

Федеральное государственное бюджетное учреждение
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РЕАБИЛИТАЦИИ И КУРОРТОЛОГИИ
(ФГБУ «НМИЦ РК» Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель директора по
стратегическому развитию
медицинской деятельности
"Национальный медицинский
исследовательский центр
реабилитации и курортологии"
Минздрава России

М. Ю. Яковлев

« 22 » *декабрь* 2023 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

«Оценка регенеративных свойств композитного коллагенсодержащего
продукта, бренда «Первый живой коллаген», в отношении клеток дермы и
клеток эпителия кишечника человека»
(Заключительный отчет)

Научный руководитель:

Зав. лабораторией клеточных
технологий

Еремин П.С.

Москва 2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный
руководитель:
Зав. лабораторией
клеточных
технологий


27.12.23

П.С. Еремин


Ответственный
исполнитель:
Ведущий научный
сотрудник,
к.б.н.


27.12.23

П.А. Марков

Исполнители:

Старший научный
сотрудник,
к.б.н.


27.12.23

Е.Ю. Костромина

РЕФЕРАТ

Отчет 19с., 6 рис.

ИНДОМЕТАЦИН, КОЛЛАГЕН, ЭНТЕРОЦИТЫ, АПОПТОЗ, КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

Целью 2 этапа исследования являлось охарактеризовать влияние композитного коллагенсодержащего продукта, бренда «Первый живой коллаген» на жизнеспособность и пролиферативную активность интактных клеток кишечника (линии NuTu80) и клеток кишечника с дисфункцией, вызванной индометацином.

Клеточная популяция была проанализирована по таким параметрам как: морфология клеток, скорость роста, фазы клеточного цикла и соотношение живых, апоптических и мертвых клеток при инкубации с объектом исследования – коллагеновым гидрогелем, бренда «Первый живой коллаген», индометацином и смеси коллагенового гидрогеля и индометацина.

В результате работы было установлено, что индометацин вызывает нарушения в скорости роста энтероцитов, их пролиферативной активности, стимулирует переход клеток в стадию апоптоза, а также вызывает нарушения в клеточном цикле клеток кишечника. Выявлено, что коллагеновый гидрогель защищает клетки кишечника от патогенного действия индометацина и предотвращает нарушения в функциональной активности клеток, сохраняя тем самым клеточную популяцию в жизнеспособном состоянии.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	2
РЕФЕРАТ	3
СОДЕРЖАНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	5
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	6
Материалы	6
Методы	7
РЕЗУЛЬТАТЫ	11
ВЫВОДЫ	17
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	18

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Благодаря эффективности в уменьшении боли и воспаления нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) входят в число наиболее часто используемых лекарственных средств, что подтверждает их положение в 21-Примерном перечне основных лекарственных средств ВОЗ.

НПВП используются в лечении пациентов с болевым синдромом и воспалительными заболеваниями различных этиологий, а к основным областям применения относятся такие состояния, как головная боль, остеоартрит, ревматоидный артрит, послеоперационные хирургические состояния, а также дисменорея [1, 2, 3].

В настоящее время НПВП являются одними из самых популярных безрецептурных препаратов во всем мире, составляя около 5% всех назначаемых лекарств [4]. Несмотря на широкое терапевтическое применение, НПВП обладают многочисленными побочными эффектами, наиболее распространенные из которых являются воспалительные и язвенные заболевания желудочно-кишечного тракта [5, 6].

Предлагаемые стратегии снижения побочных эффектов НПВП, в первую очередь за счет повышения селективности действия и использования новых лекарственных форм, не эффективны [5, 7, 8]. В связи с этим остается актуальным поиск новых способов снижения тяжести побочных эффектов и повышения эффективности применения НПВП. Одним из подходов позволяющих снизить неблагоприятные последствия приема НПВП может быть использование пищевых добавок, в составе рациона питания пациентов регулярно принимающих НПВП.

Цель исследования оценить способность пищевого коллагенсодержащего гидрогеля защищать клетки кишечника от повреждения, вызванного индометацином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Композитный коллагенсодержащий гидрогель был предоставлен компанией ООО «Первый живой коллаген» (Россия) и представляет собой гидрогель, состоящий из гидролизата пищевого коллагена, гиалуроновой кислоты, эластина и триглицеридов. В работе использовали коммерческую культуру клеток эпителия тонкой (HuTu80) кишки человека (Коллекция клеточных культур, Институт Цитологии РАН, г. Санкт-Петербург).

При выполнении работы были использованы следующие реактивы и расходные материалы:

- культуральная среда DMEM/F12 (Gibco, США);
- антибиотик Пенициллин (25000 Ед.) (ПанЭко, Россия);
- L-Глютамин (StemCell Technologies, США);
- 0,25% раствор трипсина-EDTA (StemCell, США);
- 0,02% раствор Версена (ПанЭко, Россия);
- Фосфатно-солевой буфер 1xD-PBS (StemCell, США);
- SYTOX Green (Invitrogen, USA);
- FBS, эмбриональная телячья сыворотка (Gibco, США);
- Kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen);
- Kit CellCycle (Thermo Fisher Scientific Inc., США);
- Kit_Live/Dead Test (Thermo Fisher Scientific Inc., США);
- культуральные флаконы (T25, T75, T150) (Corning, США);
- фильтрационная система 500 мл (Corning, США);
- пипетки серологические (5,10,25 мл) (Corning, США);
- пробирки стерильные 50 мл (Corning, США);
- чашки Петри d-35 mm (Corning, США).

При выполнении работы было использовано следующее оборудование:

- Магнитная мешалка MR Hei-Tec Package (Heidolph Rus, Россия);
- Ламинарный шкаф СЛШ-1,8 ЗП (Lamsystems, Россия);

- Ультрафиолетовые лампы FOTON-2 (Beauty Star, Китай);
- Весы аналитические Pioneer New PX224 (Ohaus, США);
- CO₂-инкубатор Мод. 3427 (Thermo Scientific, США);
- Автоматический счетчик клеток Vi-Cell XR (Beckman Coulter, США);
- Центрифуга SorvallBIOS 16 (Thermo Scientific, США);
- Водяная баня BMH150 (Beckers, Италия);
- Микроскоп DMI4000 microscope (Leica Microsystems, Germany)
- Автоматический дозатор для серологических пипеток (Gilson Macroman, США);
 - Проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США).

Методы

Моделирование повреждения клеток кишечника, in vitro

В качестве модели, имитирующей повреждение стенки кишки человека при приеме НПВП, использовали совместную инкубацию клеток эпителия кишечника с раствором индометацина (Софарма, Болгария).

Для выявления концентрации полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток, готовили растворы индометацина с последовательным двукратным разведением. После чего растворы индометацина переносили в лунки 6 луночного планшета с адгезированными клетками NuTu80. Клетки инкубировали сутки при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Затем клетки снимали с поверхности пластика используя для этого 0,25% раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФСБ. После чего с использованием световой микроскопии и проточной цитофлуориметрии оценивали размеры клеток и количество живых и мертвых клеток согласно протоколу, рекомендованному производителем набора Kit Live/Dead Test.

Установлено, что индометацин ингибирует функциональную активность клеток, замедляет их рост и пролиферативную активность. Интенсивность токсического действия индометацина на клетки кишечника зависит от его концентрации в культуральной среде. Полученные результаты согласуются с данными литературы [9, 10]. Моделирование повреждения клеток кишечника в условиях *in vitro* имитирует повреждение клеток кишечника у людей регулярно принимающих НПВП [11].

На основе полученных результатов (Рис. 1, Рис. 2) для проведения исследований была выбрана концентрация индометацина 1 мг/мл, ингибирующая рост клеток (Рис. 1) и вызывающая гибель 30% клеток (Рис. 2).

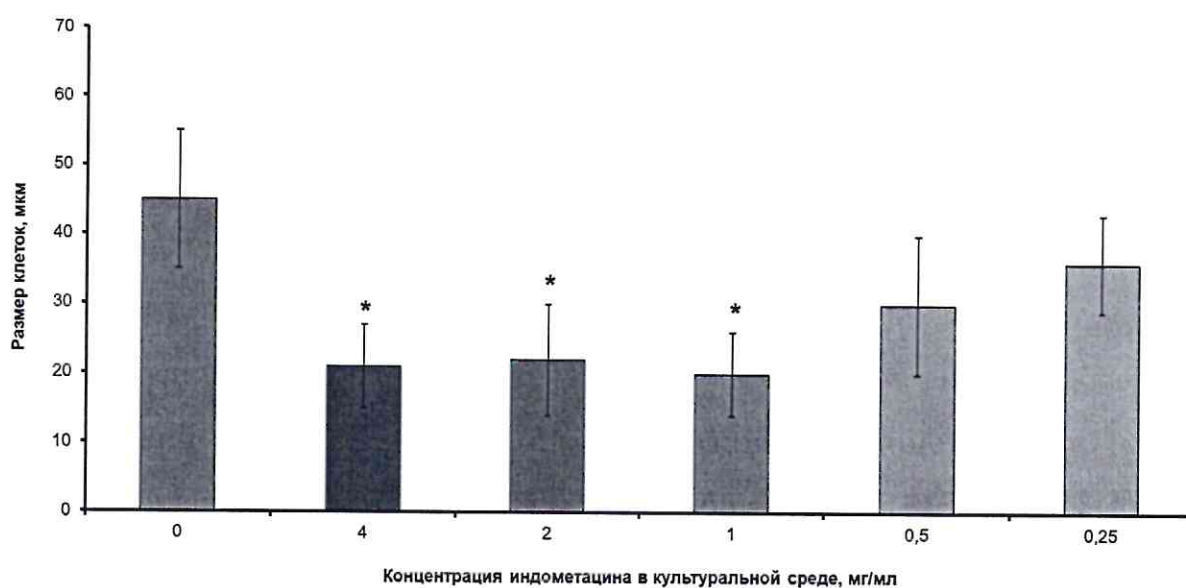


Рисунок 1. Влияние концентрации индометацина на рост клеток эпителия тонкой кишки NuTu80. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; $n=5$, * – различия достоверны при $p<0.05$, по сравнению с контролем (0 мг/мл).

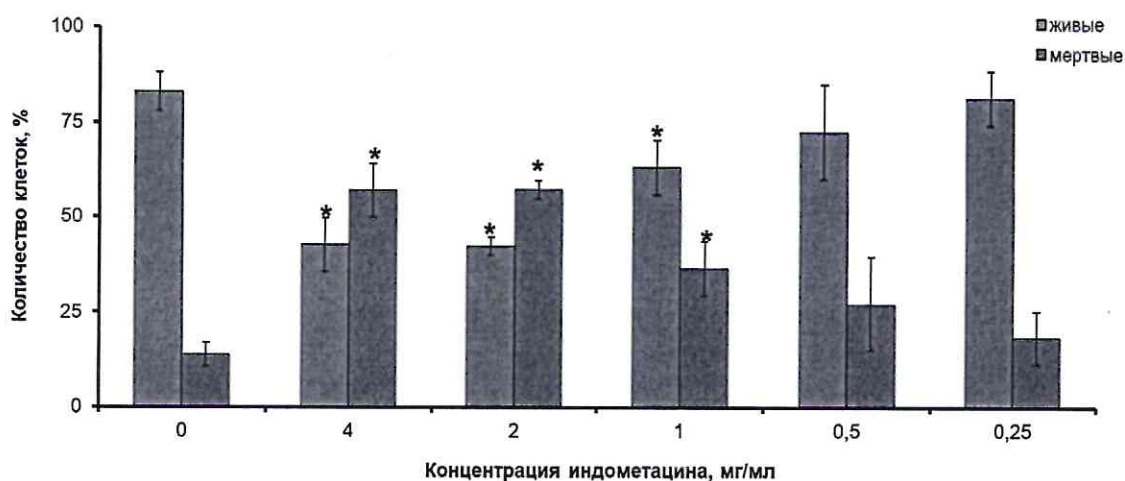


Рисунок 2. Влияние концентрации индометацина на количество живых и мертвых клеток в популяции NuTu80. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; $n=5$, * – различия достоверны при $p<0.05$, по сравнению с контролем (0 мг/мл).

Оценка цитотоксичности

Цитотоксичность 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). Для этого в 6 луночный культуральный планшет вносили исследуемые образцы. Затем в лунки вносили интактные клетки NuTu80 (1×10^6 шт/100 мкл). Во всех экспериментах, где не указано иное, использовали питательную среду ДМЕМ, содержащую 10% ФБС и 1% раствор пенициллина-стрептомицина. Инкубировали сутки с исследуемыми образцами, при стандартных условиях (37°C , 5% CO_2). Затем клетки снимали с поверхности пластика используя для этого 0,25% раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФСБ и оценивали количество живых и мертвых клеток согласно протоколу, рекомендованному производителем набора Kit Live/Dead Test.

Морфометрическая характеристика клеток

Оценивали влияние исследуемых образцов на размеры, форму клеток и количество клеток эпителия кишечника NuTu80 и CaCo2. Как было описано выше, интактные и поврежденные 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). Пролиферативную активность оценивали, подсчитывая количество клеток на квадрате площадью 0,1 мм².

Оценка количества апоптических клеток

Влияние исследуемых образцов на количество апоптических клеток в популяции оценивали при их совместной инкубации интактными и поврежденными клетками эпителия кишечника HuTu80 и CaCo2. Для этого в 9 луночный культуральный планшет вносили по 1 мл заранее приготовленных разведений исследуемого образца. Затем в лунки вносили интактные клетки (1×10^6 шт/100 мкл) и инкубировали в течение суток при стандартных условиях. Затем клетки снимали с поверхности пластика используя для этого 0,25% раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФСБ. Оценку количества апоптических и некротических клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I BD, Pharmingen, США).

Клеточный цикл клеток эпителия кишечника

Оценивали влияние исследуемых образцов на фазы клеточного цикла интактных и поврежденных клеток кишечника человека. Для этого в 9 луночный культуральный планшет вносили по 1 мл заранее приготовленных разведений исследуемого образца. Затем в лунки вносили интактные и поврежденные клетки (1×10^6 шт/100 мкл) и инкубировали в течение суток при стандартных условиях. Затем клетки снимали с поверхности пластика используя для этого 0,25% раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФСБ. Фазы клеточного цикла: фаза покоя (G0 фаза), фаза клеточного роста, (G1 фаза), синтетическая (S фаза) и фаза клеточного деления (M фаза) оценивали методом проточной цитометрии и коммерческого набора Kit CellCycle (BD Pharmingen, США). Индекс пролиферативной активности

определяли, суммируя количество клеток находящихся в S и M фазах клеточного цикла.

Статистическая обработка результатов

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение (M), среднее квадратичное отклонение (sd). Достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента и критерию χ^2 Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование проведено с целью оценить способность коллагенсодержащего гидрогеля, представляющего собой пищевую добавку к стандартному рациону, защищать клетки кишечника от повреждения, вызванного индометацином. Индометацин представляет собой производное индолуксусной кислоты и обладает противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим действием.

Установлено, что в контроле, через сутки после инкубации, клетки эпителия кишечника NuTu-80 увеличиваются в размерах и приобретают вытянутую форму (Рис. 3а) с длиной тела 40 ± 12 мкм (Рис. 4). Содержание в среде коллагенового гидрогеля, в 3% концентрации, не влияет на размеры и форму клеток (Рис. 3б, Рис. 4). При совместной инкубации клеток с индометацином (1 мг/мл) рост клеток замедляется, более 90% клеток обладают шаровидной формой, диаметр клеток составляет 16 ± 4 мкм (Рис. 3в, Рис. 4). Установлено, что внесение коллагенового гидрогеля в среду, содержащую индометацин сохраняет способность клеток к росту. Через сутки культивирования клеток в среде, содержащей как индометацин, так и коллагеновый гидрогель, большинство клеток приобретает веретеновидную форму (Рис. 3г), при этом длина тела клеток сопоставима с контрольными значениями и составляет 35 ± 10 мкм (Рис. 4).

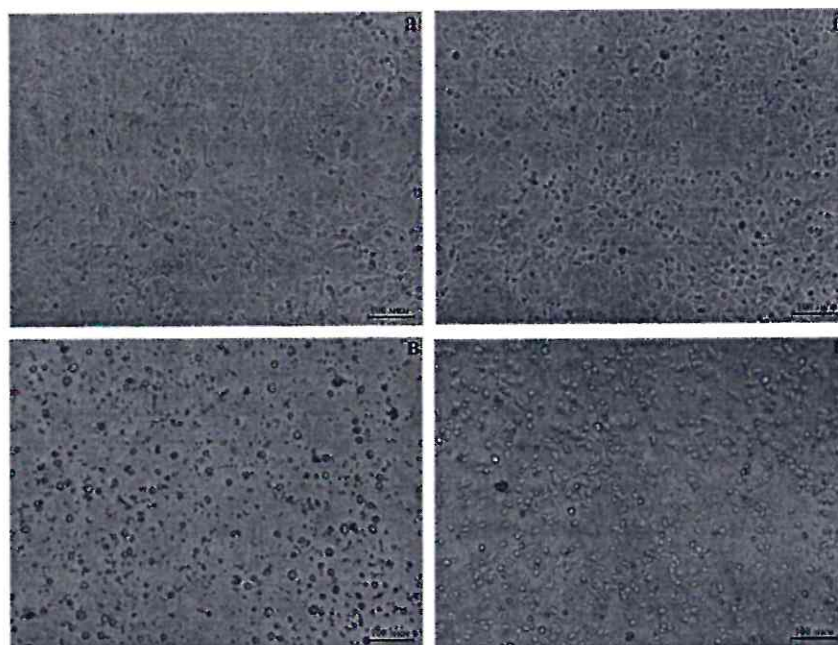


Рисунок 3. Типичное изображение клеток эпителия тонкой кишки человека NuTu-80 через сутки инкубации в интактной питательной среде (а), в средах содержащей коллагеновый гидрогель, (б), индометацин (в) и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином (г). Световая микроскопия, увеличение 100×.

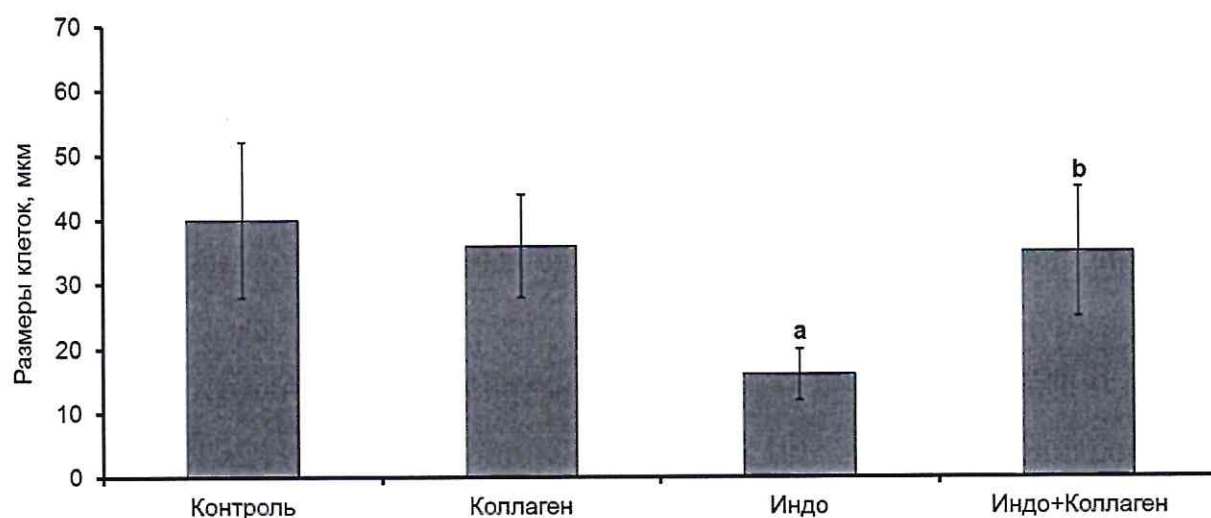


Рисунок 4. Размеры клеток NuTu-80 через сутки инкубации в интактной питательной среде (а), в средах содержащей коллагеновый гидрогель (б), индометацин (в) и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином (г). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; ^a -

различия достоверны при $p < 0.05$, по сравнению с контролем, ^b - различия достоверны при $p < 0.05$, по сравнению с группой «Индо» (индометацин).

Таким образом установлено, что индометацин ингибирует рост клеток эпителия тонкой кишки человека. Результаты многочисленных исследований показывают, что как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* НПВП, в том числе индометацин, оказывают ингибирующее действие на функциональную активность и жизнеспособность энтероцитов [13, 14]. Механизмы патогенного действия НПВП на клетки кишечника, по всей видимости, обусловлены повреждением митохондрий и накоплением активных форм кислорода [12].

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы и демонстрируют, что инкубация энтероцитов (HuTu-80) с индометацином ингибирует рост клеток, их пролиферативную активность, вызывает активацию апоптоза, а также приводит к изменению клеточного цикла энтероцитов.

Установлено, что коллагеновый гидрогель ингибирует клеточную дисфункцию, вызванную индометацином. Ранее сообщалось, что подобное защитное действие на культуру энтероцитов человека и животных, могут оказывать различные соединения, как например полифенолы и их метаболиты [10, 15], пептиды пшеницы [16], 5-Аминосалициловая кислота (5-АСК) и сульфасалазин [17]. Защитное действие данных соединений связывают с их антиоксидантными свойствами. Механизмы защитного действия коллагена в отношении НПВП-индуцированного повреждения энтероцитов также может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами. В пользу этого предположения говорит то, что ранее было показано, что коллаген, желатин и коллагеновые пептиды, в условиях *in vitro*, обладают антиоксидантным действием реализуемым посредством поглощения свободных радикалов [18, 19].

На следующем этапе исследования оценивали влияние коллагенового гидрогеля на количество живых, апоптических и мертвых клеток HuTu-80

инкубированных в стандартной питательной среде и в среде, содержащей индометацин.

Апоптоз представляет собой особую, генетически запрограммированную, форму гибели клетки и является необходимым условием нормального существования клеточной популяции и организма. Назначение А состоит в поддержании постоянства численности клеток, обеспечении правильного соотношения клеток различных типов и удалении генетически дефектных клеток.

В норме, при культивировании интактных клеток NuTu-80 в стандартных условиях, количество живых, апоптических и мертвых клеток в популяции составляет 91 ± 3 , $1,4 \pm 0,3$ и $7 \pm 1\%$, соответственно (Рис. 5а-в).

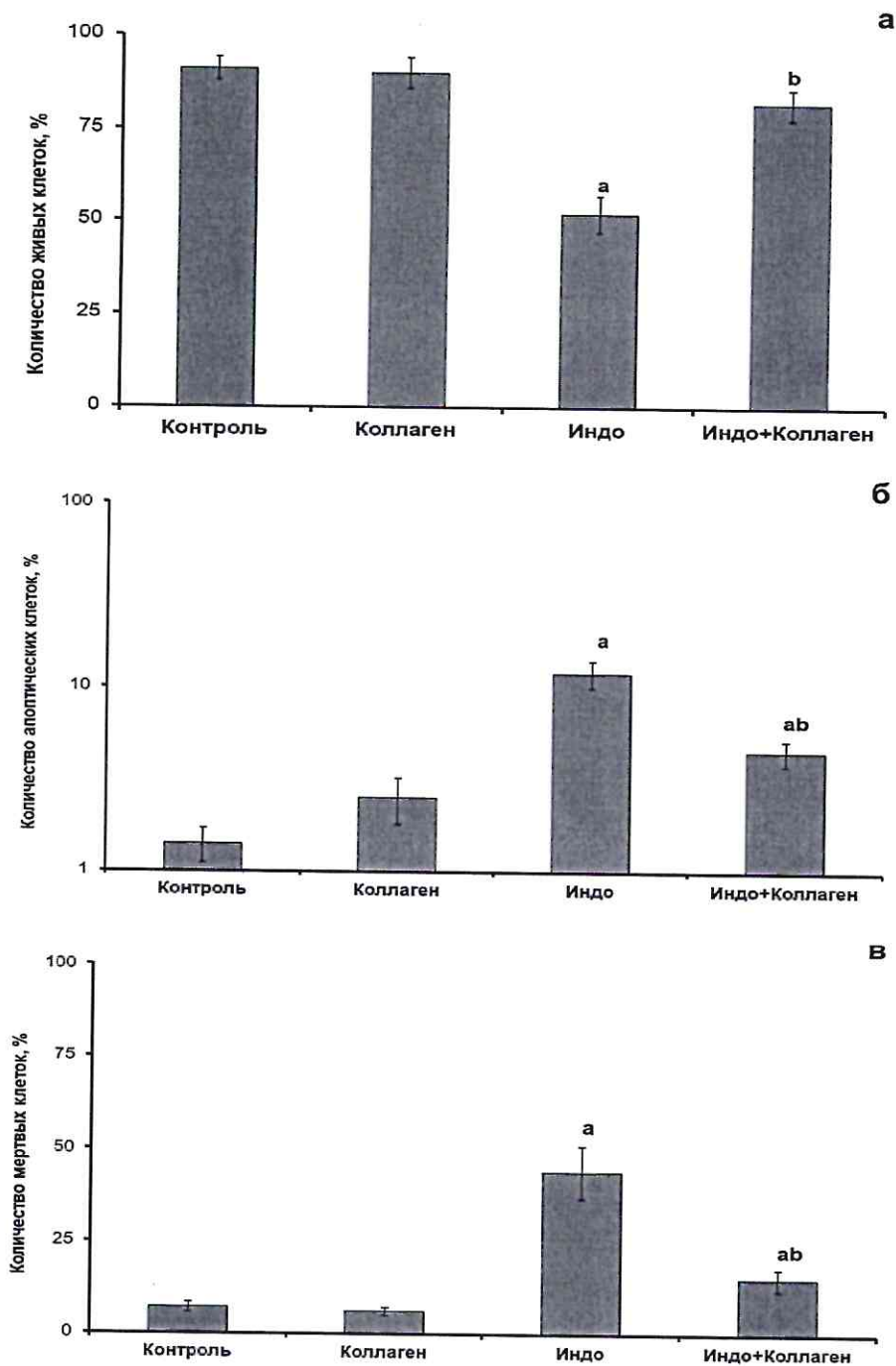


Рисунок 5. Количество живых (а), апоптических (б) и мертвых (в) клеток NuTi-80, через сутки инкубации в интактной питательной среде, в средах содержащей коллагеновый гидрогель, индометацин и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; ^a - различия достоверны при $p < 0.05$, по сравнению с контролем, ^b - различия достоверны при $p < 0.05$, по сравнению с группой «Индо» (индометацин).

Внесение коллагенового гидрогеля в культуральную среду не влияет на соотношение клеток, в то время как совместная инкубация клеток с индометацином вызывает гибель 50% клеток (Рис. 5а, в) и увеличивает количество апоптических клеток более чем в 10 раз (Рис. 5б). Выявлено, что внесение коллагенового гидрогеля в среду содержащей индометацин предотвращает гибель клеток (Рис. 5а, в) и снижает количество апоптических клеток в популяции (Рис. 5б).

Полученные результаты согласуются с данными морфометрического анализа клеток и указывают на то, что коллагеновый гидрогель предотвращает гибель клеток и снижает количество апоптических клеток в популяции.

Хорошо известно, что воздействие НПВП влияет на распределение фаз клеточного цикла [9, 20]. Правильное развитие клеточного цикла от G1 фазы до M фазы гарантирует, что каждая из двух дочерних клеток получит идентичные хромосомы от родительской клетки. Поэтому на следующем этапе исследования оценивали изменения, происходящие в клеточном цикле эпителиальных клеток линии NuTu-80.

В контроле, при инкубации в стандартной питательной среде, большинство клеток находится в фазе роста G1, в синтетической фазе (S-фаза, фаза синтеза ДНК) и G2 фазе (пред митотический период) находятся 17 ± 2 и $31\pm 2\%$ клеток, соответственно (Рис. 6а). Полученные результаты согласуются с данными литературы [21] и указывают на то, что исследуемая популяция клеток имеет нормальное распределение фаз клеточного цикла.

Установлено, что внесение в культуральную среду коллагенового гидрогеля не влияет на распределение фаз клеточного цикла (Рис. 6б), в то время как инкубация клеток NuTu-80 совместно с индометацином приводит к изменению нормального клеточного цикла и накоплению клеток в S-фазе (Рис. 6в). Ранее было показано, что накопление клеток в S-фазе, при воздействии НПВП, связано с повреждением нити ДНК. Нарушения в стабильности клеточного генома приводит к активации апоптоза и гибели клеток [22, 23].

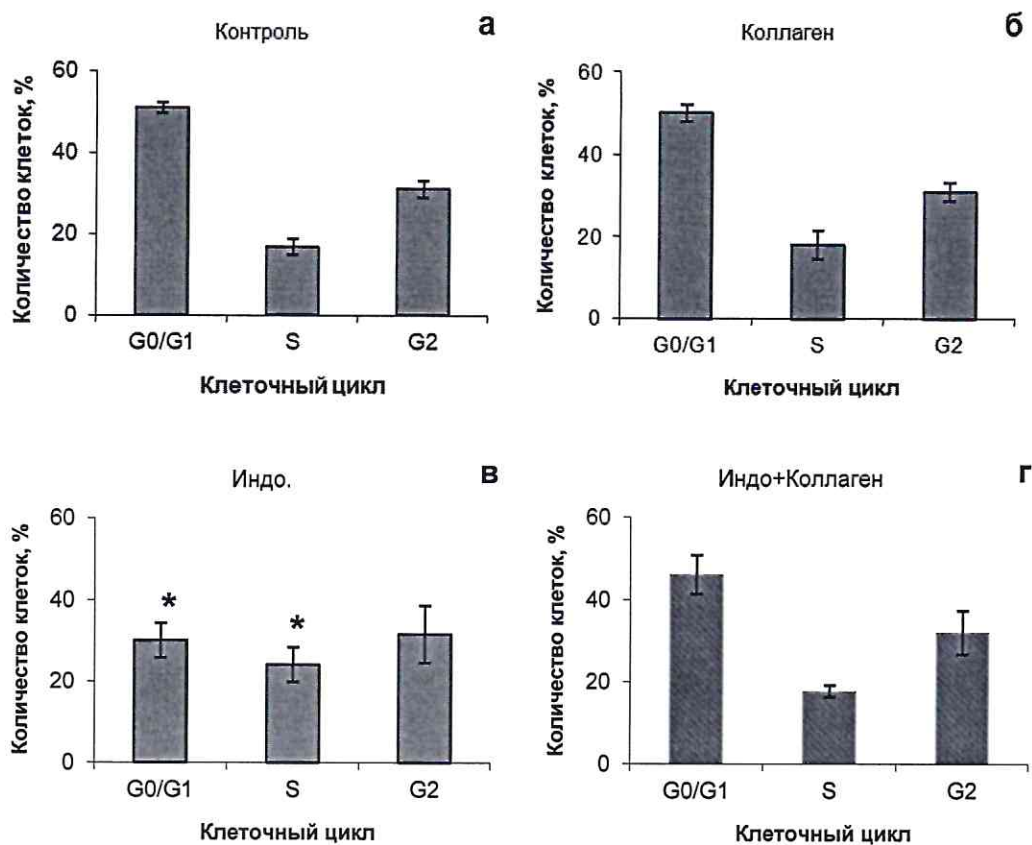


Рисунок 6. Распределение фаз клеточного цикла клеток NuTu-80, через сутки инкубации в интактной питательной среде (а), в средах содержащей коллагеновый гидрогель (б), индометацин (в) и смесь коллагенового гидрогеля с индометацином (г). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; * - различия достоверны при $p < 0.05$, по сравнению с контролем.

Выявлено, что внесение коллагенового гидрогеля в культуральную среду, содержащую индометацин, предотвращает патологические изменения в клеточном цикле клеток (Рис. 6г). Распределение клеток в фазах клеточного цикла сопоставимо с контрольными значениями.

Таким образом, установлено, что коллагеновый гидрогель способен снижать патогенное действие индометацина на эпителиальные клетки кишечника человека, в условиях *in vitro*. Защитное действие коллагенового гидрогеля характеризуется сохранением жизнеспособности и

пролиферативной активности клеток, а также сохранением стабильности клеточного генома.

ВЫВОДЫ

1. Внесение индометацина в культуральную среду ингибирует жизнеспособность клеток кишечника тонкой кишки. Патогенное действие индометацина характеризуется снижением ростовых качеств клеток, увеличением количества мертвых и апоптотических клеток, нарушением фаз клеточного цикла. Модель индометацинового повреждения клеток кишечника *in vitro*, имитирует дисфункцию энтероцитов у людей регулярно принимающих НПВП.

2. Коллагеновый гидрогель (ООО «Первый живой коллаген») защищает клетки кишечника от токсического действия индометацина и способствует сохранению функциональной активности клеток кишечника на уровне сопоставимом с интактными клетками.

3. Полученные результаты указывают на то, что коллагеновый гидрогель (ООО «Первый живой коллаген») может использоваться, в качестве биологически активной добавки, для профилактики НПВП-зависимых энтеропатий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Arden NK, Perry TA, Bannuru RR, Bruyère O, Cooper C, Haugen IK, Hochberg MC, McAlindon TE, Mobasheri A, Reginster JY. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSI 2019 guidelines. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Jan;17(1):59-66. doi: 10.1038/s41584-020-00523-9. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33116279.
2. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SMA, Kraus VB, Lohmander LS, Abbott JH, Bhandari M, Blanco FJ, Espinosa R, Haugen IK, Lin J, Mandl LA, Moilanen E, Nakamura N, Snyder-Mackler L, Trojian T, Underwood M, McAlindon TE. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Nov;27(11):1578-1589. doi: 10.1016/j.joca.2019.06.011. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31278997.
3. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shah AA, Shmagel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020 Feb;72(2):149-162. doi: 10.1002/acr.24131. Epub 2020 Jan 6. Erratum in: *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2021 May;73(5):764. PMID: 31908149.
4. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging Dis*. 2018 Feb 1;9(1):143-150. doi: 10.14336/AD.2017.0306. PMID: 29392089; PMCID: PMC5772852.
5. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*. 2020 Oct; 180:114147. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114147. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32653589; PMCID: PMC7347500.

6. García-Rayado G, Navarro M, Lanás A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018 Oct;11(10):1031-1043. doi: 10.1080/17512433.2018.1516143. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30139288.
7. Badri W, Miladi K, Nazari QA, et al. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. *Int J Pharm*. 2016;515(1-2):757-773
8. Singh DP, Borse SP, Nivsarkar M. A novel model for NSAID induced gastroenteropathy in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016 Mar-Apr;78:66-75. doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.008. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26655077.
9. Yip-Schneider MT, Sweeney CJ, Jung SH, Crowell PL, Marshall MS. Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Sep;298(3):976-85. PMID: 11504793.
10. Fuentes J, Brunser O, Atala E, Herranz J, de Camargo AC, Zbinden-Foncea H, Speisky H. 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. *J Nutr Biochem*. 2022 Feb;100:108886. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108886.
11. Omatsu T, Naito Y, Handa O, Hayashi N, Mizushima K, Qin Y, Hirata I, Adachi S, Okayama T, Kishimoto E, Takagi T, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Involvement of reactive oxygen species in indomethacin-induced apoptosis of small intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol*. 2009;44 Suppl 19:30-4. doi: 10.1007/s00535-008-2293-3.
12. Bhatt AP, Gunasekara DB, Speer J, Reed MI, Peña AN, Midkiff BR, Magness ST, Bultman SJ, Allbritton NL, Redinbo MR. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Leaky Gut Modeled Using Polarized Monolayers of Primary Human Intestinal Epithelial Cells. *ACS Infect Dis*. 2018 Jan 12;4(1):46-52. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00139

13. Chao G, Hong X, Zhang S. Effects of Mast Cells Induced by NSAIDs Impair Intestinal Epithelial Barrier Function In Vivo and In Vitro. *Inflammation*. 2021 Aug;44(4):1396-1404. doi: 10.1007/s10753-021-01424-z.
14. Handa O, Takayama S, Mukai R, Suyama Y, Majima A, Fukui A, Omatsu T, Naito Y. A review of the mechanism and prophylaxis of acetyl salicylic acid-induced injury of the small intestine. *Free Radic Res*. 2018 Dec;52(11-12):1266-1270. doi: 10.1080/10715762.2018.1455003.
15. 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. *J Agric Food Chem*. 2013 Jun 5;61(22):5291-7. doi: 10.1021/jf400150p.
16. Yin H, Pan X, Song Z, Wang S, Yang L, Sun G. Protective effect of wheat peptides against indomethacin-induced oxidative stress in IEC-6 cells. *Nutrients*. 2014 Jan 29;6(2):564-74. doi: 10.3390/nu6020564.
17. Jung ES, Jang HJ, Hong EM, Lim HL, Lee SP, Kae SH, Lee J. 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 Oct 1;56(10):515. doi: 10.3390/medicina56100515.
18. Nurilmala M, Hizbullah HH, Karnia E, Kusumaningtyas E, Ochiai Y. Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Mar Drugs*. 2020 Jan 31;18(2):98. doi: 10.3390/md18020098.
19. Medina-Medrano JR, Quiñones-Muñoz TA, Arce-Ortíz A, Torruco-Uco JG, Hernández-Martínez R, Lizardi-Jiménez MA, Varela-Santos E. Antioxidant Activity of Collagen Extracts Obtained from the Skin and Gills of *Oreochromis* sp. *J Med Food*. 2019 Jul;22(7):722-728. doi: 10.1089/jmf.2019.0013
20. Chang JK, Wang GJ, Tsai ST, Ho ML. Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res*. 2005;46(4-5):200-10. doi: 10.1080/03008200500344025. PMID: 16546823.

21. Wang Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2022;2579:3-23. doi: 10.1007/978-1-0716-2736-5_1. PMID: 36045194.
22. Luciani MG, Campregher C, Fortune JM, Kunkel TA, Gasche C. 5-ASA affects cell cycle progression in colorectal cells by reversibly activating a replication checkpoint. *Gastroenterology.* 2007 Jan;132(1):221-35. doi: 10.1053/j.gastro.2006.10.016. Epub 2006 Oct 12. PMID: 17241873; PMCID: PMC1839818.
23. Koelink PJ, Mieremet-Ooms MA, Corver WE, Wolanin K, Hommes DW, Lamers CB, Verspaget HW. 5-aminosalicylic acid interferes in the cell cycle of colorectal cancer cells and induces cell death modes. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Mar;16(3):379-89. doi: 10.1002/ibd.21086. PMID: 19774649.