

## Итоговый отчет по гранту РФФИ

Исследование социобиологических факторов раннего развития ребенка и становление эпигенетического статуса: влияние факторов курения матери и грудного вскармливания на ДНК-метилирование детей

(№ 17-06-00667 от 07.04.2017)

Руководитель: Одинцова Вероника Викторовна

### Реферат

Объект исследования: состояние здоровья детей в связи с факторами курения матери и грудного вскармливания и метилирования ДНК клеток периферической крови. Цель исследования: анализ влияния факторов курения матери и грудного вскармливания на состояние здоровья детей и выявление изменений профилей метилирования ДНК детей связанные с курением матери и грудным вскармливанием. Методы и методология проведения работы: в исследовании приняли участие 225 детей в возрасте от 8 месяцев до 4 лет, из которых 138 проживали в семьях биологических родителей и 87 в домах ребенка г. Санкт-Петербурга. Методы исследования включали оценку показателей здоровья и физического развития детей на время рождения и обследования; опрос матерей об опыте курения, грудном вскармливании и социальном окружении; полногеномные профили метилирования ДНК в лимфоцитах периферической крови изучались с помощью микрочипов Infinium Methylation 450K и EPIC.

Результаты работы и их новизна: показано, что на характеристики физического развития детей на время рождения могут оказывать влияние фактор социального окружения (семья/дом ребенка), наличие опыта курения у матери; на физическое развитие детей до 4 лет – грудное вскармливание; пренатальное курение матери и грудное вскармливание связано с вариативностью ДНК метилирования в клетках периферической крови. В группе детей с историей материнского курения наблюдается более высокая вариабельность уровней метилирования и снижение общегеномных показателей уровня ДНК-метилирования. Дифференциально метилированные сайты расположены в различных структурно-регуляторных участках свыше 400 генов, связанных с развитием и делением клеток, внутриклеточными сигнальными путями, развитием анатомических структур. В нашей работе впервые для сайта cg24171908, локализованного в CGI на 2-ой хромосоме и относящегося к промотору гена *CNRIP1*, выявлено значимое межгрупповое различие в уровне метилирования (гипометилирован в группе детей с опытом материнского курения). *CNRIP1* может быть одним из потенциальных генов-кандидатов, изменяющих метилирование в ассоциации с пренатальным воздействием материнского курения. Выявлена связь между длительностью грудного вскармливания и уровнем метилирования множества CpG сайтов в геноме. В контексте геномной аннотации CpG сайты относятся в первую очередь к генам, вовлеченным в функционирование иммунной системы и ЦНС. Перепредставленность среди списка генов, ассоциированных с грудным вскармливанием, генов вовлеченными в биологические пути, связанные с иммунной системой и ее функциями, согласуется с многочисленными свидетельствами о значимой

роли грудного вскармливания в созревании иммунной системы новорожденных. Одним из первых (в числе ранжированных) биологических путей, ассоциированных с грудным вскармливанием, выступает окситоциновый сигнальный путь. Данное исследование является одним из семи полногеномных ассоциативных исследований ДНК метилирования, связанного с грудным вскармливанием, проведенных в мире. Результаты нашего исследования выполнены впервые на когорте детей, составленной на основе современного населения Северо-западного региона Российской Федерации, хорошо соотносятся с представленными ранее в работах консорциумов результатами аналогичных более крупномасштабных исследований и представляют новые данные о генах-кандидатах, чье метилирование может изменяться под действием материнского курения и грудного вскармливания. Рекомендации по внедрению или итоги внедрения результатов НИР: результаты исследования, касающиеся механизмов влияния пренатального курения и грудного вскармливания, могут быть использованы для информирования женщин, планирующих беременность, о влиянии этих факторов на состояние здоровья плода и развитие ребенка; подготовки медицинских работников, проводящих консультирование по репродукции и планированию семьи, в виде объяснений краткосрочных и долгосрочных эффектов курения и грудного вскармливания; также рекомендации к диете с содержанием витаминов группы В, которые являются основными донорами-игроками метилирования ДНК (которое по нашим и опубликованным ранее данным понижено в геноме детей от курящих матерей). Сайты метилирования и гены, в которых и рядом с которыми локализируются выявленные нами сайты в связи с исследуемыми факторами, требуют валидации на других когортах, и в перспективе могут рассматриваться в качестве кандидатов для разработки тест-систем для определения профилей ДНК метилирования, связанных с неблагоприятным прогнозом для ребенка и требующих возможной коррекции (диеты, дополнений к питанию и пр.). Прогнозные предположения о развитии объекта исследования: предполагается, что с увеличением количества исследований в данной области и мощности выборок через мета-анализ, станет возможно описать эпигенетические механизмы, лежащие в основе формирования хронических заболеваний и нарушений развития под воздействием факторов ранней среды развития ребенка (пренатального и раннего постнатального периода), а также создать эпигенетические предикторы дальнейшего развития и здоровья состояния ребенка.

## Содержание

Введение.....	4
Основная часть отчета о НИР .....	7
Заключение .....	14
Список литературы .....	19
Список публикаций, подготовленных по результатам НИР.....	25

## Введение

Влияние условий, в которых протекало начало жизни, на развитие различных заболеваний, осуществляется посредством ряда механизмов, в том числе связанных с пластичностью процессов развития, «программированием» [1,2,3] и эпигенетическими процессами [4].

Курение является причиной летального исхода в следствие развития многих заболеваний: сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований, хронических болезней легких и многих других, относящихся ко всем клиническим направлениям медицины. Согласно Международной классификации болезней Всемирной организации здравоохранения 10-го пересмотра (МКБ-10 ВОЗ) и Американской психиатрической ассоциации (АРА, Справочник по диагностике и статистике психических расстройств, 5-е издание — DSM-5) табачная зависимость является заболеванием. По данным Всемирной организации здравоохранения, употребление никотина приводит к снижению уровня здоровья, благополучия и безопасности всего молодого и взрослого населения, как следствие влияет на развитие нации в целом [5]. В том числе эта проблема актуальна для женщин репродуктивного возраста, так как употребление никотина негативно сказывается на развитии плода. Наблюдение за беременными, злоупотребляющими табакокурением, показало, что отслойка плаценты встречается у них с частотой 7,5–8,3 %, а это вдвое выше, чем у тех, кто не курит; предлежание плаценты – от 2,4 до 3 %, что в 1,5 раза чаще, чем у некурящих [6, 7]. Молекулярные механизмы, обеспечивающие связь между материнским курением и его эффектами на развитие и здоровье потомка, особенно отдаленными эффектами, проявляемые в течение всей его жизни, являются объектом активного изучения медицины и биологии. Исследования последних лет в области геномики человека показали, что одним из таких механизмов может являться эпигенетическая регуляция активности генов, а именно устойчивые альтерации в этой системе под влиянием табачного дыма могут обуславливать сопутствующие курению нарушения развития и здоровья. Материнское курение во время беременности оказывает двойной эффект: во-первых, негативно влияет на здоровье женщины, а во-вторых, приводит к непоправимым нарушениям развития плода, сказывается на здоровье и развитии новорожденного, качестве его последующей жизни. Пренатальный период, в свою очередь, является самым критическим в становлении эпигенетического статуса индивида. Первые же сравнительные исследования

показали, что геномы детей (исследовалась периферическая кровь детей дошкольного и младшего школьного возраста), подвергшихся воздействию материнского курения во время беременности, характеризуются изменениями в глобальном и геноспецифическом метилировании ДНК [8] (Breton et al, 2009). Причем исследования изменений в ДНК-метилировании в зависимости от продолжительности воздействия табачного дыма обнаружили, что метильные метки указывают скорее на устойчивое, нежели краткосрочное, воздействие курения матери во время беременности [9] (Joubert et al, 2012). Показано, что многие ассоциированные с материнским курением эпигенетические изменения имеют долгосрочный эффект и сохраняются на протяжении взрослой жизни (возраст испытуемых был за 40 лет), вне зависимости от активного курения [10] (Tehranifaer et al, 2018).

Другой актуальной проблемой на данный момент является отказ матерей от грудного вскармливания. Согласно рекомендациям ВОЗ, для оптимального развития ребенку необходимо получать исключительно грудное вскармливание на протяжении первых 6 месяцев жизни, а далее получать грудное молоко вместе с прикормом. Однако большинство детей не получают необходимого питания. Так, например, в среднем в мире, лишь 36% детей в возрасте до 6 месяцев находится на исключительном грудном вскармливании [11] (ВОЗ, 2016). По данным исследований распространенность искусственного вскармливания тем выше, чем выше уровень развития страны [12, 13]. (Радзинский,2010; Brown, 2015). Согласно данным Росстата, в РФ в 2014 году грудное вскармливание получали 42,0% детей в возрасте от 3 до 6 месяцев и 41,1% детей в возрасте от 6 до 12 месяцев [14] (Росстат,2014). Существует много обзоров о краткосрочной и долгосрочной пользе грудного вскармливания для здоровья. Человеческое молоко состоит не только питательных веществ, но и из биологически активных соединений, которые могут играть важную роль в пользе для здоровья, связанной с грудным вскармливанием. Грудное молоко, с его пищевыми, а также функциональными компонентами, является реальной биологической системой. Сегодня признается, что грудное вскармливание связано не только с улучшенными параметрами роста, но и с лучшим интеллектуальным развитием [15] (Mortensen E.L.et al, 2002). Грудное молоко способствует сенсорному и познавательному развитию, защищает ребенка от инфекционных и хронических болезней. Исключительное грудное вскармливание способствует снижению смертности детей грудного возраста в результате распространенных детских болезней, таких как диарея и пневмония, а также более быстрому выздоровлению от болезней [16-19]. (ВОЗ, 2016; Schack-Nielsen et al,2005). Источником этой медицинской пользы может быть своеобразной состав грудного молока, влияние которого частично объясняется эпигенетическими процессами [20]. Действительно, связь между питанием в раннем периоде жизни и геномом может позволить понять основные механизмы болезней, которые оказывают большое влияние на здоровье. Основными эпигенетическими процессами являются метилирование ДНК, модификации гистонов и других белков хроматина с участием ферментативных систем и микроРНК, хотя все еще обсуждается, может ли микроРНК рассматриваться как эпигенетический фактор. На сегодняшний день, большинство исследований о влиянии питания в начальный период жизни на эпигенетическую регуляцию генов были сосредоточены на метилировании ДНК [21-24] В мире проведено несколько ассоциативных исследований ДНК метилирования в связи с грудным вскармливанием на

людях с выделением ДНК из клеток периферической крови [25-28] и опухолей [29] (Тао et al., 2013). Все исследования выполнены на небольших выборках (средний размер 300 случаев), и лишь одно исследование включает детей раннего возраста (до 3 лет), исследуя при этом лишь метилирование одного гена LEP [25].

Таким образом, данное исследование направлено на изучение молекулярно-биологических основ раннего развития и взаимодействия ребенка со средой, влияния грудного вскармливания, а также вредных факторов, таких как курение матери, на программирование развития ребенка. Данные об ассоциированных с курением и грудным вскармливанием глобальных изменениях паттернов метилирования ДНК на ранних стадиях развития, могут быть использовано в области охраны здоровья матери и ребенка. Значимость изучения этих механизмов важна для снижения числа не обусловленных генетическими факторами заболеваний в популяции в целом, персонализированного лечения, персонализированных рекомендаций по питанию, профилактике неинфекционных заболеваний, разработки мер по снижению курения матерей. Эти данные могут послужить для новых концептуальных подходов к пониманию взаимодействия матери и ребенка на ранних стадиях развития. Если будут определены закономерности, по которым метилированию подвергаются те (а не иные) гены в нейронах, то будет возможно направлять развитие предшественников нервных клеток так, чтобы избежать ряда нарушений развития мозга.

## Основная часть отчета о НИР

Целью исследования являлось проанализировать влияние факторов курения матери и грудного вскармливания на состояние здоровья детей и выявить изменения профилей метилирования ДНК детей связанные с курением матери и грудным вскармливанием.

Задачи исследования:

- 1) проанализировать влияние курения матери и грудного вскармливания на состояние здоровья и физического развития ребенка;
- 2) выявить специфичные CpG сайты, связанные с фактором курения матери и грудным вскармливанием;
- 3) выявить гены-кандидаты, связанные с фактором курения матери и грудным вскармливанием, для последующих исследований.

Исследование является клинико-генетическим и нацелено на изучение влияния средовых факторов раннего развития (курение матери, грудное вскармливание и социальное окружение) на показатели физического развития ребенка, при медирующей роли эпигенетических механизмов (опосредованных средовыми факторами изменений полногеномных профилей ДНК-метилирования). Выборка была составлена из детей, вовлеченных в исследование био-поведенческих эффектов ранней социальной депривации (грант №14.Z50.31.0027). С целью сбора дополнительной информации по поведению, связанному с курением, и грудному вскармливанию среди матерей был разработан дополнительный дизайн исследования и пройден Этический комитет в РГПУ им. А.И. Герцена. В актуальном исследовании приняли участие 225 детей, из которых 87 (группа 1) проживали в сиротских учреждениях и 138 (группа 2) – в семьях биологических родителей. Дети, воспитывающиеся в учреждениях, проживали в четырех домах ребенка Санкт-Петербурга, которые провели или проводили изменения, направленные на создание для них семейных условий проживания (см. Постановление № 481 Правительства РФ от 24 мая 2014 г.). Все родители детей, проживавших в семьях, заполнили информированное согласие. На время обследования возраст детей из семей составлял  $25,4 \pm 10,7$  (от 8,6 до 52,6) месяцев. Возраст матерей детей, переданных впоследствии в дома ребенка, составил  $28,6 \pm 5,5$  лет, воспитывающихся в семье –  $28,9 \pm 4,5$  лет.

### 1) Оценка здоровья и физического развития

В работе использован клинико-анамнестический метод: характеристики физического развития детей на время рождения (срок гестации, Апгар на 5 минуте, вес, длина тела, окружность головы и окружность груди) и обследования (вес, длина тела, окружность головы и окружность груди) измерялись традиционными методами врачами родильных домов, домов ребенка или детских поликлиник и впоследствии были собраны из медицинских карт развития детей, проживающих как в домах ребенка, так и в биологических семьях. Информация о наличии у матери опыта курения (никогда не курила, либо курит или курила раньше) и о грудном вскармливании (да/нет) была получена из медицинских карт детей, переданных в дома ребенка, и по данным опроса матерей детей, проживающих в семьях. При анализе физического развития детей использовали первичные показатели развития детей и z-значения показателей физического развития, полученные с помощью программы Antro-ВОЗ. Проверка влияния на зависимую переменную (показатель развития детей) независимых факторов

проводилась с применением трехфакторного ковариационного анализа (ANCOVA) отдельно для каждого из первичных и z-значений показателей физического развития с ковариатой в виде срока гестации или срока гестации и возраста. В качестве независимых факторов выступали следующие оригинальные социобиологические показатели: на время рождения ребенка – опыт курения матери, пол ребенка, а также психосоциальный риск отделения ребенка от матери, реализованный впоследствии в его передаче в сиротское учреждение; на время обследования – курение матери, грудное вскармливание и социальное окружение ребенка в виде места его проживания – в доме ребенка или семье. В последующих множественных сравнениях использовался тест Бонферрони. Статистические решения принимались на 5%-ном уровне значимости.

Анализ физического развития детей проведен в двух частях. В первой части проведено изучение физического развития детей на время рождения в связи с опытом курения их матерей и последующим социальным окружением, во второй - изучение физического развития детей на время обследования в связи с опытом курения их матерей, грудным вскармливанием и социальным окружением.

## 2) Эпигенетический анализ

Полногеномные профили метилирования ДНК в лимфоцитах периферической крови изучались с помощью одной из самых современных и активно используемых в подобных исследованиях технологий – микрочипов высокой плотности Infinium Methylation 450K и EPIC, которые включают в себя, соответственно, около 460 и 860 тысяч проб для анализа уровня метилирования CpG сайтов, расположенных в 96% известных CpG островках (CGI) и за пределами CGI, и покрывают около 99% генов. Протоколы молекулярно-генетического анализа соответствовали таковым, рекомендуемым производителем биочипов (Illumina). Для анализа данных использовался один из наиболее валидированных и активно используемых специализированных пакетов – Minfi [30]. В ходе анализа соблюдались все требования к качеству анализа, такие как (1) фильтрация данных – в соответствии с уровнем надежности детекции пробы ( $p < .05$ ), её хромосомной локализацией (аутосомы) и отсутствием известных полиморфизмов в CpG сайте ( $maf > .05$ ), (2) нормализация сигналов с чипа – методом стратифицированной квантильной нормализации, (3) контроль эффектов пола и возраста ребенка, и клеточной гетерогенности образцов крови, имеющих известный и значимый эффект на профили метилирования ДНК [32-34], и (4) контроль над ошибкой множественного тестирования с помощью коррекции p-значений методом Бенджамини-Хохберга [31].

В работе использовались классические методы поиска эпигеномных ассоциаций (Epigenome-Wide Association Analysis, EWAS): (1) анализ дифференциального метилирования при сравнении групп случай vs. контроль (фенотип – курение матери) на основе модифицированного T-теста [30] и (2) поиск ассоциаций с качественно/количественными признаками (отсутствие/наличие грудного вскармливания и его продолжительность) с помощью методов частной корреляции и линейной регрессии, при контроле влияния ковариат, а также с помощью анализа главных компонент (ГК), вычисленных на основе корреляционных матриц. Геномное аннотирование сайтов метилирования было проведено согласно манифесту Illumina и в соответствии с БД UCSC [32] и GENCODE [33]. Поиск перепредставленных среди генов, ассоциированных с фенотипом, биологических путей и молекулярных функций, определенных в терминах GO

[34], KEGG [35] и PANTHER [36], проводился с использованием интегративных БД и аналитических ресурсов: DAVID [37], EnrichR [38] и g:Profiler [39], а также с помощью построения генных сетей [40].

Результаты исследования:

1) Анализ данных о женском курении и грудном вскармливании в РФ. Курение женщин во время беременности и грудного вскармливания, имеющее негативное воздействие не только на здоровье матери, но и ребенка, признается ВОЗ важной проблемой общественного здравоохранения. В России данные о распространенности табакокурения среди беременных и кормящих женщин неоднородны как с методологической точки зрения, так и по полученным результатам. Затрудняют сопоставление данных российских региональных исследований следующие факторы: обследование женщин с различным сроком гестации; использование разных подходов к методам сбора информации и способов формирования выборки исследования; несопоставимость размера выборок исследования. Социальные нормы неодобрения курения во время беременности приводят к тому, что женщины скрывают свой истинный статус курения, опасаясь резкого осуждения, которому подвергаются курильщицы со стороны социума. Научные данные свидетельствуют, что распространенность табакокурения среди беременных женщин в России сопоставима с наиболее высокими европейскими показателями и варьируется в диапазоне 12% - 40%, хотя наблюдаются внутренние территориальные различия (см. Цветкова и др, 2018).

2) Физическое развитие ребенка в связи с курением матери и грудным вскармливанием

2.1. Изучение физического развития детей на время рождения в связи с опытом курения их матерей и последующим социальным окружением. Цель исследования: изучение влияния опыта курения матерей и последующего социального окружения детей на показатели их развития при рождении (Апгар на 5 минуте, первичные антропометрические характеристики и z-значения физического развития, полученные по программе Антро-ВОЗ). Информация о курении матерей была получена в 160 случаях (71.1% от общего числа), из которых 31 по матерям детей, переданных в дома ребенка (35.6% от числа детей из домов ребенка) и 129 по матерям детей из семей (93.5% от числа детей в семьях). Согласно данной информации ко времени рождения ребенка опыт курения имели 75 матерей (46.9% от общего числа случаев с информацией о курении), из них 21 матери детей, переданных в дома ребенка (67.7% от числа случаев с информацией о курении), и 54 матери детей из семей (41.9%). Таким образом, полученные результаты основаны на анализе 160 детей: 31 из домов ребенка (16 мальчиков) и 129 из биологических семей (69 мальчиков).

Результаты свидетельствуют, что на характеристики физического развития детей на время рождения могут оказывать влияние фактор их последующего сохранения в семье или отказа и передачи в сиротскую организацию (показан вклад этого фактора в значения веса, длины тела, окружности головы и окружности груди детей, а также в z-значения массы, длины тела, окружности головы и ИМТ), наличие у матери опыта курения (вклад в значения длины тела и z-значения длины тела), а также пол ребенка (в z-значения массы к длине тела). Выявлено, что по большому числу показателей дети, переданные впоследствии в дома ребенка, имели более низкие значения физического развития, по

сравнению с детьми в семьях, в том случае, если у матерей был опыт курения (см. Мухамедрахимов и др., 2019).

2.2. Изучение физического развития детей на время обследования в связи с опытом курения их матерей, грудным вскармливанием и социальным окружением. Цель исследования: изучение влияния опыта курения матерей, грудного вскармливания и социального окружения детей на показатели их физического развития (первичные антропометрические характеристики и z-значения физического развития, полученные по программе Антро-ВОЗ). Информация одновременно о курении и грудном вскармливании матерей была получена в 147 случаях (65.3% от общего числа), из которых 18 по матерям детей, воспитывающихся в дома ребенка (20.7% от числа детей из домов ребенка) и 129 по матерям детей из семей (93.5% от числа детей в семьях). Согласно данной информации опыт курения имели 65 матерей и грудное вскармливание было у 128 матерей (соответственно, 44.2% и 8.7% от общего числа случаев с информацией о курении и грудном вскармливании), из них 11 и 1 из матерей детей, переданных в дома ребенка (61.1% и 5.6%), 54 и 127 матерей детей из семей (41.9% и 98.4%).

Результаты свидетельствуют, что среди изучаемых независимых факторов (социальное окружение в виде места проживания, опыт курения матери и наличие грудного вскармливания) изменение характеристик физического развития наблюдается в связи с социальным окружением детей (для первичных значений роста и окружности головы и для z-значений окружности головы) (см. Аринцина и др., 2018). При этом среднегрупповые значения характеристик физического развития больше, если ребенок проживает в семье, чем в доме ребенка (для первичных значений веса, роста и окружности головы, и для z-значений роста и окружности головы). При представленности случаев грудного вскармливания в основном матерями детей из семей, физическое развитие детей выше при грудном вскармливании, чем без него (для первичных значений веса и роста, и для z-значений роста и массы тела) (см. Наумова и др., 2019).

3) ДНК-метилирование и материнское курение. Ассоциация материнского курения с эпигенетическими перестройками в геномах детей изучалась на когорте детей из домов ребенка г. Санкт-Петербурга. Данные по детям из семей были исключены, так как генотипированная в рамках проекта 14.Z50.31.0027 выборка включала только трех индивидов с историей материнского курения, согласно информации, полученной в ходе выполнения настоящего исследования. Анализ проводился на выборке из 56 детей, представляющей целевую (дети с историей воздействия пренатального табачного дыма; N = 28, Mage = 20.8 ± 10.3 мес., 39 % девочки) и контрольную (дети от не куривших матерей; N = 28, Mage = 22.1 ± 11.9 мес., 42 % девочки) группы сравнения. После фильтрации данных биочипа, оценивалось дифференциальное метилирование между группами с коррекцией результатов на значимые ковариаты (клеточная гетерогенность и демографические характеристики детей).

Анализ дифференциального метилирования между группами показал, что, на условно принятом пороге  $p_{nominal} \leq .001$ , 546 CpG сайтов показывают межгрупповые отличия в среднем уровне метилирования в 1.2 и более раз пороговое для биочипов Illumina значение [41]). На основе профилей метилирования этих 546 сайтов, группы дифференцируются и дистанцируются на основе данных многомерного анализа – кластерного анализа и анализа главных компонент. При этом, в группе детей с историей

материнского курения наблюдается (1) более высокая вариабельность уровней метилирования и (2) снижение общегеномных показателей уровня ДНК-метилирования. Последнее согласуется с результатами исследований влияния активного табакокурения на эпигеном взрослых [42], где одним из установленных эффектов было значимое понижение ДНК-метилирования (см. Naumova et al., 2018, Одинцова и др., 2018).

По данным геномного аннотирования и генно-функционального анализа, дифференциально метилированные сайты расположены в различных структурно-регуляторных участках свыше 400 генов. Для того чтобы определить, могут ли выявленные эпигеномные события быть систематическими, был проведен анализ межгенных взаимодействий и функциональной значимости этих взаимодействий в контексте контролируемых генами биологических процессов. Сеть ген-генных взаимодействий дифференциально-метилированных генов была статистически значимо ( $p < .05$ ) обогащена онтологиями, относящимися к регуляции развития: развитие и деление клеток, внутриклеточные сигнальные пути, развитие анатомических структур и, в особенности, центральной нервной системы. Сделанное наблюдение полностью соответствует представленным в литературе результатам сходных, но гораздо более широкомасштабных исследований [43, 44].

Несмотря на малую выборку исследования, один из 546 CpG сайтов показал значимое межгрупповое различие в уровне метилирования после коррекции на множественное тестирование ( $p_{adjusted} \leq .05$ ); он был гипометилирован в группе детей с опытом материнского курения ( $Mbeta = 0.0713 \pm 0.0191$ ) в сравнении с контрольной группой ( $Mbeta = 0.1169 \pm 0.0223$ ). Этот сайт, cg24171907, локализован в CGI на 2-ой хромосоме (chr2:68546339-68547111) и относится к промотору гена *CNRIP1* (Cannabinoid Receptor-Interacting Protein 1). *CNRIP1* кодирует протеин, связывающийся и, соответственно, регулирующий активность каннабиоидного рецептора CB1, который играет важную физиологическую роль в синаптической пластичности, анальгезии, аппетите и нейропротекции [45]. В нашей работе мы впервые определяем данный ген, как потенциальный кандидат в ряду генов, изменяющих метилирование в ассоциации с пренатальным воздействием материнского курения, данная находка, несомненно, потребует дополнительных исследований и валидации на независимых когортах. Однако, следует заметить, что существуют (пусть немногочисленные) работы в области структурной геномики, указывающие на ассоциацию данного гена с фармакологическими эффектами марихуаны [46] и зависимостью от табакокурения, или успешностью отказа от курения [47].

4) ДНК-метилирование и грудное вскармливание. Ассоциация грудного вскармливания с метилированием ДНК изучалась на выборке из контрольной когорты детей (исследование №14.Z50.31.0027) – это дети из полных семей со средним уровнем дохода, проживающих в г. Санкт-Петербург ( $N = 37$ ; 20 девочек и 17 мальчиков в возрасте от 9 месяцев до четырех лет). Критерии исключения из выборки были следующими: осложнения беременности и родов, задержки внутриутробного развития, наличие у ребенка врожденных патологий, тяжелых хронических и системных заболеваний. Продолжительность грудного вскармливания детей варьировала на момент их обследования от 0 до 34 мес., временной интервал между прекращением кормления грудью и обследованием ребенка составлял от 0 до 38.5 месяцев, как следствие,

продолжительность грудного вскармливания не имела значимой корреляции с возрастом детей:  $r = .198$ ;  $p = .109$ , в то время как интервал после прекращения кормления был высоко скоррелирован с возрастом:  $r = .746$ ;  $p < .001$ . Статистически достоверных отличий между девочками и мальчиками по демографическим показателям и показателям грудного вскармливания не наблюдалось. Профили метилирования ДНК лимфоцитов изучались с помощью биочипа Illumina MethylationEPIC.

По результатам EWAS уровни метилирования 4276 CpG сайтов показали статистически достоверную (2201 сайт – положительную,  $R_{\text{partial}} = .361-.760$ , и 2075 сайтов – отрицательную,  $R_{\text{partial}} = -.361-.760$ ; при  $p < .05$ ) ассоциацию с продолжительностью грудного вскармливания. При этом, около 20 % совокупной изменчивости метилирования этих сайтов (1-ая ГК) может быть обусловлено грудным вскармливанием и его длительностью:  $r = .928$ ;  $r_{2\text{adj}} = .858$ ;  $p < .001$ . По результатам геномной аннотации выявленные 4276 CpG сайтов были связаны с 2635 генами. По результатам функционального анализа показано, что ряд биологических процессов и путей статистически значимо перепредставлены в списке этих генов, это – процессы, связанные с сигнальными клеточными системами и их регуляцией, с развитием анатомических структур и клеток, и, в первую очередь, с развитием и функционированием нервной и иммунной систем. Перепредставленность среди списка генов, ассоциированных с грудным вскармливанием, биологических путей, связанных с иммунной системой и ее функциями, была ожидаемой, учитывая специфику вовлеченной в анализ ткани (кровь), и многочисленные свидетельства о значимой роли грудного вскармливания в созревании иммунной системы младенцев, напр. [48, 49]. Представляется примечательным значительное обогащение категорий, связанных с развитием и функциями нервной системы. Причем, одним из первых (в числе ранжированных по значению  $p$  enrich) биологических путей выступает окситоциновый сигнальный путь.

Известно, что уровень окситоцина в крови у младенца превышает таковой у матери [50]. Окситоцин является активатором секреции молока из лактирующей груди, он содержится в молоке (причем в максимальной дозе в самом начале лактации), а его кишечная проницаемость в кровяное русло установлена [51]. Предполагается, что окситоцин из материнского молока, полученный во время первых кормлений, является триггером систематического выделения этого гормона гипоталамусом младенца [50]. В дополнение, тесный телесный контакт во время кормления также может стимулировать собственную выработку «гормона привязанности» окситоцина у ребенка [10]. Окситоцин зачастую действует как активатор широкого спектра систем и индуцирует выделение других гормонов и транмиттеров [52]. Он оказывает прямое влияние на активность синапсов и возбудимость нейронов, действуя через свои рецепторы на синаптических мембранах. В настоящее время активно исследуется способность окситоцина модулировать нейрогенез и синаптическую пластичность [53]. Зарегистрированный нами сигнал в ДНК метилировании может указывать на эпигеномную апрегуляцию окситоцинового пути у младенцев в ответ на материнское молоко и грудное вскармливание *per se*. Результаты работы позволяют предположить, что индуцированная материнским кормлением активация окситоциновых путей может являться тем триггером, который способен индуцировать множественные изменения в системах передачи сигналов, в том числе синаптических, что в итоге может отражаться в слаженных

изменениях эпигенетических паттернов ряда генов, связанных с функциями ЦНС. (см. Наумова и др., 2019).

5) Внедрение результатов в программу обучения и методические материалы. Полученные в ходе исследования результаты включены в лекционный курс «Методология разработки профилактических проектов в сфере здоровья». Данный курс включен в программу подготовки психологов (3 курс, бакалавриат) и педагогов-психологов (2 курс, бакалавриат), РГПУ им. А.И. Герцена. В настоящее время идет подготовка 2-го, дополненного результатами исследования, издания учебного пособия "Профилактические проекты в сфере здоровья: разработка, внедрение, оценка эффективности".

## Заключение

Краткие выводы по результатам НИР и сопоставление результатов, полученных при реализации с мировым уровнем:

### 1) Физическое развитие детей, материнское курение и грудное вскармливание

Курение женщин во время беременности и грудного вскармливания, имеющее негативное воздействие не только на здоровье матери, но и ребенка, признается важной проблемой общественного здравоохранения. В педиатрии широко известны неблагоприятные перинатальные исходы материнского курения на развитие плода. Так, накапливающиеся производные никотина в фетальной крови, амниотической жидкости и грудном молоке, негативно влияют на скорость роста плода и его гестационный возраст во время родов, повышают риск спонтанных аборт, преждевременных родов и снижения веса ребенка при рождении [54-58]. В научной литературе описывается связь курения во время беременности матери и дисфункций у ребенка в отдаленном периоде развития: поведенческих расстройств в детском возрасте [59], гиперактивности [60], риска развития астмы [61], обструктивной болезни легких [по 62] и др. В качестве посредников эффектов материнского курения при беременности на развитие ребенка все активнее рассматриваются эпигенетические механизмы, а именно, – устойчивые изменения в системе регулирования активности генов (или изменения в паттернах метилирования ДНК), вызванные внутриутробной интоксикацией продуктами табачного дыма [63; 64; 65]. Акцентируя внимание на негативном влиянии курения на здоровье матери и ребенка, ВОЗ рекомендует во время беременности женщинам воздерживаться от курения [66].

В последние годы исследования влияния курения матери на развитие ребенка проводятся в рамках концепции онтогенетической природы здоровья и болезней, и направлены прежде всего на изучение роли взаимодействия внешних/экзогенных и внутренних/эндогенных факторов развития ребенка [67]. Отдельное внимание уделяется изучению здоровья новорожденных детей при сочетании фактора курения матери и негативных психосоциальных условий развития, в т. ч. ведущих к отделению ребенка от матери [68]. Исследования демонстрируют, что перинатальное воздействие табака, повышающее риск возникновения проблем развития, в сочетании с кластеризацией факторов риска в семье, может в конечном итоге повышать риск последующего размещения ребенка в приемной семье [68]. В тоже время изучение парциального, отдельного от других факторов, влияния курения женщины на характеристики развития ребенка сталкивается с значительными методическими трудностями [69], и этот вопрос до настоящего времени остается открытым. В литературе наблюдается недостаток исследований перинатальных характеристик развития ребенка в связи с курением женщины не только во время беременности [68, 70, 71], но и в течении всего периода жизни до рождения ребенка. При значительной информации о здоровье и физическом развитии воспитанников домов ребенка [72], отсутствуют данные о влиянии курения женщин на перинатальные показатели развития детей, переданных в сиротские организации.

Проведенное исследование показало, что по большому числу показателей дети, переданные впоследствии в дома ребенка, имели более низкие значения физического развития, по сравнению с детьми в семьях, в том случае, если у матерей был опыт

курения. Эти результаты поддерживают данные ретроспективных популяционных исследований неонатального здоровья и развития детей, свидетельствующие, что матери детей, переданных впоследствии в приемные семьи, чаще курили, а дети отличались от сохраненных в семье сверстников более низкими показателями физического развития и здоровья уже на самых первых этапах развития [68]. В нашей работе эти данные были подтверждены результатами исследования отдельно как мальчиков (по значениям веса, длины тела, окружности головы, окружности груди, и по z-значениям длины тела, массы, окружности головы и ИМТ), так и девочек (по z-значениям массы и массы к длине тела). Иными словами, результаты исследования свидетельствуют, что добавление к фактору риска в виде общего опыта курения матери психосоциального риска отделения ребенка от матери, реализованных впоследствии в его передаче в сиротское учреждение, оказывает значимый отрицательный эффект на показатели физического развития детей на время рождения. Вне зависимости от типа культурально и экономически обусловленной системы замещающего ухода (дома ребенка РФ или приемные семьи Финляндии), в которую впоследствии передаются дети, наблюдается связь между показателями развития детей на время рождения и наличием факторов риска нарушений развития: как в виде опыта курения матери, так и в виде отражающего негативные психосоциальные условия развития отделения ребенка от матери и перевода в замещающие условия.

Другим дополнением результатов настоящего исследования к существующим в литературе данным явилось то, что, при наличии опыта курения у матерей, значения показателей физического развития мальчиков и девочек на время рождения могут отличаться. Этот эффект проявился больше у детей, проживающих после рождения в семьях (мальчики имеют более высокие показатели развития, по сравнению с девочками, по весу, длине тела, окружности головы и окружности груди), чем у детей, переданных матерями в дома ребенка (у мальчиков более высокие z-значения массы к длине тела, тогда как у девочек - z-значения длины тела). При этом, в отличие от представлений о разных нормах развития для мальчиков и девочек [73], в нашем исследовании было обнаружено, что если матери не курили, то значимых различий изучаемых показателей физического развития в связи с полом детей не наблюдалось, и этот результат был одинаковым как в группе детей, которые после рождения проживали в семье, так и в группе детей, переданных впоследствии матерями в дома ребенка.

В последнее время в научной литературе дискутируется вопрос о прямом влиянии курения матери во время беременности на физическое и психическое развитие детей [68; 74]. Согласно обзорным данным [69], результаты многочисленных исследований, фиксирующих дефицит развития детей на разных этапах в связи с курением матери во время беременности, противоречат данным исследований, говорящих в пользу отсутствия прямой зависимости между этими переменными при контроле переменных-конфаундеров (например, возраст матери, уровень образования, семейный статус и пр.). Было показано, что проблемы поведения ребенка могут быть связаны скорее с общим фактом курения матери, чем с курением во время беременности [74]. Результаты проведенного нами исследования поддерживают представления о влиянии на развитие новорожденного ребенка общего факта курения матери, но лишь в группе женщин, отказавшихся от сохранения ребенка в семье, и при этом не исключают возможности негативных последствий при курении непосредственно в период беременности. Согласно данным

литературы [68], эти результаты могут свидетельствовать не о прямой зависимости развития ребенка от курения матери, а о влиянии на развитие детей различных социальных, семейных и материнских факторов. В проведенном нами исследовании к таким общим факторам относится как опыт курения, так и наблюдаемый после рождения отказ матери от сохранения ребенка в семье и передача его в сиротское учреждение.

Проведенное во второй части исследования изучение физического развития детей на время обследования в связи с опытом курения их матерей, грудным вскармливанием и социальным окружением показало, что изменение характеристик развития наблюдается в связи с социальным окружением детей (больше, если ребенок проживает в семье, чем в доме ребенка) при отсутствии значимого влияния факторов наличия у матерей опыта курения или грудного вскармливания детей. Этот факт негативного воздействия окружения на развитие детей соответствует значительному объему исследовательской информации об отрицательном влиянии институциональных депривационных условий на физическое развитие младенцев [75, 76, 72]. В тоже время в результате исследования показано, что в целом физическое развитие детей выше при грудном вскармливании, по сравнению с развитием без грудного вскармливания, и этот результат, полученный для первичных значений веса и роста, и для z-значений роста и массы тела, выявлен прежде всего в связи с данными детей, воспитывающихся в семьях. Значение грудного вскармливания в поддержке и программировании нормального роста и развития младенцев и детей раннего возраста является общепризнанным [77-81], в т.ч. и для усыновленных детей с связанным с отделением от матери опытом депривации [82]. По результатам проведенного исследования свидетельств изменения показателей физического развития на время обследования в связи с взаимодействием факторов социального окружения, опыта курения матери, грудного вскармливания не обнаружено, что может определяться, с одной стороны, спецификой изучаемой выборки с минимальным числом случаев грудного вскармливания матерями, впоследствии передавшими детей на воспитание в учреждение, с другой – ведущим негативным влиянием на развитие детей фактора отделения от матери и проживания в депривационных условиях дома ребенка.

Выделенные в работе различия в показателях физического развития между детьми в семьях и домах ребенка могут быть связаны с влиянием стрессовых депривационных условий на усвоение пищи у детей в условиях учреждения [75], а также трудностями при кормлении детей с проявлениями функциональных нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта (в исследованной выборке таких детей было больше в домах ребенка и практически не было в семьях), и, в целом, сложностями учета индивидуальных особенностей и пищевых предпочтений детей в учреждениях, по сравнению с семьями [75, 83, 84, 85, 86, 87]. Вероятно, что пищевые потребности отдельных детей достаточно сложно учитывать в среде, где диетические планы и протоколы кормления строго регламентированы, и являются основанием для действий воспитателя в большей степени, чем сигналы ребенка. Кроме того, имеются принципиальные различия в организации питания детей, воспитывающихся в различных социальных условиях, когда в семье, в отличие от учреждения, доступ к пище для ребенка является открытым практически в любое время по требованию (по потребности), и он имеет возможность общаться и

разделять трапезу взрослых, что стимулирует развитие его пищевых предпочтений, способствует полноценному физическому и общему психическому развитию.

## 2) ДНК-метилирование и материнское курение

Рядом исследований было показано, что курение вызывает изменения в ДНК-метилировании, которые могут медиировать негативные эффекты курения на здоровье. Пренатальный период и раннее детство, в свою очередь, являются самым критическими периодами в становлении эпигенетического статуса индивида. Первые же сравнительные исследования показали, что геномы детей (исследовалась периферическая кровь детей дошкольного и младшего школьного возраста), подвергшихся воздействию материнского курения, характеризуются изменениями в глобальном и геноспецифическом метилировании ДНК [88]. Причем, исследования изменений в ДНК-метилировании в зависимости от продолжительности воздействия табачного дыма обнаружили, что метильные метки указывают скорее на устойчивое, нежели краткосрочное, воздействие курения матери во время беременности [36]. Показано, что многие, ассоциированные с материнским курением эпигенетические изменения имеют долгосрочный эффект и сохраняются на протяжении взрослой жизни (40 лет и старше), вне зависимости от активного курения [90]. Одно из первых крупномасштабных полногеномных исследований [91, 89], было выполнено на когорте из свыше тысячи новорожденных. Изучая метилирование ДНК в клетках пуповинной крови и оценивая воздействие пренатального сигаретного дыма на основе циркулирования материнского котинина – метаболита никотина и стабильного биомаркера сигаретного курения, авторы идентифицировали эпигенетические изменения в 10 генах, ассоциированные с уровнем материнского котинина. Среди них наиболее значимыми были те, которые были обнаружены в генах ксенобиотик-детоксикации, а именно *AHRR* (Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor) и *CYP1A1* (Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1). Несколькими годами позже, эти результаты были частично и полностью подтверждены и дополнены новыми находками в целом ряде исследований [91-96]. Силами консорциума «Консорциум по эпигенетике беременности и детства» (Pregnancy and Childhood Epigenetics consortium, PACE) были объединены полногеномные данные целого ряда исследований, выполненных на одной платформе—биочип Illumina Infinium HumanMethylation450. Были сделаны следующие основные наблюдения и выводы: (1) материнское курение при беременности вносит значимую дисрегуляцию в геном развивающегося ребенка; (2) наблюдаемые у младенцев эпигеномные альтерации являются долгосрочными; (3) в наибольшей мере эпигенетическим изменениям подвержены гены, участвующие в контроле над биологическими процессами развития – рост и анатомическое развитие (включая те, которые специфически связаны с эмбриональным морфогенезом, или гены активные во время эмбриогенеза), развитие нервной системы, развитие и пролиферация клеток [97].

Результаты нашего исследования, выполненные впервые на когорте детей, составленной на основе современного населения Северо-западного региона Российской Федерации, (1) хорошо соотносятся с представленными ранее в работах консорциумов результатами аналогичных исследований, свидетельствующими о том, что материнское курение во время беременности может приводить к изменениям уровней экспрессии генов, контролирующим развитие ребенка, и (2) представляют новые данные о генах-

кандидатах, чье метилирование может изменяться под действием материнского курения, а именно, – *CNRIP1*, кодирующий белок взаимодействующий с каннабиноидным рецептором CB1.

### 3) ДНК-метилирование и грудное вскармливание

Известно, что грудное вскармливание оказывает положительное влияние не только на здоровье и развитие ребенка в младенческом и младшем детском возрасте, но и имеет долгосрочные эффекты на протяжении всей жизни [98]. Сегодня, активно обсуждается существование эпигенетических изменений, индуцированных вскармливанием грудным молоком, а именно, – изменений в метилировании геномной ДНК, см. напр. [46-48], как возможных посредников вышеуказанных долгосрочных эффектов. Интерес к этому направлению исследований достаточно высок. Так, согласно одному из последних систематических обзоров литературы [101], на запрос “epigenetics breastfeeding” в поисковой системе Google на конец прошлого года приходилось свыше 110 тыс. обращений и было найдено свыше 5 тыс. релевантных публикаций. Однако, после тщательной их фильтрации и изучения, авторами [101] было обнаружено лишь семь публикаций, в которых представлены результаты эмпирических исследований, где грудное вскармливание рассматривается как целевой фенотип, или, гораздо чаще, как одна из значимых ковариат, а именно, – один из факторов ранней среды развития. Из этих семи работ пять были выполнены на человеке [102-106]. При этом, они были крайне разнообразны в отношении выборок исследований, возраста когорты (средняя варьирует от 0 [106] до 57.5 [103] лет), исследуемой ткани (пуповинная [106] и периферическая кровь [102, 104-106], раковые клетки [103]), геномных мишеней метилирования и методов его оценки (отдельные CpG сайты и гены [102, 103, 106] и полногеномный анализ [104, 105]), и категоризации грудного вскармливания (целевой фенотип [102] и ковариата [103-106]). По результатам этих исследований следует отметить следующее. У младенцев была установлена связь между продолжительностью грудного вскармливания и понижением уровня метилирования в промотере лептина (*LEP*) – гормона, регулирующего энергетический обмен [102]. На когорте подростков был показан отдаленный модулирующий эффект грудного вскармливания на метилирование ряда CpG сайтов в локусе 17q21 [105]. Также, в качестве отдаленных эпигенетических эффектов, было обнаружено, что отсутствие грудного вскармливания в младенчестве может быть связано с повышением метилирования промотера гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2A* в пременопаузальных опухлях молочной железы [103].

Таким образом, недавние исследования предоставляют данные о потенциальном влиянии грудного вскармливания на метилирование геномной ДНК, которое, в свою очередь, может являться медиатором широкого спектра долгосрочных эффектов для развития и здоровья. Тем не менее, исследования эти крайне немногочисленны, и, за редким исключением, они не фокусируются конкретно на факторе грудного вскармливания. Это определяет актуальность нашего, одного из первых, исследования по поиску полно-эпигеномных ассоциаций с грудным вскармливанием и его продолжительностью и новизну полученных в этом исследовании результатов.

## Список литературы

1. Barker, D. J. (1990) 'The fetal and infant origins of adult disease.', *BMJ*, 301(6761), pp. 1111–1111. doi: 10.1136/bmj.301.6761.1111.
2. Bateson, P. et al. (2004) 'Developmental plasticity and human health', *Nature*. Nature Publishing Group, 430(6998), pp. 419–421. doi: 10.1038/nature02725.
3. Gluckman, P.D.; Hanson, M.A.; Beedle, A.S. Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *Am. J. Hum. Biol.* 2007, 19, 1–19.
4. Wadhwa, P.D.; Buss, C.; Entringer, S.; Swanson, J.M. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 2009, 27, 358–368.
5. World Health Organization report on the global tobacco epidemic 2015: raising taxes on tobacco. World Health Organization. 2015.
6. Fried PA. Tobacco consumption during pregnancy and its impact on child development. *Encyclopedia on Early Childhood Development* 2002
7. Hackshaw A., Rodeck C., Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum Reprod Update.* 2011; 17(5):589-604
8. Breton, C.V., et al., Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(5): p. 462-467.
9. Joubert, B.R., et al., 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect*, 2012. 120(10): p. 1425-1431.
10. Tehranifar, P., et al., Maternal cigarette smoking during pregnancy and offspring DNA methylation in midlife. *Epigenetics*, 2017. 11.
11. World Health Organization. Protecting, promoting, and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services: the revised Baby-friendly Hospital Initiative 2018' (2019)
12. Радзинский В.Е., Семятов С.Д., Тотчиев Г.Ф., Шишкин Е.А. Табакокурение и беременность. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.* 2009; 7:334-40.
13. Brown N., Luckett T., Davidson P.M., Di Giacomo M. Interventions to reduce harm from smoking with families in infancy and early childhood: a systematic review. *Int. J. Environmental Research and Public Health.* 2015; 12(3): 3091-119.
14. *Здравоохранение в России. 2015: Статистический сборник.* – М.: Росстат, 2014.
15. Michaelsen, K. F., Lauritzen, L. and Mortensen, E. L. (2009) 'Effects of Breast-feeding on Cognitive Function', in *Breast-Feeding: Early Influences on Later Health*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 199–215. doi: 10.1007/978-1-4020-8749-3\_15.
16. American Academy of Pediatrics Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2012;29:e827–e841.
17. Национальная программа оптимизации вскармливания детей первого года жизни в Российской Федерации. Утверждена на XVI Съезде педиатров России (февраль 2009 г.) Союз педиатров России. Национальная ассоциация диетологов и нутрициологов. Научный центр здоровья детей РАМН. НИИ питания РАМН. Москва, 2010. 68 с.
18. Национальная программа оптимизации питания детей в возрасте от 1 года до 3 лет в Российской Федерации. 2-е издание, исправленное и дополненное. Москва: ПедиатрЪ, 2016. 36 с.
19. Всемирная организация здравоохранения. Глобальная стратегия по кормлению детей младенческого и раннего возраста. Женева, 2003. 40 с.
20. Verduci, E. et al. (2014) 'Epigenetic Effects of Human Breast Milk', *Nutrients*, 6(4), pp. 1711–1724. doi: 10.3390/nu6041711.

21. Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Low, F. M. (2011) 'The role of developmental plasticity and epigenetics in human health', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(1), pp. 12–18. doi: 10.1002/bdrc.20198.
22. Godfrey, K. M. et al. (2007) 'Epigenetic Mechanisms and the Mismatch Concept of the Developmental Origins of Health and Disease', *Pediatric Research*, 61(5 Part 2), pp. 5R-10R. doi: 10.1203/pdr.0b013e318045bedb.
23. Langley-Evans, S. C. (2015) 'Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review', *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 28, pp. 1–14. doi: 10.1111/jhn.12212.
24. Hartwig, F.P., et al., Breastfeeding effects on DNA methylation in the offspring: A systematic literature review. *PLoS One*, 2017. 12(4): p. e0175604.
25. Obermann-Borst, S.A., et al., Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res*. 2013;74:344–349. pmid:23884163. *Pediatr Res*, 2013. 74(3): p. 344-349.
26. Soto-Ramirez, N., et al., The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clin Epigenetics*, 2013. 5(1): p. 1.
27. Simpkin, A.J., et al., Prenatal and early life influences on epigenetic age in children: a study of mother-offspring pairs from two cohort studies. *Hum Mol Genet*, 2016. 25(1): p. 191-201.
28. Sherwood, W. B. et al. (2019) 'Duration of breastfeeding is associated with leptin (LEP) DNA methylation profiles and BMI in 10-year-old children', *Clinical Epigenetics*. *BioMed Central*, 11(1), p. 128. doi: 10.1186/s13148-019-0727-9.
29. Tao, M.H., et al., Exposures in early life: associations with DNA promoter methylation in breast tumors. *J Dev Orig Health Dis*, 2013. 4: p. 182-190.
30. Aryee, M.J., et al., Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA Methylation microarrays. *Bioinformatics* 2014. 30(10): p. 1363–1369
31. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1995. B57: p. 289-300.
32. Casper, J., et al., The UCSC Genome Browser database: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 2018. 46(D1): p. D762-D769.
33. Harrow, J., et al., GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome research* 2012. 22(9): p. 1760-1764.
34. Consortium., T.G.O., The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Research*, 2008. 36(Database issue): p. D440–444.
35. Kanehisa, M. and S. Goto, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000. 28(1): p. 27-30.
36. Thomas, P.D., et al., PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*, 2003. 13(9): p. 2129-2142.
37. Dennis, G.J., et al., DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 2003. 4(5): p. P3.
38. Chen, E.Y., et al., Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*, 2013. 14(128): p. 1-14.
39. Reimand, J., et al., g:Profiler - a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Research*, 2016. 44(W1): p. W83-89.
40. Szklarczyk, D., et al., STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 2015. 43(Database issue): p. D447-452.

41. Bibikova, M., et al., High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 2011. 98(4): p. 288-295.
42. Gao, X., et al., DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies *Clin Epigenetics*, 2015. 7(113).
43. Joubert, B.R., et al., DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet*, 2016. 98(4): p. 680-696.
44. Rotroff, D.M., et al., Maternal smoking impacts key biological pathways in newborns through epigenetic modification in Utero. *BMC Genomics*, 2016. 17(1): p. 976.
45. Niehaus, J.L., et al., CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. *Mol Pharmacol*, 2007. 72(6): p. 1557-1566.
46. Smith, T.H., L.J. Sim-Selley, and D.E. Selley, Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? *Br J Pharmacol*, 2010. 160(3): p. 454-466.
47. Rose, J.E., et al., Personalized smoking cessation: interactions between nicotine dose, dependence and quit-success genotype score. *Mol Med*, 2010. 16(7-8): p. 247-253.
48. Andersson, Y., et al., Formula feeding skews immune cell composition toward adaptive immunity compared to breastfeeding. *J Immunol*, 2009. 183(7): p. 4322-4328.
49. Jackson, K.M. and A.M. Nazar, Breastfeeding, the immune response, and long-term health. *J Am Osteopath Assoc*, 2006. 106(4): p. 203-207.
50. Uvnäs Moberg, K. and D.K. Prime, Oxytocin effects in mothers and infants during breastfeeding. *Infant*, 2013. 9(6): p. 201-206.
51. Higashida, H., et al., Intestinal transepithelial permeability of oxytocin into the blood is dependent on the receptor for advanced glycation end products in mice. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 7883.
52. Ludwig, M. and G. Leng, Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci*, 2006. 7: p. 126-136.
53. Bakos, J., et al., Molecular Mechanisms of Oxytocin Signaling at the Synaptic Connection. *Neural Plasticity*, 2018.
54. Kramer M.S. Determinants of low birth-weight – methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 1987; 65:663–737.
55. Lambers D.S., Clark K.E. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin. Perinatol*. 1996; 20(2):115-26.
56. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine & Tobacco Research*. 2004; 6(2): S125–40.
57. Радзинский В.Е., Семятов С.Д., Тотчиев Г.Ф., Шишкин Е.А. Табакокурение и беременность. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2009; 7:334-40.
58. Hackshaw A., Rodeck C., Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(5):589-604.
59. Wakschlag L.S., Pickett K.E., Cook Jr.E., Benowitz N.L., Leventhal B.L. Maternal smoking during pregnancy and severe antisocial behavior in offspring: a review. *American journal of public health*. 2002; 92(6):966-74.
60. Kotimaa A., Moilanen I., Taanila A., Ebeling H., Smalley S.M., McGough J., Hartikainen A.L., Jarvelin M.R. Maternal smoking and hyperactivity in 8-year old children. *J. of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2003; 42(7):826–33.

61. Thacher J.D., Gehring U., Gruziova O., Standl M., Pershagen G., Bauer C.P., ... Kull I. Maternal Smoking during Pregnancy and Early Childhood and Development of Asthma and Rhinoconjunctivitis - a MeDALL Project. *Environ Health Perspect.* 2018; 126(4):047005.
62. Gould G.S., Lim L.L., Mattes J. The prevention and treatment of smoking and tobacco use during pregnancy in selected Indigenous communities in high-income countries of USA, Canada, Australia and New Zealand: an evidence-based review. *Chest.* 2017.
63. Richmond R.C., Simpkin A.J., Woodward G., Gaunt T.R., Lyttleton O., McArdle W.L., ... Davey Smith G. Prenatal exposure to maternal smoking and offspring DNA methylation across the lifecourse: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Hum Mol Genet.* 2014; 24(8):2201-17.
64. Joubert B.R., Felix J.F., Yousefi P., Bakulski K.M., Just A.C., Breton C., ... Küpers L.K. DNA methylation in newborns and maternal smoking in pregnancy: genome-wide consortium meta-analysis. *The American J. of Human Genetics.* 2016; 98(4):680-96.
65. Одинцова В.В., Сайфитдинова А.Ф., Наумова О.Ю. Курение матери и нарушения метилирования ДНК у детей на ранних стадиях развития. *Акушерство и гинекология.* 2018; 9:5-12.
66. World Health Organization report on the global tobacco epidemic 2015: raising taxes on tobacco. World Health Organization. 2015.
67. Barker D.J.P. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 2007; 261: 412–417.
68. Kalland M., Sinkkonen J., Gissler M., Merilainen J., Siimes M.A. Maternal smoking behavior, background and neonatal health in Finnish children subsequently placed in foster care. *Child Abuse & Neglect.* 2006; 30:1037–47.
69. Gilman S.E., Gardener H., Buka S.L. Maternal smoking during pregnancy and children's cognitive and physical development: a causal risk factor? *Am. J. of Epidemiology.* 2008; 168(5):522-31.
70. Kallén K. The impact of maternal smoking during pregnancy on delivery outcome. *The European J. of Public Health.* 2001; 11(3):329-33.
71. Цветкова Л.А., Антонова Н.А., Ерицян К.Ю., Мухамедрахимов Р.Ж., Аринцина И.А., Дмитриева В.В., Одинцова В.В. Табакокурение среди беременных женщин: роль психосоциальных факторов. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2018; 26(4):217-20.
72. Аринцина И.А., Одинцова В.В., Пеньков Д.Г., Лянко Л.М., Солодунова М.Ю., Вершинина Е.А., Мухамедрахимов Р.Ж. Заболеваемость и физическое развитие детей, воспитывающихся в домах ребенка Санкт-Петербурга. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского.* 2018; 97(1):167-74.
73. World Health Organization. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. World Health Organization, 2006.
74. Maughan B., Taylor C., Taylor A., Butler N., Bynner J. Pregnancy smoking and childhood conduct problems: A causal association? *J. of Child Psychology and Psychiatry.* 2001; 42(8):1021-8.
75. Johnson D.E., Guthrie D., Smyke A.T., Koga S.F., Fox N.A., Zeanah C.H., Nelson C.A. Growth and relations between auxology, caregiving environment and cognition in socially deprived Romanian children randomized to foster vs. ongoing institutional care. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine.* 2010; 164(6): 507-16.

76. Johnson D. E., Bruce J., Tarullo A. R., and Gunnar M. R. Growth delay as an index of allostatic load in young children: predictions to disinhibited social approach and diurnal cortisol activity. *DevPsychopathol.* 2011; 23(3): 859–71. doi: 10.1017/S0954579411000356
77. Боровик Т.Э., Конь И.Я., Ладодо К.С., Яцык Г.В., Скворцова В.А. Национальная стратегия вскармливания детей первого года жизни в Российской Федерации. *Практика педиатра.* 2008, №1.
78. Боровик Т.Э., Конь И.Я., Ладодо К.С., Яцык Г.В., Скворцова В.А. Национальная стратегия вскармливания детей первого года жизни в Российской Федерации. Смешанное и искусственное вскармливание. *Медицинский совет.* 2009, №1.
79. Национальная программа оптимизации вскармливания детей первого года жизни в Российской Федерации. Утверждена на XVI Съезде педиатров России (февраль 2009 г.) Союз педиатров России. Национальная ассоциация диетологов и нутрициологов. Научный центр здоровья детей РАМН. НИИ питания РАМН. Москва, 2010. 68 с.
80. Национальная программа оптимизации питания детей в возрасте от 1 года до 3 лет в Российской Федерации. 2-е издание, исправленное и дополненное. Москва: ПедиатрЪ, 2016. 36 с.
81. Всемирная организация здравоохранения. Глобальная стратегия по кормлению детей младенческого и раннего возраста. Женева, 2003. 40 с.
82. Gribble K. D. Mental health, attachment and breastfeeding: implications for adopted children and their mothers. *International Breastfeeding Journal.* 2006; 1:5. DOI: 10.1186/1746-4358-1-5
83. Бородулина Т.В. Особенности физического и нервно-психического развития детей, воспитывающихся в условиях дома ребенка. *Вопросы современной педиатрии.* 2009; т. 8(4): 121-4. [S.l.], v. 8, n. 4, p. 121-124.
84. Park H., Bothe D., Holsinger E., Kirchner L., Olness K., Mandalakas A. The impact of nutritional status and longitudinal recovery of motor and cognitive milestones in internationally adopted children. *Int J Environ Res Public Health.* 2011; 8(1): 105–16. doi: 10.3390/ijerph8010105
85. Miller B. S., Kroupina M. G., Mason P., Iverson S. L., Narad C., Himes J. H., Johnson D. E., Petryk A. Determinants of catch-up growth in international adoptees from Eastern Europe. *Int J PediatrEndocrinol.* 2010; 2010: 107252. Published online 2010 December 29. doi: 10.1155/2010/107252
86. Sonuga-Barke E. J., Schlotz W., Rutter M. Deprivation-specific psychological patterns. VII: Physical growth and maturation following early severe institutional deprivation: Do they mediate specific psychopathological effects? *Monographs of the Society for Research in Child Development.* 2008; 75 (1): 143-66.
87. Van IJzendoorn M. H., Bakermans-Kranenburg M. J., Juffer F. Plasticity of growth in height, weight, and head circumference: Meta-analytic evidence of massive catch-up after international adoption. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics.* 2007; 28(4):334–343.
88. Breton, C.V., et al., Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med,* 2009. 180(5): p. 462-467.
89. Joubert, B.R., et al., 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect,* 2012. 120(10): p. 1425-1431.
90. Tehranifar, P., et al., Maternal cigarette smoking during pregnancy and offspring DNA methylation in midlife. *Epigenetics,* 2017. 11.
91. Rotroff, D.M., et al., Maternal smoking impacts key biological pathways in newborns through epigenetic modification in Utero. *BMC Genomics,* 2016. 17(1): p. 976.

92. Rzehak, P., et al., Maternal smoking during pregnancy and DNA-methylation in children at age 5.5 years: epigenome-wide-analysis in the European Childhood Obesity Project (CHOP)-study. *Plos One*, 2016. 11(5): p. e0155554.
93. Richmond, R.C., et al., Prenatal exposure to maternal smoking and offspring DNA methylation across the lifecourse: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Hum Mol Genet*, 2015. 24: p. 2201-2217.
94. Janssen, B.G., et al., Placental mitochondrial DNA and CYP1A1 gene methylation as molecular signatures for tobacco smoke exposure in pregnant women and the relevance for birth weight. *J Transl Med*, 2017. 15(1): p. 5.
95. Markunas, C.A., et al., Identification of DNA methylation changes in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect*, 2014. 122(10): p. 1147-1153.
96. Morales, E., et al., Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. *Int J Epidemiol*, 2016. 45(5): p. 1644-1655.
97. Joubert, B.R., et al., DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet*, 2016. 98(4): p. 680-696.
98. Victora, C.G., et al., Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet Psychiatry*, 2016. 387(10017): p. 475-490.
99. Mischke, M. and T. Plösch, More than just a gut instinct-the potential interplay between a baby's nutrition, its gut microbiome, and the epigenome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013. 304(12): p. R1065-R1069.
100. Verduci, E., et al., Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*, 2014. 6(4): p. 1711-1724.
101. Hartwig, F.P., et al., Breastfeeding effects on DNA methylation in the offspring: A systematic literature review. *PLoS One*, 2017. 12(4): p. e0175604.
102. Obermann-Borst, S.A., et al., Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res*. 2013;74:344-349. pmid:23884163. *Pediatr Res*, 2013. 74(3): p. 344-349.
103. Tao, M.H., et al., Exposures in early life: associations with DNA promoter methylation in breast tumors. *J Dev Orig Health Dis*, 2013. 4: p. 182-190.
104. Rossnerova, A., et al., Factors affecting the 27K DNA methylation pattern in asthmatic and healthy children from locations with various environments. *Mutat Res.*, 2013. 741-742: p. 18-26.
105. Soto-Ramirez, N., et al., The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clin Epigenetics*, 2013. 5(1): p. 1.
106. Simpkin, A.J., et al., Prenatal and early life influences on epigenetic age in children: a study of mother-offspring pairs from two cohort studies. *Hum Mol Genet*, 2016. 25(1): p. 191-201.

## Список публикаций, подготовленных по результатам НИР

1. Мухамедрахимов Р.Ж., Аринцина И.А., Цветкова Л.А., Антонова Н.А., Вершинина Е.А., Наумова О.Ю., Михайлова Ю.В. Одинцова В.В. Социобиологические факторы раннего физического развития детей: курение матери во время беременности и социальное окружение/ Педиатрия. Журнал им. Сперанского. 2019, Том 98/№5, с. 144-150.
2. Naumova O.Y., Rychkov S.Y., Kornilov S.A., Odintsova V.V., Anikina V.O., Solodunova M.Yu., Arintcina I.A., Zhukova M.A., Ovchinnikova I.V., Burenkova O.V., Zhukova O.V., Muhamedrahimov R.J., Grigorenko E.L. Effects of early social deprivation on epigenetic statuses and adaptive behavior of young children: A study based on a cohort of institutionalized infants and toddlers. PLoS One. 2019;14(3):e0214285. Published 2019 Mar 26. doi:10.1371/journal.pone.0214285
3. Наумова О.Ю., Одинцова В.В., Аринцина И.А., Рычков С.Ю., Мухамедрахимов Р.Ж., Шнейдер Ю.В., Грошева А.Н., Жукова О.В., Григоренко Е.Л. Исследование ассоциации между грудным вскармливанием и метилированием ДНК в клетках периферической крови младенцев//Генетика. 2019, том 55, №6, с. 707-713. [Naumova O.Yu, Odintsova V.V., et al. A study of the association between breastfeeding and DNA methylation in peripheral blood cells of infants// Russian Journal of Genetics, 2019, Vol. 55, No. 6, pp. 707–713]
4. Odintsova V., Ovchinnikova I., Zhukova M., Naumova O. Maternal smoking during pregnancy and DNA methylation disruption in toddlers. Behav Genet (2018) 48:520. <http://programme.exordo.com/bga18/delegates/presentation/112/>
5. Одинцова В.В., Сайфитдинова А.Ф., Наумова О.Ю. Курение во время беременности и нарушения метилирования у детей. Акушерство и гинекология. 2018 (9), с. 5-12 [Odintsova, V.V., Saifitdinova, A.F., Naumova, O.Y. Maternal smoking and DNA methylation abnormalities in children at early developmental stages. Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation). 2018 (9), с. 5-12]
6. Цветкова Л.А., Антонова Н.А., Ерицян К.Ю., Мухамедрахимов Р.Ж., Аринцина И.А., Дмитриева В.В., Одинцова В.В. Табакокурение среди беременных женщин: роль психосоциальных факторов//Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2018; 26 (4): 217-221.[Tsvetkova, L.A., Antonova, N.A., Eritsian, K.Y., Mukhamedrakhimov, R.J., Arintsina, I.A., Dmitrieva, V.V., Odintsova, V.V. The Tobacco Smoking of Pregnant Women: the Role of Psycho-Social Factors (2018) Problemy sotsial'noi gigieny, zdravookhraneniia i istorii meditsiny, 26 (4), pp. 217-220]
7. Аринцина И.А., Одинцова В.В., Пеньков Д.Г., Лянко Л.М., Солодунова М.Ю., Вершинина Е.А., Мухамедрахимов Р.Ж. Заболеваемость и физическое здоровье в домах ребенка Санкт-Петербурга// Педиатрия. Журнал им. Сперанского. №1/18, с. 167-174, <https://doi.org/10.24110/0031-403X-2018-97-1-167-174>
8. Naumova O.Yu, Rychkov S.Yu., Odintsova V.V., Kornilov S.A., Shabalina E.V., Antsiferova D.V., Zhukova O.V., Grigorenko E.L. Aberrant DNA Methylation in Lymphocytes

of Children with Neurodevelopmental Disorders// *Russian Journal of Genetics*, 2017, Vol. 53, No. 11, pp. 1243–1258. Наумова О.Ю., Рычков С.Ю., Одинцова В.В., Корнилов С.А., Шабалина Е.В., Анциферова Д.В., Жукова О.В., Григоренко Е.Л. Абберантное метилирование ДНК в лимфоцитах детей с врожденными нарушениями ЦНС//Генетика. 2017, Т. 53, N 11, pp. 1243–1258. [Naumova O.Yu, Rychkov S.Yu., Odintsova V.V., Kornilov S.A., Shabalina E.V., Antsiferova D.V., Zhukova O.V., Grigorenko E.L. Aberrant DNA Methylation in Lymphocytes of Children with Neurodevelopmental Disorders// *Russian Journal of Genetics*, 2017, Vol. 53, No. 11, pp. 1243–1258].

9. Naumova O.Y., Rychkov S.Y., Kuznetzova T.V., Odintsova V.V., Kornilov S.A, Grigorenko E.L. DNA methylation alterations in the genome of a toddler with cri-du-chat syndrome// *Clinical Case Reports*. Volume 6, Issue 1 Version of Record online : 20 NOV 2017, DOI: 10.1002/ccr3.1274