

## Коллагеновый гидрогель защищает эпителиальные клетки кишечника от индометацин-индуцированного повреждения: результаты эксперимента in vitro

Марков П.А.<sup>1,\*</sup>, Соколов А.С.<sup>2</sup>, Артемьева И.А.<sup>2</sup>, Гильмутдинова И.Р.<sup>1</sup>,  
 Фесюн А.Д.<sup>1</sup>, Еремин П.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН», Москва, Россия

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Индометацин представляет собой производное индолуксусной кислоты и обладает противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим действием. Однако результаты многочисленных исследований показывают, что индометацин, как и многие другие нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), оказывают ингибирующее действие на жизнеспособность и функциональную активность энтероцитов. В связи с этим остается актуальным поиск новых способов снижения тяжести побочных эффектов от применения НПВП. Одним из таких подходов может быть обогащение рациона питания пациентов немедикаментозными биологически активными соединениями, в том числе белками. Однако действие пищевых белков и биологически активных пептидов на НПВП-индуцированное повреждение стенки тонкой кишки и желудка изучено недостаточно.

**ЦЕЛЬ.** Оценить способность коллагенсодержащей пищевой добавки защищать клетки эпителия двенадцатиперстной кишки человека (линия NuTu-80) от индометацин-индуцированного повреждения.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Композитный коллагенсодержащий гидрогель был предоставлен компанией ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН» (Россия) и является зарегистрированной пищевой биологически активной добавкой. В работе использовали коммерческую культуру клеток фибробластов кожи человека и клетки эпителия двенадцатиперстной кишки человека (линия NuTu-80). С использованием методов световой и люминесцентной микроскопии и методов проточной цитометрии оценивали жизнеспособность клеток кишечника и фибробластов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Установлено, что индометацин ингибирует рост клеток, вызывает апоптоз и гибель энтероцитов, а также приводит к накоплению клеток в S-фазе, что говорит о нарушении в регуляции клеточного цикла. Выявлено, что коллагеновый гидрогель предотвращает гибель клеток, вызванную индометацином, снижает количество апоптических клеток в популяции. Защитное действие коллагенового гидрогеля характеризуется нормализацией клеточного цикла энтероцитов и восстановлением их роста и пролиферативной активности.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, коллагеновый гидрогель в условиях in vitro способен снижать патогенное действие индометацина на эпителиальные клетки кишечника человека. Защитное действие коллагенового гидрогеля характеризуется сохранением жизнеспособности, ингибированием апоптических процессов, а также сохранением стабильности клеточного цикла. Полученные результаты говорят о перспективности использования пищевой добавки на основе композитного коллагенового гидрогеля в качестве профилактического средства для снижения рисков возникновения НПВП-ассоциированных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Тем не менее для подтверждения терапевтической эффективности пищевой добавки необходимо проведение дальнейших исследований, как с использованием моделирования на экспериментальных животных НПВП-ассоциированных заболеваний желудочно-кишечного тракта человека, так и клинических исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** коллагеновый гидрогель, нестероидные противовоспалительные препараты, энтероциты, NuTu-80, апоптоз, клеточный цикл.

**Для цитирования / For citation:** Марков П.А., Соколов А.С., Артемьева И.А., Гильмутдинова И.Р., Фесюн А.Д., Еремин П.С. Коллагеновый гидрогель защищает эпителиальные клетки кишечника от индометацин-индуцированного повреждения: результаты эксперимента in vitro. Вестник восстановительной медицины. 2024; 23(2):25-33. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2024-23-2-25-33> [Markov P.A., Sokolov A.S., Artemyeva I.A., Gilmutdinova I.R., Fesyun A.D., Eremin P.S. Collagen Hydrogel Protects Intestinal Epithelial Cells From Indomethacin-Induced Damage: Results of an in vitro Experiment. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2024; 23(2):25-33. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2024-23-2-25-33> (In Russ.).]

\* Для корреспонденции: Марков Павел Александрович, E-mail: [markovpa@nmicrk.ru](mailto:markovpa@nmicrk.ru), [p.a.markov@mail.ru](mailto:p.a.markov@mail.ru)

Статья получена: 01.03.2024  
Статья принята к печати: 08.04.2024  
Статья опубликована: 15.04.2024

# Collagen Hydrogel Protects Intestinal Epithelial Cells From Indomethacin-Induced Damage: Results of an in vitro Experiment

 Pavel A. Markov<sup>1,\*</sup>,  Andrey S. Sokolov<sup>2</sup>,  Irina A. Artemyeva<sup>2</sup>,  Ilmira R. Gilmutdinova<sup>1</sup>,  Anatoliy D. Fesyun<sup>1</sup>,  Petr S. Eremin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>FIRST ALIVE COLLAGEN Limited Liability Company, Moscow, Russia

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Indomethacin is a derivative of indoleacetic acid and has anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects. However, the results of numerous studies show that indomethacin, like many other nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have an inhibitory effect on the viability and functional activity of enterocytes. In this regard, the search for new ways to reduce the severity of side effects from the use of NSAIDs remains relevant. One of these approaches may be to enrich patients' diets with non-drug biologically active compounds, including proteins. However, the effect of dietary proteins and biologically active peptides on NSAID-induced damage to the wall of the small intestine and stomach has not been sufficiently studied.

**AIM.** To evaluate the ability of a collagen-containing dietary supplement to protect human duodenal epithelial cells (HuTu-80 line) from indomethacin-induced damage.

**MATERIALS AND METHODS.** The composite collagen-containing hydrogel was provided by «FIRST ALIVE COLLAGEN» LLC (Russia) and is a registered dietary supplement. The work used a commercial culture of human skin fibroblast cells and human duodenal epithelial cells (line HuTu-80). The viability of intestinal cells and fibroblasts was assessed using light and fluorescence microscopy and flow cytometry methods.

**RESULTS AND DISCUSSION.** It has been established that indomethacin inhibits cell growth, causes apoptosis and death of enterocytes, and also leads to the accumulation of cells in the S-phase, which indicates a disruption in the regulation of the cell cycle. It was revealed that collagen hydrogel prevents cell death caused by indomethacin and reduces the number of apoptotic cells in the population. The protective effect of collagen hydrogel is characterized by normalization of the cell cycle of enterocytes and restoration of their growth and proliferative activity.

**CONCLUSION.** Thus, collagen hydrogel, in vitro, is able to reduce the pathogenic effect of indomethacin on human intestinal epithelial cells. The protective effect of collagen hydrogel is characterized by maintaining viability, inhibiting apoptotic processes, and maintaining cell cycle stability. The results obtained indicate the prospects of using a dietary supplement based on a composite collagen hydrogel as a prophylactic agent to reduce the risk of NSAID-associated gastrointestinal diseases. However, to confirm the therapeutic effectiveness of the dietary supplement, further research is necessary, both using experimental animal modeling of NSAID-associated diseases of the human gastrointestinal tract, and clinical studies.

**KEYWORDS:** collagen hydrogel, non-steroidal anti-inflammatory drugs, enterocytes, HuTu-80, apoptosis, cell cycle.

**For citation:** Markov P.A., Sokolov A.S., Artemyeva I.A., Gilmutdinova I.R., Fesyun A.D., Eremin P.S. Collagen Hydrogel Protects Intestinal Epithelial Cells From Indomethacin-Induced Damage: Results of an in vitro Experiment. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2024; 23(2):25-33. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2024-23-2-25-33> (In Russ.).

\* **For correspondence:** Pavel A. Markov, E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru

**Received:** 01.03.2024

**Accepted:** 08.04.2024

**Published:** 15.04.2024

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются одними из самых популярных безрецептурных препаратов во всем мире, составляя около 5 % всех назначаемых лекарств [1]. Несмотря на широкое терапевтическое применение, НПВП обладают многочисленными побочными эффектами, наиболее распространенные из которых — воспалительные и язвенные заболевания желудочно-кишечного тракта [2, 3].

Эрозивно-язвенное действие НПВП связывают с ингибированием активности циклооксигеназ (ЦОГ-1, ЦОГ-2) и уменьшением синтеза гастропротекторных факторов (простагландина PGE2 и простацилина PGI2). Кроме того, НПВП могут вызывать гибель клеток кишечника посредством дисфункции митохондрий эн-

тероцитов и последующей индукции окислительного стресса [4].

Предлагаемые стратегии снижения побочных эффектов НПВП, как, например, повышение селективности действия [2, 3, 5], использование новых лекарственных форм [6, 7], а также комбинированного использования совместно с препаратами, снижающими секреторную активность париетальных клеток желудка [8, 9], пока мало эффективны.

В связи с этим остается актуальным поиск новых способов снижения тяжести побочных эффектов от применения НПВП. Одним из таких подходов может быть обогащение рациона питания пациентов немедикаментозными биологически активными соединениями. Согласно данным литературы, такими биологически активными соединениями, оказывающими

протекторное действие в отношении НПВП-зависимых гастро- и энтеропатий, могут быть белки пищи. Результаты ряда экспериментов, проведенных на лабораторных животных, показывают, что некоторые пищевые белки могут оказывать противовоспалительное действие и способствовать заживлению повреждений слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [10–12]. Защитное и противовоспалительное действие пищевых белков в отношении слизистой кишечника связывают с биологически активными пептидами, образующимися в кишечнике в результате ферментативного гидролиза пищевых белков [13]. Источником таких биологически активных пептидов могут быть белки: овотрансферрин [14], альфа-лактальбумин, бета-лактоглобулин, лактоферрин [15, 16], коллаген и желатин [12, 17].

Следует отметить, что большинство исследований по противовоспалительному действию пищевых белков проведено с использованием модели язвенного колита [11, 12, 18]. В то же время действие пищевых белков и биологически активных пептидов на НПВП-индуцированное повреждение стенки тонкой кишки и желудка изучено недостаточно.

Следует отметить, что среди всех пищевых белков, обладающих противовоспалительным действием, исследование защитного действия коллагена в отношении НПВП-индуцированных гастро- и энтеропатий имеет свои преимущества, поскольку как НПВП, так и пищевые добавки на основе коллагена используются при дегенеративных заболеваниях костей и суставов [19, 20].

В связи с этим цель исследования состояла в оценке способности коллагенсодержащей пищевой добавки защищать клетки эпителия двенадцатиперстной кишки человека (линия HuTu-80) от индометацин-индуцированного повреждения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Композитный коллагенсодержащий гидрогель был предоставлен компанией ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН» (Россия) и представляет собой гидрогель, состоящий из смеси высоко- и низкомолекулярного коллагена, мукополисахаридов и триглицеридов. Коллагеновый гидрогель зарегистрирован как пищевая биологически активная добавка (сертификаты соответствия № ЕСО.RU.0001.ЭГК39028, ЕАЭС N RU Д-РУ.ТРО6. В.05844/19). Физико-химическая характеристика коллагенового гидрогеля представлена в табл. 1.

### Методы

Оценивали влияние исследуемых образцов на размеры, форму и пролиферативную активность клеток. Клетки инкубировали с исследуемыми образцами при стандартных условиях культивирования в течение трех суток. Каждые сутки клетки фотографировали с использованием микроскопа Leica (Leica Microsystems). Размеры и количество клеток оценивали с использованием встроенного программного обеспечения Image Analysis (Leica Microsystems). Количество повторов каждой группы — 3, количество охарактеризованных клеток в каждой группе — 25 шт.

**Таблица 1.** Физико-химическая характеристика коллагенового гидрогеля

**Table 1.** Physical and chemical characteristics of the collagen hydrogel

Показатель / Parameter	Значение / Value
Гидролизат коллаген / Collagen hydrolyzate	8,5–9,5 %
Триглицериды / Triglycerides	0,2–0,6 %
Зола сульфатная / Sulphated ash	1,6–2 %
Вода / Water	35,2–51,1 %
Молекулярная масса коллагена / Molecular weight of collagen	от 12–270 кДа
Плотность (20°C) / Density (20°C)	2,00–2,10 г/мл
pH	4,5–6,0
Соли / Salt	3–5 %

В работе использовали коммерческую культуру клеток фибробластов кожи человека HDF (Cell Applications, США, кат. № 106K-05a) и клетки эпителия двенадцатиперстной кишки человека (линия HuTu-80), приобретенные в ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург.

Цитотоксичность исследуемых образцов оценивали с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США) и коммерческого набора Kit Live/Dead Test (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Исследуемые образцы вносили в лунки в 9-луночный культуральный планшет с предварительно адгезированными фибробластами или энтероцитами HuTu-80 с плотностью монослоя более 90 %. Во всех экспериментах, где не указано иное, использовали питательную среду DMEM, содержащую 10 % ФБС и 1 % раствор пенициллина-стрептомицина. Инкубировали 1 сутки при стандартных условиях (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Затем клетки снимали с поверхности пластика, используя для этого 0,25 % раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФБС и оценивали количество живых и мертвых клеток согласно протоколу, рекомендованному производителем набора Kit Live/Dead Test.

Оценка количества апоптических клеток. Оценку проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I BD, Pharmingen, США). Как было описано выше, клетки инкубировали с исследуемыми образцами при стандартных условиях культивирования в течение трех суток. Затем клетки снимали с поверхности пластика, используя для этого 0,25 % раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФБС и оценивали количество апоптических клеток согласно протоколу, рекомендованному производителем набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit.

Клеточный цикл и индекс пролиферации клеток. Фазы клеточного цикла: фаза покоя (G0-фаза), фаза клеточного роста (G1-фаза), синтетическая фаза (S-фаза) и фаза клеточного деления (M-фаза) — оценивали методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора Kit CellCycle (BD Pharmingen, США). Как было описано выше, клетки инкубировали с исследуемыми образцами при стандартных условиях культивирования в течение трех суток. Затем клетки снимали с поверхности пластика, используя для этого 0,25 % раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФБС и оценивали количество апоптических клеток согласно протоколу, рекомендованному производителем набора Kit CellCycle.

Статистическая обработка результатов. При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение ( $M$ ), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ). Достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индометацин представляет собой производное индолуксусной кислоты и обладает противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим действием. Однако результаты многочисленных исследований показывают, что индометацин, как и многие другие НПВП, оказывает ингибирующее действие на жизнеспособность и функциональную активность энтероцитов [21–23]. В связи с этим остается актуальным поиск новых способов снижения тяжести побочных эффектов от применения НПВП.

Исследование проведено с целью оценить способность коллагенсодержащего гидрогеля, представляющего собой биологически активную добавку к пище, защищать клетки кишечника от повреждения, вызванного индометацином.

Поскольку внесение в стандартную культуральную среду дополнительных количеств белков и иных химических соединений влияет на жизнеспособность клеток, то на первом этапе исследований подбирали концентрацию коллагенового гидрогеля, совместимую с нормальной жизнеспособностью фибробластов и энтероцитов при их совместном культивировании. Для этого использовали две культуры клеток — фибробласты, как общепринятый стандарт оценки цитотоксичности биологически активных соединений, и линию клеток NuTi-80, как модельный объект для оценки воздействия индометацина и коллагенового гидрогеля на функциональную активность эпителиальных клеток тонкой кишки.

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием проточной цитометрии и набора Live/Dead test. Установлено, что жизнеспособность как фибробластов, так энтероцитов напрямую зависит от концентрации коллагенового гидрогеля в культуральной среде (табл. 2).

Соединение принято считать нетоксичным при снижении клеточной жизнеспособности менее чем на 10 %. Снижение количества живых клеток более чем на 70 % оценивается как тяжелая цитотоксичность, на 60–40 % — как умеренная и на 10–30 % — как небольшая [24]. Полученные данные указывают на то, что коллагеновый гидрогель не оказывает цитотоксического действия при концентрации в культуральной среде менее 3 %,

**Таблица 2.** Влияние концентрации коллагенового гидрогеля в культуральной среде на жизнеспособность фибробластов и энтероцитов

**Table 2.** The effect of a concentration of collagen hydrogel, in the culture medium, on the viability of fibroblasts and enterocytes

Концентрация гидрогеля в питательной среде, мг/мл / Concentration of collagen hydrogel in cultural medium	Количество живых клеток, % / Amount of live cell, %	
	фибробласты / fibroblasts	энтероциты / enterocytes
0 (Control)	95 ± 3	90 ± 4
0,7	92 ± 5	88 ± 2
1,4	92 ± 3	89 ± 3
2,8	87 ± 7	81 ± 4
5,6	31 ± 4*	40 ± 4*

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (Control);  $n = 7, M \pm \sigma$ .

**Note:** \* — differences are significant compared to control, at  $p < 0.05$ ;  $n = 7, M \pm \sigma$ .

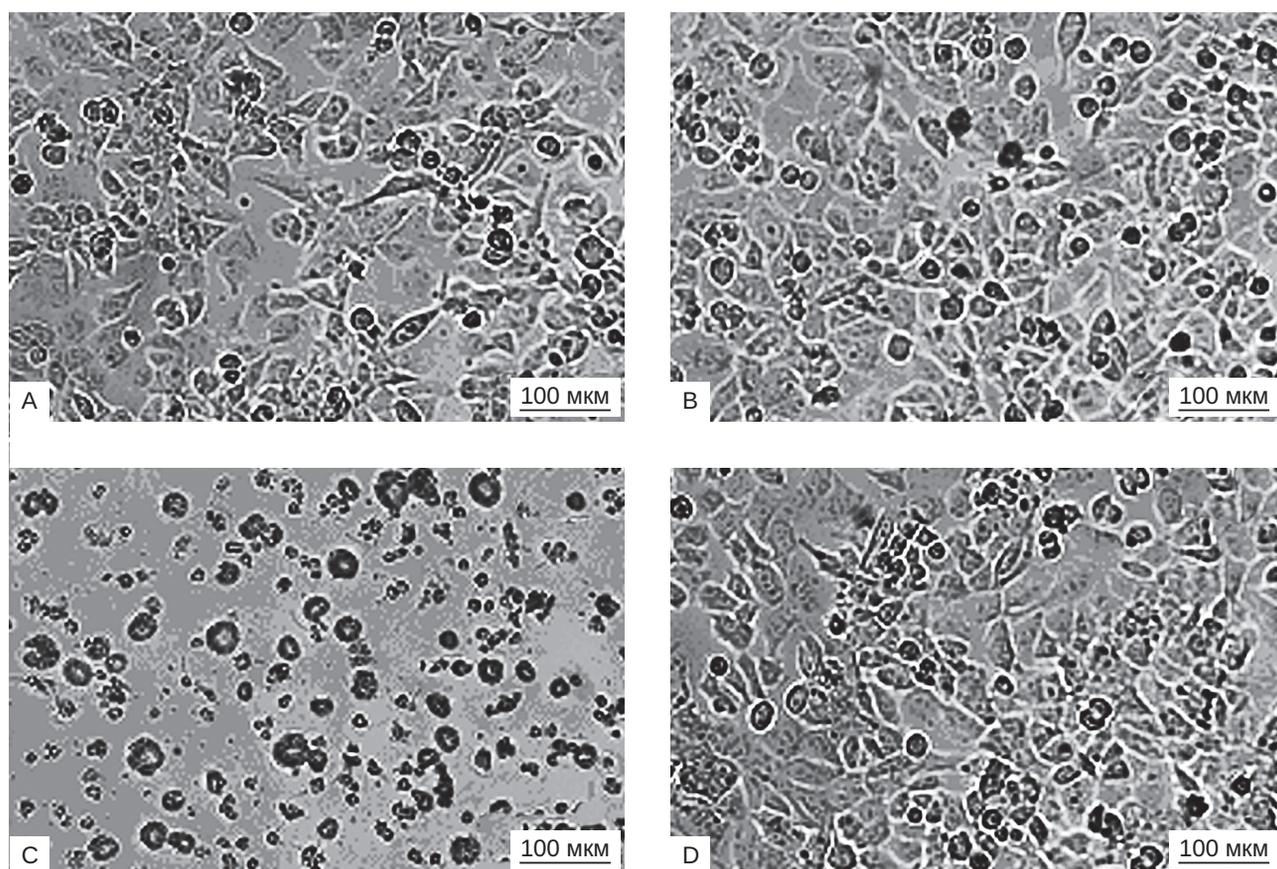
**Таблица 3.** Влияние концентрации индометацина в культуральной среде на жизнеспособность энтероцитов

**Table 3.** The effect of a indomethacin concentration in the culture medium, on the viability of enterocytes

Концентрация индометацина в питательной среде, мг/мл / Concentration of indomethacin in cultural medium	Количество клеток, % / Amount of cell, %	
	живые / live	мертвые / dead
0 (Control)	83 ± 5	14 ± 3
0,25	82 ± 7	18 ± 7
0,5	73 ± 12	27 ± 12
1	63 ± 7*	37 ± 7*
2	42 ± 2*	57 ± 3*
4	43 ± 7*	57 ± 7*

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (Control);  $n = 7, M \pm \sigma$ .

**Note:** \* — differences are significant compared to control, at  $p < 0.05$ ;  $n = 7, M \pm \sigma$ .



**Рис. 1.** Фото клеток эпителия тонкой кишки человека HuTu-80 через 1 сутки инкубации  
**Fig. 1.** The photo of HuTu-80 human small intestine epithelial cells after a 24 h of incubation

**Примечание:** (A) интактная питательная среда; (B) среда, содержащая коллагеновый гидрогель; (C) индометацин; (D) смесь коллагенового гидрогеля с индометацином. Световая микроскопия,  $\times 100$ .

**Note:** (A) in intact culture medium; (B) in a culture medium with the addition of collagen, (C) indomethacin; (D) culture medium contains collagen hydrogel and indomethacin. Light microscopy,  $\times 100$ .

что соответствует расчетному содержанию коллагена в среде 2,8 мг/мл. Поэтому для дальнейших исследований использовалась 3 % концентрация гидрогеля, как максимально возможная с точки зрения биосовместимости с клеточными культурами.

На следующем этапе исследования определяли полумаксимальную ингибирующую концентрацию (LC50) индометацина. Для этого энтероциты вносили в культуральные среды, содержащие индометацин в концентрациях от 0,2 до 4 мг/мл. Установлено, что индометацин в концентрации 1 мг/мл вызывает гибель более 40 % популяции клеток, с увеличением концентрации количество мертвых клеток возрастает (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными литературы. Ранее было показано, что в условиях *in vitro* индометацин, диклофенак и ряд других НПВП ингибируют жизнеспособность клеток желудка, кишечника и печени [4, 25, 26].

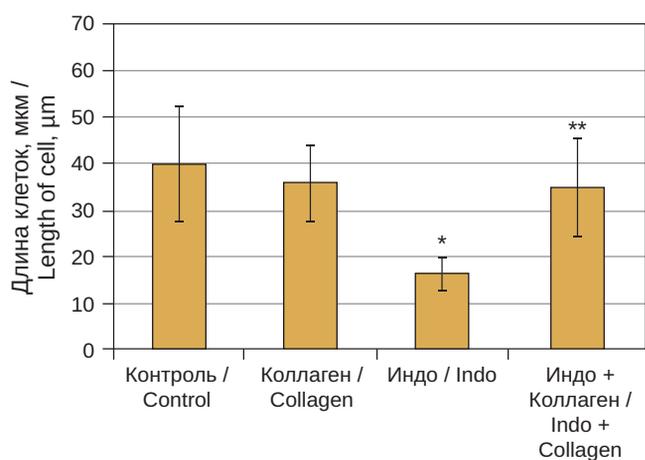
Основываясь на полученных результатах, для индукции повреждения эпителиальных клеток кишечника использовали концентрацию индометацина 1 мг/мл, как наиболее близкую к концентрации полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток.

Установлено, что внесение коллагенового гидрогеля в среду, содержащую индометацин, сохраняет способность клеток к росту. В контроле через сутки инкубации в стандартной культуральной среде клетки эпителия

кишечника HuTu-80 трансформируются из шаровидной в веретеновидную форму и увеличиваются в размерах и (рис. 1A). Длина тела клеток составляет  $40 \pm 12$  мкм (рис. 2).

Такая же картина наблюдается при инкубации энтероцитов HuTu-80 с коллагеновым гидрогелем (рис. 1B, рис. 2). При инкубации энтероцитов совместно с индометацином процесс трансформации клеток замедляется, более 90 % клеток остаются сферической формы, диаметр клеток составляет  $16 \pm 4$  мкм (рис. 1C, рис. 2). В то же время при культивировании клеток в среде, содержащей как индометацин, так и коллагеновый гидрогель, способность клеток к трансформации и росту сохраняется: большинство клеток приобретают веретеновидную форму (рис. 1D), длина тела клеток становится сопоставимой с контрольными значениями и составляет  $35 \pm 10$  мкм (рис. 2).

Коллагеновый гидрогель предотвращает гибель клеток, вызванную индометацином, и снижает количество апоптических клеток в популяции. В контроле при культивировании клеток HuTu-80 в стандартных условиях количество живых, апоптических и мертвых клеток в популяции составляет  $91 \pm 3$ ,  $1,4 \pm 0,3$  и  $7 \pm 1$  % соответственно (рис. 3). Подобная картина наблюдается при инкубации энтероцитов с коллагеновым гидрогелем (рис. 3). Совместная инкубация энтероцитов с индоме-



**Рис. 2.** Длина клеток HuTu-80 через 1 сутки инкубации в интактной питательной среде (Контроль), средах, содержащих коллагеновый гидрогель (Коллаген), индометацин (Индо) и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином (Индо + Коллаген)

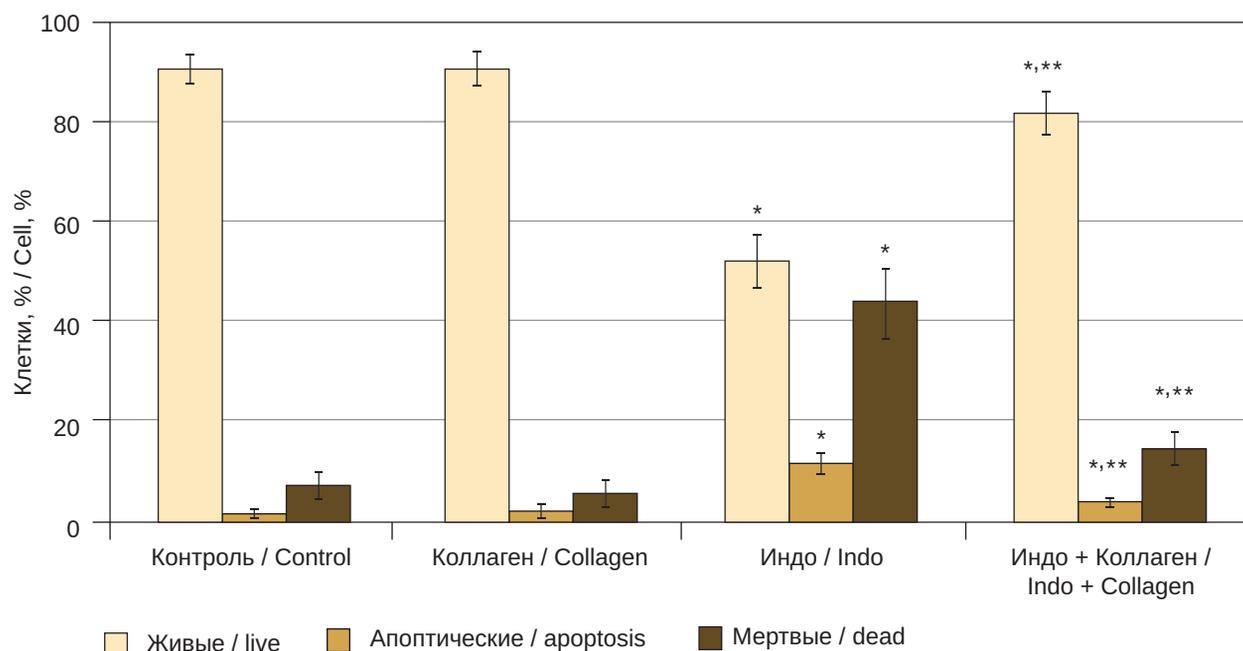
**Fig. 2.** The length of HuTu-80 cells after a day of incubation in intact nutrient medium (Control) and media containing collagen hydrogel (Collagen), indomethacin (Indo), and a mix of collagen hydrogel and indomethacin (Indo + Collagen)

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с индометацином (Индо);  $M \pm \sigma, n = 50$ .  
**Note:** \* — differences are significant compared to control, at  $p < 0.05$ ; \*\* — differences are significant compared to indomethacin (Indo), at  $p < 0.05$ ;  $M \pm \sigma, n = 50$ .

тацином вызывает гибель 50 % клеток и многократное увеличение количества апоптических клеток (рис. 3). Внесение коллагенового гидрогеля в среду с индометацином ингибирует гибель клеток, что выражается в снижении количества как мертвых клеток, так и клеток на стадии апоптоза (рис. 3).

Установлено, что коллагеновый гидрогель предотвращает патологические изменения в клеточном цикле, вызванные индометацином. Правильное развитие клеточного цикла от G1-фазы до M-фазы гарантирует, что каждая из двух дочерних клеток получит идентичные хромосомы от родительской клетки. В контроле при инкубации в стандартной питательной среде более 50 % клеток находится в фазе роста G1, в синтетической фазе (S-фаза, фаза синтеза ДНК) и G2-фазе (предмитотический период) находятся 17 ± 2 и 31 ± 2 % клеток соответственно (рис. 4). Полученные результаты согласуются с данными литературы [27] и указывают на то, что исследуемая популяция клеток имеет нормальное распределение фаз клеточного цикла.

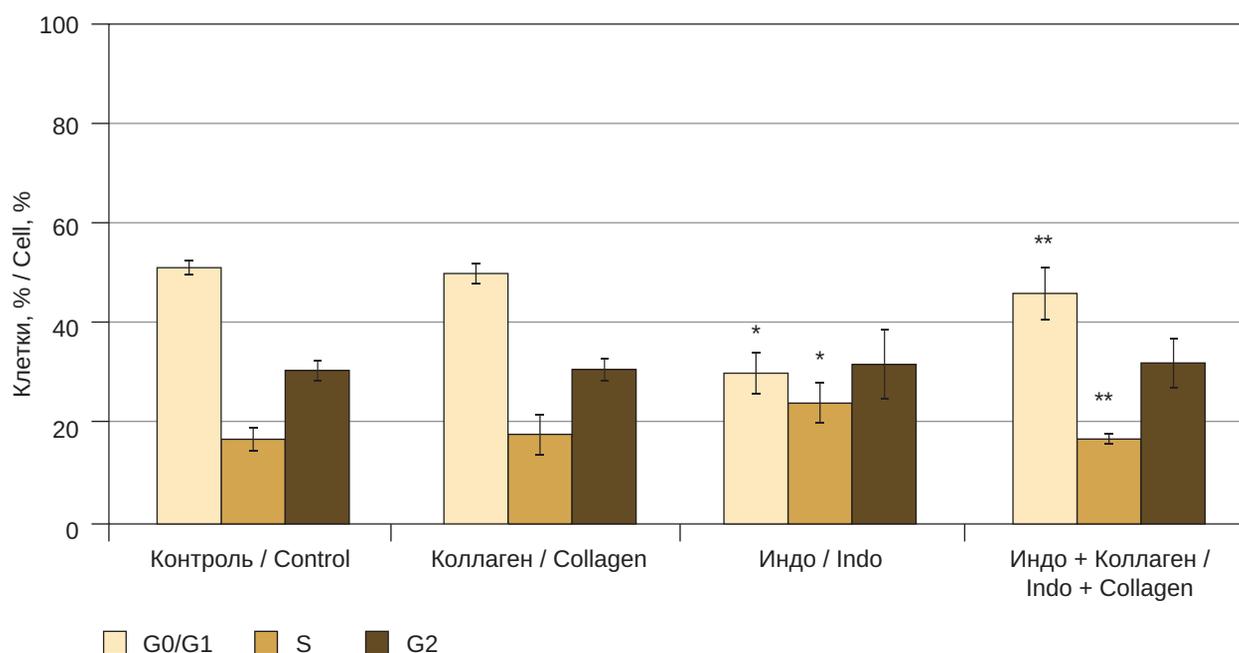
Культивирование кишечных клеток с индометацином приводит к накоплению клеток в S-фазе (рис. 4). Из данных литературы известно, что накопление клеток в S-фазе при воздействии НПВП связано с повреждением нити ДНК. Индуцированные нарушения в стабильности клеточного генома вызывают активацию апоптоза и гибель клеток [28, 29]. Внесение коллагенового гидрогеля в инкубационную среду, содержащую индометацин, предотвращает патологические изменения в клеточном цикле клеток (рис. 4).



**Рис. 3.** Процент живых, апоптических и мертвых клеток HuTu-80 через 1 сутки инкубации в интактной питательной среде (Контроль), средах, содержащих коллагеновый гидрогель (Коллаген), индометацин (Индо) и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином (Индо + Коллаген)

**Fig. 3.** The percentage of live, apoptotic and dead HuTu-80 cells after a day of incubation in intact nutrient medium (Control) and in a culture medium with the addition of collagen (Collagen), indomethacin (Indo), and a mix of collagen hydrogel and indomethacin (Indo + Collagen)

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* — различия достоверны при  $p < 0,05$ , по сравнению с индометацином (Индо);  $M \pm \sigma, n = 7$ .  
**Note:** \* — differences are significant compared to control, at  $p < 0.05$ ; \*\* — differences are significant compared to indomethacin (Indo), at  $p < 0.05$ ;  $M \pm \sigma, n = 7$ .



**Рис. 4.** Распределение клеток HuTu-80 по фазам клеточного цикла через 1 сутки инкубации в интактной питательной среде (Контроль), средах, содержащих коллагеновый гидрогель (Коллаген), индометацин (Индо) и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином (Индо + Коллаген)

**Fig. 4.** Phases of the cell cycle in a population of HuTu-80 cells, after a 24 h of incubation in intact nutrient medium (Control) and in a culture medium with the addition of collagen (Collagen), indomethacin (Indo), and a mix of collagen hydrogel and indomethacin (Indo + Collagen)

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* — различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с индометацином (Индо);  $M \pm \sigma$ ,  $n = 7$ .

**Note:** \* — differences are significant compared to control, at  $p < 0.05$ ; \*\* — differences are significant compared to indomethacin (Indo), at  $p < 0.05$ ;  $M \pm \sigma$ ,  $n = 7$ .

Механизмы защитного действия коллагена в отношении НПВП-индуцированного повреждения энтероцитов пока не исследованы. Возможно, что его защитное действие обусловлено способностью коллагена поглощать свободные радикалы и оказывать тем самым антиоксидантное действие [30, 31]. Согласно данным литературы, таким защитным действием в отношении клеток кишечника обладают и другие известные противовоспалительные полимеры синтетического и природного происхождения: полифенолы и их метаболиты [21, 32], пептиды пшеницы [33], 5-аминосалициловая кислота (5-АСК) и сульфасалазин [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенном исследовании установлено, что коллагеновый гидрогель в условиях *in vitro* способен снижать патогенное действие индоме-

тацина на эпителиальные клетки кишечника человека. Защитное действие коллагенового гидрогеля характеризуется сохранением жизнеспособности, ингибированием апоптических процессов, а также сохранением стабильности клеточного цикла. Полученные результаты говорят о перспективности использования пищевой добавки на основе композитного коллагенового гидрогеля в качестве профилактического средства для снижения рисков возникновения НПВП-ассоциированных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Тем не менее для подтверждения терапевтической эффективности пищевой добавки необходимо проведение дальнейших исследований, как с использованием моделирования на экспериментальных животных НПВП-ассоциированных заболеваний желудочно-кишечного тракта человека, так и клинических исследований.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Марков Павел Александрович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, отдел биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

**Соколов Андрей Сергеевич**, директор по проектам ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН».

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0685-5109>

**Артемьева Ирина Александровна**, креативный директор ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН».

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3559-2435>

**Гильмутдинова Ильмира Ринатовна**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, отдел биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

**Фесюн Анатолий Дмитриевич**, доктор медицинских наук, и. о. директора, ФГБУ «Национальный медицинский иссле-

довательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3097-8889>

**Еремин Петр Серафимович**, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают свое авторство в соответствии с международными критериями ICMJE (все авторы внесли значительный вклад в концепцию, дизайн исследования и подготовку статьи, прочитали и одобрили окончательный вариант до публикации). Наибольший вклад распределен следующим образом: Марков П.А. — научное обоснование, анализ данных; Гильмутдинова И.Р. — проверка

и редактирование текста статьи; Соколов А.С. — обеспечение материалов для исследования; Артемьева И.А. — обеспечение материалов для исследования; Фесюн А.Д. — проектное руководство; Еремин П.С. — проведение исследования.

**Источники финансирования.** Данное исследование не было поддержано никакими внешними источниками финансирования.

**Конфликт интересов.** Фесюн А.Д. — и. о. директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии», президент Национальной ассоциации экспертов по санаторно-курортному лечению, главный редактор журнала «Вестник восстановительной медицины». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Доступ к данным.** Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить по обоснованному запросу у корреспондирующего автора.

#### ADDITIONAL INFORMATION

**Pavel A. Markov**, Ph.D. (Biol.), Leading Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

E-mail: [markovpa@nmicrk.ru](mailto:markovpa@nmicrk.ru), [p.a.markov@mail.ru](mailto:p.a.markov@mail.ru);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

**Andrey S. Sokolov**, Project Director, FIRST ALIVE COLLAGEN Limited Liability Company.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0685-5109>

**Irina A. Artemyeva**, Creative Director, FIRST ALIVE COLLAGEN Limited Liability Company.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3559-2435>

**Ilmira R. Gilmudinova**, Ph.D. (Med), Leading Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

**Anatoliy D. Fesyun**, Dr Sci. (Med.), Acting Director, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3097-8889>

**Petr S. Eremin**, Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

**Author Contributions.** All authors confirm their authorship in accordance with the international ICMJE criteria (all authors made significant contributions to the concept, study design and preparation of the article, read and approved the final version before publication). Special contribution: Markov P.A. — conceptualization, data analysis; Gilmudinova I.R. — writing — review & editing; Sokolov A.S. — resources; Artemyeva I.A. — resources; Fesyun A.D. — project administration; Eremin P.S. — investigation.

**Funding.** The authors declare no external funding in the conduct of the study.

**Disclosure.** Fesyun A.D. — Acting Director of the National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, President of the National Association of Experts in Spa Treatment, Editor-in-Chief of the Bulletin of Rehabilitation Medicine. Other authors declare that there is no conflict of interest related to the research and publication of this article.

**Data Access Statement.** The data supporting the conclusions of this study are available upon reasonable request from the corresponding author.

### Список литературы / References

1. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami JA Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging and disease*. 2018; 9(1): 143–150. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0306>
2. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*. 2020; 180: 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
3. García-Rayado G., Navarro M., Lanás A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2018; 11(10): 1031–1043. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1516143>
4. Boonyong C., Vardhanabhuti N., Jianmongkol S. Natural polyphenols prevent indomethacin-induced and diclofenac-induced Caco-2 cell death by reducing endoplasmic reticulum stress regardless of their direct reactive oxygen species scavenging capacity. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020; 72(4): 583–591. <https://doi.org/10.1111/jphp.13227>
5. Bäck M., Yin L., Ingelsson E. Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk in a nation-wide cohort study after the withdrawal of rofecoxib. *European Heart Journal*. 2012; 33(15): 1928–1933. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr421>
6. Fiorucci S., Distrutti E. COXIBs, CINODs and H<sub>2</sub>S-releasing NSAIDs: current perspectives in the development of safer non steroidal anti-inflammatory drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18(23): 3494–3505. <https://doi.org/10.2174/092986711796642508>
7. Badri W., Miladi K., Nazari Q.A., et al. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. *Int J Pharm*. 2016; 515(1-2): 757–773. <https://doi.org/10.1016/j.jipharm.2016.11.002>
8. Singh D.P., Borse S.P., Nivsarkar M. A novel model for NSAID induced gastroenteropathy in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016; 78: 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.008>
9. Satoh H., Amagase K., Takeuchi K. Mucosal protective agents prevent exacerbation of NSAID-induced small intestinal lesions caused by antisecretory drugs in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014; 348(2): 227–235. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208991>

10. He F, Wu C, Li P, et al. Functions and Signaling Pathways of Amino Acids in Intestinal Inflammation. *BioMed Research International*. 2018; 2018:9171905. <https://doi.org/10.1155/2018/9171905>
11. Vidal-Lletjós S, Andriamihaja M, Blais A, et al. Dietary Protein Intake Level Modulates Mucosal Healing and Mucosa-Adherent Microbiota in Mouse Model of Colitis. *Nutrients*. 2019; 11(3): 514. <https://doi.org/10.3390/nu11030514>
12. Rahabi M, Salon M, Bruno-Bonnet C, et al. Bioactive fish collagen peptides weaken intestinal inflammation by orienting colonic macrophages phenotype through mannose receptor activation. *European Journal of Nutrition*. 2022; 61(4): 2051–2066. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02787-7>
13. Zhu W, Ren L, Zhang L, et al. The Potential of Food Protein-Derived Bioactive Peptides against Chronic Intestinal Inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2020; 2020: 6817156. <https://doi.org/10.1155/2020/6817156>
14. Huang W, Chakrabarti S, Majumder K, et al. Egg-derived peptide IRW inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(20): 10840–10846. <https://doi.org/10.1021/jf102120c>
15. Oyama M, Hung T, Yoda K, et al. A novel whey tetrapeptide IPAV reduces interleukin-8 production induced by TNF- $\alpha$  in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*. 2017; 35: 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.001>
16. Nielsen S.D., Liang N., Rathish H., et al. Bioactive milk peptides: an updated comprehensive overview and database. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2240396>
17. Lee M., Kim D., Park S.H., et al. Fish Collagen Peptide (Naticol®) Protects the Skin from Dryness, Wrinkle Formation, and Melanogenesis Both In Vitro and In Vivo. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2022; 27(4): 423–435. <https://doi.org/10.3746/pnf.2022.27.4.423>
18. Daskalaki M.G., Axarlis K., Aspevik T., et al. Fish Sidestream-Derived Protein Hydrolysates Suppress DSS-Induced Colitis by Modulating Intestinal Inflammation in Mice. *Marine Drugs*. 2021; 19(6): 312. <https://doi.org/10.3390/md19060312>
19. Khatri M., Naughton R.J., Clifford T., et al. The effects of collagen peptide supplementation on body composition, collagen synthesis, and recovery from joint injury and exercise: a systematic review. *Amino Acids*. 2021; 53(10): 1493–1506. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03072-x>
20. Arden N.K., Perry T.A., Bannuru R.R., et al. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCO and OARSI 2019 guidelines. *Nature Reviews Rheumatology*. 2021; 17(1): 59–66. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00523-9>
21. Fuentes J., Brunser O., Atala E., et al. Protection against indomethacin-induced loss of intestinal epithelial barrier function by a quercetin oxidation metabolite present in onion peel: In vitro and in vivo studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022; 100: 108886. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108886>
22. Bhatt A.P., Gunasekara D.B., Speer J., et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Leaky Gut Modeled Using Polarized Monolayers of Primary Human Intestinal Epithelial Cells. *ACS Infectious Diseases*. 2018; 4(1): 46–52. <https://doi.org/10.1021/acscinfed.7b00139>
23. Handa O., Takayama S., Mukai R., et al. A review of the mechanism and prophylaxis of acetyl salicylic acid-induced injury of the small intestine. *Free Radical Research*. 2018; 52(11–12): 1266–1270. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1455003>
24. Barrioni B.R., de Carvalho S.M., Oréfice R.L., et al. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2015; 52: 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.027>
25. Chen P., Chen C., Hu M., et al. S-allyl-L-cysteine protects hepatocytes from indomethacin-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *FEBS Open Bio*. 2020; 10(9): 1900–1911. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12945>
26. Ahluwalia A., Hoa N., Jones M.K., Tarnawski A.S. NSAID-induced injury of gastric epithelial cells is reversible: roles of mitochondria, AMP kinase, NGF, and PGE2. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2019; 317(6): G862–G871. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00192.2019>
27. Wang Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods in molecular biology*. 2022; 2579: 3–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_1)
28. Luciani M.G., Campregher C., Fortune J.M., et al. 5-ASA affects cell cycle progression in colorectal cells by reversibly activating a replication checkpoint. *Gastroenterology*. 2007; 132(1): 221–235. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.016>
29. Koelink P.J., Mieremet-Ooms M.A., Corver W.E., et al. 5-aminosalicylic acid interferes in the cell cycle of colorectal cancer cells and induces cell death modes. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2010; 16(3): 379–389. <https://doi.org/10.1002/ibd.21086>
30. Nurilmala M., Hizbullah H.H., Karnia E., et al. Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Marine Drugs*. 2020; 18(2): 98. <https://doi.org/10.3390/md18020098>
31. Medina-Medrano J.R., Quiñones-Muñoz T.A., Arce-Ortiz A., et al. Antioxidant Activity of Collagen Extracts Obtained from the Skin and Gills of *Oreochromis* sp. *Journal of Medicinal Food*. 2019; 22(7): 722–728. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0013>
32. Carrasco-Pozo C., Morales P., Gotteland M. Polyphenols protect the epithelial barrier function of Caco-2 cells exposed to indomethacin through the modulation of occludin and zonula occludens-1 expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(22): 5291–5297. <https://doi.org/10.1021/jf400150p>
33. Yin H., Pan X., Song Z., et al. Protective effect of wheat peptides against indomethacin-induced oxidative stress in IEC-6 cells. *Nutrients*. 2014; 6(2): 564–574. <https://doi.org/10.3390/nu6020564>
34. Jung E.S., Jang H.J., Hong E.M., et al. The Protective Effect of 5-Aminosalicylic Acid Against Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Injury Through Free Radical Scavenging in Small Intestinal Epithelial Cells. *Medicina (Kaunas)*. 2020; 56(10): 515. <https://doi.org/10.3390/medicina56100515>