ova u dozama 50 mg/kg i 200 mg/kg kroz 10 tjedana pri čemu su peptidi veličine <2 kDa te 2-6 kDa je uzrokovala povećanje imunosti, smanjen gubitak vlažnosti i lipida te su popravljena vlakna kolagena i elastina. Unosom CP-ova u dozi od 200 mg/kg je povišen sadržaj vode u koži dok unosom CP-ova u dozi od 50 mg/kg nije povišen. Pri tome su bolji učinak imali CP-ovi veličine 2-6 kDa od CP-ova veličine do 2 kDa. Na temelju povećanja indeksa timusa i slezene nakon unosa CP-ova, može se zaključiti da unos CP-ova povećava imunološku aktivnost kod miševa (31).

Učinci CP-ova na starenje kože u studijama na ljudima su slični učincima iz studija na miševima. TEWL je smanjen, elastičnost kože povećana, smanjen je broj kožnih pora te je povećana razina IGF-1 nakon 8

tjedana oralnog unosa pripravka koji sadrži 10 g CP-ova veličine 2-3 kDa i ornitin (34). Nakon 4 tjedna unosa CP-ova prosječne veličine 2 kDa smanjena je dubina bora oko očiju, a nakon 8 tjedana smanjenje dubine bora je bilo puno veće. Sadržaj prokolagena tipa I je povećan. Porastao je i sadržaj elastina i fibrilina. Za razliku od većine topikalno apliciranih pripravaka ovaj pozitivni učinak na kožu je uzrokovan direktnim učinkom na dermalni ekstracelularni matriks jer je došlo do značajnog povećanja sinteze kolagena i elastina. Taj direktni učinak na dermalni matriks može objasniti dugodjelujuće poboljšanje bora kože koje je trajalo 4 tjedna nakon zadnjeg unosa CP-ova (33).

Značajna je razlika između konvencionalnih CH-ova i CH-ova koji imaju viši sadržaj specifičnih bioaktivnih dipeptida kao što su Pro-Hyp i Hyp-Gly. CH koji je sadržavao veći omjer dipeptida Pro-Hyp i Hyp-Gly prema ostalom sadržaju pripravka (2 g/kg od pripravka) više je povisio vlažnost na području obraza i uglova očiju nego onaj koji je sadržavao manji omjer (0,1 g/kg od pripravka). Učinak je postignut nakon 4 tjedna unosa CH-ova, a još veći učinak nakon 8 tjedana. Elastičnost je povećana samo unosom CH-ova sa većim omjerom dipeptida. Područje i dubina bora su smanjeni, ali ne i broj bora. Štetnih učinaka nakon oralnog unosa CH-ova nije bilo (35).

Učinak CP-ova na sindrom lomljivih noktiju je vjerojatno rezultat povećanog kapaciteta vezanja vode oštećenih noktiju što je potaknuto suplementacijom CP-ovima. Lomljivost noktiju je određena sadržajem vode u nokatnoj ploči. Unos CP-ova prosječne veličine 2 kDa u dozi od 2,5 g dnevno kroz 6 mjeseci je potaknuo sintezu proteina koji su važni za epidermalnu barijeru i vlažnost te smanjio učestalost lomljenja noktiju. Porastao je prosječni rast noktiju te je poboljšan izgled noktiju (36).

Dnevnim unosom 3 g CP-ova iz riblje ljuske prosječne veličine 3 kDa kroz 12 tjedana je smanjena veličina bora oko očiju te su povećani hidratacija i elastičnost kože na području obraza. CP-ovi su bili bogati ak Gly, Pro i Hyp (37). Elastičnost kože je povećana kod ljudi nakon 4 i 8 tjedana unosa CH-ova prosječne veličine peptida 2 kDa u dnevnoj dozi 5 g i 2,3 g. Pri tome nije bilo značajne razlike u učinku unosom različite količine CH-ova. Najveći učinak je bio kod žena starijih od 50 godina. Učinak na hidrataciju i TEWL nije bio značajan, a najveći je bio ponovno kod žena starijih od 50 godina. Također nije došlo do

poboljšanja što se tiče hrapavosti kože. S obzirom da studija nije dugo trajala, moguće je da bi nakon duljeg unosa CH-ova došlo do značajnih, pozitivnih učinaka i na ostale analizirane karakteristike kože (39). Uzimanje malih doza vitamina C (500 mg) uz CP-ove kroz 12 tjedana nije pojačalo pozitivne učinke CP-ova na kožu (40).

Topikalna formulacija peptida riže u kraćem je vremenu postigla hidratantni učinak na kožu od oralnog pripravka CH-ova. Elastičnost kože je topikalnim pripravkom poboljšana u periorbitalnoj regiji kože jer je u tom području koža tanja i lakše ju je tretirati topikalno. S druge strane, oralni pripravak je elastičnost poboljšao u periorbitalnoj ali i nazolabijalnoj regiji koja zahtjeva drugačiji, invazivniji tip tretmana. Oba tretmana su imala dobar učinak na morfologiju dermisa, ali je učinak oralnog pripravka bio izraženiji jer djeluje na kožu iz dubljih slojeva. Topikalni pripravak je poboljšao sve ispitivane parametre kože s kraćim učinkom, dok je oralni pripravak poboljšao sve parametre te je učinak bio dugodjelujući. Poboljšanje elastičnosti, hidratacije i smanjenje bora je postignuto nakon 90 dana unosa oralnog pripravka (42).

Dodatkom antioksidansa u pripravak dolazi do jednakog učinka na povišenje razine Hyp-a, a uz manju dozu CP-ova. Biološka dob je nakon unosa CP-ova blago smanjena, a produkcija sebuma povećana. Prisutnost antioksidansa u pripravku nije narušila učinak CP-ova na sintezu kolagena, a održana je sistemska endogena antioksidativna obrana te je zaštićeno skladištenje energije. Umjereno povišene plazmatske razine NO-a i MDA nakon unosa CP-ova bi mogle imati pozitivnu ulogu kao medijatori u CP-ovima induciranoj sintezi kolagena i ATP-a, kao i u produkciji sebuma. Samo su prekomjerne količine NO-a i MDA štetne jer pokreću senescenciju stanica i smrt, a u ovoj studiji su ostale unutar normalnih raspona vrijednosti (43). Unos CP-ova tokom 8 tjedana u dozi od 10 g pri čemu su peptidi veličine 2-5 kDa je poboljšalo hidrataciju kože. Povišenje hidratacije je posljedica povećanja sadržaja GAG-ova u epidermisu, što je dokazano nakon inkubacije stanica kože CP-ovima (44).

## 5. ZAKLJUČAK

Oralnim unosom CP-ova kod ljudi dolazi do smanjenja znakova kronološkog i ekstrinzičnog starenja kože. Smanjeni su TEWL, broj kožnih pora, dubina i područje bora te biološka dob. Povećani su elastičnost kože, vlažnost i gustoća te sadržaj elastina i fibrilina. Smanjena je učestalost lomljenja noktiju, a porastao je prosječni rast noktiju te je poboljšán izgled noktiju. Kod miševa su postignuti isti učinci kao i kod ljudi te je dodatno smanjen stupanj opuštenosti kože, aktivnost MDA i razina mRNA hijaluronidaza. Poboljšana je morfologija kože, tj. vlakna su postala gušća i organiziranija. Povećan je broj lojnih žlijezda, sadržaj kolagena i HA, omjer kolagena tipa I i tipa III, aktivnosti SOD-a i CAT-a te mRNA sintaze HA. Povećana je debljina dermisa. Ekspresija kolagena tipa I i tipa III, sinteza prokolagena tipa I i tipa III te razina TIMP-1 su povećane, a razina MMP-1 je smanjena. Boja, sjaj i debljina dlake miševa su poboljšani. TGF- $\beta$ 1 faktor rasta, PF4 kemokin i serpin-E1, koji utječu na sintezu i razgradnju kolagena, su povišeni. Povećani su indeksi timusa i slezene odnosno imunološka aktivnost kod miševa. Za postizanje navedenih učinaka potrebno je oralno unositi CP-ove svakodnevno minimalno 8 tjedna u dozi od 10 g. Pri tome prosječna molekulska masa peptida treba iznositi 3-6 kDa. Nakon oralnog unosa, CP-ovi postižu maksimalne koncentracije u plazmi nakon 1-2 sata od unosa te se u plazmi zadržavaju do 3, a u koži do 14 dana. CP-ovi pripremljeni enzimskom hidrolizom pomoću alkalaze imaju bolji učinak na starenje kože, nego CP-ovi pripremljeni pomoću kolagenaze. Također, što je veći udio Pro, Hyp i Gly u kolagenu, postiže se bolji učinak na sintezu mRNA kolagena tipa I i staničnu proliferaciju fibroblasta. Peptidi Pro-Hyp i Pro-Hyp-Gly su otporniji na razgradnju GI enzimima i enzimima u krvi od ostalih peptida koji su u sastavu kolagena. Unos CP-ova nema toksičnih učinaka te ne utječe na promjenu tjelesne težine.

## 6. LITERATURA

- 1- Farage MA, Miller KW, Maibach HI. Degenerative Changes in Aging Skin. U: Farage MA, Miller KW, Maibach HI. ur. Textbook of Aging Skin. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2015; 15-30.
- 2- Lin P, Hua N, Hsu YC i sur. Oral Collagen Drink for Antiaging: Antioxidation, Facilitation of the Increase of Collagen Synthesis, and Improvement of Protein Folding and DNA Repair in Human Skin Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev* 2020;8031795:1-9.
- 3- Lee HJ, Jang HL, Ahn DK i sur. Orally administered collagen peptide protects against UVB-induced skin aging through the absorption of dipeptide forms, Gly-Pro and Pro-Hyp. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019;83:1146-1156.
- 4- 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. *The Open Nutraceuticals Journal*. 2015;8:29-42.
- 5- Contet-Audonneau JL, Jeanmaire C, Pauly G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *Br J Dermatol*. 1999;140:1038-47.
- 6- Haydont V, Bernard BA, Fortunel NO. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mech Ageing Dev*. 2019;177:150-156.
- 7- Baumann L. Skin ageing and its treatment. *J Pathol*. 2007;211:241-51.
- 8- Yaar M, Eller MS, Gilchrist BA. Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2002;7:51-8.
- 9- Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol*. 2008;144:666-72.



- 10- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:1531-46.
- 11- Liang J, Pei X, Zhang Z, Wang N, Wang J, Li Y. The protective effects of long-term oral administration of marine collagen hydrolysate from chum salmon on collagen matrix homeostasis in the chronological aged skin of Sprague-Dawley male rats. *J Food Sci.* 2010;75:230-8.
- 12- Coppola D, Oliviero M, Vitale GA i sur. Marine Collagen from Alternative and Sustainable Sources: Extraction, Processing and Applications. *Mar Drugs.* 2020;214:1-23.
- 13- Fliigel SE, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol.* 2003;120:842-8.
- 14- Shen W, Matsui T. Intestinal absorption of small peptides: a review. *International Journal of Food Science and Technology.* 2019;54:1942-48.
- 15- Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y i sur. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 2005;53:6531-6.
- 16- Wang L, Wang Q, Qian J i sur. Bioavailability and bioavailable forms of collagen after oral administration to rats. *J Agric Food Chem.* 2015;63:3752-6.
- 17- 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;55:1532-5.
- 18- Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of (<sup>14</sup>C) labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr.* 1999;129:1891-5.

- 19- Yazaki M, Ito Y, Yamada M i sur. 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.
- 20- Ichikawa S, Morifuji M, Ohara H, Matsumoto H, Takeuchi Y, Sato K. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *Int J Food Sci Nutr.* 2010;61:52-60.
- 21- 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;144:1-10.
- 22- Chen RH, Hsu CN, Chung MY, Tsai WL, Liu CH. Effect of different concentrations of collagen, ceramides, N-acetyl glucosamine, or their mixture on enhancing the proliferation of keratinocytes, fibroblasts and the secretion of collagen and/or the expression of mRNA of type I collagen. *J Food Drug Anal.* 2008;16:66-74.
- 23- Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H i sur. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol.* 2010;37:330-8.
- 24- Flurkey K, Curren JM. Pitfalls of animal model systems in ageing research. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18:407-421.
- 25- 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;1209:1-14.
- 26- Kang MC, Yumnam S, Kim SY. Oral Intake of Collagen Peptide Attenuates Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Dehydration In Vivo by Regulating Hyaluronic Acid Synthesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19:3551.
- 27- Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y i sur. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2006;52:211-5.

- 28- Wang L, Jiang Y, Wang X i sur. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. *J Funct Foods*. 2018;44:112-117.
- 29- 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.
- 30- 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;14:618-24.
- 31- Fan J, Zhuang Y, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients*. 2013;5:223-33.
- 32- Hou H, Li B, Zhang Z i sur. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. *Food Chem*. 2012;135:1432-9.
- 33- Proksch E, Schunck M, Zague V, Segger D, Degwert J, Oesser S. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27:113-9.
- 34- 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;16:1-12.
- 35- 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;96:4077-81.

- 36- 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.
- 37- Koizum S, Inoue N, Shimizu M, Kwon C, Kim H, Park KS. Effects of Dietary Supplementation with Fish Scales-Derived Collagen Peptides on Skin Parameters and Condition: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *Int J Pept Res Ther*, 2018;24:397-402.
- 38- 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;10:1-13.
- 39- 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.
- 40- Choi SY, Ko EJ, Lee YH i sur. Effects of collagen tripeptide supplement on skin properties: a prospective, randomized, controlled study. *J Cosmet Laser Ther*. 2014;16:132-7.
- 41- 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.
- 42- Maia Campos PMBG, Melo MO, Siqueira César FC. Topical application and oral supplementation of peptides in the improvement of skin viscoelasticity and density. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18:1693-1699.
- 43- De Luca C, Mikhal'chik EV, Suprun MV, Papacharalambous M, Truhanov AI, Korkina LG. Skin Antiageing and Systemic Redox Effects of Supplementation with Marine Collagen Peptides and Plant-Derived Antioxidants: A Single-Blind Case-Control Clinical Study. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;4389410:1-14.

44- 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.

45- Wenzel U, Kuntz S, Daniel H. Flavonoids with epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitory activity stimulate PEPT1-mediated cefixime uptake into human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299:351-7.

## 7. ŽIVOTOPIS



Curriculum vitae

### PERSONAL INFORMATION

**Martina Švarc**



Antuna Stipančića 14, 10000 Zagreb (Croatia)

0917280530

svarcmartina10@gmail.com

Skype martinaszwarz93

Date of birth 10/01/1993

### WORK EXPERIENCE

- 01/04/2017–Present **farmaceut, voditelj ljekame**  
Ljekame Filipović
- 03/10/2016–31/03/2017 **farmaceut**  
FARMACIA ZU, Zagreb
- 01/06/2014–01/06/2015 **promotor Vichy kozmetike**  
Drum d.o.o., Zagreb

### EDUCATION AND TRAINING

- 13/07/2011–20/09/2016 **student**  
Farmaceutsko biokemijski fakultet, Zagreb (Croatia)  
Diplomski rad: Zavod za analitiku i kontrolu lijekova; Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu pirfenidona u hrani HPLC- DAD- MS metodom
- 20/01/2016–01/07/2016 **stručno osposobljavanje za ljekarnike**  
FARMACIA ZU, Galenski laboratorij GLJZ, bolnička ljekarna Dubrava, Zagreb
- 15/06/2016–01/10/2016 **povjerenik za studentske razmjene na lokalnoj razini**  
CPSA
- 07/09/2015–28/09/2015 **studentska razmjena**  
Associacio Valenciana de Joves Estudiantes de Farmacia, Valencia (Spain)  
rad u javnoj ljekarni, komunikacija na engleskom jeziku
- 01/11/2013–01/09/2014 **član**  
studentska udruga eSTUDENT, Zagreb  
Tim za prakse i pripravništvo

### PERSONAL SKILLS

Mother tongue(s) Croatian

Foreign language(s)

UNDERSTANDING

SPEAKING

WRITING

	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	C1	C1	B2	B2	B2
Eureka centar opći engleski C 1.1					
German	A2	A2	A2	A2	A2

Levels: A1 and A2: Basic user - B1 and B2: Independent user - C1 and C2: Proficient user  
Common European Framework of Reference for Languages

**Digital skills** Znanje iz područja MS PowerPoint, MS Word, MS Internet te MS Excel.

**Other skills** Hobi- trčanje, planinarenje, skijanje

**Driving licence** B