

Kolejne dowody na transdermalność i działanie kolagenu rybiego

Kiedy powstawały pierwsze wydania tego skryptu, wówczas jeszcze publiczne głoszenie, że kolagen rybi przenika przez ludzką skórę i aktywuje fibroblasty do produkcji prokolagenu ustrojowego – narażało prezentera tematu na niewybredną krytykę, a bywało, że i na wyzywanie od szarlatanów. Świat idzie jednak do przodu. Oto jedno z wielu już badań dowodzących, że polscy biochemicy wyprzedzili naukę o dobrych 20 lat... a jednak przenika !

J Biomed Biotechnol. 2010; 2010: 757301.

Data publikacji w Internecie: 8 czerwca 2010 doi: [10.1155/2010/757301](https://doi.org/10.1155/2010/757301)

PMCID: PMC2896882

Wpływ rozmiarów i konformacji peptydów kolagenowych ze skór rybich na cechy skóry twarzy i efektywność ich przenikania do skóry.

Huey-Jine Chai,^{1, 2} Jing-Hua Li,² Han-Ning Huang,¹ Tsung-Lin Li,³ Yi-Lin Chan,⁴ Chyuan-Yuan Shiau,¹ and Chang-Jer Wu^{1,*}

¹Wydział Nauk Żywnościowych, National Taiwan Ocean University, Keelung 20224, Tajwan

²Wydział Technologii Żywności Pochodzenia Morskiego, Instytut Badań nad Rybołówstwem, Keelung 20246, Tajwan

³Ośrodek Badań nad Genomiką, Academia Sinica, Tajpej 11529, Tajwan

⁴Ośrodek Badań Biomedycznych, Academia Sinica, Tajpej 11529, Tajwan

*Chang-Jer Wu: e-mail: wuchangjer@yahoo.com.tw

Abstrakt (fragmenty)

Przygotowano peptydy kolagenowe pozyskane ze skór rybich (...) – tilapii (*Oreochromis*). (...) po określonym połączeniu proteaz (...) stwierdzono, że FSCP (fish-scale collagen peptides) **stymulują namnażanie się komórek fibroblastów i syntezę prokolagenu** w trybie zależnym od czasu i dawki. Oceniono zdolność **przenikania przezskórnego** frakcjonowanych peptydów FSCP za pomocą modelu komór dyfuzyjnych Franz. Cięższe peptydy FSCP, 3500 i 4500 Da, wykazywały większą zdolność do przenikania przez skórę, w porównaniu do lżejszych (...) i zdawały się zachowywać korzystnie spiralne struktury (...). Stwierdzono, że FSCP, w szczególności te cięższe, **efektywnie przenikają warstwę zrogowaciałą naskórka i docierają do naskórka i skóry właściwej, aktywują fibroblasty i przyspieszają syntezę kolagenu.** (...)

1. Wstęp (fragmenty)

(...) Skóra właściwa zawiera duże ilości macierzy pozakomórkowej (ECM), takiej jak kolageny i glikozaminoglikany (GAG) produkowane głównie przez fibroblasty. Wiadomo, że kolagen typu I [5] utrzymuje integralność skóry właściwej i jego ilość w ludzkim organizmie jest największa. Proces starzenia się skóry jest w dużej mierze związany ze zmniejszeniem się ilości kolagenu typu I [6]. (...) Spożywanie peptydów kolagenowych może mieć korzystny wpływ na organizm (...) jako suplement diety mogą poprawiać gęstość mineralną kości i pomagać w zwyrodnieniowej chorobie stawów [7-9]. Badacze wskazują również, że spożywanie kolagenu może zwiększać gęstość włosów i kondycję paznokci, zwiększać rozmiar mikrowłókien kolagenowych (...), gęstość fibroblastów oraz pobudzać tworzenie mikrowłókien kolagenowych w skórze właściwej itp. [13]. (...) Materiały biomedyczne stosowane miejscowo na skórę muszą pokonać barierę warstwy zrogowaciałej naskórka, aby przedostać się do komórek fibroblastów w warstwie skóry właściwej. (...) Hydrolizaty kolagenów pochodzące z dowolnych źródeł [wieprzowe, wołowe – przyp.] mogą nie przynosić pożądanych efektów, na przykład nie wywołać namnażania kolagenu typu I. (...) Objętość lub masa cząsteczkowa (MW) kolagenu może odgrywać kluczową rolę w zdolności do przenikania podczas stosowania miejscowego [21].

(...) Oceniono fizjologiczne oddziaływanie przygotowanych kolagenów w postaci esencji na skórę twarzy uczestników badania. Określiliśmy również poziom namnażania fibroblastów oraz syntezę kolagenu w zarodkowych liniach fibroblastów po zastosowaniu zabiegów FSCP. **Zbadano skuteczność przenikania przezskórnego FSCP z uwzględnieniem wielkości cząsteczek.** (...)

2. Materiały i metody (fragmenty)

2.1. Przygotowanie peptydów kolagenowych ze skór ryb (FSCP)

Peptydy kolagenowe ze skór ryb (FSCP) zostały wyizolowane (Ko-Fwu Fishes Co.) enzymatycznie zgodnie z opatentowanym protokołem [22] (...) rozdrobniono je za pomocą dyspergatora (Kinematica, NY, USA) (...) z proteazą N 1% przez 2,5 godziny i 0,5% Flavourzyme (Novozymes, Chiba-shi, Japonia) przez kolejne 30 minut przy optymalnym pH i temperaturze (...) Następnie odwirowano je przy 12 000 g przez 20 min.

Supernatanty (FSCP) poddano liofilizacji i przechowywano w temperaturze -20°C .

2.2. Zawartość wilgoci oraz testy względnej elastyczności

Z esencji do skóry na bazie FSCP utworzono 5%, 7% i 10% roztwory FSCP. Sześćdziesiąt dwie ochotniczki z Tajwanu (w wieku od 23 do 60 lat) poddano zabiegom na twarz z wykorzystaniem esencji do skóry - dwa razy dziennie przez 30 dni. Uczestnikom badania zabroniono korzystania z innych produktów kosmetycznych podczas trwania testów. Co dwa tygodnie (w 0, 2 i 4 tygodniu) mierzono zawartość wilgoci za pomocą sondy do skóry Cutometer MAP 580 (KOKO, Leichlingen, Niemcy) w temperaturze $20-22^{\circ}\text{C}$ i wilgotności względnej 40%–60%.

2.3. Namnażanie komórek i testy uwalniania kolagenu

Około 2×10^5 komórek Detroit 551 (linia komórkowa ludzkich zarodkowych fibroblastów skóry, ATCC CCL-110) oraz komórek STO (...) nałożono na płytkę z 96 zagłębieniami i utrzymywano w pożywce o określonym składzie chemicznym (Eagle minimum essential medium - EMEM) oraz modyfikowanej pożywce Dulbecco zmodyfikowanej przez Eagle'a (Sigma, St. Louis, MO, USA) i wzbogaconej 10% surowicą płodową wołową (FBS) (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Komórki hodowano przez noc. Pożywkę odświeżono nową podwyżką zawierającą 0, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,3, 12,5, 25, 50, 100 i 200 mM FSCP; komórki inkubowano przez 48 godzin przed wykonaniem MTT i testów produkcyjnych w prokolagenie typu I. w teście MTT $100 \mu\text{l}$ roztworu MTT [a mieszanka bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT) i lipoproteiny żółtkowej (YLP) (Invitrogen, San Diego, CA, USA) w PBS] dodano do zagłębień i prowadzono reakcję przez 3 godziny w temperaturze 37°C . Zawartość płytek mieszano przez 2 min., a absorbancję zarejestrowano przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika ELISA [6]. w teście produkcji kolagenu typu I, zastosowano zestaw peptydu C prokolagenu typu I i ELISA kit (Takara Bio Inc, Otsu, Japonia). Pokrótce, $20 \mu\text{l}$ pożywki i $100 \mu\text{l}$ roztworu sprzężonego przeciwciał-POD dodawano sekwencyjnie do płytek do mikromiareczkowania i prowadzono reakcję przez 3 godziny w temperaturze 37°C . Po 4×5 min. wymywania za pomocą dostarczonego roztworu buforowego ($400 \mu\text{l}$ /zagłębienie), dodano $100 \mu\text{l}$ roztworu substratu. Po 15 min. inkubacji w temperaturze pokojowej, dodano roztwór zatrzymujący reakcję ($100 \mu\text{l}$; absorbancję zarejestrowano przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika ELISA. (...)

2.6. Efektywność przenikania przezskórnego *in vivo* peptydów FSCP znaczących FITC

(...) Zrogowaciałą warstwę naskórka poddano działaniu 10% kwasów alfa-hydroksylowych (AHAs; BIOPEUTIC, USA) przez 5 minut i oczyszczono. Na kawałki włókniny (maska kosmetyczna; Widetex Biotech Co., Tajwan) nałożono 25 μg FSCP oznaczonych FITC w jałowej wodzie dejonizowanej (100 μl). Włóknina pokrywała 1 cm^2 skóry, którą następnie pokryto 1,5 cm^2 przezroczystego plastra opatrunkowego (Tegaderm, Neuss, Niemcy). Włókninę usunięto po godzinie. Następnie tkanki skórne poddane działaniu peptydów FSCP oznaczone FITC zatopiono w O.C.T. Środek zatapiający (Sakura Finetek USA, Torrance, Kalifornia) podzielono na fragmenty grubości 10 μm . Tkanę skórną obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (BX-51, Olympus, Japonia) wyposażonym w aparat cyfrowy [24].

2.7. Model komór dyfuzyjnych Franza

(...) Zmierzono ogólną zawartość peptydów kolagenowych z roztworu receptorowego za pomocą testu BCA (Pierce, Rockford, USA). Kumulacyjna wartość przenikania (μg) = $[C (\text{ppm}) \times V_i (\text{mL})] + \sum_{n-1} (C \times V_s)$ (C = stężenie; V_i = objętość początkowa; V_s = objętość próbki). Kumulacyjna wartość przenikania ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) = kumulacyjna wartość przenikania/miara powierzchni (0,66 cm^2).

2.8. Efektywność przenikania przezskórnego peptydów FSCP znaczących FITC określona za pomocą konfokalnego mikroskopu spektralnego

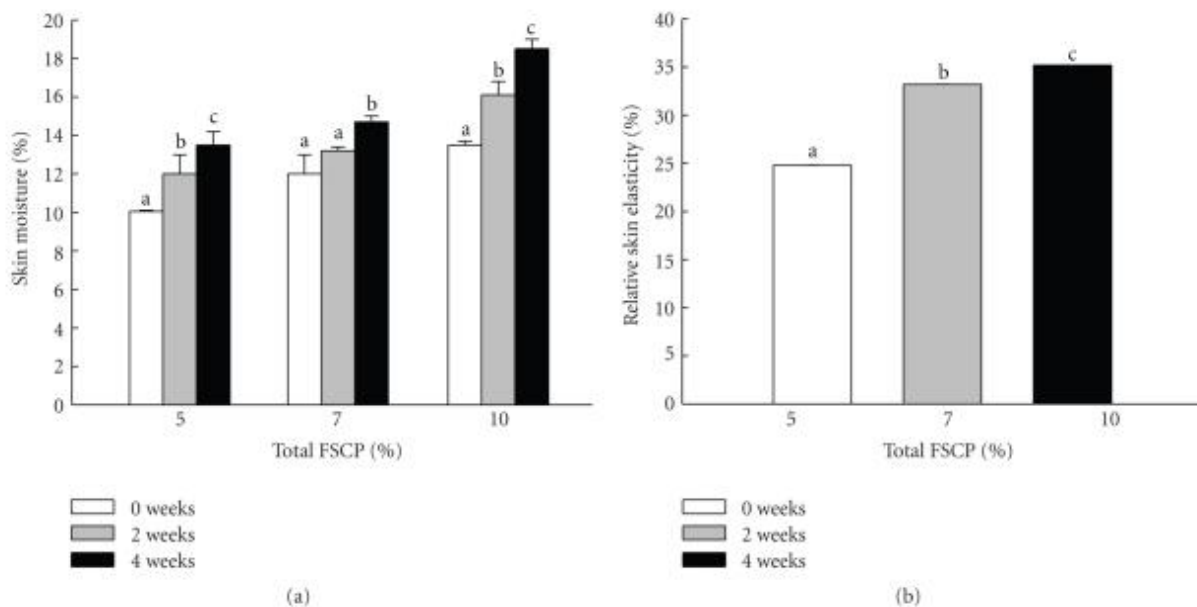
Za pomocą FITC oznaczono różne rozmiary FSCP przenikające przez skórę w modelu komory dyfuzyjnej Franza. (...) próbki obserwowano pod konfokalnym mikroskopem spektralnym (TCS SP5, Leica, Wetzlar, Germany).

3. Wyniki (fragmenty)

3.1. Wpływ FSCP na zawartość wilgoci ludzkiej skóry i względną elastyczność

Podczas gdy peptydy kolagenowe uznaje się za idealny materiał w przemyśle kosmetycznym [26], peptydy kolagenowe ze skór ryb (FSCP) nie zwróciły na siebie zbyt wiele uwagi jako ekologiczne źródło kolagenu.

w tym badaniu przeanalizowaliśmy wpływ peptydów FSCP stanowiących główny składnik esencji do skóry na zawartość wilgoci w skórze i jej względną elastyczność za pomocą standardowych sond do skóry. z esencji do skóry ludzkiej na bazie FSCP utworzono 5%, 7% i 10% roztwory FSCP. Sześćdziesiąt dwie ochotniczki z Tajwanu (w wieku od 23 do 60 lat) poddano zabiegom na twarz z wykorzystaniem esencji do skóry - dwa razy dziennie przez 30 dni. Stwierdzono, że pod wpływem wszystkich esencji FSCP zawartość wilgoci w skórze poprawiła się istotnie, jednak stopień poprawy zależał od czasu i dawki ($P \leq .05$; Rysunek 1(a)). Podobnie, stwierdzono pozytywny wpływ wszystkich esencji na bazie FSCP na względną elastyczność skóry twarzy, tak samo jak dla testu wilgotności skóry - odpowiednio o 24%, 33% i 35% ($P \leq 0,05$; Rysunek 1(b)).



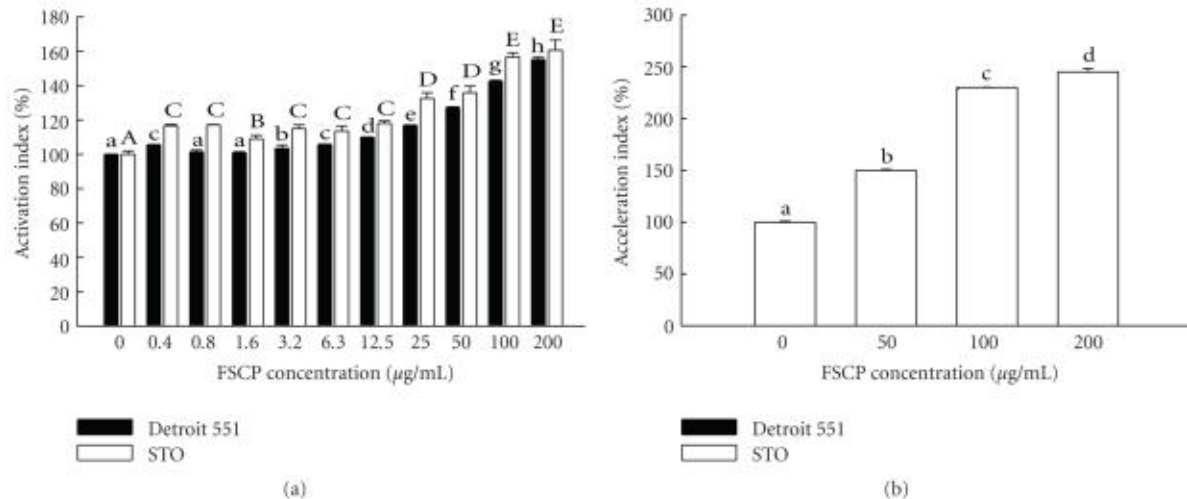
Rysunek 1

Wpływ esencji na bazie FSCP na zawartość wilgoci i względną elastyczność skóry twarzy. Zawartość wilgoci w skórze (a) i względną elastyczność skóry (b) zmierzono za pomocą profesjonalnych sond do badania skóry. Wyniki wyrażono jako średnie \pm ...

3,2. Namnażanie komórek i uwalnianie kolagenu w zarodkowych liniach fibroblastów po zabiegach FSCP

(...) Namnażanie komórek i uwalnianie prokolagenu w badanych komórkach określono odpowiednio za pomocą testów MTT i testów ELISA peptydów C prokolagenu typu I. Jak pokazano na Rysunku 2(a), FSCP (0.4–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mogą w zależności od dawki stymulować namnażanie komórek w obu typach komórek fibroblastów. Podobnie, stwierdzono syntezę prokolagenu typu I w komórkach poddanych działaniu FSCP – o natężeniu uzależnionym od stężenia FSCP (Rysunek 2(b)). w badaniach

synteza prokolagenu była najbardziej widoczna w obecności 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSCP, a jej szczytowe wartości osiągały nawet 250%. w ten sposób stwierdzono, że peptydy FSCP są zdolne do efektywnej stymulacji i indukcji namnażania komórek fibroblastów i syntezy kolagenu, poprawiając w ten sposób jakość skóry twarzy.

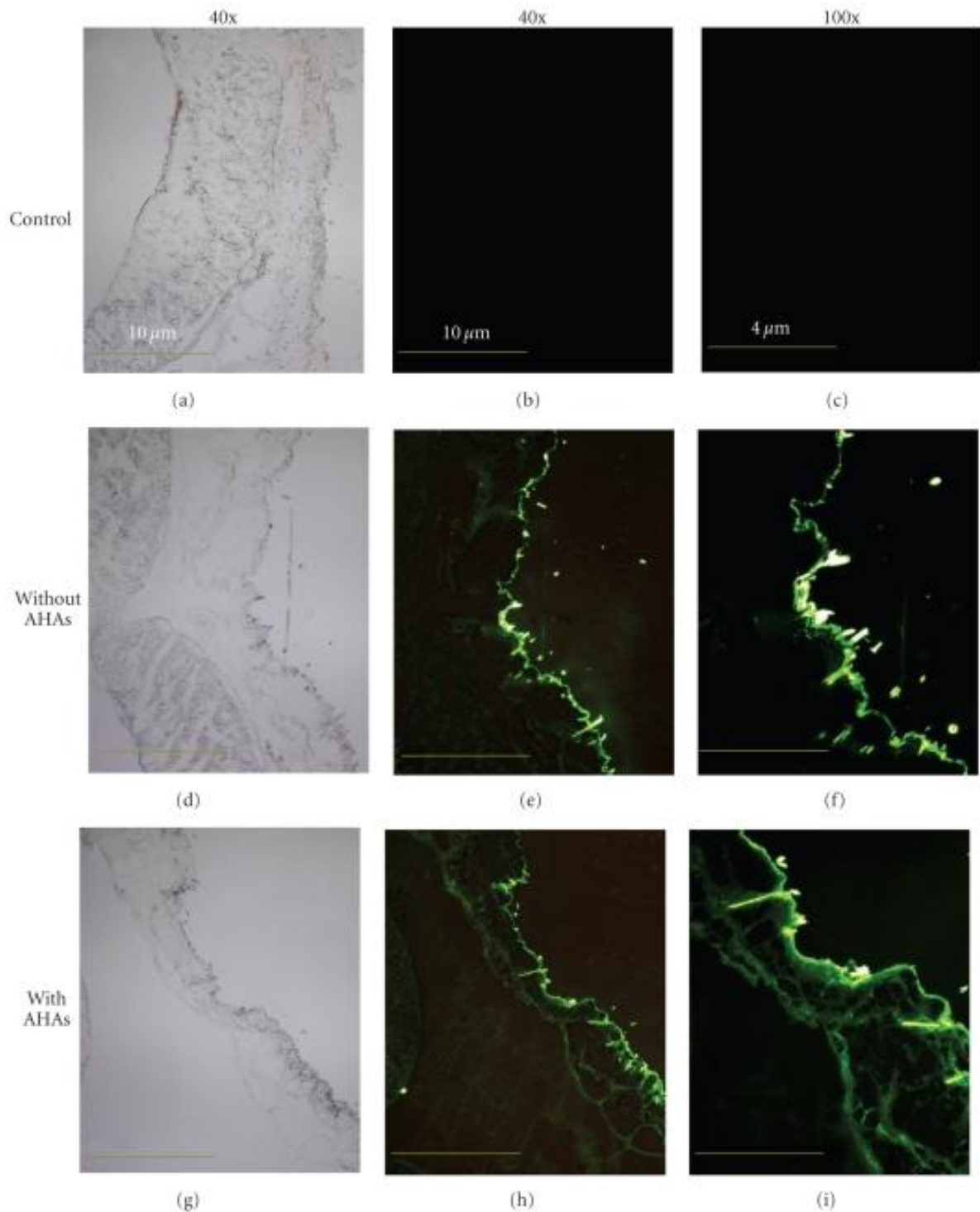


Rysunek 2

Namnażanie komórek i uwalnianie kolagenu w zarodkowych liniach fibroblastów po zabiegach FSCP Porównanie namnażania (a) i zdolności do syntezy prokolagenu (b) na komórki Detroit 551 (linia ludzkich zarodkowych fibroblastów skóry) i komórki STO .

3,3. Określenie efektywności przenikania przezskórnego *in vivo* peptydów FSCP znaczących FITC

(...) Jak widać na Rysunku 3, pozytywne sygnały FITC znajdowały się głównie w obszarze skóry powierzchniowej. Natomiast pozytywne sygnały FITC w skórze, na którą wstępnie zastosowano kwasy AHA znajdowały się głębiej i były jaśniejsze niż sygnały w przypadkach, w których nie zastosowano kwasów AHA. Pozytywne sygnały FITC stwierdzono również w mieszkach włosowych w naskórku. w ten sposób stwierdzono, że bariera zrogowaciałej warstwy naskórka jest kluczowym czynnikiem mającym wpływ na efektywność penetracji FSCP w skórze myszy. Niemniej jednak, peptydy FSCP bez wstępnego zastosowania kwasów AHA nadal charakteryzują się znacznym przenikaniem przez zrogowaciałą warstwę naskórka (...)

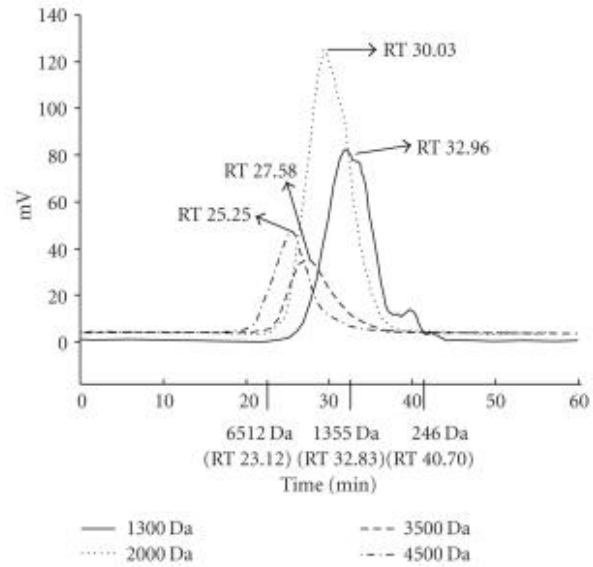
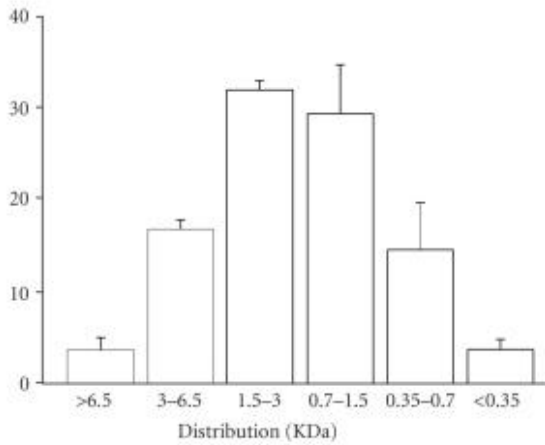


Rysunek 3

Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego peptydów FSCP skóry znaczonej FITC C3H/HeN. Zielona fluorescencja jest widoczna w obszarach mieszków włosowych i naskórka przekrojów pionowych skóry poddanej zabiegom. (a), (d) i (g) ukazują kontrasty fazowe ...

3.4. Zdolność do przenikania przezskórnego peptydów FSCP w modelu komory dyfuzyjnej Franza

Rozważyliśmy czynniki takie jak objętość cząsteczkową (MV) lub masa cząsteczkowa (MW) kolagenu może odgrywać kluczową rolę lub zdolność do przenikania podczas stosowania miejscowego. Określono wpływ wielkości komórki FSCP za pomocą modelu komory dyfuzyjnej Franza. Produkty hydrolizy skór rybich najpierw poddano chromatografii żelowej (kolumny peptydowe Superdex 10/300 GL), a następnie podzielono je według wielkości komórek. Jak pokazano na Rysunku 4(a), eluowane peptydy zebrano w sześciu frakcjach, >6,5 KDa (3,65%), 3–6,5 KDa (16,8%), 1,5–3,0 KDa (32,0%), 0,7–1,5 KDa (29,3%), 0,35–0,7 KDa (14,6%) i <0,35 KDa (3,7%). Następnie, te frakcje peptydów poddano ultrafiltracji za pomocą odpowiedniej membrany (5, 3, 1 i 0.5 kDa), dzieląc je na cztery grupy I–IV (Mw = 3–5, 1–3, 1–0,5 i <0,5 KDa) o średniej masie cząsteczkowej odpowiednio 4500, 3500, 2000 i 1300 Da, (Rysunek 4(b)). Te peptydy kolagenowe porównano ze standardowymi markerami za pomocą chromatografii żelowej (kolumna Sp-Sephadex C-25). Jak pokazano na Rysunku 5, stwierdzono, że wszystkie grupy posiadają zdolność przenikania skóry w komorze dyfuzyjnej Franza, jednak w różnym zakresie i czasie. Reasumując, grupy I i II charakteryzowały się względnie lepszą zdolnością do przenikania przezskórnego w ciągu pierwszych 4 godzin. Najwyższe kumulacyjne wartości przenikania dla grupy I i II po 24 godzinach wynosiły odpowiednio $1825,17 \pm 495,66$ i $1986,43 \pm 671,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Natomiast, mieszanka FSCP (wszystkie FSCP bez podziału według wielkości) wykazywały najniższą zdolność do przenikania przezskórnego ($1010 \pm 583,34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Rysunek 5).

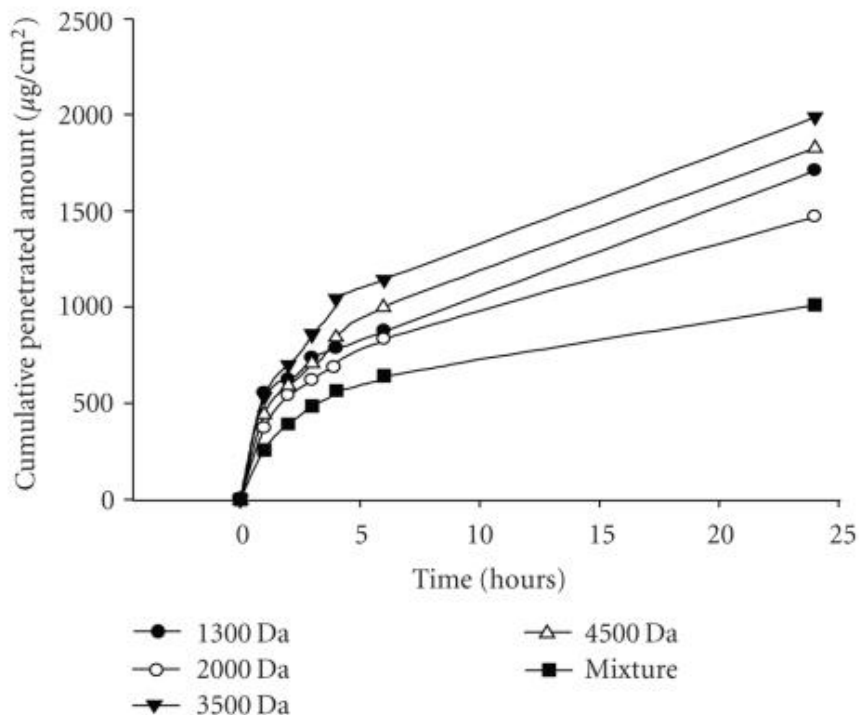


(a)

(b)

Rysunek 4

Dystrybucja FSCP według wielkości (a) Materiał badany oddzielono za pomocą chromatografii żelowej (kolumny peptydowe Superdex 10/300 GL); dla każdej frakcji określono wielkość cząsteczek; dystrybucję FSCP odpowiednio naniesiono na wykres. Dystrybucja według wielkości (KDa) ...

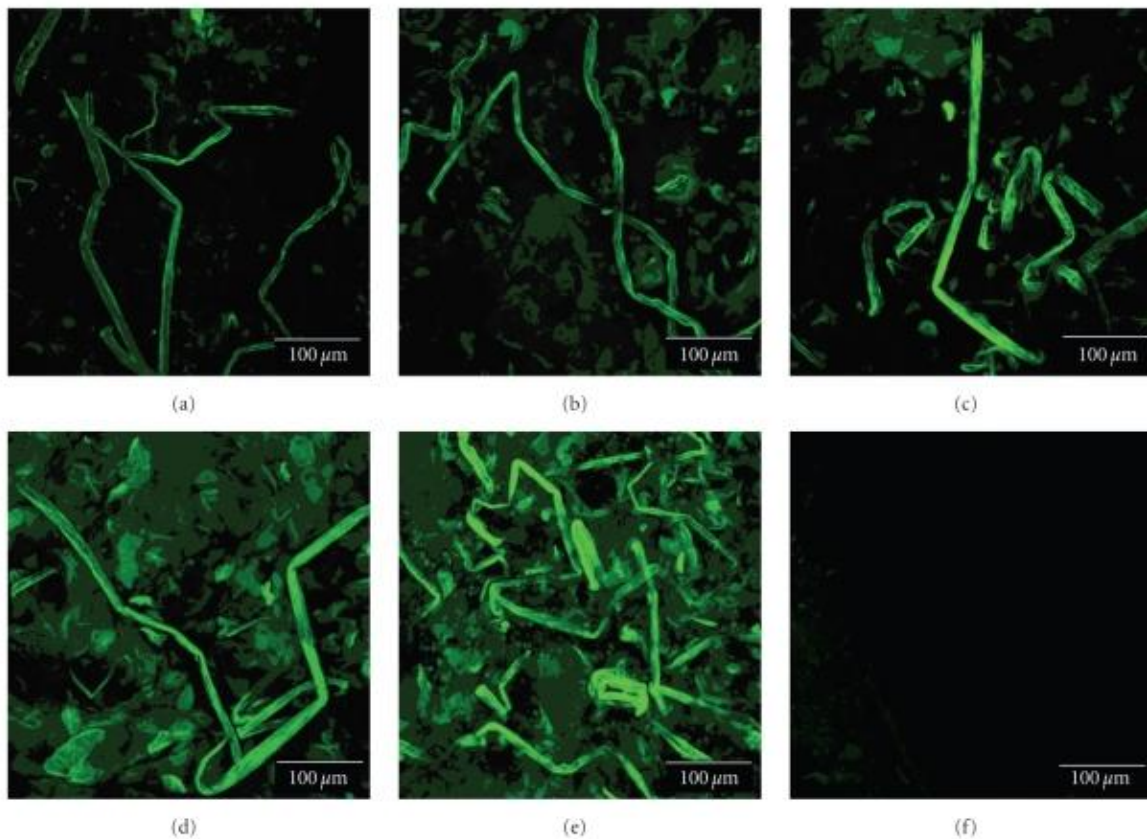


Rysunek 5

Zdolność do przenikania przezskórnego frakcji FSCP. Zdolność do przenikania różnych wielkości cząsteczkowych FSCP określono za pomocą komory dyfuzyjnej Franza, przeprowadzając po 1, 2, 3, 4, 6 i 24 godzinach testy ilości ogólnych peptydów kolagenowych.

3.5. Głębokość przenikania przezskórnego i konformacja peptydów w skórze

W celu zbadania głębokości przenikania i konformacji peptydów dla danej grupy FSCP, każdą grupę oznaczono najpierw FITC i nałożono na skórę w komorze dyfuzyjnej Fraza na 1 godzinę. Ze skórą, na którą nałożono FSCP oznaczone FITC postępowano w sposób opisany w poprzednim punkcie. Co ciekawe, grupa I (Rysunek 6(d)) and II (Rysunek 6(c)) miały budowę spiralną w naskórku w przeciwieństwie do grupy III (Rysunek 6(b)) i IV (Rysunek 6(a)), które były mniej skręcone lub miały budowę liniową. Natomiast, wymieszana grupa peptydów FSCP nie miała określonej struktury (Rysunek 6(e)). Głębokość penetracji dla każdej grupy FSCP również zmierzono pod konfokalnym mikroskopem spektralnym. Odległości pomiędzy grupami IV–I a mieszaniną wynosiły odpowiednio 21,21, 21,44, 28,72, 27,73 i 14,58 μm . Cięższe FSCP charakteryzowały się głębszym przenikaniem niż lżejsze FSCP (...). Budowa spiralna łańcuchów peptydowych zdaje się sprzyjać transdermalności .



Rysunek 6

Konformacje peptydów o różnej wielkości z FSCP oznaczonych FITC.

4. Dyskusja (fragmenty)

W wielu publikacjach wskazywano wszechstronne zastosowania kolagenu w przemyśle kosmetycznym [13]. Proteiny z rybich skór są idealnym źródłem kolagenu, gdyż są relatywnie tanie, posiadają wysoką zawartość kolagenu i są ekologiczne [25, 26]. Należy pamiętać że to kolagen jest kluczowym składnikiem utrzymującym elastyczność skóry. Zmniejszenie zawartości kolagenu w skórze powoduje powstawanie zmarszczek i jej wiotczenie [27]. w tym artykule ukazaliśmy, że esencje do skóry na bazie FCSP mają korzystny wpływ na zwiększenie zawartości wilgoci w skórze. (Rysunek 1). FCSP o 200 µg/mL miało najlepszy skutek, wykazując namnażanie zarodkowych komórek fibroblastów (komórki Detroit 551 i komórki STO) i syntezę prokolagenu. Te wyniki potwierdzają badania Katayamy i in., w których wykazano, że pentapeptydy kolagenu typu i promują produkcję macierzy pozakomórkowej w fibroblastach [28, 29].

Ze względu na fakt, że zrogowaciała warstwa naskórka pełni funkcję bariery fizycznej [19, 20], ma ona wpływ na efektywność przenikania esencji na bazie FSCP, gdyż ich obecność stwierdzono głównie w powierzchniowej warstwie naskórka. Jednak **peptydy FSCP oznakowane FITC skutecznie przenikały przez zrogowaciałą warstwę naskórka do naskórka i skóry właściwej** (...) Doniesienia Potts i Guya są zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu - w swoich badaniach badacze ci zaproponowali, że dyfuzyjność leku w skórze jest skorelowana z cechami cząsteczkowymi danego leku [30, 31]; chociaż Lin i in. [32] stwierdzili, że wpływ lipofilności w pasywnym przenikaniu dyfuzyjnym jest czynnikiem dominującym, oprócz wagi cząsteczkowej związku. Potts i Guy zaproponowali również przyjęcie, że większa masa cząsteczkowa odpowiada większej lipofilności/przenikalności [30]. (...) Co więcej, kolageny typowo występują w strukturze potrójnej helisy, w której sekwencja tworząca helisę Gly-X-Y powtarza się na długości 300 nm, co odpowiada ok. 1000 aminokwasów w kolagenach tworzących mikrowłókna (I, II, III) [33–36]. Kolageny z rybich skór znajdują się w grupie kolagenu typu I [26]. w ten sposób, większą efektywność penetracji FSCPs przy 3500 i 4500 Da można przypisać synergicznemu efektowi wysokiej lipofilności (odpowiednia wielkość) i cech strukturalnych.

Reasumując, wykazano, że przygotowane peptydy FSCP **są w stanie efektywnie przenikać przez zrogowaciałą warstwę naskórka do jego głębszych warstw i dalej - do skóry właściwej.** FSCP

w naskórku i skórze właściwej są w stanie aktywować fibroblasty i przyspieszyć syntezę kolagenu, w ten sposób istotnie poprawiając cechy skóry (zawartość wilgoci i elastyczność względną). w rezultacie, przygotowane FSCP wraz z esencją do skóry powinny spotkać z dużym zainteresowaniem ze strony podmiotów komercyjnych. Warto również przeprowadzić dodatkowe dokładne badania mające na celu zwiększenie zdolności przenikania przezskórnego.

Bibliografia

1. Nagai T, Araki Y, Suzuki N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) *Food Chemistry*. 2002;78(2):173-177.
2. Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. *Current Opinion in Cell Biology*. 1993;5(5):883-890. [[PubMed](#)]
3. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB Journal*. 1991;5(13):2814-2823. [[PubMed](#)]
4. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*. 2006;34(10, supplement 1):98-110.
5. Svoboda KKH, Fischman DA, Gordon MK. Embryonic chick corneal epithelium: a model system for exploring cell-matrix interactions. *Developmental Dynamics*. 2008;237(10):2667-2675. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
6. Lee J, Jung E, Lee J, et al. Panax ginseng induces human type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;109(1):29-34. [[PubMed](#)]
7. Wu J, Fujioka M, Sugimoto K, Mu G, Ishimi Y. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2004;22(6):547-553. [[PubMed](#)]
8. Koyama Y-I, Hirota A, Mori H, et al. Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2001;47(1):84-86. [[PubMed](#)]
9. Moskowicz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2000;30(2):87-99. [[PubMed](#)]
10. Scala J, Hollies NRS, Sucher KP. Effect of daily gelatine ingestion on human scalp hair. *Nutrition Reports International*. 1976;13(6):579-592.
11. Tyson TL. The effect of gelatin on fragile fingernails. *Journal of Investigative Dermatology*. 1950;14:323-325. [[PubMed](#)]
12. Minaguchi J, Koyama Y-I, Meguri N, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in Achilles tendon. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2005;51(3):169-174. [[PubMed](#)]
13. Matsuda N, Koyama Y-I, Hosaka Y, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2006;52(3):211-215. [[PubMed](#)]
14. Ogawa M, Portier RJ, Moody MW, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*) *Food Chemistry*. 2004;88(4):495-501.
15. Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) *Food Chemistry*. 2005;93(3):475-484.
16. Sadowska M, Kołodziejska I, Niecikowska C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) *Food Chemistry*. 2003;81(2):257-262.
17. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) *Food Chemistry*. 2005;89(3):363-372.

18. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(12):1531-1546. [[PubMed](#)]
19. Elias PM, Choi EH. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Experimental Dermatology*. 2005;14(10):719-726. [[PubMed](#)]
20. Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005;125(2):183-200. [[PubMed](#)]
21. Baert B, Deconinck E, Gele MV, et al. Transdermal penetration behaviour of drugs: CART-clustering, QSPR and selection of model compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007;15(22):6943-6955. [[PubMed](#)]
22. Wu CH, Chai HJ. Collagen of fish scale and method of macking thereof. Taiwan Invention patent publication number i 263678, 2006.
23. Ma Z, Lim L-Y. Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(11):1812-1819. [[PubMed](#)]
24. Russell TD, Fischer A, Beeman NE, Freed EF, Neville MC, Schaack J. Transduction of the mammary epithelium with adenovirus vectors in vivo. *Journal of Virology*. 2003;77(10):5801-5809. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim N, El-Kattan AF, Asbill CS, et al. Evaluation of derivatives of 3-(2-oxo-1-pyrrolidine) hexahydro-1H-azepine-2-one as dermal penetration enhancers: side chain length variation and molecular modeling. *Journal of Controlled Release*. 2001;73(2-3):183-196. [[PubMed](#)]
26. Wang L, An X, Yang F, Xin Z, Zhao L, Hu Q. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*) *Food Chemistry*. 2008;108(2):616-623.
27. Tanaka H, Hasegawa S. Skin permeable collagen peptide preventing wrinkle formation induced by photoaging. *Biotechnology Industrial*. 2005;22(9):18-23.
28. Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF. Cleavage of type i procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptid. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(11):7127-7131. [[PubMed](#)]
29. Katayama K, Armendariz-Borunda J, Raghov R, Kang AH, Seyer JM. a pentapeptide from type i procollagen promotes extracellular matrix production. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(14):9941-9944. [[PubMed](#)]
30. Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharmaceutical Research*. 1992;9(5):663-669. [[PubMed](#)]
31. Guy RH, Potts RO. Structure-permeability relationships in percutaneous penetration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1992;81(6):603-604. [[PubMed](#)]
32. Lin R-Y, Hsu C-W, Chen W-Y. a method to predict the transdermal permeability of amino acids and dipeptides through porcine skin. *Journal of Controlled Release*. 1996;38(2-3):229-234.
33. Kuhn K. The collagen family-variations in the molecular and supermolecular structure. *Rheumatology*. 1986;10:29-69.
34. Piez KA. Molecular and aggregate structure of the collagens. In: Pietz KA, Reddi H, editors. *Extracellular Matrix Biology*. New York, NY, USA: Elsevier; 1984. pp. 1-39.
35. Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. In: Comper WD, editor. *Extracellular Matrix*. Melbourne, Australia: Harwood; 1996. pp. 22-67.
36. Von der Mark K. Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. New York, NY, USA: Elsevier; 1999. pp. 3-29.