

УДК 575+577.2+577.29

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ МЕЖДУ ГРУДНЫМ ВСКАРМЛИВАНИЕМ И МЕТИЛИРОВАНИЕМ ДНК В КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЛАДЕНЦЕВ

© 2019 г. О. Ю. Наумова^{1, 2, 3, *}, В. В. Одинцова^{2, 4}, И. А. Аринцина², С. Ю. Рычков¹,
Р. Ж. Мухамедрахимов², Ю. В. Шнейдер¹, А. Н. Грошева¹, О. В. Жукова¹, Е. Л. Григоренко^{2, 3}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория междисциплинарных исследований
развития человека, Санкт-Петербург, 119034 Россия

³Техасский институт измерения, оценки и статистики, Хьюстонский университет, Хьюстон, 77204 США

⁴Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. академика В.И. Кулакова, Москва, 117198 Россия

*e-mail: oksana.yu.naumova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2018 г.

После доработки 10.11.2018 г.

Принята к публикации 13.12.2018 г.

Представлены данные об ассоциации грудного вскармливания с метилированием ДНК в клетках периферической крови 37 детей в возрасте от 9 мес. до четырех лет. Полногеномные профили метилирования ДНК изучались с помощью биочипа высокой плотности Illumina MethylationEPIC. Поиск полно-эпигеномных ассоциаций позволил выявить связь между продолжительностью грудного вскармливания и уровнем метилирования 4276 CpG-сайтов: положительную ассоциацию для 2201 и отрицательную – для 2075 сайтов. В контексте геномной аннотации эти CpG-сайты были отнесены к 2635 генам. Среди функций, контролируемых этими генами, преобладают связанные с сигнальными клеточными системами, с развитием анатомических структур и клеток и в первую очередь – с развитием и функционированием иммунной системы и ЦНС. По результатам анализа предположена особая роль окситоцинового сигнального пути как одного из возможных триггеров слаженных эпигенетических изменений в генах, контролирующих функции ЦНС, в ответ на грудное вскармливание.

Ключевые слова: грудное вскармливание, лимфоциты периферической крови, полногеномный профиль метилирования ДНК, микрочип Illumina MethylationEPIC.

DOI: 10.1134/S0016675819060109

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 [1]. Сегодня, в эру “омики”, активно обсуждается существование эпигенетических эффектов вскармливания грудным молоком, а именно – изменений в метилировании геномной ДНК (см., например, [2, 3]). Интерес к этому направлению исследований достаточно высок. Так, согласно одному из последних систематических обзоров литературы [4], на запрос “epigenetics breastfeeding” в поисковой системе Google на 2017 г. приходилось свыше 110 тыс. обращений и было найдено свыше 5 тыс. релевантных публикаций. Однако после тщательной их фильтрации и изучения авторами [4] 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 [5–9]. При этом они были крайне разнообразны в отношении выборок исследований, возраста когорты (средняя варьирует от 0 [9] до 57.5 [6] лет), исследуемой ткани (пуповинная [9] и периферическая кровь [5, 7–9], раковые клетки [6]), геномных мишеней метилирования и методов его оценки (отдельные CpG-сайты и гены [5, 6, 9] и полногеномный анализ [7, 8]) и категоризации грудного вскармливания (целевой фенотип [5] и ковариата [6–9]). По результатам этих исследований следует отметить следующее. У младенцев была установлена связь между продолжитель-

ностью грудного вскармливания и понижением уровня метилирования в промоторе лептина (*LEP*) – гормона, регулирующего энергетический обмен [5]. На когорте подростков был показан отдаленный модулирующий эффект грудного вскармливания на метилирование ряда CpG-сайтов в локусе 17q21 [8]. Также в качестве отдаленных эпигенетических эффектов было обнаружено, что отсутствие грудного вскармливания в младенчестве может быть связано с повышением метилирования промотора гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2A* в пременопаузальных опухолях молочной железы [6].

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 работы эти крайне немногочисленны и, за редким исключением, они не фокусируются конкретно на факторе грудного вскармливания. Это определяет актуальность и новизну нашего исследования по поиску полно-эпигеномных ассоциаций с грудным вскармливанием и его продолжительностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

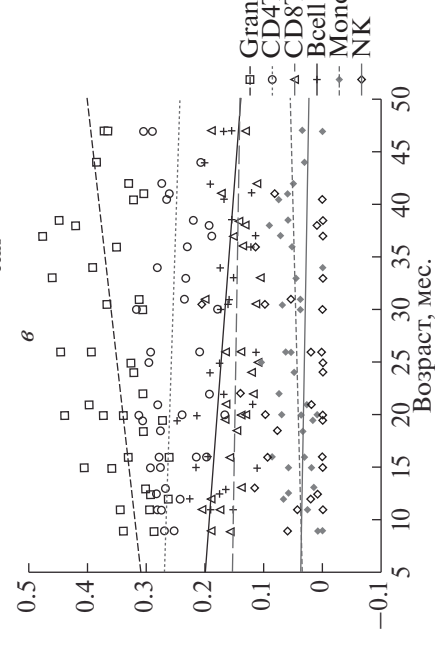
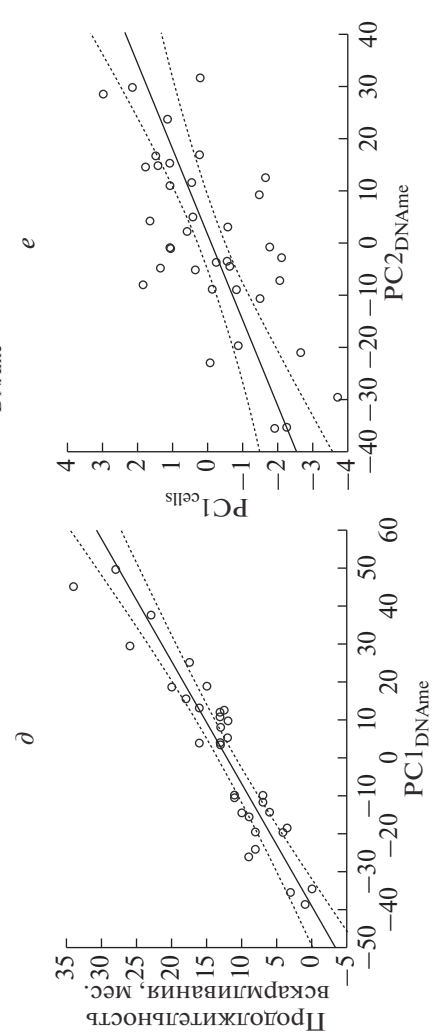
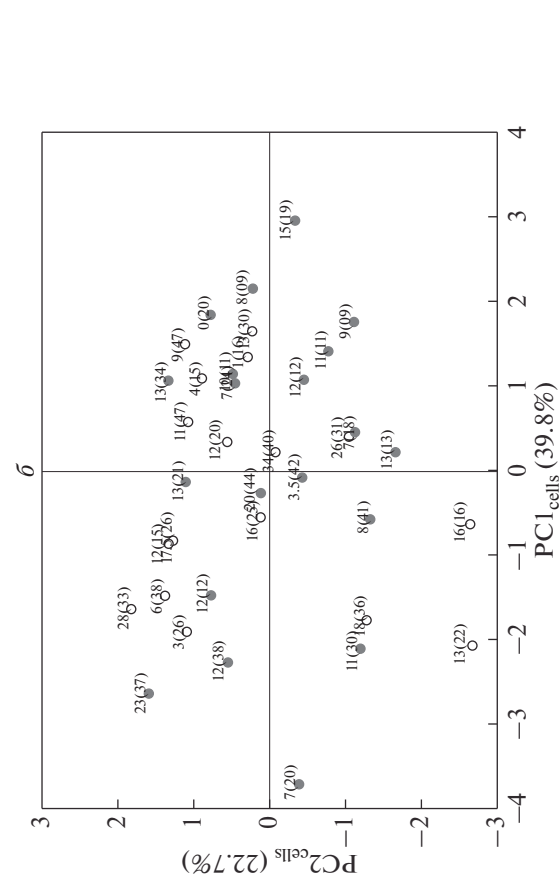
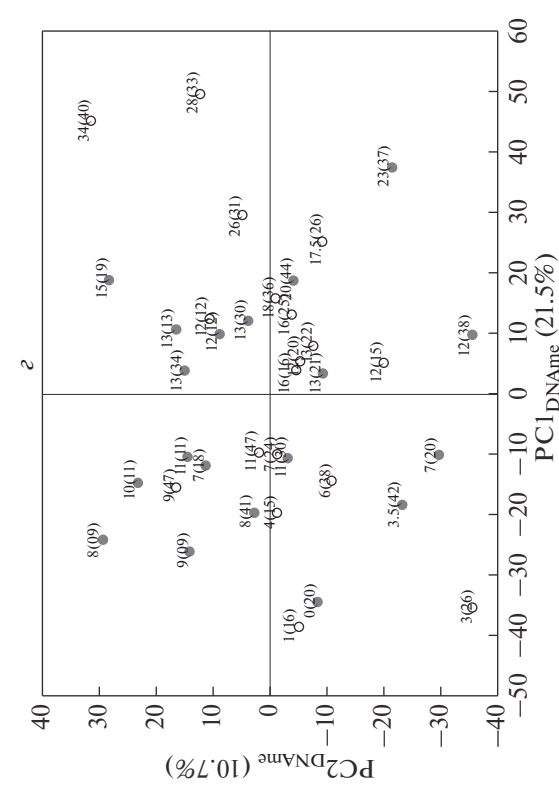
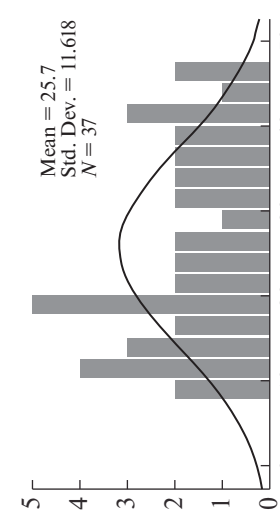
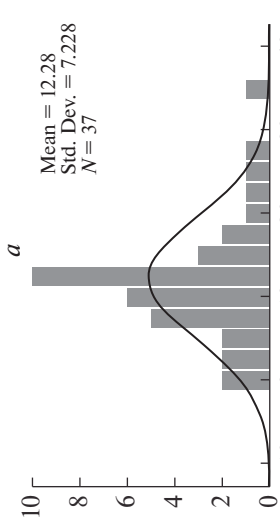
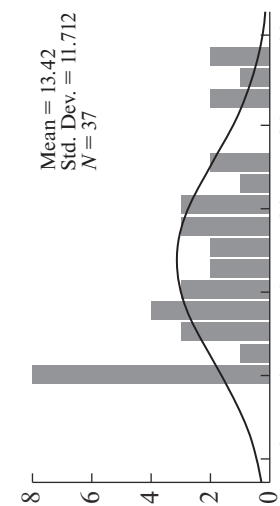
Представленная здесь работа была выполнена на выборке из контрольной когорты детей, вовлеченных в исследование био-поведенческих эффектов ранней социальной депривации (грант № 14.Z50.31.0027), – это типично развивающиеся дети из полных семей со средним уровнем дохода, проживающих в г. Санкт-Петербург ($N = 37$; 20 девочек и 17 мальчиков в возрасте от 9 мес. до четырех лет; рис. 1,а). Источником информации о детях являлись медицинские карты, результаты когнитивно-поведенческого обследования детей [10] и опросы матерей. 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 мес. (рис. 1,а), как следствие продолжительность грудного вскармливания не имела значимой корреляции с возрастом детей: $r = 0.198$; $p = 0.109$, в то время как интервал после прекращения кормления был высоко скоррелирован с возрастом: $r = 0.746$; $p < 0.001$. Статистически достоверных различий между девочками и мальчиками по демографическим показателям и показателям грудного вскармливания не наблюдалось.

Полногеномные профили метилирования ДНК из периферической крови детей были получены с помощью микрочипа Illumina Infinium MethylationEPIC, который включает в себя свыше 860 тыс. проб для анализа уровня метилирования CpG-сайтов, расположенных в 96% известных CpG-островков (CGI), и сайтов за пределами CGI; панель EPIC покрывает около 99% RefSeq генов. Геномная ДНК была изолирована из 0.5–1 мл крови с помощью набора реагентов FlexiGene®DNA (Qiagen); бисульфитную конверсию ДНК проводили по протоколу Illumina с использованием набора EZ DNA Methylation (Zymo Research). Для обработки и анализа данных использовали R-пакет Minfi [11]; нормализацию сигналов с чипа проводили методом стратифицированной квантильной нормализации. Данные были отфильтрованы в соответствии со следующими критериями: уровень надежности детекции пробы ($p < 0.05$), ее хромосомная локализация (аутосомы) и отсутствие известных полиморфных вариантов в CpG-сайте ($maf > 0.05$). По результатам фильтрации оставалось 805 тыс. проб, из которых, в свою очередь, были исключены пробы, показавшие низкую ($SD_{\beta} < 0.05$) межиндивидуальную вариативность уровня метилирования; оставшиеся 102368 проб были включены в последующий анализ.

Анализ ассоциации уровня метилирования CpG-сайтов с целевым фенотипом проводили на основе матрицы значений относительных уровней метилирования проб (бета-значения) и с помощью методов частной корреляции и линейной

Рис. 1. Распределение выборочных показателей (а); слева направо: возраст, продолжительность грудного вскармливания и временной интервал между прекращением грудного кормления и обследованием ребенка; все показатели (ось абсцисс) приведены в мес.; на оси ординат отмечено число наблюдений. Распределение индивидов в пространстве первых двух ГК, вычисленных на основе распределения шести типов клеток крови, PC_{cells} (б), и изменчивости показателей уровня метилирования 4276 CpG-сайтов, PC_{DNAme} (в); пол ребенка отмечен цветом кружка: белый для мальчиков и серый для девочек; цифрами (в мес.) отмечены продолжительность грудного вскармливания и возраст ребенка (в скобках). График корреляции индивидуальных распределений шести типов клеток: гранулоцитов (Gran), CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD4T и CD8T), В-лимфоцитов (Vcell), моноцитов (Mono) и NK-клеток (NK) с возрастом детей (в); для достоверных корреляций линия регрессии показана черным. Графики линейной регрессии, показывающие высокую положительную корреляцию первой ГК индивидуальной изменчивости уровня метилирования 4276 CpG-сайтов (PC1_{DNAme}) и продолжительности грудного вскармливания в мес. (д) и второй ГК изменчивости метилирования (PC2_{DNAme}) с первой ГК совокупной изменчивости клеточного состава крови (PC1_{cells}) (е). Коэффициенты корреляции и детерминации приведены в тексте.



регрессии, при контроле эффектов пола и возраста ребенка и клеточной гетерогенности образцов крови, имеющих известный и значимый эффект на профили метилирования ДНК [12, 13], а также с помощью анализа главных компонент (далее ГК), вычисленных на основе корреляционных матриц. Индивидуальные распределения типов клеток (гранулоцитов, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, моноцитов и NK-клеток) оценивали с помощью алгоритма [13], разработанного для оценки клеточного состава крови из метиломов на основе эмпирических данных [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленное распределение типов клеток не показало значимой связи с полом ребенка, как это видно из распределения индивидов в пространстве первых ГК (рис. 1, б) изменчивости индивидуальных частот типов клеток (далее PC_{cells}). Однако наблюдались статистически значимые корреляции с возрастом детей, а именно – возрастание числа гранулоцитов, $r = 0.408$; $p = 0.012$, и убывание В-лимфоцитов, $r = -0.399$; $p = 0.014$ (рис. 1, в). При этом грудное вскармливание не привнесло значимого вклада в выявленные ассоциации: $r = 0.412$; $p = 0.014$ и $r = -0.378$; $p = 0.032$, для гранулоцитов и В-клеток соответственно. Следует отметить, что возможно в силу малой величины выборки продолжительность грудного вскармливания не показала значимой связи с иммуно-фенотипом (или клеточным составом крови) ребенка, ожидаемой, исходя из релевантных данных о различных темпах развития врожденного иммунитета у младенцев с различными, естественным и искусственным, типами вскармливания [15].

По результатам корреляционного анализа уровни метилирования 4276 CpG-сайтов показали статистически достоверную (2201 сайт – положительную, $R_{\text{partial}} = 0.361-0.760$, и 2075 сайтов – отрицательную, $R_{\text{partial}} = -0.361-0.760$; при $p < 0.05$) ассоциацию с продолжительностью грудного вскармливания. На рис. 1, г представлено распределение индивидов в пространстве первых двух ГК изменчивости уровня метилирования (бета-значений) 4276 CpG-сайтов (далее PC_{DNAme}). По результатам анализа корреляции PC1_{DNAme} и PC2_{DNAme}, описывающих 21.5 и 10.7% изменчивости соответственно, с демографическими переменными (пол и возраст детей), частотами типов клеток и генеральными показателями совокупной их изменчивости (PC_{cells}), а также с показателями грудного вскармливания, были получены следующие данные. Во-первых, изменчивость уровня метилирования рассматриваемых сайтов не показала значимой связи с полом и возрастом детей. Во-вторых, PC1_{DNAme} была высоко коррелирована с продолжительностью грудного вскармливания ребенка: $r = 0.928$; $r_{\text{adj}}^2 = 0.858$; $p < 0.001$ (рис. 1, д). Это, в свою очередь, подтверждает достаточно высокую степень надежности ассоциаций, выявленных методом частных корреляций, а также указывает на то, что как минимум 20% совокупной изменчивости уровня метилирования выявленных сайтов может быть обусловлено грудным вскармливанием и его длительностью. И, в-третьих, около 10% изменчивости метилирования (PC2_{DNAme}) может быть связано, в первую очередь, с индивидуальной клеточной вариативностью (PC1_{cells}): $r = 0.665$; $r_{\text{adj}}^2 = 0.426$; $p < 0.001$ (рис. 1, е), причем эта корреляция значительно возрастает при учете такого фактора, как грудное вскармливание и его продолжительность: $r = 0.794$; $r_{\text{adj}}^2 = 0.630$; $p < 0.001$. Последнее свидетельствует о наличии связи грудного вскармливания с клеточным составом крови детей, не выявленном в предыдущем анализе на значимом пороге статистической достоверности.

В вышеизложенном анализе CpG-сайты рассматривались как независимые маркеры. В последующем анализе 4276 сайтов были рассмотрены в контексте их кометилирования, геномной колокализации и функций генов, с которыми они связаны. Геномное аннотирование сайтов было проведено согласно манифесту EPIC (Illumina) и в соответствии с БД UCSC [16] и GENCODE [17]. Поиск перепредставленных характеристик регуляторных элементов и генов проводили с использованием интегративных БД и аналитических ресурсов: DAVID [18], Enrichr [19] и g:Profiler [20].

По результатам геномной аннотации выявленные 4276 CpG-сайтов были связаны с 2635 генами. В контексте регуляторных геномных регионов (CGI и их фланкирующих регионов, генных промоторов и энхансеров, сайтов связывания факторов транскрипции и др.) выявленный список CpG не был значимо обогащен конкретными регуляторными регионами в сравнении с массивом таковых, представленных в панели EPIC. В то же время ряд биологических процессов и путей были найдены статистически перепредставленными в списке 2635 генов. Среди биологических процессов, определенных в терминах Генной Онтологии, GO [21], это процессы, связанные с сигнальными клеточными системами и их регуляцией, с развитием анатомических структур и клеток и в первую очередь с нервной и иммунной системами (табл. 1). Результаты анализа перепредставленности биологических путей KEGG [22] и PANTHER [23] также указывают на значимое обогащение списка из 2635 генов функциями, связанными с сигнальными системами, и функциями, связанными с активностью иммунной (диабет, реакция

Таблица 1. Результаты анализа статистической перепредставленности биологических процессов и биологических путей среди таковых, контролируемых генами, чье метилирование ассоциировано с грудным вскармливанием и его продолжительностью

Идентификационный код	Биологические процессы	P_{FDR}
GO:0007399	Развитие нервной системы	2.80E-15
GO:0048856	Развитие анатомических структур	1.40E-13
GO:0048468	Развитие клеток	3.30E-12
GO:0009653	Морфогенез анатомических структур	2.79E-11
GO:0000902	Морфогенез клеток	1.74E-08
GO:0022008	Нейрогенез	1.80E-07
GO:0007155	Клеточная адгезия	4.46E-07
GO:0030182	Дифференциация нейронов	1.72E-06
GO:0007154	Клеточные сигнальные пути	7.93E-06
GO:0030154	Клеточная дифференциация	1.22E-05
GO:0060284	Регуляция развития клеток	2.50E-05
GO:0007610	Поведение	7.68E-04
GO:0061564	Развитие аксонов	1.20E-03
GO:0007165	Передача сигнала	5.54E-03
GO:0099536	Синаптические сигнальные системы	6.22E-03
GO:0023051	Регуляция сигнала	2.20E-02
GO:0002520	Развитие иммунной системы	4.15E-02
Идентификационный код	Биологические пути	P_{FDR}
hsa04921	Окситоциновый сигнальный путь	1.21E-04
hsa04940	Диабет I типа	2.82E-04
hsa04550	Сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток	8.82E-04
hsa05330	Реакция отторжения трансплантата	3.60E-03
hsa04725	Холинергический синапс	6.73E-03
hsa04390	Нipро сигнальный путь	9.58E-03
hsa05169	Вирусная инфекция Эпштейна-Барра	1.13E-02
hsa04726	Серотонинергический синапс	3.48E-02
hsa04724	Глутаматергический синапс	4.43E-02
hsa04010	МАРК сигнальный путь	4.63E-02
P00057	Wnt сигнальный путь	8.03E-03
P00012	Кадгеринный сигнальный путь	9.28E-03
P00005	Развитие кровеносных сосудов	9.52E-03

отторжения трансплантата, вирусные инфекции) и нервной (синапсы) систем (табл. 1).

Перепредставленность среди списка генов, ассоциированных в настоящем исследовании с грудным вскармливанием, биологических путей, связанных с иммунной системой и ее функциями, была ожидаемой, учитывая специфичность вовлеченной в анализ ткани (кровь) и многочисленные свидетельства о значимой роли грудного вскармливания в созревании иммунной системы младенцев (см., например, [15, 24]). Представляется

примечательным значительное обогащение категорий, связанных с развитием и функциями нервной системы. Причем одним из первых (в числе ранжированных по значению p) биологических путей выступает окситоциновый сигнальный путь (табл. 1). Известно, что уровень окситоцина в крови у младенца превышает таковой у матери [25]. Возможно, зарегистрированный нами сигнал в ДНК-метилировании указывает на эпигеномную активацию окситоцинового пути у младенцев в ответ на материнское молоко и грудное вскармливание.

ливание как таковое. Известно, что 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 [26]. Предполагается, что окситоцин из материнского молока, полученный во время первых кормлений, является триггером систематического выделения этого гормона гипоталамусом младенца [25]. В дополнение тесный телесный контакт во время кормления также может стимулировать собственную выработку “гормона привязанности” окситоцина у ребенка [25]. Окситоцин зачастую действует как активатор широкого спектра систем и индуцирует выделение других гормонов и трансмисмиттеров [27]. 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 [28].

Может ли являться индуцированная материнским кормлением активация окситоциновых путей тем триггером, который способен индуцировать множественные изменения в системах передачи сигналов, в том числе синаптических, что в итоге отражается на сложных изменениях эпигенетических паттернов ряда генов, связанных с функциями ЦНС? Представленное в настоящем сообщении исследование фактически только открывает тему изучения возможных эпигеномных перестроек в ответ на систему питания на первых месяцах жизни, а результаты работы, на наш взгляд, представляют только “верхушку айсберга” из таких эффектов. Для ответа на заданный и многие другие вопросы, несомненно, нужны дополнительные полно-эпигеномные исследования на более обширной, стратифицированной в плане возраста, выборке детей при тщательной категоризации фенотипа – режима грудного вскармливания.

Сбор и молекулярно-генетический анализ образцов крови проводили при поддержке Правительства РФ (грант № 14.Z50.31.0027, рук. Е.Л. Григоренко); статистический и биоинформатический анализы данных проводили при поддержке РФФИ (грант № 17-06-00667, рук. В.В. Одинцова).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Victoria C.G., Bahl R., Barros A.J. et al.* Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and life-long effect // *Lancet Psychiatry*. 2016. V. 387. № 10017. P. 475–490. doi 10.1016/S0140-6736(15)01024-7
2. *Mischke M., Plösch T.* 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. V. 304. № 12. P. R1065–R1069. doi 10.1152/ajpregu.00551.2012
3. *Verduci E., Banderali G., Barberi S. et al.* Epigenetic effects of human breast milk // *Nutrients*. 2014. V. 6. № 4. P. 1711–1724. doi 10.3390/nu6041711
4. *Hartwig F.P., Loret de Mola C., Davies N.M. et al.* Breastfeeding effects on DNA methylation in the offspring: A systematic literature review // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 4. P. e0175604. doi 10.1371/journal.pone.0173070
5. *Obermann-Borst S.A., Eilers P.H., Tobi E.W. et al.* Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children // *Pediatr. Res.* 2013. V. 74. № 3. P. 344–349. doi 10.1038/pr.2013.95
6. *Tao M.H., Marian C., Shields P.G. et al.* Exposures in early life: associations with DNA promoter methylation in breast tumors // *J. Dev. Orig. Health. Dis.* 2013. V. 4. P. 182–190. doi 10.1017/S2040174412000694
7. *Rossnerova A., Tulupova E., Tabashidze N. et al.* Factors affecting the 27K DNA methylation pattern in asthmatic and healthy children from locations with various environments // *Mutat. Res.* 2013. V. 741–742. P. 18–26. doi 10.1017/S2040174412000694
8. *Soto-Ramirez N., Arshad S.H., Holloway J.W. 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. Epigenet.* 2013. V. 5. № 1. P. 1. doi 10.1186/1868-7083-5-1
9. *Simpkin A.J., Hemani G., Suderman M. 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. V. 25. № 1. P. 191–201. doi 10.1093/hmg/ddv456
10. *Колесникова М.А., Жукова М.А., Овчинникова И.В.* Особенности когнитивного развития и адаптивного поведения детей в домах ребенка в РФ // *Клин. и спец. психология*. 2018. V. 7. № 2. P. 53–69. doi 10.17759/psyclin.2018070204
11. *Aryee M.J., Jaffe A.E., Corrada-Bravo H. et al.* Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA Methylation microarrays // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. № 10. P. 1363–1369. doi 10.1093/bioinformatics/btu049
12. *Boks M.P., Derks E.M., Weisenberger D.J. et al.* The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 8. P. e6767. doi 10.1371/journal.pone.0006767
13. *Jaffe A.E., Irizarry R.A.* Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies // *Genome Biol.* 2013. V. 15. P. R31. doi 10.1186/gb-2014-15-2-r31
14. *Reinius L.E., Acevedo N., Joerink M. et al.* Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. P. e41361. doi 10.1371/journal.pone.0041361

15. Andersson Y., Hammarström M.L., Lönnerdal B. et al. Formula feeding skews immune cell composition toward adaptive immunity compared to breastfeeding // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 7. P. 4322–4328. doi 10.4049/jimmunol.0900829
16. Casper J., Zweig A.S., Villarreal C. et al. The UCSC Genome Browser database: 2018 update // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D762–D769. doi 10.1093/nar/gkx1020
17. Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M. et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 9. P. 1760–1764. doi 10.1101/gr.135350.111
18. Dennis G.J., Sherman B.T., Hosack D.A. et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery // *Genome Biol.* 2003. V. 4. № 9. P. R60.1–R60.11.
19. Chen E.Y., Tan C.M., Kou Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool // *BMC Bioinformatics.* 2013. V. 128. № 14. doi 10.1186/1471-2105-14-128
20. Reimand J., Arak T., Adler P. et al. g:Profiler – a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update) // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № W1. P. W83–W89. doi 10.1093/nar/gkw199
21. Consortium T.G.O. The Gene Ontology project in 2008 // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. D440–D444. doi 10.1093/nar/gkm883
22. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 27–30.
23. Thomas P.D., Campbell M.J., Kejariwal A. et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function // *Genome Res.* 2003. V. 13. № 9. P. 2129–2142. doi 10.1101/gr.772403
24. Jackson K.M., Nazar A.M. Breastfeeding, the immune response, and long-term health // *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2006. V. 106. № 4. P. 203–207.
25. Uvnäs Moberg K., Prime D.K. Oxytocin effects in mothers and infants during breastfeeding // *Infant.* 2013. V. 9. № 6. P. 201–206.
26. Higashida H., Furuhashi K., Yamauchi A.M. 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. V. 7. № 1. P. 7883. doi 10.1038/s41598-017-07949-4
27. Ludwig M., Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours // *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. V. 7. P. 126–136. doi 10.1038/nrn1845
28. Bakos J., Srancikova A., Havranek T., Bacova Z. Molecular mechanisms of oxytocin signaling at the synaptic connection // *Neural Plasticity.* 2018. V. 2018. № 4864107. doi 10.1155/2018/4864107

A Study of the Association between Breastfeeding and DNA Methylation in Peripheral Blood Cells of Infants

O. Yu. Naumova^{a, b, c, *}, V. V. Odintsova^{b, d}, I. A. Arincina^b, S. Yu. Rychkov^a,
R. J. Muhamedrahimov^b, Yu. V. Shneider^a, A. N. Grosheva^a,
O. V. Zhukova^a, and E. L. Grigorenko^{b, c}

^aVavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, 119991 Russia

^bLaboratory of Translational Sciences of Human Development,
Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 119034 Russia

^cTexas Institute for Measurement, Evaluation and Statistics, University of Houston, Houston, TX, 77204 USA

^dResearch Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, 117198 Russia

*e-mail: oksana.yu.naumova@gmail.com

This article reports on new data on the association of breastfeeding with DNA methylation in the peripheral blood cells of 37 children aged from 9 months to four years. Whole-genome DNA methylation profiling was performed using the Illumina MethylationEPIC array. The Epigenome-Wide Association Study (EWAS) revealed an association between the duration of breastfeeding and the methylation level of 4276 CpG sites related to 2635 genes. According to the functional annotation, these genes were predominantly involved in the control of cell signaling systems, the development of anatomical structures and cells, and, above all, were related to the development and function of the immune system and the CNS. The results of the study allowed assuming a special role of the oxytocin signaling pathway, as a potential trigger of coordinated epigenetic changes in the genes involved in the CNS function in response to breastfeeding.

Keywords: breastfeeding, peripheral blood lymphocytes, genome-wide DNA methylation, Illumina MethylationEPIC microarray.