

FRI-216-1-NMTS(S)-02

COLLAGEN - STRUCTURE, PURIFICATION AND APPLICATION. CLINICAL TRIALS WITH COLLAGEN¹⁰³

Student Marina Petkova

Department of Medical faculty
University "Prof. dr Assen Zlatarov"
Tel: 0885442050
E-mail: donna3ve33da@abv.bg

Assistant professor Marina Yaneva

Department of Medical faculty
University "Prof. dr Assen Zlatarov"
Tel: 0885236068
E-mail: marinayaneva@abv.bg

Assistant professor Tanya Tsaneva

Department of Technical science
University "Prof. dr Assen Zlatarov"
Tel: 0886812319
E-mail: tanq.tsaneva@abv.bg

Abstract: Collagen is a major structural protein in our tissues. The word has a Greek origin "kolla", which means "glue". Found in skin, hair, nails, tendons, cartilage and bones. It is one of the main components of the extracellular matrix of the dermis and articular cartilage and affects the mechanical, organizational and tissue properties of the body. It helps to preserve the integrity of the skin and its elasticity. But as we age, we produce less collagen. This contributes to the skin looking less elastic and sometimes even sagging and contributes to the formation of wrinkles more easily. Aging is closely related to the breakdown of collagen, which affects the structure and strength of muscles, joints, bones and skin. Continuous aging of the skin is a natural process that is influenced by external factors such as exposure to ultraviolet rays, dietary habits, smoking and cosmetic additives. Collagen supplementation has become increasingly popular in recent years, with claims that it can improve the health of nails, skin and hair. Collagen sources, extraction techniques, structure and properties in recent decades help to develop more collagen-based products and biomaterials for tissue engineering.

Keywords: collagen extraction, application, sources, wound treatment

ВЪВЕДЕНИЕ

Източниците на колаген, техниките за извличане, структурата и свойствата през последните десетилетия помагат за разработването на повече продукти на базата на колаген и биоматериали за тъканно инженерство. Продуктите с колаген играят важна роля за подобряване на здравето на човешкото тяло, регенерация на кожата, заздравяване на рани и други. Колагенът представлява структурен протеин, който има ключова роля във формирането на съединителната тъкан в човешкото тяло. Той е най-разпространеният протеин при бозайниците, основен компонент на съединителната тъкан, представляващ около 25% от общото протеиново съдържание. Той образува структурния компонент на съединителната тъкан като сухожилия, кости, зъби и стави. Съдържа 19 аминокиселини, включително 8 незаменими аминокиселини: изолевцин, левцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин и валин. Поддръждането на колагеновите влакна варира в зависимост

¹⁰³ Докладът е представен пред секция "Природоматематически и технически науки" на 63-тата научна конференция на Русенския университет „Ангел Кънчев“ и Съюза на учените-Русе на 18 октомври 2024 година с оригинално заглавие на български език: КОЛАГЕН - СТРУКТУРА, ПРЕЧИСТВАНЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ. КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ С КОЛАГЕНА.

от тъканта, от която се извлича. Сухожилните влакна са подредени в успоредни снопчета, докато кожните влакна са разпръснати по цялата повърхност (Shin, J.W., Kwon S. H., Choi, J.Y., Na, J. I., Huh, C. H., Choi, H. R., & Park, K. C., 2019).

ИЗЛОЖЕНИЕ

Колагенът представлява дясна тройна спирала (right-handed triple helix), изградена от три идентични полипептидни вериги. Всяка верига има около 1000 аминокиселини (Potti, R.& Fahad, M., 2017). Колагенът е способен да изрази голяма якост на опън и да се организира в неразтворими влакна. Колагенът се синтезира като отделна полипептидна верига от епителните клетки и фибробластните клетки (Gnanamani, A., Shanmugavel, M., Ghosh, P., & Radhakrishnan R., 2020). Проколагените са молекули с тройна спирала, които включват глобуларни домени в техните крайни краища. Тези глобуларни домени се отцепват от тройната спирала, за да осигурят полимеризирана структура, която се нарича тропоколаген. Тропоколагенът действа като основна единица на колагена и се стабилизира чрез електростатични и хидрофобни взаимодействия (Potti, R.& Fahad, M., 2017).

Наричан „скелета на живота“, колагенът е семейство протеини, състоящи се от над 28 различни вида, а не от един протеин (Hulmes, D. J. S. 2008). Всяка разновидност показва различни анатомични и функционални характеристики, старателно изработени, за да изпълняват различни функции в сложната мозайка от човешки тъкани.

Изключително важно е да се разбере, че видът на извлечения колаген има значително влияние върху неговия функционален потенциал. Всеки тип колаген има специфична функционална специализация, определена от неговата уникална аминокиселинна, последователност и пост-транслационни модификации. Колагенът има активна роля в заздравяването на рани отвъд своята структурна функция, като действа като скеле за регенерация на тъкани и на образуваните белези.

Като източници на колаген могат да се посочат различни видове, птици, риби, морски животни, насекоми и бозайници (Silvipriya, K. S., Kumar, K. K., Bhat, A. R., Kumar, B. D., & John, A., 2015). Въпреки това, с напредъка на технологиите, колагенът може да бъде получен от рекомбинантни системи за производство на протеини (Rodriguez, A., Rodriguez, M. I., Barroso, L. G., & Sanchez, M. L., 2018).

Говеда

Кожата и костите на кравите се използват широко в индустриите, свързани с говеждо месо, като значителен източник на колаген (Rittié, L., 2017). Количеството колаген, получено по време на процесът на екстракция се различава въз основа на възрастта на говеждата тъкан, с по-младите тъкани, които произвеждат повече значително количество колаген. Освен това термичната стабилност и механичната сила на колагените, произведени от говеждо, са по-високи, отколкото тези от други източници, като например морски продукт. Установено е, че 3% от хората са показали, че са алергични към колаген от говеда (Badnjevic, A., Škrbić, P., & Pokvić, L. G., 2019).

Свине

Кости и кожа на свинете са широко използвани в индустрията за екстракция на колаген (Silvipriya, K. S., Kumar, K. K., Bhat, A. R., Kumar, B. D., & John, A., 2015). Много характеристики на свински колаген, като например механична сила, термичен стабилност, съотношение на подуване и др. са подобни на тези на говеждо колаген. Свинският колаген наподобява колагена, открит при хората (Badnjevic, A., Škrbić, P., & Pokvić, L. G., 2019), което го прави изключително рентабилен вариант като източник на колаген (Rittié, L., 2017). Освен това е доказано, че колагенът, генериран от свине, намалява бръчките и акне, без да причинява никакви негативни странични ефекти.

Водни източници

Основните източници на колаген са сухоземните животни, но производството и добивът са сложни, отнема много време и са скъпи. Проучена е възможността гръбначни и

безгръбначни водни същества да бъдат използвани като източници на колаген. Гръбначните са риби и бозайници, живеещи във водата. От гръбначните животни най-често използваният източник е рибата. Сред всички рибни продукти кожата се счита за най-добрият ресурс (Maschmeyer, T., Luque, R., & Selva, M., 2020). Към безгръбначните спадът медузи, гъба, морска звезда, морски таралеж, мекотели и т.н. (Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., & Wahid, F., 2021).

Насекоми

Все по-широкото използване на колаген, опасенията от различни заболявания, както и недостатъчност на ресурсите извеждат на дневен ред нови устойчиви алтернативни ресурси (Maschmeyer, T., Luque, R., & Selva, M., 2020). В този контекст, като нови източници на колаген, се разработват рекомбинантни колагени (Morikawa, T., Reátegui-Pinedo, N., Salirrosas, D., Sánchez-Tuesta, L., Quiñones, C., Jáuregui-Rosas, S. R., Barraza, G., Cabrera, A., Ayala-Jara, C., Miliani-Martinez, R., Baby, A. R., & Prieto, Z. A., 2022).

Интересът към ядливите насекоми се увеличава от година на година (Prajaputra, V., Isnaini, N., Maryam, S., Ernawati, E., Deliana, F., Haridhi, H. A., Fadli, N., Karina, S., Agustina, S., Nurfadillah, N., Arisa, I. I., Desiyana, L. S., & Bakri, T. K., 2024). Насекомите в световен мащаб се консумират като част от редовната диета, варираща от скакалци и копринени буби в Тайланд до насекоми в Южна Корея (Fu, C., Shi, S., Wei, N., Fan, Y., Gu, H., Liu, P., & Xiao, J., 2023). Въпреки положителни ефекти обаче, недостатъците на рекомбинантните технологии, като високи разходи, ниска ефективност и други, причиняват производството на синтетичен колаген да остане на заден фон (Rodríguez, A. M. I., Barroso, R. L. G., & Sánchez, M. L., 2018).

Методи за извличане

Традиционни техники

Екстракцията на колаген се състои от предварителна обработка и екстракция, като основни етапи. Изборът на предварителна обработка е важна стъпка за елиминиране на примесите, за да се подобри качеството на колагена. Предварителните обработки са киселинни, основни и ензими. Целта на предварителната обработка е да се дисоциират ковалентните междумолекулни напречни връзки, които свързват заедно молекулите на колагена.

Обработка с физиологичен разтвор

Неутралните солни разтвори (фосфати, цитрати, натриев хлорид и Tris-HCl) могат да разтворят колагена (Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., & Wahid, F., 2021). Разтвор на натриев хлорид (NaCl) може да се използва за извличане на колаген от източници на морски дарове. Екстракцията със соли се нуждае от внимателен контрол, поради ограниченията на концентрацията на сол. (Del Mastro, N. L., 2021)

Нови технологии

Екстракция с дълбок евтектичен разтворител (DES).

Дълбоките евтектични разтворители (DES) се появиха като устойчива и екологична алтернатива на традиционните органични разтворители. DES са вид йонна течност, образувана от комбинацията на акцептор на водородна връзка, като кватернерна амониева сол и донор на водородна връзка, като карбоксилна киселина или амин (Meyer-Rochow, V. B., & Jung, C. 2020). Тези разтворители са били използвани при извличането на широка гама биоактивни съединения от естествени източници поради тяхната ниска токсичност, биоразградимост и способност да разтварят различни съединения (Hernández-Aguirre, O. A., Muro, C., Hernández-Acosta, E., Alvarado, Y., & Díaz-Nava, M. D. C., 2021).

Суперкритична флуидна екстракция (SFE)

Суперкритичната флуидна екстракция (SFE) се очертава, като широко възприет екологичен метод за извличане на химически съединения (Thirukumaran, R., Anu Priya, V. K., Krishnamoorthy, S., Ramakrishnan, P., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C., 2022). Този метод разделя един компонент от друг, използвайки суперкритична течност, като

екстрахиращ разтворител. Суперкритичните течности са вещества, които се поддържат при температура и налягане над тяхната критична точка, което води до уникални свойства на разтворител.

Екструзия и екстракция с помощта на ултразвук

Екструзионната технология е един от важните методи в производството на храни и методите за екстракция. Основната предпоставка включва инжектиране под налягане на съставките в цилиндричен контейнер (Bai, M.Y.; Ku, F.Y.; Shyu, J.F.; Hayashi, T.; & Wu, C.C., 2021). Използването на тази технология предлага значителни предимства по отношение на спестяване на пространство и енергия в сравнение с конвенционалните методи, а освен това, всички параметри на процеса могат да бъдат регулирани (Choton, S., Gupta, N., Bandral, J. D., Anjum, N., & Choudary, A., 2020).

Третиране на рани

Екстрацелуларният матрикс, включват фиброзни компоненти (напр. колагени и еластини) и гликопротеинови компоненти (напр. фибронектин, протеогликани и ламинини). Всяка от тези молекули взаимодейства, за да управлява процеса на тъканна функция, растеж и възстановяване. Възстановяването на рани е сложен процес, включващ четири фази, които протичат във времева последователност, но се припокриват: хемостаза, възпаление, пролиферация (клетъчна инфилтрация, ангиогенеза и повторна епителизация) и узряване/ремоделиране.

Видът, количеството и организацията на колагена се променя в заздравяващата рана и определя якостта на опън на заздравялата кожа.

Тъй като колагенът е важен регулатор на няколко от тези процеси, той се използва като допълнителна терапия за рани за насърчаване на заздравяването. Биосъвместимост, ниска имуногенност, способност за набиране на реагиращи на заздравяването на рани клетки (макрофаги, фибробласти и т.н.) и лекота на приложение са някои от причините, поради които биоматериалите на базата на колаген се използват за превръзки на рани. Стандартните източници на колаген обикновено са от говежди, конски, птичи или свински произход (Cruz, M.A.; Araujo, T.A.; Avanzi, I.R.; Parisi, J.R.; de Andrade, A.L.M. & Rennó, A.C.M. 2021).

Има значителни недостатъци: развитие на алергични реакции, предаване на прионовите заболявания (напр. спонгиформна енцефалопатия по говедата) и микробно замърсяване и други (Silva, T.H.; Moreira-Silva, J.; Marques, A.L.; Domingues, A.; Bayon, Y. & Reis, R.L., 2014; Ehterami, A.; Salehi, M.; Farzamfar, S.; Vaez, A.; Samadian, H.; Sahraeypour, H.; Mirzaei, M.; Ghorbani, S.; & Goodarzi, A., 2018), религиозни ограничения, свързани с използването на говежди и свински тъкани. Поради това са разгледани алтернативни естествени (морски) или създадени (рекомбинантен човешки колаген от бактериален или растителен материал) източници на колаген.

Колагеновите превръзки за рани съдържат колаген, смесен с естествени и синтетични полимери като полиетилен оксид, поли (L-млечна киселина), хиалуронова киселина, еластин и копринен фиброин, алгинат, хитозан и др. Тези смесени изделия включват други добавки като инсулин (Silva, T.H.; Moreira-Silva, J.; Marques, A.L.; Domingues, A.; Bayon, Y. & Reis, R.L., 2014), (C. Silver), антибиотици (Bai, M.Y.; Ku, F.Y.; Shyu, J.F.; Hayashi, T.; & Wu, C.C., 2021) или златни наночастици и са тествани предимно в *in vitro* проучвания или малки животински модели на заздравяване на рани. Постигнати са много положителни резултати, но все още не така убедителни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Колагенът е най-разпространеният протеин в човешкото тяло. Загубата или дефектът на колаген може да причини стареене на кожата и други заболявания. Лечението с колаген води до ефективни подобрения в хидратацията, еластичността, стегнатост и блясък на кожата, намаляване на бръчките както и до лечението на кожни проблеми. Източниците на колаген могат да бъдат различни и разнообразни (насекоми, водни обитатели, бозайници). Методите и техниките за изолиране и пречистване на колаген, също могат да бъдат различни в

зависимост от съответният източник. Изолиране и пречистване на колаген позволяват получаването на високо чисти и активни форми на протеина. Третирането на рани с колагенови продукти предоставя редица предимства, включително намаляване на времето за възстановяване, подобряване на качеството на зарастването и намаляване на риска от инфекции. Благодарение на всичко изброено до тук, а и на направените предклинични и клинични проучвания, водят до доказване на безопасността и ефикасността на използването му. В заключение, интегрирането на колаген в лечението на рани представлява иновация с значителен потенциал за подобряване на медицинските резултати и качеството на живот на пациентите.

REFERENCES

- Badnjevic, A., Škrbić, P., & Pokvić, L. G. (2019). Recent advancements and implications in the delivery of collagen. *In IFMBE Proceedings Book Series; Madjarevic, REd.; Springer: Berlin, Germany*, 250–257
- Bai, M.Y.; Ku, F.Y.; Shyu, J.F.; Hayashi, T.; & Wu, C.C. (2021) Evaluation of Polyacrylonitrile Nonwoven Mats and Silver-Gold Bimetallic Nanoparticle-Decorated Nonwoven Mats for Potential Promotion of Wound Healing In Vitro and In Vivo and Bone Growth In Vitro. *Polymers*, 13, 516.
- C. Silver sulfadiazine-loaded electrospun ethyl cellulose/poly(lactic acid)/collagen nanofibrous mats with antibacterial properties for wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.*, 162, 1555–1565.
- Choton, S., Gupta, N., Bandral, J. D., Anjum, N., & Choudary, A. (2020). Extrusion technology and its application in food processing: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 9(2), 162–168.
- Cruz, M.A.; Araujo, T.A.; Avanzi, I.R.; Parisi, J.R.; de Andrade, A.L.M. & Rennó, A.C.M. (2021) Collagen from Marine Sources and Skin Wound Healing in Animal Experimental Studies: A Systematic Review. *Mar. Biotechnol.* 23, 1–11.
- Del Mastro, N. L. (2021). Evolution of the Interest on Edible Insects. *American Journal of Biological and Environmental Statistics*, 7(2), 52–56.
- Ehterami, A.; Salehi, M.; Farzamfar, S.; Vaez, A.; Samadian, H.; Sahrapeyma, H.; Mirzaei, M.; Ghorbani, S.; & Goodarzi, A. (2018) In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *Int. J. Biol. Macromol.*, 117, 601–609.
- Fu, C., Shi, S., Wei, N., Fan, Y., Gu, H., Liu, P., & Xiao, J. (2023). Biocompatible triple-helical recombinant collagen dressings for accelerated wound healing in microneedle-injured and photodamaged skin. *Cosmetics*, 10(1), 31.
- Gnanamani, A., Shanmugavel, M., Ghosh, P., & Radhakrishnan R. (2020) Poultry spent wastes: an emerging trend in collagen mining, *Adv. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 26–35.
- Hernández-Aguirre, O. A., Muro, C., Hernández-Acosta, E., Alvarado, Y., & Díaz-Nava, M. D. C. (2021). Extraction and stabilization of betalains from beetroot (*Beta vulgaris*) wastes using deep eutectic solvents. *Molecules*, 26(21), 6342.
- Hulmes, D. J. S. (2008) Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In P. Fratzl (Ed.), *Collagen: Structure and Mechanics*, (pp. 15-47).
- Maschmeyer, T., Luque, R., & Selva, M. (2020). Upgrading of marine (fish and crustaceans) biowaste for high added-value molecules and bio(nano)-materials. *Chemical Society Reviews*, 49(13), 4527–4563.
- Meyer-Rochow, V. B., & Jung, C. (2020). Insects Used as Food and Feed: Isn't That What We All Need Foods, 9(8), 1003.
- Morikawa, T., Reátegui-Pinedo, N., Salirrosas, D., Sánchez-Tuesta, L., Quiñones, C., Jáuregui-Rosas, S. R., Barraza, G., Cabrera, A., Ayala-Jara, C., Miliani-Martinez, R., Baby, A. R., & Prieto, Z. A. (2022). Characterization of collagen from three genetic lines (*Gray, Red and F1*) of *Oreochromis niloticus* (*Tilapia*) skin in young and old adults. *Molecules*, 27(3), 1123.

Potti, R. & Fahad, M. (2017) Extraction and characterization of collagen from broiler chicken feet (*Gallus gallus domesticus*) - biomolecules from poultry waste, *J. Pure Appl. Microbiol.* 11 315–322.

Prajaputra, V., Isnaini, N., Maryam, S., Ernawati, E., Deliana, F., Haridhi, H. A., Fadli, N., Karina, S., Agustina, S., Nurfadillah, N., Arisa, I. I., Desiyana, L. S., & Bakri, T. K. (2024). Exploring marine collagen: Sustainable sourcing, extraction methods, and cosmetic applications. *South African Journal of Chemical Engineering*, 47, 197–211.

Rittié, L. (2017). Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. In: Rittié, L. (eds) *Fibrosis. Methods in Molecular Biology*, vol 1627. Humana Press, New York, NY.

Rodriguez, A., Rodriguez, M. I., Barroso, L. G., & Sanchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(1), 20–26.

Shin, J.W., Kwon S. H., Choi, J.Y., Na, J. I., Huh, C. H., Choi, H. R., & Park, K. C. (2019) Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mol Sci.*; 20.

Silva, T.H.; Moreira-Silva, J.; Marques, A.L.; Domingues, A.; Bayon, Y. & Reis, R.L. Marine origin collagens and its potential applications. (2014) *Mar. Drugs*, 12, 5881–5901.

Silvipriya, K. S., Kumar, K. K., Bhat, A. R., Kumar, B. D., & John, A. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 123–127.

Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., & Wahid, F. (2021). A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(6), 1027–1037.

Thirukumaran, R., Anu Priya, V. K., Krishnamoorthy, S., Ramakrishnan, P., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2022). Resource recovery from fish waste: Prospects and the usage of intensified extraction technologies. *Chemosphere*, 299, 134361.