

DOI 10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119

UDC 615.212.03:577.21-074/-076-092.9

**Burlaka K. A.**

**INFLUENCE OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON THE LEVEL OF WHOLE GENOME DNA METHYLATION AND ITS FRAGMENTATION IN RATS**

Zaporizhzhia State Medical University (Zaporizhzhia, Ukraine)

[burlakakristina98@gmail.com](mailto:burlakakristina98@gmail.com)

*In recent years, there has been rapid growth in epigenetic research associated with the development of new molecular and cytological approaches. Recent studies have established that chemical compounds can have an epigenetic effect, influencing the expression activity of specific genes. And most often, it is connected with people with chronic diseases because they are forced to use medicines for a long time to improve their quality of life. It is known that long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) leads to the formation of erosions, ulcers and oncological diseases of the stomach and intestines. It is suggested that side effects result from damage to the mucous membrane under the influence of NSAIDs and the possible effect of NSAIDs on genes that regulate the cell cycle, especially with their long-term use. In the research, 60 male rats were used, which were divided into four groups of 15 animals each, which were administered NSAIDs daily for 3 months: 1st – control (CG), 0.9% sodium chloride solution, 2nd – rats, which were injected with indomethacin, the 3rd group – rats, which were injected with acetylsalicylic acid, and the 4th group – rats, which were injected with meloxicam. Long-term use of all NSAIDs led to a statistically significant increase in genome-wide DNA methylation and intensification of its fragmentation processes. It is important to note that according to the degree of epigenetic influence, the effect of the studied NSAIDs was of varying severity. Indomethacin had the most pronounced effects (increase of MspI/HpaII by 99%; DNA fragmentation by 90% compared to intact). Taking into account the established effects of NSAIDs, regarding their ability to increase the level of whole-genome DNA methylation and their fragmentation, a promising direction is to study the level of methylation of genes that regulate the cell cycle of the stomach and intestines, as well as the study of their expression/protein synthesis function.*

**Key words:** DNA methylation, epigenetics, ulcerogenic effect, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

**Connection of the publication with planned research works.**

The work was carried out as part of the research work of the Department of Clinical and Laboratory Diagnostics of the Zaporizhzhia State Medical University “Development of new effective ways of diagnosis and endogenous cytoprotection of ischemic damage of the coronary and cerebral blood circulation (clinical and experimental research)”, state registration number – 0118U004369.

**Introduction.**

In human life, the body is subject to the influence of negative external environment factors, leading to epigenetic changes and, accordingly, to a violation of the expression/protein synthesizing function of the body's cells. Researches of the last decade have established that drugs can act as epigenetic factors, especially with their long-term administration, some drugs are considered as epigenetically active xenobiotics, which can chemically interact with the nucleic acids of the cell, leading to histone modification and DNA methylation [1, 2].

It is known that epigenetic modification of DNA affects the expression activity of certain genes at several levels, which leads to a change in the phenotype of the cell. In the body, there are molecular-biochemical systems aimed at inactivating xenobiotics, including drugs, but it is known that drugs change not only molecular reactions, physiological functions but also can model gene expression [3].

It has long been known that gene mutations play an important role in the formation of oncogenesis. However, only recently was it recognized that epigenetic changes significantly contribute to the development of oncological diseases [3, 4, 5].

Based on the above, studying the epigenetic effect of drugs on epigenetic changes in genes is interesting. In recent years, there has been a rapid increase in epigenetic research associated with the development of new molecular and cytological approaches. It has been established that there are basic epigenetic mechanisms, or, as they often say, epigenetic markers. Currently, DNA methylation is the most studied. DNA methylation is catalyzed by a family of DNA methyltransferases (Dnmts), which transfer a methyl group from S-adenylmethionine (SAM) to the fifth carbon of a cytosine residue to form 5mC. Dnmt3a and Dnmt3b can establish a new methylation pattern of unmodified DNA and are therefore known as Dnmt de novo. On the other hand, Dnmt1 functions during DNA replication by copying the DNA methylation pattern from the parental DNA strand to the newly synthesized daughter strand [2, 3, 6, 7].

Today, the ability of drugs to epigenetically affect gene expression is considered one of the likely mechanisms of unwanted side reactions.

There are data that long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) leads to the formation of erosions, ulcers and oncological diseases of the stomach and intestines. It is suggested that these side effects result from damage to the mucous membrane

under the influence of NSAIDs and the possible effect of NSAIDs on genes that regulate the cell cycle, especially with their long-term use [8].

**The aim of the study.**

Study of the effect of various NSAIDs on the level of genome-wide DNA methylation and its fragmentation processes.

**Object and research methods.**

The research used 60 male Wistar rats weighing 200-400 grams, obtained from the kennel of the SI "Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS of Ukraine". All experimental studies complied with the main provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Care, maintenance and feeding of animals were carried out in accordance with the requirements of regulatory documents in standard vivarium conditions. Before starting the research, the Bioethics Commission of the State Medical University reviewed and approved the research protocol (No. 7 dated 11.11.2019) and all procedures related to keeping animals, humane treatment of animals, and their use in experiments. Each group included 15 animals (15 males). The duration of quarantine (acclimatization period) for all animals was 14 days. During the quarantine, each animal was examined daily (behavior and general condition), twice a day the animals were observed in the cells (morbidity and mortality).

Sixty laboratory rats weighing 200-400 g. were divided into four groups of 15 animals as follows: 1st – control (CG), which were injected with a 0.9% sodium chloride solution daily for 3 months, 2nd – rats, which were injected with indomethacin (Ind) daily for 3 months months at a dose of 0.6 mg/kg, the 3rd group – rats that were administered daily for 3 months with acetylsalicylic acid (Asa) for 3 months at a dose of 0.6 mg/kg and the 4th group – rats that were administered daily with meloxicam (Mxc) in a dose of 0.1 mg/kg – 3 months.

DNA fragmentation and methylation levels were determined using the DNA-comet assay method. MspI and HpaII restriction enzymes (Abcam, USA) were used to study methylation processes. The degree of DNA fragmentation was expressed as a percentage. The level of DNA methylation was expressed as a percentage of MspI and HpaII in the nuclei of blood cells [9].

Statistical evaluation of the research results was performed using the Statistica 10.0 software package (Statsoft Inc., USA). The obtained results are presented in the form of the median of the interquartile range. Differences between groups were assessed using nonparametric methods using the Mann-Whitney test. Differences at  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

**Research results and their discussion.**

Long-term use of all NSAIDs led to a statistically significant increase in genome-wide DNA methylation and intensification of its fragmentation processes (table). It is important to note that according to the degree of epigenetic influence, the effect of the studied NSAIDs was of varying severity. Thus, the most significant effect on the amount of MspI/HpaII was exerted by long-term administration of indometacin (increase by 99% compared to the intact group of animals), then acetylsalicylic acid and meloxicam (by 56% and 41%, respectively). Similar dynamics of NSAIDs was also established when studying the degree of total DNA fragmentation.

We established the ability of NSAIDs to affect DNA methylation processes, to some extent confirming many researchers' assumptions regarding the presence of NSAIDs in the epigenetic mechanism of their unwanted side effects.

**Table – Whole-genome DNA methylation (MspI/HpaII) and its fragmentation in blood lymphocytes of rats against the background of long-term administration of NSAIDs**

Animals group	MspI/HpaII	DNA fragmentation
Intact	5,1 [3,2 6,4]	0,2 [0,1 0,4]
Ind, 14 days	15,7 [11,3 17,8]*	1,1 [0,7 1,3]*
Asa, 14 days	11,4 [9,3 14,7]*	0,8 [0,64 1,0]*
Mxc, 14 days	8,6 [6,4 10,2]*	0,5 [0,35 0,62]*

Note: \* –  $p < 0.05$  in relation to the intact group of animals.

DNA methylation is regulated by a family of DNA methyltransferase enzymes (DNMTs), of which DNMT1 methylates DNA during replication, DNMT3A and DNMT3B carry out de novo methylation, and DNMT3L, in turn, is responsible for binding the listed methyltransferases to the methyl group donor – S – adenosyl-L-methionine. There are 2 main mechanisms of epigenetic regulation of transcription by DNA methylation: direct and indirect. The direct mechanism of action is based on the steric hindrance of methyl groups in the interaction of DNA with transcription factors. In the case of a mediated mechanism, methylated regions interact with methyl binding proteins (MBPs) MeCP-1 and MeCP-2, which bind to DNA. MeCP-1 sterically blocks the binding of DNA to the transcription apparatus, which leads to repression of transcription [6, 8, 10]. MeCP-2, in turn, recruits histone deacetylases (HDACs) together with transcriptional corepressors, leading to compaction of chromatin structure and transcriptional repression, leading to DNA fragmentation.

The molecular processes described above lead to disruption of gene expression/protein synthesis function, which can lead to genomic instability and disruption of cell proliferation and differentiation processes. A number of studies have shown that NSAIDs can cause oncological diseases of the gastrointestinal tract with their long-term use. An epigenetic effect of NSAIDs on genes regulating the cell cycle of the stomach (CDH1, MHL1) and intestines (SEPT9, APC) was established. It is known that the SEPT9 gene encodes the synthesis of septin-9 protein. DNA methylation of this gene stops its active work and "turns off" the cancer growth suppressor protein synthesis. Loss of SEPT9 gene expression is associated with the development of colorectal cancer (CRC) [8, 10]. The presence of an inactive tumor suppressor gene in the blood indicates the processes of tumor development in the intestine, reflecting such events as cell proliferation and angiogenesis in the tumor [11]. In addition, our previous studies established a probable MMP-mediated mechanism of side effects of NSAIDs, due to changes in the expression activity of genes encoding the synthesis of matrix metalloproteinases, an increase in their concentration and their participation in the degradation of the extracellular matrix.

**Conclusions.**

Thus, the experimental studies we conducted established the ability of NSAIDs to increase whole-genome DNA methylation and intensify their fragmentation processes with long-term administration. Indomethacin had the most pronounced effects (increase of MspI/HpaII by 99%; DNA fragmentation by 90% compared to intact).

**Prospects for further research.**

Considering the established effects of NSAIDs regarding their ability to increase the level of genome-wide DNA methylation and their fragmentation, a promising direction is to study the methylation level of genes that regulate the cell cycle of the stomach (CDH1, MHL1) and intestines (SEPT9, APC), as well as the study of their expression/protein-synthesizing function.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119

УДК 615.212.03:577.21-074/-076-092.9

Бурлака К. А.

**ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ НА РІВЕНЬ ПОВНОГЕНОМНОГО МЕТИЛЮВАННЯ ДНК ТА ЇЇ ФРАГМЕНТАЦІЇ У ЩУРІВ**

Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя, Україна)

[burlakakristina98@gmail.com](mailto:burlakakristina98@gmail.com)

За останні роки, спостерігається бурхливе зростання епігенетичних досліджень, пов'язаних з розвитком нових молекулярних і цитологічних підходів. Останніми дослідженнями було встановлено, що хімічні сполуки можуть мати епігенетичний вплив, тобто впливати на активність експресії певних генів. А найчастіше, це пов'язано з людьми які мають хронічні захворювання, тому що вони вимушені застосовувати лікарські засоби тривало, з метою покращення якості життя. Відомо, що тривалий прийом нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЗ) приводить до утворення ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунка та кишечника. Висловлюється припущення, що побічні ефекти є не тільки результатом пошкодження слизової оболонки під впливом НПЗЗ, але і можливим впливом НПЗЗ на гени, які регулюють клітинний цикл, особливо при їх тривалому застосуванні. У дослідженнях були використані 60 щурів-самців, які були розподілені на чотири групи по 15 тварин, котрим вводили щоденно у продовж 3 місяців НПЗЗ: 1-а – контрольна (КГ), розчин натрію хлориду 0,9%, 2-га – щури, котрим вводили індометацин, 3-я – щури, котрим вводили ацетилсаліцилову кислоту та 4-а група – щури, котрим вводили мелоксикам. Тривале призначення всіх НПЗЗ призводило до статистично вірогідного збільшення повногеномного метилювання ДНК та до інтенсифікації процесів її фрагментації. Важливо зазначити, що за ступенем епігенетичного впливу, дія досліджуваних НПЗЗ була різного ступеня вираженості. Найбільш вираженими ефектами володіє індометацин (збільшення MspI/HpaII на 99 %; фрагментації ДНК – на 90% по відношенню до інтакту). Враховуючи встановлені ефекти НПЗЗ, щодо їх здатності підвищувати рівень повногеномного метилювання ДНК та їх фрагментації, перспективним напрямом є вивчення рівня метилювання генів, що регулюють клітинний цикл шлунка та кишечника, а також вивчення їх експресивної/білоксинтетуючої функції.

**Ключові слова:** метилювання ДНК, епігенетика, ульцерогенна дія, нестероїдні протизапальні лікарські засоби.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи кафедри клінічної та лабораторної діагностики ЗДМУ «Розробка нових ефективних шляхів діагностики та ендогенної цитопротекції ішемічних пошкоджень коронарного і церебрального кровообігу (клінічно-експериментальне дослідження)», № державної реєстрації – 0118U004369.

**Вступ.**

В процесі життєдіяльності людини організм підлягає впливу негативних факторів зовнішнього середовища, призводячи до епігенетичних змін, та відповідно, до порушення експресивної/білоксинтетуючої функції клітин організму. Дослідженнями останнього десятиріччя встановлено, що лікарські засоби можуть виступати у якості епігенетичних факторів, особливо при їх тривалому введенні, окремі лікарські засоби розглядають у якості епігенетично активних ксенобіотиків, які здатні хімічно взаємоді-

яти із нуклеїновими кислотами клітини, призводячи до модифікації гістонів та метилювання ДНК [1, 2].

Відомо, що епігенетична модифікація ДНК впливає на активність експресії певних генів на кількох рівнях, що призводить до зміни фенотипу клітини. В організмі, існують молекулярно-біохімічні системи, спрямовані на інактивацію ксенобіотиків, у тому числі й лікарських засобів, проте відомо, що лікарські препарати змінюють не лише молекулярні реакції, фізіологічні функції, а й здатні моделювати генну експресію [3].

Давно відомо, що генні мутації відіграють важливу роль у формуванні онкогенезу. Однак лише недавно було визнано, що епігенетичні зміни роблять значний внесок у розвиток онкологічних захворювань [3, 4, 5].

Виходячи з вищевикладеного, цікавим є вивчення епігенетичного впливу лікарських препаратів на епігенетичні зміни генів. За останні роки спостерігається бурхливе зростання епігенетичних досліджень, пов'язаних з розвитком нових молекулярних і цито-



логічних підходів. Встановлено, що існують основні епігенетичні механізми, або, як часто кажуть епігенетичні маркери. В даний час найбільш вивчено ДНК-метилування. Метилування ДНК каталізується сімейством ДНК-метилтрансфераз (Dnmts), які переносять метильну групу з S-аденілметіоніну (SAM) на п'ятий вуглець залишку цитозину з утворенням 5mC. Dnmt3a та Dnmt3b можуть встановлювати новий патерн метилування немодифікованої ДНК і тому відомі як Dnmt de novo. З іншого боку, Dnmt1 функціонує під час реплікації ДНК, копіюючи патерн метилування ДНК з батьківського ланцюга ДНК на знову синтезований дочірній ланцюг [2, 3, 6, 7].

На сьогодні, здатність лікарських засобів епігенетично впливати на експресію генів, розглядають як один з вірогідних механізмів небажаних побічних реакцій.

Є дані, що тривалий прийом нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЗ) приводить до утворення ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунка та кишечника. Висловлюється припущення, що дані побічні ефекти є не тільки результатом пошкодження слизової оболонки під впливом НПЗЗ, але і можливим впливом НПЗЗ на гени, які регулюють клітинний цикл, особливо при їх тривалому застосуванні [8].

**Мета дослідження.**

Дослідження впливу різних НПЗЗ на рівень повногеномного метилування ДНК та процесів її фрагментації.

**Об'єкт і методи дослідження.**

У дослідженнях були використані 60 щурів-самців лінії Wistar масою 200-400 грамів, отримані з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ». Усі експериментальні дослідження проводили з дотриманням основних положень Європейської конвенції про охорону хребетних тварин, що використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями (Страсбург, 1986 р.). Догляд, утримання і годування тварин здійснювався згідно з вимогами нормативних документів в стандартних умовах віварію. До початку проведення дослідження комісія з питань біоетики ЗДМУ перевірила і погодила протокол дослідження (№7 від 11.11.2019р.), а також всі процедури, пов'язані з утриманням тварин, гуманним поводженням з тваринами і їх використанням в експерименті. Кожна група включала в себе 15 тварин (15 самців). Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Протягом карантину проводили щоденний огляд кожної тварини (поведінку і загальний стан), двічі в день тварин спостерігали в клітинах (захворюваність і смертність).

60 лабораторних щурів масою 200-400 гр. були розподілені на чотири групи по 15 тварин наступним чином: 1-а – контрольна (КГ), котрим вводили щоденно у продовж 3 місяців розчин натрію хлориду 0,9%, 2-га – щури, котрим вводили щоденно індометацин (Інд) протягом 3 місяців в дозі 0,6 мг/кг., 3-я – щури, котрим вводили щоденно протягом 3 місяців ацетилсаліцилову кислоту (Аск) 3 місяці в дозі 0,6 мг/кг та 4-а група – щури, котрим вводили щоденно мелоксикам (Мкс) в дозі 0,1 мг/кг – 3 місяці.

Рівень фрагментації та метилування ДНК встановлювали за методикою DNA-comet assay. При до-

слідженні процесів метилування використовували рестриктази MspI та HpaII (Abcam, USA). Ступінь фрагментації ДНК виражали у відсотках. Рівень метилування ДНК виражали у відсотках MspI та HpaII у ядрах клітин крові [9].

Статистичну оцінку результатів дослідження проводили із використанням програмного пакету Statistica 10,0 (Statsoft Inc., USA). Отримані результати подано у вигляді медіани інтерквартильного розмаху. Відмінності між групами оцінювалися із застосуванням непараметричних методів із використанням критерію Манна-Уїтні. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.**

Тривале призначення всіх НПЗЗ призводило до статистично вірогідного збільшення повногеномного метилування ДНК та до інтенсифікації процесів її фрагментації (табл.). Важливо зазначити, що за ступенем епігенетичного впливу, дія досліджуваних НПЗЗ була різного ступеня вираженості. Так, найбільший вплив на кількість MspI/HpaII чинило тривале призначення індамітацину (збільшення на 99% по відношенню до інтактної групи тварин), далі – ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам (відповідно на 56% та 41%). Аналогічна динаміка НПЗЗ була встановлена також при дослідженні ступеню загальної фрагментації ДНК.

**Таблиця – Повногеномне метилування ДНК (MspI/HpaII) та її фрагментація у лімфоцитах крові щурів на тлі тривалого введення НПЗЗ**

Група тварин	MspI/HpaII	Фрагментація ДНК
Інтакт	5,1 [3,2 6,4]	0,2 [0,1 0,4]
Інд, 14 днів	15,7 [11,3 17,8]*	1,1 [0,7 1,3]*
Аск, 14 днів	11,4 [9,3 14,7]*	0,8 [0,64 1,0]*
Мкс, 14 днів	8,6 [6,4 10,2]*	0,5 [0,35 0,62]*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  по відношенню до інтактної групи тварин.

Встановлена нами здатність НПЗЗ впливати на процеси метилування ДНК, деякою мірою підтверджує припущення низки дослідників, щодо наявності у НПЗЗ епігенетичного механізму їх небажаних побічних ефектів.

Метилування ДНК регулюється сімейством ферментів ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), з яких DNMT1 метилує ДНК під час реплікації, DNMT3A і DNMT3B виконують метилування de novo, а DNMT3L, у свою чергу, відповідає за зв'язування перерахованих метилтрансфераз з донором метильної групи-S-аденозил-L-метіоніном. Існує 2 основні механізми епігенетичної регуляції транскрипції за допомогою метилування ДНК: прямий та опосередкований. Прямий механізм дії ґрунтується на стеричній перешкоді метильних груп взаємодії ДНК з транскрипційними факторами. У разі опосередкованого механізму метильовані області взаємодіють з метилзв'язуючими білками (methylbinding proteins, MBPs) MeCP-1 та MeCP-2, які приєднуються до ДНК. MeCP-1 стерично блокує зв'язування ДНК із транскрипційним апаратом, що веде до репресії транскрипції [6, 8, 10]. MeCP-2, у свою чергу, рекрутує гістонові деацетилази

(histone deacetylases, HDACs) спільно з транскрипційними корепресорами, що призводить до ущільнення структури хроматину та репресії транскрипції, що призводить до фрагментації ДНК.

Вищеописані молекулярні процеси призводять до порушення експресійної/білоксинтетичної функції генів, що може призвести до геномної нестабільності, а також порушення процесів проліферації та диференціювання клітин. Низкою досліджень показано, що НПЗЗ здатні викликати онкологічні захворювання шлунково-кишкового тракту при їх тривалому застосуванні. Був встановлений епігенетичний вплив НПЗЗ на гени, що регулюють клітинний цикл шлунка (CDH1, MHL1), а також кишечника (SEPT9, APC). Відомо, що ген SEPT9 кодує синтез білка septin-9. Метилування ДНК цього гена припиняє його активну роботу і «вимикає» синтез білка-супресора ракового зростання. Пошкодження експресії гена SEPT9 асоційоване з розвитком колоректального раку (КРР) [8, 10]. Наявність в крові неактивного гена-супресора ракової пухлини свідчить про процеси розвитку пухлини в кишечнику, відображає такі події як проліферація клітин і ангиогенезу в пухлині [11]. Крім того,

нашими попередніми дослідженнями був встановлений вірогідний *MMP* опосередкований механізм побічної дії НПЗЗ, за рахунок зміни експресивної активності генів, що кодують синтез матриксних металопротеїназ, збільшення їх концентрації та їх участі у деградації позаклітинного матриксу.

#### Висновки.

Таким чином, проведеними нами експериментальними дослідженнями була встановлена здатність НПЗЗ при їх тривалому введенні збільшувати повногеномне метилування ДНК та інтенсифікувати процеси їх фрагментації. Найбільш вираженими ефектами володів індометацин (збільшення *MspI*/*HpaII* на 99%; фрагментації ДНК – на 90% по відношенню до інтакту).

#### Перспективи подальших досліджень.

Враховуючи встановлені ефекти НПЗЗ щодо їх здатності підвищувати рівень повногеномного метилування ДНК та їх фрагментації, перспективним напрямом є вивчення рівня метилування генів, що регулюють клітинний цикл шлунка (CDH1, MHL1) та кишечника (SEPT9, APC), а також вивчення їх експресивної/білоксинтетичної функції.

### References / Література

- Ganesan A, Arimondo PB, Rots MG, Jeronimo C, Berdasco M. The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. *Clinical Epigenetics*. 2019 Dec 2;11(1):174. DOI: [10.1186/s13148-019-0776-0-2](https://doi.org/10.1186/s13148-019-0776-0-2).
- Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2018;837:8-24. DOI: [10.1016/j.ejphar.2018.08.021](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021).
- Han M, Jia L, Lv W, Wang L, Cui W. Epigenetic enzyme mutations: role in tumorigenesis and molecular inhibitors. *Front Oncol*. 2019;9:194. DOI: [10.3389/fonc.2019.00194](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00194).
- Mohammad HP, Smitheman KN, Kamat CD, Soong D, Federowicz KE, Van Aller GS, et al. A DNA hypomethylation signature predicts antitumor activity of LSD1 inhibitors in SCLC. *Cancer Cell*. 2015;28:57-69. DOI: [10.1016/j.ccell.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.002).
- Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12:565-75. DOI: [10.1038/nrg3032](https://doi.org/10.1038/nrg3032).
- Achinger-Kawecka J, Valdes-Mora F, Luu PL, Giles KA, Caldon CE, Qu W, et al. Epigenetic reprogramming at estrogen-receptor binding sites alters 3D chromatin landscape in endocrine-resistant breast cancer. *Nat Commun*. 2020;11:320. DOI: [10.1038/s41467-019-14098-x](https://doi.org/10.1038/s41467-019-14098-x).
- Shire A, Lombark G, Lai JP, Zou H, Tsuchiya N, Aderca I, et al. Restoration of epigenetically silenced SULF1 expression by 5-aza-2-deoxycytidine sensitizes hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Med Epigenet*. 2015;3:1-18. DOI: [10.1159/000375461](https://doi.org/10.1159/000375461).
- Lee JU, Soo Chang H, Kyung Kim M, Park SL, Kim JH, Park JS, et al. Genome-wide DNA methylation profile of peripheral blood lymphocytes from subjects with nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced respiratory diseases. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2022;32(6):226-234. DOI: [10.1097/FPC.0000000000000475](https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000475).
- Bonetta L. Epigenomics: The new tool in studying complex diseases. *Nature Education*. 2008;1(1):178. DOI: [10.1038/454795a](https://doi.org/10.1038/454795a).
- Mavioglu RN, Ramo-Fernandez L, Gumpp AM, Kolassa IT, Karabatsiakis A. A history of childhood maltreatment is associated with altered DNA methylation levels of DNA methyltransferase 1 in maternal but not neonatal mononuclear immune cells. *Front Psychiatry*. 2022;13:945343. DOI: [10.3389/fpsy.2022.945343](https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.945343).
- Bhogal B, Weir BA, Crescenzo R, Marien A, Kwon MC, Philippar U, et al. The methyltransferase domain of DNMT1 is an essential domain in acute myeloid leukemia independent of DNMT3A mutation. *Commun Biol*. 2022;5(1):1174. DOI: [10.1038/s42003-022-04139-5](https://doi.org/10.1038/s42003-022-04139-5).

### ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ НА РІВЕНЬ ПОВНОГЕНОМНОГО МЕТИЛУВАННЯ ДНК ТА ЇЇ ФРАГМЕНТАЦІЇ У ЩУРІВ

Бурлака К. А.

**Резюме.** Епігенетика – це розділ генетики, о вивченні спадкових змін в активності або функції генів, які не пов'язані з будь-якою зміною самої послідовності ДНК. Хоча практично всі клітини організму містять однакову генетичну інформацію, але не всі гени експресуються одночасно у всіх типах клітин. У більш широкому сенсі епігенетичні механізми опосередковують різноманітні профілі експресії генів у різних клітинах і тканинах багатоклітинних організмів. За останні роки спостерігається бурхливе зростання епігенетичних досліджень, пов'язане з розвитком нових молекулярних і цитологічних підходів. Проте, основні фундаментальні спостереження пов'язані з вивченням процесів диференціювання у розвитку. Останніми дослідженнями було встановлено, що хімічні сполуки можуть мати епігенетичний вплив, тобто впливати на активність експресії певних генів. А найчастіше, це пов'язано з людьми які мають хронічні захворювання, тому що вони вимушені застосовувати лікарські засоби тривало, з метою покращення якості життя. Відомо, що тривалий прийом нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЗ) приводить до утворення ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунка та кишечника. Висловлюється припущення, що побічні ефекти є не тільки результатом пошкодження слизової оболонки під впливом НПЗЗ, але і можливим впливом НПЗЗ на гени, які регулюють клітинний цикл, особливо при їх тривалому застосуванні.

У дослідженнях були використані 60 щурів-самців, які були розподілені на чотири групи по 15 тварин, котрим вводили щоденно у продовж 3 місяців НПЗЗ: 1-а – контрольна (КГ), розчин натрію хлориду 0,9%, 2-га

– щури, котрим вводили індометацин, 3-я – щури, котрим вводили ацетилсаліцилову кислоту та 4-а група – щури, котрим вводили мелоксикам. Тривале призначення всіх НПЗЗ призводило до статистично вірогідного збільшення повногеномного метилювання ДНК та до інтенсифікації процесів її фрагментації. Важливо зазначити, що за ступенем епігенетичного впливу, дія досліджуваних НПЗЗ була різного ступеня вираженості.

Найбільш вираженими ефектами володів індометацин (збільшення MspI/HpaII на 99%; фрагментації ДНК – на 90% по відношенню до інтакту). Враховуючи встановлені ефекти НПЗЗ, щодо їх здатності підвищувати рівень повногеномного метилювання ДНК та їх фргментації, перспективним напрямом є вивчення рівня метилювання генів, що регулюють клітинний цикл шлунка та кишечника, а також вивчення їх експресивної/білоксинтетуючої функції.

**Ключові слова:** метилювання ДНК, епігенетика, улцерогенна дія, нестероїдні протизапальні лікарські засоби.

### **INFLUENCE OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON THE LEVEL OF WHOLE GENOME DNA METHYLATION AND ITS FRAGMENTATION IN RATS**

**Burlaka K. A.**

**Abstract.** Epigenetics is the branch of genetics concerned with the study of inherited changes in the activity or function of genes that are not associated with any change in the DNA sequence itself. Although almost all cells of the body contain the same genetic information, not all genes are expressing simultaneously in all cell types. More broadly, epigenetic mechanisms mediate different gene expression patterns in different cells and tissues of multicellular organisms. In recent years, there has been a rapid growth in epigenetic research associated with the development of new molecular and cytological approaches. However, the main fundamental observations are connecting with the study of the processes of differentiation in development. Recent studies have found that chemical compounds can have an epigenetic effect, that is, affect the activity of the expression of certain genes. And most often this is due to people who have chronic diseases, because they are forced to use drugs for a long time, in order to improve the quality of life. It is known that long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) leads to the formation of erosions, ulcers and oncological diseases of the stomach and intestines. It has been suggested that side effects are not only the result of mucosal damage under the influence of NSAIDs, but also the possible effect of NSAIDs on genes that regulate the cell cycle, especially with their long-term use.

In the studies, 60 male rats were used, which were divided into four groups of 15 animals, which were administered daily for 3 months with NSAIDs: 1st – control (CG), sodium chloride solution 0.9%, 2nd – rats, which were injected with indomethacin, the 3rd group – rats that were injected with acetylsalicylic acid and the 4th group – rats that were injected with meloxicam. Long-term administration of all NSAIDs led to a statistically probable increase in whole-genome DNA methylation and intensification of its fragmentation processes. It is important to note that according to the degree of epigenetic impact, the effect of the studied NSAIDs was of varying severity.

Indomethacin had the most pronounced effects (an increase in MspI/HpaII by 99%; DNA fragmentation by 90% relative to intact). Considering the established effects of NSAIDs, in terms of their ability to increase the level of genome-wide DNA methylation and their fragmentation, a promising direction is to study the level of methylation of genes that regulate the cell cycle of the stomach and intestines, as well as to study their expressive/biloxin-synthesizing function.

**Key words:** DNA methylation, epigenetics, ulcerogenic effect, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

#### **ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:**

Burlaka K. A.: [0000-0003-0587-9811](https://orcid.org/0000-0003-0587-9811) <sup>ABCDEF</sup>

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Burlaka Krystyna Anatoliyivna / Бурлака Кристина Анатоліївна

Zaporizhzhia State Medical University / Запорізький державний медичний університет

Ukraine, 69096, Zaporizhzhia, 26 Mayakovsky str. / Адреса: Україна, 69096, м. Запоріжжя, вул. Маяковського

26

Tel.: +380997754356 / Тел.: +380997754356

E-mail: [burlakakristina98@gmail.com](mailto:burlakakristina98@gmail.com)

**A** – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

*Received 20.08.2022 / Стаття надійшла 20.08.2022 року*

*Accepted 27.01.2023 / Стаття прийнята до друку 27.01.2023 року*