

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie
4XMGVP



Mgr. Jitka Pavlíková

Vliv výživy matek v těhotenství na metylaci genomu novorozenců
The effect of maternal nutrition on the newborn genome methylation

Disertační práce

Školitel:

RNDr. Pavel Rössner Jr, Ph.D.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i

Praha, 2023

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne _____

Mgr. Jitka Pavlíková

PODĚKOVÁNÍ

Za veškerou podporu a pomoc děkuji svému školiteli Dr. Pavlu Rössnerovi Jr., všem svým kolegům a rovněž všem maminkám, díky jejichž vynaloženému úsilí mohla tato práce vzniknout. Zvláštní poděkování potom patří Dr. Radimu Šrámovi, bez jehož nezměrné důvěry a neutuchajícího povzbuzování při každém sebemenším pokroku by tato práce nikdy nevznikla.

Děkuji všem svým blízkým, dospělým i těm nejmenším, kteří pro mě byli po celou dobu mého studia zdrojem síly, energie a optimismu.

OBSAH

| | |
|--|----|
| ABSTRAKT | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| SEZNAM ZKRATEK | 3 |
| 1 CÍL PRÁCE | 4 |
| 2 ÚVOD..... | 5 |
| 2.1 Hypotéza fetálního původu | 5 |
| 2.2 Epigenetika | 6 |
| 2.2.1 Metylace cytosinu | 6 |
| 2.2.2 Modifikace histonů | 7 |
| 2.2.3 RNA interference..... | 8 |
| 2.3 Transgenerační přenos epigenetických změn | 9 |
| 2.4 Nutrigenetika a nutrigenomika | 10 |
| 2.5 Epigenom a nutriční kvalita mateřské stravy | 12 |
| 2.6 Epigenom a expozice perzistentním organickým polutantům | 13 |
| 3 METODIKA..... | 14 |
| 3.1 Účastníci | 15 |
| 3.2 Design studie | 15 |
| 3.2.1 Strava těhotných žen | 15 |
| 3.2.2 Metylace genomu novorozenců | 17 |
| 3.3 Použité metody | 17 |
| 3.3.1 Hodnocení kvality stravy..... | 17 |
| 3.3.2 Analýza persistentních organických polutantů a výpočet jejich alimentárního příjmu. 19 | |
| 3.3.3 Celogenomová analýza metylace DNA | 20 |
| 4 VÝSLEDKY | 28 |
| 4.1 Účastníci studie | 28 |
| 4.2 Kvalita stravy | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.2.1 Množství a nutriční kvalita stravy | 30 |
| 4.2.2 Perzistentní organické polutanty ve stravě..... | 34 |
| 4.3 Metylace DNA novorozenců..... | 36 |
| 4.3.1 Kvalita, normalizace a filtrace dat..... | 36 |
| 4.3.2 Testování diferenciální metylace | 38 |
| 5 DISKUZE | 40 |
| 5.1 Množství a nutriční kvalita stravy matek | 40 |
| 5.1.1 Příjem energie, makroživin a vlákniny | 40 |
| 5.1.2 Kvalita a příjem stravy u jednotlivých potravinových skupin..... | 41 |
| 5.2 Alimentární příjem perzistentních organických polutantů | 41 |
| 5.2.1 Polychlorované bifenyly..... | 41 |
| 5.2.2 Organochlorové pesticidy | 43 |
| 5.2.3 Bromované zpomalovače hoření | 44 |
| 5.2.4. Perfluorované látky | 45 |
| 5.2.5. Polycyklické aromatické uhlovodíky | 46 |
| 5.3 Diferenciální metylace | 47 |
| 5.3.1 Faktory potenciálně ovlivňující metylom..... | 47 |
| 5.3.2 Množství a nutriční kvalita stravy | 47 |
| 5.3.3 Perzistentní organické polutanty ve stravě..... | 47 |
| 6 ZÁVĚR | 49 |
| LITERATURA..... | 51 |
| PROHLÁŠENÍ O PODÍLU ČINNOSTI..... | 67 |

ABSTRAKT

Strava matky v období těhotenství je významným faktorem podílejícím se na epigenetickém programování potomků. Na epigenom mají kromě nutričního hlediska vliv také případné kontaminující látky, které se mohou ve stravě těhotných žen vyskytovat. Důležitou skupinou těchto možných kontaminantů jsou perzistentní organické polutanty, což jsou sloučeniny většinou antropogenního původu, které dlouhodobě přetrvávají v životním prostředí, stávají se součástí potravních řetězců a část z nich se akumuluje v živých organismech. Pro své nepříznivé účinky na organismy jsou tyto látky sledovány a používání některých z nich bylo již zakázáno nebo alespoň významně omezeno.

Cílem této práce bylo zjistit, zda je kvalita stravy těhotných žen v České republice z hlediska nutriční i kontaminace perzistentními organickými polutanty natolik rozdílná, že se tyto rozdíly mohou odrazit v metylomu novorozenců.

Byla analyzována strava 49 těhotných žen z regionu Karviná a České Budějovice. Tyto ženy v posledním měsíci těhotenství po dobu jednoho týdne podrobně zaznamenávaly veškerou snědenou stravu a zároveň čtvrtinu této stravy shromažďovaly do krabiček (jedna krabička na jeden den). Ze záznamů stravy byly získány informace o množství a kvalitě stravy a v sesbíraných vzorcích byla stanovena koncentrace 67 různých perzistentních organických polutantů náležejících do pěti různých skupin – polychlorované bifenyls, organochlorové pesticidy, bromované zpomalovače hoření, perfluorované sloučeniny a polyaromatické uhlovodíky. Následně byly hodnoceny možné asociace mezi nutriční kvalitou mateřské stravy a mateřským alimentárním příjmem perzistentních organických polutantů na straně jedné a stavem metylomu novorozenců v buňkách pupečnickové krve na straně druhé.

Nutriční kvalita stravy těhotných žen ve studovaném souboru nedosahovala v některých sledovaných parametrech doporučených hodnot, nedostatečný byl zejména příjem bílkovin a vlákniny. Alimentární příjem perzistentních organických polutantů byl na velmi nízké úrovni a v naprosté většině případů byl řádově nižší, než ukládají stanovené limity. Rozdíly ve stravě jednotlivých žen nebyly natolik výrazné, aby se projevíly v metylomu novorozenců.

ABSTRACT

The maternal diet during pregnancy is an important factor involved in the epigenetic programming of the offspring. In addition to the nutritional aspect, the epigenome is also influenced by possible contaminating substances that may occur in the diet of pregnant women. An important group of these potential contaminants are persistent organic pollutants, which are compounds of mostly anthropogenic origin that persist in the environment for a long time, become part of food chains, and some of them accumulate in living organisms. These substances are being monitored for their adverse effects on organisms, and the use of some of them has already been banned or at least significantly restricted.

The aim of this work was to find out whether the quality of the diet of pregnant women in the Czech Republic differs in terms of nutrition and contamination with persistent organic pollutants so much that these differences can be reflected in the methylome of newborns.

The diet quality of 49 pregnant women from the Karviná and České Budějovice regions was analyzed. During the last month of pregnancy, these women recorded in detail all the food they ate for one week and at the same time collected a quarter of this food in boxes (one box for one day). Information on the quantity and quality of the diet was obtained from the diet records, and the concentrations of 67 different persistent organic pollutants belonging to five different groups - polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, brominated flame retardants, perfluorinated compounds and polyaromatic hydrocarbons - were analyzed in the collected food samples. Subsequently, possible associations were evaluated between the nutritional quality of the maternal diet and the maternal alimentary intake of POPs on the one hand and the methylome status of newborns in umbilical cord blood cells on the other.

The nutritional quality of the diet of the pregnant women in the studied group did not reach the recommended values in some monitored parameters, especially the protein and fiber intake was insufficient. Alimentary intake of persistent organic pollutants was at a very low level and in the vast majority of cases it was an order of magnitude lower than the established limits. Differences in the diet of individual women were not significant enough to be reflected in the methylome of newborns.

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| BaP | benzo[a]pyren |
| BFR | bromované zpomalovače hoření |
| CYP1A1 | cytochrom P450, rodina 1, podrodina A, polypeptid 1 |
| DDE | dichlorodifenylchloroetylen |
| ddNTP | dideoxynukleotid |
| DDT | dichlordifenyltrichloreten |
| DNP | dinitrofenyl |
| dSPE | disperzní extrakce na pevné fázi |
| GC | plynová chromatografie |
| HBCD | hexabromocyklododekan |
| KPT | kontrolní praktický test kvality výživy těhotných a kojících žen |
| LOQ | mez stanovitelnosti |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| ncRNA | nekódující RNA |
| OCP | organochlorové pesticidy |
| PAH | polyaromatické uhlovodíky |
| PBDE | polybromované difenylethery |
| PBP | pentabromofenol |
| PCB | polychlorované bifenyly |
| PFAS | perfluorované alkylované látky |
| PFBA | kyselina perfluorobutanová |
| POP | perzistentní organické polutanty |
| RISC | RNA-induced silencing complex |
| SNP | jednonukleotidový polymorfismus |
| SUMO | small ubiquitin-related modifier |
| TDI | tolerovatelný denní příjem |
| TWI | tolerovatelný týdenní příjem |
| UHPLC | ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| UTR | nepřekládaná oblast genu |
| WHR | poměr pasu k výšce |

1 CÍL PRÁCE

V této práci jsem se zabývala analýzou kvality stravy těhotných žen a jejím vztahem k metylaci genomové DNA (metylomu) u jejich novorozenců. Hodnotila jsem kvalitu stravy matek jak z hlediska nutričního složení, tak s ohledem na kontaminaci perzistentními organickými polutanty (POP). Cílem práce bylo získání dat o kvalitě stravy a alimentární expozici POP a následná analýza vztahů mezi těmito faktory a metylomem DNA v buňkách pupečníkové krve.

Očekávala jsem, že se odlišná kvalita vybraných faktorů stravy matek odrazí v metylaci DNA novorozenců, neboť alimentární příjem některých látek je významným faktorem prostředí, který ji může ovlivnit. Mechanismy tohoto vlivu mohou zahrnovat buď změnu aktivity enzymů, které katalyzují metylaci DNA, nebo změnu dostupnosti a využití metylových skupin potřebných pro tuto reakci. Zejména jsem očekávala souvislost mezi stavem metylomu a příjmem těch složek stravy, které jsou zdrojem vlákniny (ovoce, zelenina, luštěniny) a bílkovin (mléčné výrobky, maso, vejce, luštěniny), neboť tyto potraviny jsou rovněž zdrojem látek ovlivňujících metylaci DNA (např. kyselina listová, vitamín B₁₂, cholin, betain, flavonoidy).¹⁻⁴ V případě významnějšího mateřského alimentárního příjmu některých POP jsem očekávala i souvislost mezi metylací DNA novorozenců a těmito látkami.⁵

2 ÚVOD

2.1 Hypotéza fetálního původu

Vyvážená a zdravotně nezávadná strava matky v průběhu těhotenství je nezbytná pro optimální vývoj plodu. Vědecké práce se zpočátku zabývaly především otázkou, jak strava v těhotenství ovlivňuje růst plodu. V první polovině dvacátého století byl kladen velký důraz zejména na vliv množství bílkovin a esenciálních aminokyselin⁶⁻⁹, tuků, vitamínů^{6,7,10-12} a minerálů^{6,7,10} ve stravě. S rostoucími znalostmi v oblasti fyziologie, genetiky a molekulární biologie významně narůstalo množství informací o mechanismech působení jednotlivých složek stravy na prenatální vývoj.¹³⁻¹⁷ Současně s tím epidemiologické studie ukázaly některé souvislosti mezi porodní váhou a fyzickým i psychickým stavem jedince v jeho pozdějším životě¹⁸⁻²⁰.

V roce 1992 formuloval David Barker na základě epidemiologických studií tzv. hypotézu spořivého fenotypu (the thrifty phenotype hypothesis). Dle této hypotézy je nižší porodní hmotnost spojena s řadou chronických onemocnění v pozdějším věku. Při nedostatečné výživě v těhotenství se plod adaptuje na prostředí s omezeným zdrojem živin a takto nastavený metabolismus posléze nedokáže zpracovávat nadbytek snadno přístupných potravin.²¹ Hypotéza spořivého fenotypu byla v roce 1997 potvrzena studií na jednovaječných a dvojvaječných dvojčatech, která ukázala na souvislost diabetu 2. typu s porodní váhou, nikoli s genotypem.²²

Epidemiologické studie se posléze začaly zabývat souvislostmi mezi zdravotním stavem jedince a kvalitou stravy matky v těhotenství. Postupně se začaly objevovat i vztahy mezi stravou přijímanou v těhotenství a psychickým stavem dětí, například pozitivní vliv konzumace ryb na kognitivní a sociální dovednosti dětí v mladším školním věku.^{23,24}

V souvislosti s rozvojem epigenetiky navázala na počátku 21. století na hypotézu spořivého genotypu hypotéza fetálního původu (the fetal origins hypothesis), podle níž podmínky během prenatálního vývoje ovlivňují trvale epigenetický stav genomu, a tím zdravotní stav jedince v průběhu života.²⁵ Naprogramování exprese fetálního genomu je mechanismem, který zprostředkovává trvalé účinky nutričního a hormonálního prostředí in utero na řadu fyziologických funkcí a struktur²⁶ odrážejících se v pozdější kondici fyzické i psychické.²⁷

V průběhu 20. století se začaly objevovat práce ukazující, že na nitroděložní vývoj plodu má vliv nejen nutriční složení stravy matky, ale také přítomnost toxických látek. Byl zahájen výzkum účinků xenobiotik a zdraví škodlivých sloučenin z potravin (např. benzo[a]pyren, nebo akrylamid). V roce 1962 vyšla kniha Rachel Carsonové Tiché jaro, která vedla k zákazu používání pesticidu DDT.²⁸ V roce 2001 byla přijata Stockholmská úmluva, kterou ratifikovalo 184 zemí světa a která reguluje produkci a používání některých perzistentních organických polutantů (POP).²⁹ POP jsou látky, které dlouhodobě

přetrvávají v prostředí a hromadí se v živých organismech. Jsou záměrně produkovány člověkem nebo vznikají jako vedlejší produkt, kupř. při spalovacích procesech, a mohou být velmi nebezpečné pro vyvíjející se plod. Látky rozpustné v tucích procházejí placentou difúzí a jsou proto potenciálně toxické i v nízkých koncentracích. Pro látky rozpustné ve vodě se placenta jeví jako účinná bariéra, pokud však dosáhnou v krvi matky vyšších koncentrací, mohou placentární bariéru též překonat. Navíc se zdá, že mohou prostoupit i přes hematoencefalickou bariéru, která ještě není zcela funkční, a tím proniknout do mozku plodu.³⁰

Mateřská strava a expozice toxickým látkám působí na vyvíjející se plod ve vzájemné provázanosti. Výživa matky významně ovlivňuje tvorbu a funkci placenty³¹⁻³³, což nejen dopadá na kvalitu a množství živin dodaných přes placentu k plodu^{34,35}, ale má vliv i na placentární expresi CYP1A1 (enzym nadrodiny cytochromu P450), který se podílí na metabolismu a odstranění toxických látek.³⁶

2.2 Epigenetika

Epigenetika je obor studující jakékoli potenciálně stabilní a v ideálním případě dědičné změny v expresi genu nebo buněčném fenotypu, které nejsou způsobeny změnami sekvence DNA.³⁷

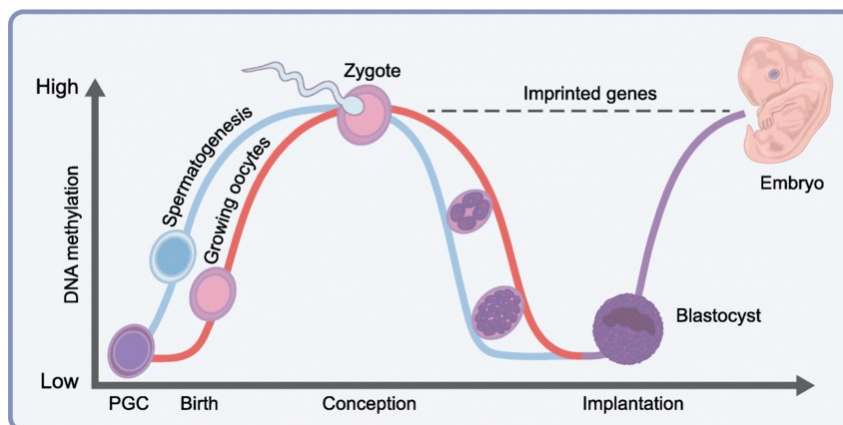
Dosud jsou známy tři základní epigenetické mechanismy – metylace cytosinu v DNA, modifikace histonů a RNA interference. Exprese genů v buněčném jádru je ovlivněna všemi třemi typy epigenetických modifikací, aktivita mitochondriálních genů pak pouze metylací cytosinu a RNA interferencí.^{38,39} Tyto epigenetické mechanismy se rovněž podílí na vlivu stravy přijímané v těhotenství na programování genové exprese potomků.⁴⁰⁻⁴³

2.2.1 Methylace cytosinu

Cytosin, jedna z bází tvořících molekulu DNA, se vyskytuje ve dvou formách – metylované a nemetylované. Na geny obsahující metylcytosiny se vážou specifické bílkoviny, které tyto geny inaktivují.

Když se stávající buňka dělí, předává se do dceřiných buněk kopie DNA, včetně metylačního vzoru. Mechanismus, kterým tento přenos probíhá, je zajišťován enzymem udržovací DNA metyltransferázou.⁴⁴ Přenos methylace DNA z jedince na jeho potomky však není objasněn. Na začátku procesu tvorby pohlavních buněk je většina metylcytosinu demetylována na cytosin. Zralé pohlavní buňky mají úroveň methylace již vysokou, ale její hladina prudce poklesne ihned po splnutí vajíčka a spermie. Během vývoje embrya potom vystoupá na obvyklou úroveň (obrázek 1). Metylační vzor se

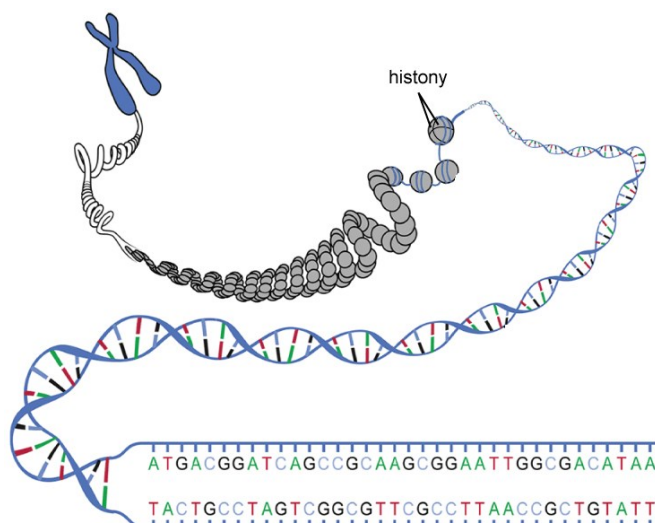
tedy během procesu vzniku nové generace dvakrát vymaže, ale následně se zase obnoví.⁴⁵ Jak k tomu dochází, není dosud jasné.



Obr. 1: Dynamika metylace DNA během vývoje člověka. Samčí (modrá čára) a samičí (červená čára) DNA sledují různé vzorce metylace, od narození rodiče až po produkci zygoty (početí) a implantaci blastocysty. Imprintované geny (černá přerušovaná čára) neprocházejí po oplodnění demethylací.⁴⁶

2.2.2 Modifikace histonů

Molekula DNA je v buněčných jádrech několikaúrovňově sbalena (kondenzována), přičemž jedna z kondenzačních úrovní zahrnuje její omotání kolem bílkovinných molekul nazývaných histony (obrázek 2).



autor: OpenStax, upraveno

Obr. 2: Kondenzace DNA

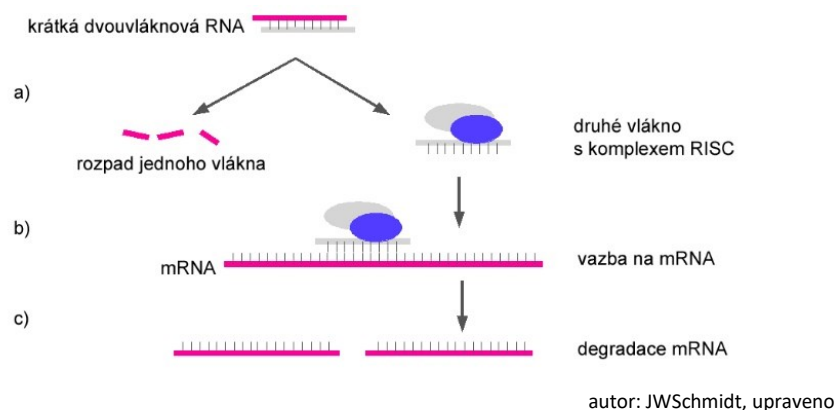
Na histony se vážou molekuly a funkční skupiny, které aktivují nebo deaktivují geny nacházející se v blízkosti takto modifikovaného histonu. Podle účinku na přilehlé geny lze tyto molekuly a funkční skupiny rozdělit do tří skupin: a) aktivační – např. bílkoviny SUMO (small ubiquitin-related modifier) a

bílkoviny Polycomb, b) deaktivační - např. acetylová funkční skupina a bílkoviny Trithorax, c) molekuly a funkční skupiny s aktivační i deaktivační funkcí, a to v závislosti na vazebném místě – např. metylová funkční skupina a ubiquitin.⁴⁴

2.2.3 RNA interference

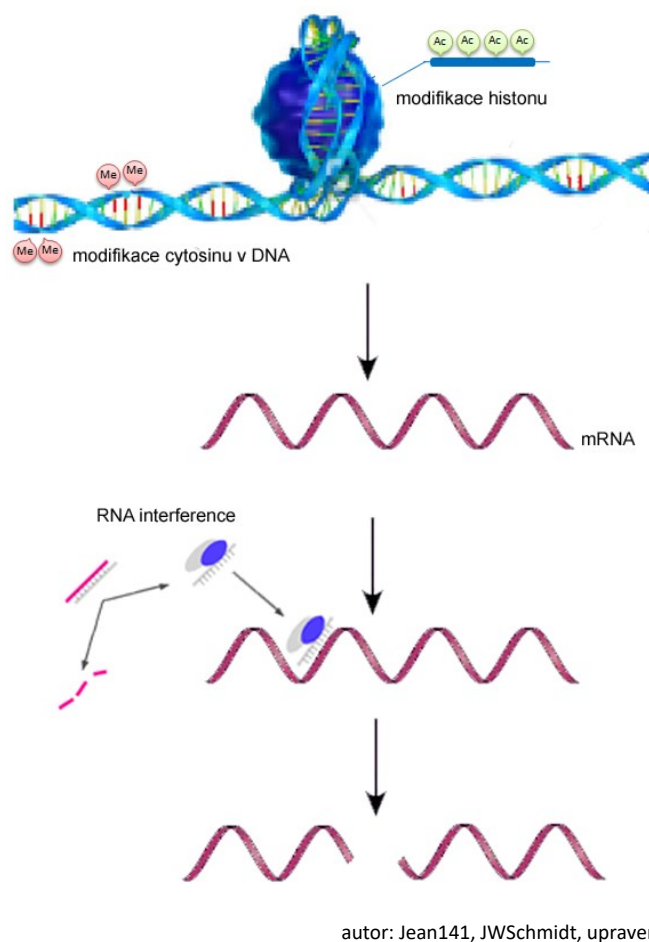
RNA interference je posttranskripční mechanismus regulující genovou expresi. Pokud je v buňce přítomna krátká dvouvláknová nekódující RNA (tzv. ncRNA, non-coding RNA), která interferuje s mRNA, může se spustit proces, na jehož konci je mRNA rozštěpena dříve, než se naváže na ribozom.

Na začátku tohoto procesu se dvouvláknová molekula ncRNA rozpojí na dvě molekuly jednovláknové (obr. 3a). Jedno z vláken se ihned rozpadne a na druhé se připojí enzymatický komplex RISC (obr. 3b). ncRNA se spojí s komplementárním úsekem mRNA a komplex RISC poté celou mRNA degraduje (obr. 3c).



Obr. 3: RNA interference

Všechny tři výše uvedené epigenetické mechanismy (obr. 4) jsou navzájem velmi úzce provázané, což vyplývá mimo jiné z faktu, že k jejich uskutečnění jsou nezbytné specifické enzymy. Metylace DNA tak může ovlivnit například tvorbu enzymu RISC, čímž působí na RNA interferenci. RNA interference může působit na tvorbu enzymu histon acetylázy, který je nezbytný pro acetylaci histonů. Ta pak může mít vliv na tvorbu enzymu DNA metyltransferázy, který je nutný pro metylaci DNA.



Obr. 4: Přehled základních epigenetických mechanismů: metylace DNA, modifikace histonů a RNA interference

2.3 Transgenerační přenos epigenetických změn

Přenos vlastností napříč generacemi nezprostředkují pouze geny, ale také epigenetické mechanismy. Mezigenerační reakce na prožité zkušenosti hrají zřejmě podstatnou a evolučně konzervovanou roli v regulaci fyziologických funkcí.⁴⁷ Informace o nastavení aktivity genů se dostává do zárodečných buněk, přesné mechanismy mezigeneračního přenosu aktivity genů však zatím nejsou známy. Je možné, že v tomto procesu hrají určitou úlohu i mikroorganismy, jejichž vliv se prostřednictvím působení produktů metabolismu na genom předává do další generace^{48,49} a jejichž význam při aktivaci a deaktivaci genů se zdá být poměrně velký.^{50,51}

2.4 Nutrigenetika a nutrigenomika

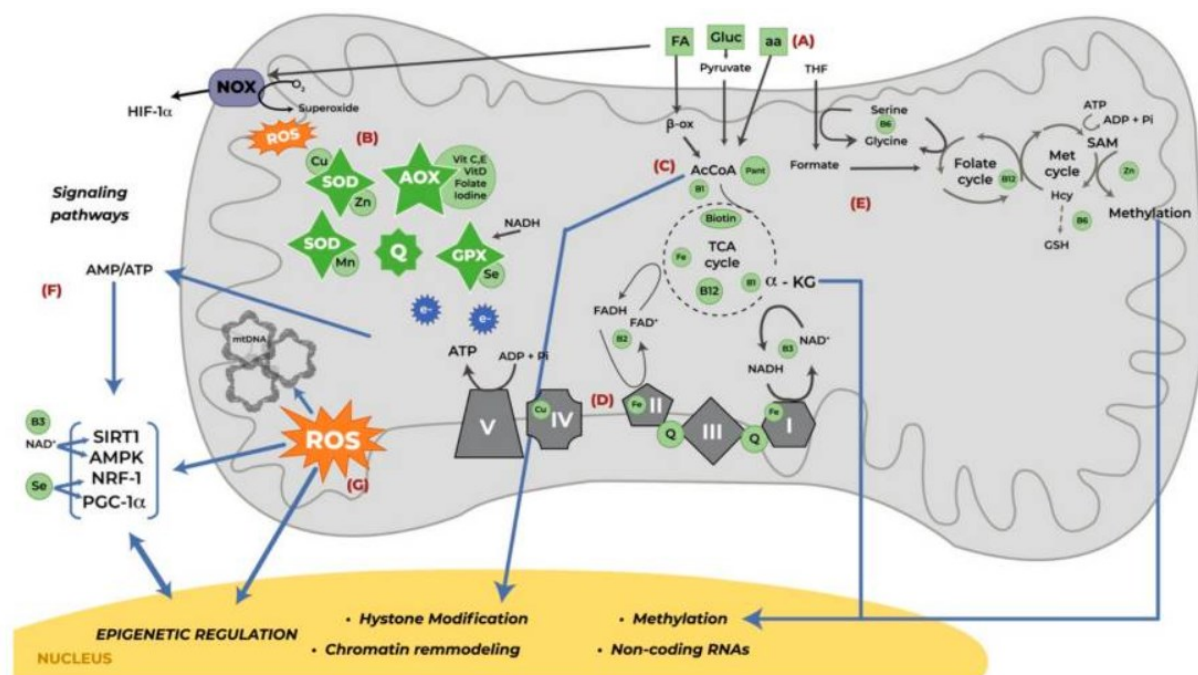
Vztahem mezi stravou a procesy na úrovni DNA se zabývají dva vědní obory – nutrigenetika a nutrigenomika. Nutrigenetika studuje účinky genetických variací na vliv stravy na organismus, zatímco nutrigenomika zkoumá, jak strava ovlivňuje funkci genů prostřednictvím epigenetických modifikací.⁵²

Nutrigenetika se věnuje geneticky daným procesům. Z dosavadních poznatků například vyplývá, že příjem ovoce a zeleniny snižuje v organismu tvorbu PAH-DNA aduktů,⁵³⁻⁵⁹ které vznikají v důsledku expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům z ovzduší i ze stravy. Jejich hladiny pozitivně korelují s výskytem tumorů⁶⁰ i se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění.⁶¹ Souvislost mezi stravou a hladinami DNA aduktů se projevuje již v prenatálním období, kdy vysoký mateřský příjem ovoce bohatého na vitamín C je statisticky významně spojen s nižšími hladinami DNA aduktů u plodu.⁵⁹ Protektivní účinek se však nemusí projevit u každého jedince, neboť je ovlivněn mnoha dalšími faktory, např. geneticky podmíněnými rozdíly v aktivitě biotransformačních enzymů. Variabilita metabolické aktivity je způsobena přítomností několika typů alel pro daný enzym.^{54,57,58} Tento genetický polymorfismus může ovlivnit ochranné působení zdravých složek stravy nejen vzhledem ke genotoxickým účinkům nepříznivých faktorů, ale i míru poškození buněčných membrán a dalších buněčných struktur.⁶²⁻⁶⁴

Nutrigenomika popisuje epigenetické nastavení genomu, včetně genomu potomků, neboť životní styl rodičů (např. podvýživa, obezita, stres, deprese, expozice xenobiotikům) může modifikovat jak mateřský, tak otcovský epigenom.⁶⁵⁻⁶⁸ Epigenetické modifikace také představují důležitý potenciální mechanismus stravovacích a environmentálních dopadů časných fází života jedince na jeho pozdější zdravotní stav.⁶⁹⁻⁷³ Strava matek během těhotenství tak má důležité účinky nejen na zdravotní stav novorozence, ale i na zdraví jedince v pozdějším věku.^{74,75}

Bylo například zjištěno, že nadměrný příjem cukru či tuků v těhotenství, stejně jako nedostatečný příjem bílkovin, mohou prostřednictvím epigenetických mechanismů negativně ovlivňovat neurogenezi vyvíjejícího se mozku, což má nepříznivé důsledky pro celý další život jedince.^{40-43,76} Také expozice toxickým látkám může vyvolat epigenetické modifikace, přičemž tyto změny mohou mít dlouhodobé účinky na aktivitu genů.⁷⁷

Nejen příjem problematických látek, ale i nedostatečný přísun látek nezbytných, zejména vitamínů, minerálů a bílkovin, vede k nežádoucím změnám v epigenomu vyvíjejícího se jedince (obr. 5).^{78,79}



Obr. 5: Složky stravy ovlivňující mitochondriální epigenetické mechanismy v buňkách plodu. (A) Nadměrná spotřeba substrátu zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku. (B) Vitamíny a minerály jsou součástí antioxidantního systému. (C) Cyklus trikarboxylových kyselin vyžaduje vitamíny pro přísun metabolitů pro biosyntetické dráhy a pro transkripční a epigenetické procesy. (D) Produkce ATP vyžaduje vitamíny a minerály jako kofaktory a antioxidanty. (E) Vitamíny a minerály jsou nutné pro přenos metylové skupiny. (F) Vitamíny a minerály se podílejí na aktivaci signálních drah ovlivňujících epigenetické mechanismy. (G) Reaktivní formy kyslíku nezpracované antioxidantním systémem ovlivňují epigenetické mechanismy.⁷⁹

Jsou známy i ochranné účinky některých látek – například omega-3 mastné kyseliny v mateřské stravě mění acetylaci histonů u potomků, a tím zvyšují aktivitu protinádorových molekulárních mechanismů.⁸⁰

Období mezi početím, těhotenstvím a prvními roky života (např. prvních 1000 dní) je tak považováno za optimální dobu, kdy faktory prostředí, jako je výživa, zdravé prostředí a kvalitní péče, mohou uplatnit své příznivé epigenetické účinky.⁸¹⁻⁸⁵

2.5 Epigenom a nutriční kvalita mateřské stravy

Výzkum naznačuje, že faktory stravy, kterým je jedinec vystaven v raných fázích svého života, ovlivňují všechny tři výše zmíněné epigenetické mechanismy, tedy metylaci DNA⁸⁶⁻⁹³, modifikaci histonů^{94,95} i RNA interferenci.^{96,97} Tyto vlivy se mohou projevat i v dalších generacích.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Epigenetické mechanismy mohou stát i za některými souvislostmi mezi stravou a úrovní genotoxického poškození organismu. Existuje například vztah mezi stravou v těhotenství a úrovní exprese histon metyltransferázy G9a.¹⁰¹ Koturbash et al. prokázali, že zvýšená exprese genu pro Ezh2 histon methyltransferázu vede k tvorbě kompaktního heterochromatinu, čímž se sníží dostupnost DNA, a tím také tvorba DNA aduktů.¹⁰²

Strava přijímaná v těhotenství ovlivňuje genovou expresi i nepřímo. V poslední době je často zmiňován výrazný vliv střevního mikrobiomu na celkový zdravotní stav, včetně velmi závažných dopadů, jako je rozvoj nádorových onemocnění^{103,104}, kardiovaskulárních chorob¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, či cukrovky.^{108,109} Koncové produkty mikrobiální fermentace makronutrientů, jako např. acetát, butyrát nebo propionát se dostávají krevním oběhem do celého těla a ovlivňují genovou expresi v různých buňkách.¹¹⁰ Jsou již známy i některé konkrétní epigenetické mechanismy, kterými tyto koncové produkty mění genovou expresi v buňkách hostitele. Butyrát například inhibuje histon deacetylázy, čímž ovlivňuje expresi mnoha genů.^{111,112} Strava matky v těhotenství ovlivňuje její střevní mikrobiom¹¹³⁻¹¹⁵, tyto změny se přenáší na potomky¹¹⁶⁻¹¹⁸, a působí na jejich celkový zdravotní stav^{93,119-125}, včetně stavu psychického.¹²⁶

Dalším důležitým prostředníkem mezi mateřskou stravou a úrovní genové exprese potomka je placenta. Její tvorba a funkce je výrazně ovlivněna stravou přijímanou těhotnou ženou¹²⁷⁻¹²⁹, což následně působí na kvalitu i kvantitu živin, které plod přijme^{130,131}, a tím i aktivitu genů v plodu.¹³² Tyto změny v genové expresi mohou být trvalé a v souladu s hypotézou fetálního programování přetrvávat až do dospělosti.¹³³ Byla například ukázána souvislost mezi podvýživou matky a sníženou aktivitou enzymu 11- β -hydroxysteroid dehydrogenázy 2 v placentě, což vede ke zvýšenému přenosu glukokortikoidů přes placentu k plodu. To má za následek zvýšenou produkci glukokortikoidů u potomků, která je spojena s metabolickými, kognitivními a imunitními chorobami.¹³⁴

2.6 Epigenom a expozice perzistentním organickým polutantům

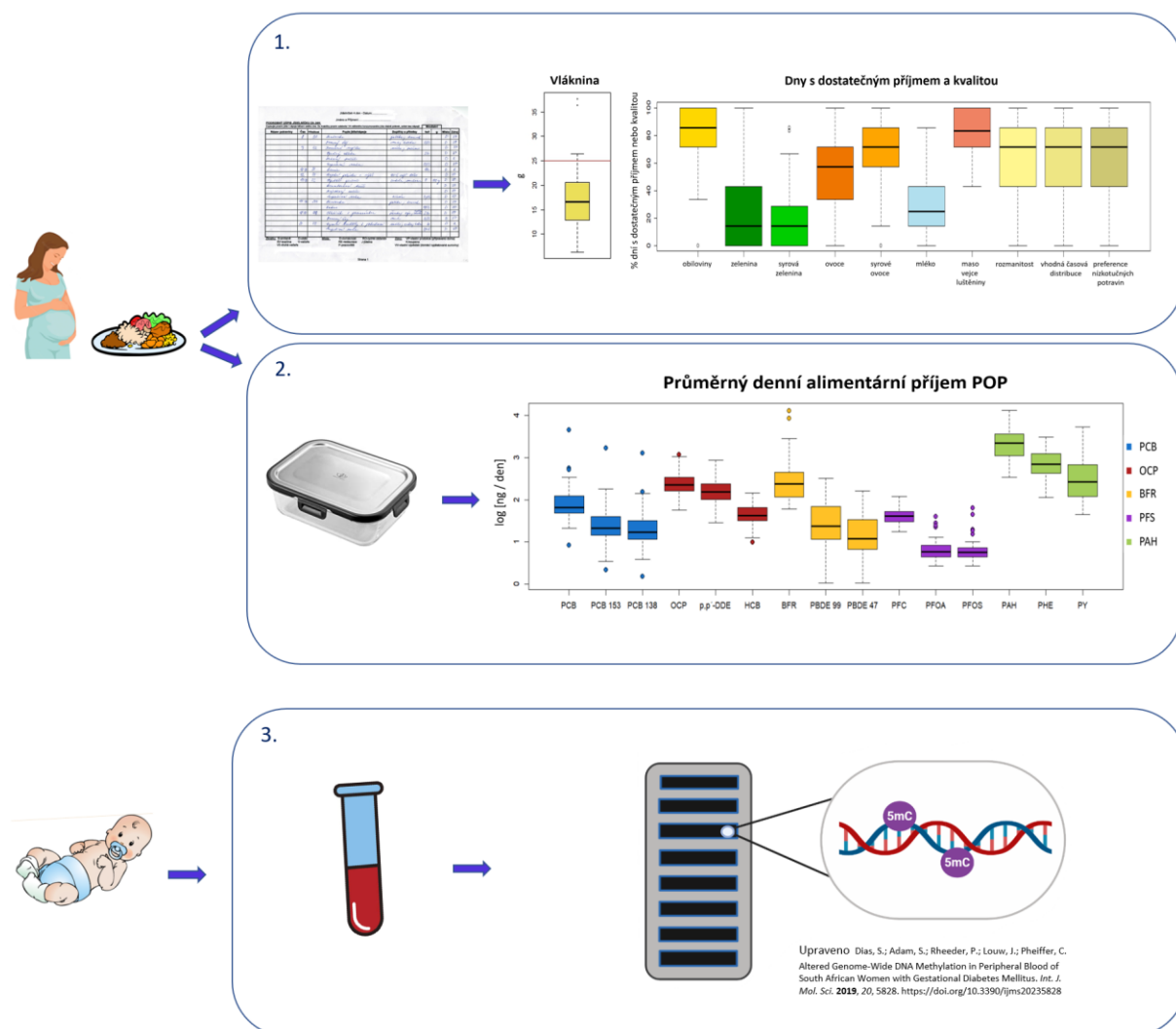
Raná expozice perzistentním organickým polutantům může mít celoživotní negativní dopad na epigenom nejen samotného exponovaného jedince¹³⁵, ale i na několik dalších generací potomků.¹³⁶ Tyto změny mohou mít za následek mnoho dlouhodobých nepříznivých jevů snižujících kvalitu a délku života jedince a také jeho schopnost reprodukce.^{137,138}

V případě expozice během těhotenství mohou být epigenetické změny u potomků, stejně jako v případě mateřské stravy, zprostředkovány i nepřímo přes epigenetické změny v buňkách placenty^{139,140} či změnami ve složení mikrobiomu.¹⁴¹

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že strava matky v těhotenství je významným faktorem ovlivňujícím různými mechanismy epigenetický stav potomků. Na základě těchto poznatků jsem se rozhodla blíže analyzovat případný vztah jednoho z těchto mechanismů, a to metylaci cytosinu v DNA, a mateřské stravy v souboru matek a novorozenců ze dvou oblastí České republiky.

3 METODIKA

V období dva týdny před očekávaným termínem porodu zaznamenávaly těhotné ženy do připravených formulářů po dobu sedmi dnů veškerou přijatou stravou a zkonsumované nápoje a současně odkládaly čtvrtinu tuhé stravy do krabiček. Ze záznamů stravy pak byla získána data o její kvantitě a kvalitě a ve vzorcích byly stanoveny koncentrace perzistentních organických polutantů. Během porodu byly ženám odebrány vzorky pupečnickové krve a v lymfocytech v nich obsažených byla provedena celogenomová analýza metylomu. (Obrázek 6)



Obr. 6: Grafický design studie: 1. Z podrobných záznamů stravy byla získána data o kvantitě a kvalitě stravy těhotných žen, 2. ve vzorcích stravy byly stanoveny koncentrace perzistentních organických polutantů, 3. v lymfocytech z pupečnickové krvi byla provedena celogenomová analýza metylomu.

3.1 Účastníci

Účastníky studie bylo 49 matek a jejich novorozenců žijících ve dvou krajích České republiky. Průmyslový region Karviná se nachází na severní Moravě (48 % účastníků) a převážně zemědělský region České Budějovice leží v jižních Čechách (52 % účastníků). Nábor žen do studie byl prováděn v předporodním kurzu v Karviné a při těhotenských lékařských prohlídkách v nemocnici v Českých Budějovicích. Účast ve výzkumu byla dobrovolná. Ženy podepsaly informovaný souhlas schválený etickými komisemi Ostravské univerzity (OU-87633/90-2018, 30. listopadu 2018), nemocnice České Budějovice (101/19, 4. ledna 2019) a nemocnice Karviná-Ráj (16 827, 25. října 2018). Studie probíhala v letech 2019 a 2020. Do studie byly zařazeny pouze ženy, které uvedly, že nekouří.

3.2 Design studie

3.2.1 Strava těhotných žen

Těhotné ženy zaznamenávaly do poskytnutých formulářů v období dvou týdnů před předpokládaným termínem porodu po dobu sedmi po sobě jdoucích dnů veškerou zkonsumovanou stravu a nápoje (obrázek 7).

Jideňník 4. den - Datum:

Jméno a Příjmení:

PODROBNÝ ZÁPIS JIDELNÍČKY ZA 24H
 Zapsujte prosím jídla i nápoje během celého dne. Do krabičky prosím odeberte 1/4 veškerého konzumovaného jídla včetně polívek, avšak bez nápojů.

| Název potraviny | Čas | Příležitost | Popis jídla/nápoje | Doplňky a přísady | Množství | | Místo | Zdroj |
|-----------------|-------|-------------|------------------------|-------------------------|----------|------|-------|-------|
| | | | | | ks/l | g | | |
| | 8 | 31 | Zenitka | zelený sýr | | | D | VP |
| | | | bramborový česnekový | mléko, sádlo | 0,2L | | D | VP |
| | 9 | 52 | Grochová polévka | mléko, sádlo | | | D | VP |
| | | | bramborový česnekový | | 20g | | D | VP |
| | | | bramborový sádlo | | | | D | K |
| | | | bramborový sádlo | | 0,2L | | D | VP |
| | 10:30 | IV | Brambor | | 10g | | D | K |
| | 12 | 01 | Řepka polévka s vejcem | 100% vejce, sádlo | | | D | VP |
| | 13:30 | 02 | Řepka polévka | vejce, sádlo | 1 | 100g | D | VP |
| | | | bramborový sádlo | | | | D | VP |
| | | | bramborový sádlo | | | | D | VP |
| | 15:30 | IV | Zenitka | zelený sýr | | | D | VP |
| | | | bramborový sádlo | | 10g | | D | VP |
| | 18:00 | IV | Čekoládka s pomerančem | bramborový sádlo, vejce | 20g | | D | VP |
| | | | bramborový sádlo | | 0,2L | | D | VP |
| | 20 | V2 | čokoládka s pomerančem | mléko, sádlo, vejce | 20 | | D | K |
| | | | bramborový sádlo | | 0,4L | | D | VP |

Zkratky: S-snídaně O-oběd M-místo D-domácnost RO-rychlé občerstvení Z-zdroj VP-vlastní produkce (připraveno doma)
 SV-veškerá SV-veškerá V-večeře RE-restaurace J-jídla K-koupeno
 V2-druhá večeře P-pracoviště VV-vlastní výtěpek (domácí vypeřované suroviny)

Strana 1

Obr. 7: Formulář s podrobným záznamem stravy v průběhu jednoho dne

Současně odkládaly jednu čtvrtinu každé porce tuhé stravy do plastové krabičky (vždy strava z jednoho dne do jedné krabičky), která byla následně uložena v mrazáku. Vzorky stravy byly později převezeny na Vysokou školu chemicko-technologickou (VŠCHT) v Praze, kde byly zhomogenizovány, homogenáty spojeny a dále zpracovávány jako jeden směsný vzorek. V 317 takto získaných vzorcích

byla měřena koncentrace 67 látek patřících do pěti skupin perzistentních organických polutantů (POP): polychlorované bifenyly (PCB - 8 látek), organochlorové pesticidy (OCP - 10 látek), bromované retardéry hoření (BFR - 11 látek), perfluorované alkylované látky (PFAS - 15 látek) a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH - 23 látek) – viz Tabulka 1.

Tab. 1: Látky patřící do pěti skupin perzistentních organických polutantů (POP) měřené ve vzorcích stravy

| | | | |
|--|-----------------|-------------------------------------|----------------|
| Polychlorované bifenyly PCB | | | |
| 2,4,4'-Trichlorobifenyl | PCB 28 | 2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobifenyl | PCB 138 |
| 2,2',5,5'-Tetrachlorobifenyl | PCB 52 | 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobifenyl | PCB 153 |
| 2,2',4,5,5'-Pentachlorobifenyl | PCB 101 | 2,2',3,3',4,4',5-Heptachlorobifenyl | PCB 170 |
| 2,3',4,4',5-Pentachlorobifenyl | PCB 118 | 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobifenyl | PCB 180 |
| Organochlorové pesticidy OCP | | | |
| p,p'- Dichlorodifenylchloroetylen | p,p'-DDE | Hexachlorobenzen | HCB |
| o,p'- Dichlorodifenylchloroetylen | o,p'-DDE | α-Hexachlorocyklohexan | α-HCH |
| p,p'- Dichlorodifenyltrichloroetan | p,p'-DDT | β-Hexachlorocyklohexan | β-HCH |
| o,p'- Dichlorodifenyltrichloroetan | o,p'-DDT | γ-Hexachlorocyklohexan | γ-HCH |
| p,p'- Dichlorodifenylchloroetan | p,p'-DDD | | |
| o,p'- Dichlorodifenylchloroetan | o,p'-DDD | | |
| Bromované zpomalovače hoření BFR | | | |
| 2,4,4'-tribromodifenylether | PBDE 28 | α-Hexabromocyklohexan | α-HBCD |
| 2,2',4,4'-tetrabromodifenylether | PBDE 47 | β-Hexabromocyklohexan | β-HBCD |
| 2,2',4,4',5-pentabromodifenylether | PBDE 99 | γ-Hexabromocyklohexan | γ-HBCD |
| 2,2',4,4',6-pentabromodifenylether | PBDE 100 | Pentabromofenol | PBP |
| 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenylether | PBDE 153 | | |
| 2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenylether | PBDE 183 | | |
| Dekabromodifenylether | PBDE 209 | | |
| Perfluorované alkylové látky PFAS | | | |
| Perfluoro-n-butanová kyselina | PFBA | Perfluoro-1-butansulfonát | PFBS |
| Perfluoro-n-pentanová kyselina | PFPeA | Perfluoro-1-hexansulfonát | PFHxS |
| Perfluoro-n-hexanová kyselina | PFHxA | Perfluoro-1-oktansulfonát | PFOS |
| Perfluoro-n-heptanová kyselina | PFHpA | Perfluoro-1-dekansulfonát | PFDS |
| Perfluoro-n-octanová kyselina | PFOA | | |
| Perfluoro-n-nonanová kyselina | PFNA | | |
| Perfluoro-n-dekanová kyselina | PFDA | | |
| Perfluoro-n-undekanová kyselina | PFUdA | | |
| Perfluoro-n-dodekanová kyselina | PFDoA | | |
| Perfluoro-n-tridekanová kyselina | PFTTrDA | | |
| Perfluoro-n-tetradekanová kyselina | PFTeDA | | |

| Polycyklické aromatické uhlovodíky PAH | | | |
|---|--------------|-----------------------|--------------|
| 5-Methylchrysen | 5MC | Cyklopenta[c,d]pyren | CPP |
| Acenaphthen | ACE | Dibenz[a,h]anthracen | DBahA |
| Acenaphthylen | ACY | Dibenzo[a,e]pyren | DBaeP |
| Anthracen | AN | Dibenzo[a,h]pyren | DBahP |
| Benz[a]anthracen | BaA | Dibenzo[a,i]pyren | DBaiP |
| Benzo[a]pyren | BaP | Dibenzo[a,l]pyren | DBalP |
| Benzo[b]fluoranthen | BbFA | Fluoranthen | FLT |
| Benzo[c]fluoren | BcFl | Fluoren | FLN |
| Benzo[g,h,i]perylene | BghiP | Indeno[1,2,3-cd]pyren | IP |
| Benzo[j]fluoranthen | BjFA | Fenanthren | PHE |
| Benzo[k]fluoranthen | BkFA | Pyren | PY |
| Chrysen | CHR | | |

Socioekonomické údaje a údaje o výšce, hmotnosti před těhotenstvím, hmotnosti před porodem a obvodu pasu před těhotenstvím byly získány při osobních rozhovorech s ženami během jejich pobytu v porodnicích. Zdravotní údaje o průběhu těhotenství, porodu a zdravotním stavu novorozenců byly získány se souhlasem žen z jejich zdravotních karet v porodnicích.

3.2.2 Metylace genomu novorozenců

Pro účely analýzy metylace DNA novorozenců byly během porodu žen zaznamenávajících stravu odebrány vzorky pupečnickové krve.

3.3 Použité metody

3.3.1 Hodnocení kvality stravy

K získání údajů o kvalitě stravy matek byla použita databáze „Kalorické tabulky“ (kaloricketabulky.cz) a dotazník „Kontrolní praktický test kvality výživy těhotných a kojících žen“ (KPT).^{142,143} S využitím těchto zdrojů bylo získáno 16 ukazatelů charakterizujících jídelníček každého dne.

Databáze „kaloricketabulky.cz“, která obsahuje informace o složení potravin a jejich energetické hodnotě (obrázek 8), byla použita k získání údajů o příjmu energie, bílkovin, sacharidů, tuků a vlákniny. Pokud konkrétní potravina v databázi nebyla, byla nahrazena vhodným ekvivalentem.



Obr. 8: Databáze Kalorické tabulky

Dotazník KPT hodnotí kvalitu stravy v průběhu 24 hodin a skládá se z deseti otázek s možností odpovědi „ano/ne“ (obr. 9). Výsledný počet kladných odpovědi (= bodový zisk) pak udává celkovou kvalitu stravy za daný den.

Kontrolní praktický test hodnocení kvality výživy těhotných a kojících žen

Záznam výživové spotřeby za posledních 24 hodin

1. *Byly ve stravě nejméně 3 jednotkové porce obilnin, těstovin, pečiva, rýže?*
(1 porce = 60 g chleba, 125 g vařených těstovin)
2. *Byly ve stravě nejméně 3 jednotkové porce zeleniny?*
(1 porce = cca 100 g kus zeleniny, 125 g brambor, miska salátu)
3. *Byly nejméně 2 porce zeleniny syrové?*
4. *Byly ve stravě nejméně 2 jednotkové porce ovoce?*
(1 porce = cca 100 g kus ovoce, miska drobných plodů)
5. *Byla nejméně 1 porce ovoce syrová?*
6. *Byly v každé potravinové skupině konzumovány rozmanité pokrmy?*
7. *Měly svačiny a jídla konzumovaná mimo dobu hlavních jídel výživovou hodnotu?*
8. *Byly konzumovány nejméně 3 jednotkové porce mléka a mléčných výrobků?*
(1 porce = 1 sklenice mléka, cca 200 ml jogurtu, 55 g sýru)
9. *Byla konzumována nejméně 1 porce ze skupiny masa, ryb, drůbeže, luštěnin?*
(1 porce = 80 g masa, 2 vařené bílky, 1 miska sójových bobů)
10. *Byly vybrány převážně netučné, libové nebo nízkotučné alternativy pokrmů?*

VYHODNOCENÍ: Za každou odpověď ANO se počítá 1 bod

10 bodů – Výživa je výborná, zcela v pořádku! Bude velmi vhodné stravovat se podle stejných zásad jako doposud.

9–7 bodů – V kvalitě stravy jsou ještě rezervy, ale nebude příliš obtížné udělat pozitivní změny k tomu, aby výživa byla zcela bez chyb.

6–4 body – Výživa není z hlediska kvality dostatečná. Je zapotřebí větších změn, aby ji bylo možné hodnotit alespoň jako dostatečnou.

3–0 bodů – kvalita výživy je zcela nedostatečná, je nutná okamžitá a razantní náprava.

Obr. 9: Kontrolní praktický test kvality výživy těhotných a kojících žen (KPT)

Otázky se týkají příjmu různých skupin potravin, časového rozložení příjmu potravy, její rozmanitostí a preferencí nízkotučných potravin pro každý den. Tabulka 2 ukazuje mezní body pro dotazované faktory.

Tab. 2: Mezní hodnoty faktorů stravy v dotazníku KPT

| Faktor stravy | Mezní hodnota |
|----------------------------------|---|
| Cereálie | 3 porce/den (1 porce = 60 g chleba, 125 g vařených těstovin) |
| Zelenina | 300 g/den |
| Syrová zelenina | 200 g/den |
| Ovoce | 200 g/den |
| Syrové ovoce | 100 g/den |
| Mléko, mléčné výrobky | 3 porce/den (1 porce = 1 sklenice mléka, cca 200 ml jogurtu, 55 g sýru) |
| Maso, vejce, luštěniny | 1 porce/den (1 porce = 80 g masa, 2 vařené bílky, 1 miska luštěnin) |
| Rozmanitost | 3 různé potraviny ve 3 různých skupinách potravin/den |
| Časové rozložení | 5 nutričně hodnotných jídel/den |
| Preference nízkotučných potravin | převaha nízkotučných potravin nad potravinami s vysokým obsahem tuku v období jednoho dne |

U každé ženy byly vypočteny průměrné hodnoty faktorů stravy získané z databáze „kaloricketabulky.cz“ ze všech dnů, kdy byla kvalita stravy sledována. Hodnoty faktorů stravy získané z KPT byly vypočteny jako procento dnů, ve kterých žena dosáhla nebo překročila mezní hodnotu. Dále byla pro každou ženu určena celková kvalita stravy jako její průměrný bodový zisk v KPT ze všech dnů, kdy byla kvalita sledována.

3.3.2 Analýza persistentních organických polutantů a výpočet jejich alimentárního příjmu

Při analýze POP byly nejprve stanoveny jejich koncentrace ve vzorcích stravy a následně vypočten jejich alimentární příjem.

3.3.2.1 Analýza koncentrací POP v celodenních vzorcích stravy

Analýza koncentrací persistentních organických polutantů ve vzorcích stravy byla provedena pracovníky VŠCHT, proto je zde popsána pouze stručně.¹⁴⁴

PCB, OCP, PBDE a PAH byly analyzovány pomocí plynové chromatografie (GC). Nejprve proběhla extrakce látek do ethylacetátu s podporou anorganických solí. Pro fázi čištění byly použity ručně vyrobené kolony oxidu křemičitého. Pro separaci a identifikaci PCB a OCP byla použita GC spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií provozovanou v ionizaci nárazem elektronů (GC-EI-MS/MS) na kapilární koloně DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). PAH byly analyzovány pomocí GC-EI-MS/MS na kapilární koloně Rxi-PAH (40 m × 0,18 mm × 0,07 μm). PBDE byly hodnoceny pomocí GC spojené s hmotnostní spektrometrií v negativní chemické ionizaci (GC-NCI-MS), se separací na kapilární koloně DB-XLB (15 m × 0,25 mm × 0,10 μm). Meze stanovitelnosti (LOQ) pro výše uvedené sloučeniny se pohybovaly mezi 0,003-0,05 ng/g ww.

PFAS, PBP a izomery HBCD byly izolovány acetonitrilem na nosiči s anorganickými solemi. Pro fázi čištění byla použita disperzní extrakce na pevné fázi (dSPE) pomocí sorbentu zSEP+. PFAS byly analyzovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií, provozovanou v elektrosprejové ionizaci v negativním módu (UHPLC-ESI-MS/MS). PBP a HBCD byly separovány na reverzní fázi za použití kolony BEH C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 μm). Meze stanovitelnosti PFAS, PBP a HBCD byly v rozmezí 0,01-0,1 ng/g ww.

3.3.2.2 Výpočet průměrného alimentárního příjmu POP

Alimentární příjem POP v jednotlivých dnech byl vypočten vynásobením jejich koncentrací ve vzorcích stravy a hmotnosti přijaté tuhé stravy v daný den. Následně byl pro každou ženu vypočítán ze všech jejích analyzovaných dní průměrný denní příjem POP.

3.3.3 Cel genomová analýza metylace DNA

Během porodu žen zaznamenávajících stravu byly odebrány vzorky pupečnickové krve. Analýza metylomu novorozenců byla provedena v lymfocytech izolovaných z těchto vzorků.

3.3.3.1 Izolace DNA

DNA byla ze vzorků krve získána Millerovou metodou modifikovanou pro izolaci z periferní krve, pupečnickové krve a kostní dřeně.¹⁴⁵ Lymfocyty byly separovány centrifugací po hemolýze a jejich DNA následně uvolněna po lýze jaderných membrán. Proteiny byly enzymaticky fragmentovány a odstraněny odsolením. DNA byla vysrážena etanolem a následně rozpuštěna ve vodě.

Koncentrace a čistota izolované DNA byly změřeny spektrofotometrem NanoDrop 1000. Izolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C.

3.3.3.2 *Bisulfidická konverze DNA*

Při bisulfidické konverzi DNA byly nemetylované cytosiny přeměněny na uracily, zatímco metylované cytosiny zůstaly nezměněné.

Metoda je založena na skutečnosti, že cytosin je reakcí s hydrogensulfidickým sodným sulfonován a následně deaminován. Po desulfonaci je výsledkem této reakce uracil. Metylová skupina v 5-metylcytosinu sulfonaci, a tím i následné deaminaci, brání. Výsledkem bisulfidické konverze je tedy DNA, ve které zůstaly metylované cytosiny nezměněné, zatímco nemetylované cytosiny byly přeměněny na uracily.

S využitím kitu „EZ DNA Methylation Kit“ firmy Zymo Research bylo konvertováno 1200 ng DNA izolované z každého vzorku pupečnickové krve. Koncentrace konvertované DNA byla následně změřena fluorometrem s využitím kitu „Qubit ssDNA Assay Kit“ firmy Thermo Fisher Scientific. Součástí tohoto kitu jsou čipy, z nichž každý umožňuje analýzu osmi vzorků. Pro každý vzorek je na čipu připravena oblast obsahující sondy, které hybridizují s 863 904 specifickými CpG místy lidského genomu.

Následující kroky popsané v odstavcích 3.3.3.3 až 3.3.3.8 byly provedeny s využitím kitu „Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit“ firmy Illumina.

3.3.3.3 *Celogenomová amplifikace DNA a fragmentace DNA*

Vzorky konvertované DNA (250 ng) byly nejprve denaturovány pomocí hydroxidu sodného a následně amplifikovány při teplotě 37°C.

Během reakce byly uracily nahrazeny tyminy. DNA byla v tomto kroku amplifikována až tisíckrát.

DNA byla dále enzymaticky fragmentována na úseky dlouhé 300-600 bp, což je délka vhodná pro hybridizaci se sondami navázanými na čipech. K fragmentaci byla použita endpoint metoda, která zabraňuje nadměrné fragmentaci DNA.

Po fragmentaci byly vzorky přečištěny vysrážením isopropanolem a následným rozpuštěním v hybridizačním pufu.

3.3.3.4 Hybridizace DNA na čipy Infinium

DNA byla nanášena na čipy Infinium EPIC firmy Illumina, kde hybridizovala se sondami. Z analyzovaných CpG míst se 54 % nachází v promotorech, 30 % v genech a 16 % v intergenových oblastech.¹⁴⁶

Na čipech jsou sondy pro jednotlivá CpG místa umístěné ve dvou různých systémech – Infinium I (142 462 sond) a Infinium II (721 642 sond). Sondy jsou v obou systémech svými 5' konci navázané na kuličku a 3' konce mají volné. Každá sonda má 23 bází dlouhou adresní sekvenci umožňující identifikaci jejího fyzického umístění na čipu a 50 bází dlouhou hybridizační sekvenci, která je komplementární ke specifickým oblastem genomové DNA.

Hlavní rozdíl mezi oběma systémy spočívá v tom, že v systému Infinium I jsou pro každé CpG místo dvě varianty sond, kdežto v systému Infinium II pouze jedna varianta. Nevýhodou systému Infinium I je fakt, že pro měření metylace jednoho CpG místa je potřeba na čipu dvakrát větší prostor oproti systému Infinium II. Výhodou naopak je, že může stanovit metylaci i v oblastech s vysokou hustotou CpG míst (CpG ostrůvky), v nichž je umístěno 19 % všech CpG míst analyzovaných na čipu. Na čipech se proto používá kombinace obou systémů. Podíl sond systému Infinium II je vysoký (83,5 %), protože je analyzováno mnoho CpG míst nacházejících se v distálních regulačních elementech. To jsou většinou oblasti s řídkým zastoupením CpG míst, která tedy nevyžadují analýzu systémem Infinium I. Pro každý tento regulační element je na čipu většinou pouze jedna sonda.

a) Systém Infinium I

Tento systém má pro každé analyzované CpG místo na čipu navázané dvě samostatné kuličky, z nichž každá nese buď jenom sondy pro metylovanou variantu daného CpG místa, nebo sondy pro nemetylovanou variantu. Oba typy sond se od sebe liší pouze posledním nukleotidem na 3' koncích, kterými jsou buď guanin (komplementární k metylovanému cytosinu) nebo adenin (komplementární k tyminu, který v procesu celogenomové amplifikace DNA vzorku nahradil uracil vzniklý konverzí nemetylovaného cytosinu).

DNA z nanášeného vzorku se naváže na obě varianty sondy. Poslední nukleotid na 3' konci sondy však hybridizuje buď pouze s metylovaným cytosinem nebo pouze s tyminem. Pokud se na sondu naváže DNA vzorku, která není v tomto místě k sondě komplementární, zůstává její 3' konec nehybridizovaný.

b) Systém Infinium II

Systém Infinium II má pro každé analyzované CpG místo na čipu navázanou jednu kuličku, která nese kopie jedné stejné sondy komplementární k danému CpG místu. Všechny sondy na všech

kuličkách systému Infinium II mají na svém volném 3'konci cytosin, který hybridizuje s guaninem daného CpG místa v DNA vzorku.

3.3.3.5 Metylačně specifické prodloužení sond

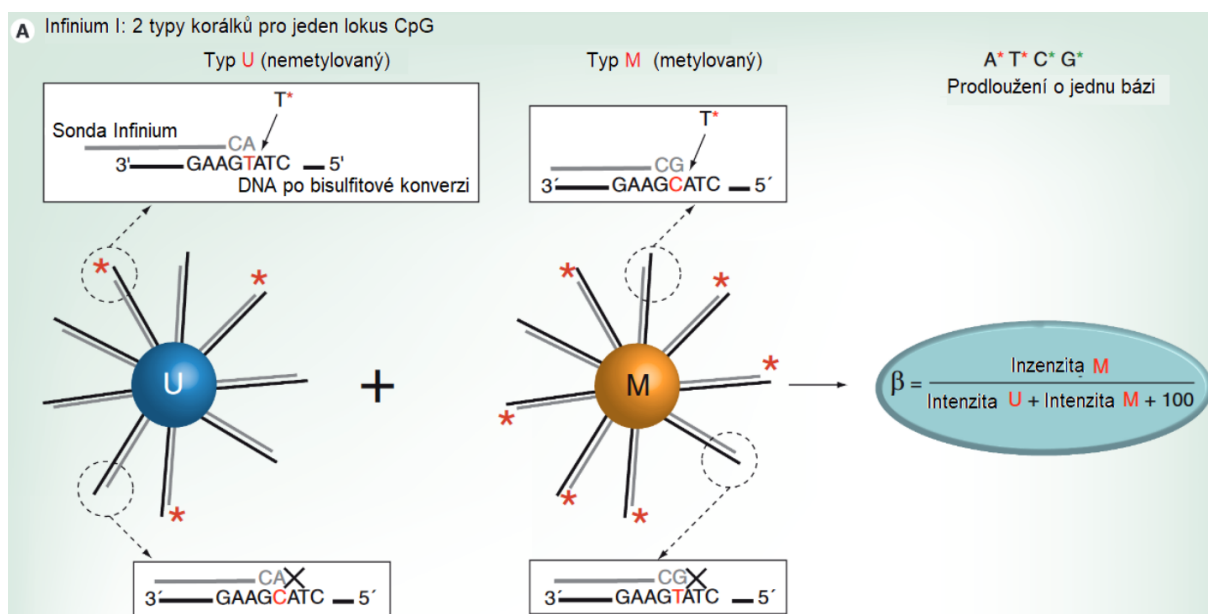
Prodloužení sond, založené na metodě single-base extension, umožňuje genotypování C/T místa, a tím rozlišení metylovaného a nemetylovaného cytosinu v původním vzorku DNA (viz kapitoly 3.3.3.2 a 3.3.3.3).

Po hybridizaci sond s konvertovanou DNA byly na čip naneseny specificky modifikované volné dideoxynukleotidy. Tyto ddNTP prodloužily sondy právě o jednu bázi. Modifikace ddATP a ddTTP spočívala v tom, že na ně byl navázán dinitrofenyl, zatímco na ddCTP a ddGTP byl navázán biotin.

Po prodloužení sond byla odmyta konvertovaná DNA i nenavázané ddNTP a na čipu tedy zůstaly pouze kuličky se sondami označenými biotinem nebo dinitrofenylem.

a) Systém Infinium I

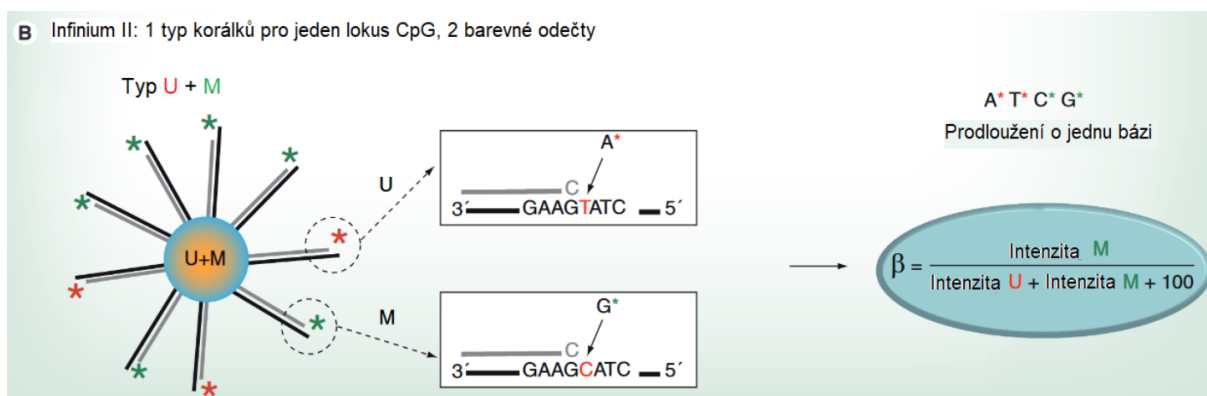
Metylačně specifické prodloužení sond systému Infinium I je založené na skutečnosti, že DNA polymeráza připojí k sondě další nukleotid pouze v případě, že je její 3' konec komplementární k hybridizované DNA vzorku. K sondám, jejichž 3' konec ke vzorku komplementární není, tedy není připojen značený ddNTP a v následujícím kroku nejsou označeny fluorescenčním barvivem (obrázek 10).



Obr. 10: Sondy systému Infinium I ¹⁴⁷

b) Systém Infinium II

V systému Infinium II mají všechny sondy 3' konce komplementární k DNA vzorku a jsou tedy všechny prodlouženy. Rozdíl je v tom, že k sondám hybridizovaným k DNA s metylovaným CpG místem je připojen ddGTP (s navázaným biotinem), zatímco k sondám hybridizujícím s DNA s nemetylovaným místem je připojen ddATP (s navázaným dinitrofenylem) (obrázek 11).



Obr. 11: Sondy systému Infinium II ¹⁴⁷

3.3.3.6 Barvení sond a zesílení fluorescenčního signálu

Na čipy byl nanesen streptavidin, který se váže na biotin, a anti-DNP protilátka, která se váže na dinitrofenyl, přičemž molekuly streptavidinu byly označeny zeleným fluorescenčním barvivem a molekuly anti-DNP protilátky červeným fluorescenčním barvivem. Po vazbě těchto molekul na biotinylované a dinitrofenylované sondy byly tedy sondy fluorescenčně označeny.

Posléze byly na čipy opakovaně nanášeny biotinem a DNP-značené protilátky a fluorescenční barviva, čímž byl fluorescenční signál zesílen.

3.3.3.7 Skenování čipů

Skenování čipů probíhalo ve skeneru iScan (Illumina). Před zahájením samotného skenování byly do přístroje staženy ze stránek firmy Illumina soubory Dmap, které umožňují ke každé kuličce umístěné na čipu přiřadit konkrétní CpG místo. Tyto soubory jsou pro každý čip specifické.

Během samotného skenování byly nejprve laserem o dvou vlnových délkách excitovány fluorofory v červeném i zeleném fluorescenčním barvivu. Následně byly pro každou kuličku zvlášť měřeny intenzity fluorescence.

a) Systém Infinium I

Čím více sond navázaných na kuličky hybridizovalo s tou variantou (metylovanou nebo nemetylovanou) daného CpG místa, která umožnila jejich prodloužení o ddNTP, tím byl fluorescenční signál kuličky silnější. Převažovala-li tedy v DNA vzorku metylovaná varianta daného CpG místa nad variantou nemetylovanou, byl signál z kuličky nesoucí sondy pro metylovanou variantu silnější než signál z kuličky nesoucí sondy pro nemetylovanou variantu.

b) Systém Infinium II

Čím více bylo v DNA vzorku metylovaných variant daného CpG místo, tím více sond navázaných na příslušné kuličky hybridizovalo s touto metylovanou variantou místa a tím intenzivnější byl zelený fluorescenční signál kuličky. Stejně tak čím více bylo v DNA vzorku nemetylovaných variant daného CpG místa, tím intenzivnější byl červený signál příslušné kuličky. U homozygotů tedy převažovala buď zelená nebo červená barva, zatímco u heterozygotů byly intenzity fluorescence obou barev podobné a výsledná barva byla tedy žlutá.

3.3.3.8 Zpracování surových dat získaných skenováním čipů

I. Příprava statistického programu R

Nejprve byly do pracovního prostředí statistického programu R uloženy soubory formátu IDAT obsahující hodnoty intenzit fluorescenčního signálu, které byly vytvořeny skenerem iScan.

Do statistického programu R byly vloženy tyto soubory:

1. minfi: balík funkcí projektu Bioconductor, který umožňuje zpracování dat z čipů v prostředí statistického programu R

2. IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b4.hg19 a IlluminaHumanMethylationEPICmanifest: soubory projektu Bioconductor přiřazující k jednotlivým CpG místům informace například o případném výskytu jednokludového polymorfismu (SNP) nebo o jejich příslušnosti ke konkrétním CpG ostrůvkům, genům a regulačním oblastem. V těchto souboru je uvedena také sekvence sondy, která na čipu s tímto CpG místem hybridizuje.

Vzhledem k CpG ostrůvkům jsou jednotlivá CpG místa rozdělena do tří skupin: CpG uvnitř ostrůvku, CpG v oblastech označovaných jako břehy ostrůvků (úseky do vzdálenosti 2000 bp od ostrůvku) a CpG nemající žádný vztah k ostrůvkům.

Vzhledem ke genům jsou jednotlivá CpG místa rozdělena do pěti skupin: uvnitř promotoru (oblast do vzdálenosti 1500 bp před místem začátku transkripce), v oblasti 5'-UTR, v kódující oblasti genu, v oblasti 3'-UTR, v intergenní oblasti.

3. samplesheet: soubor s informacemi o jednotlivých vzorcích včetně čísel čipů a konkrétních pozicích, na kterých jsou jednotlivé vzorky umístěné

4. xReactiveProbes: seznam sond, které hybridizují s více různými oblastmi genomu

II. Vytvoření souboru dat

S využitím funkcí `read.metharray.sheet` a `read.metharray.exp` balíku `minfi` byl vytvořen soubor obsahující hodnoty intenzit fluorescenčního signálu a další informace o jednotlivých vzorcích. Tento soubor byl vytvořen spojením informací z IDAT souborů a ze souboru `samplesheet`.

III. Kontrola kvality naměřených dat

Pomocí funkce `detectionP` balíku `minfi` byl pro každé CpG místo porovnán souhrnný fluorescenční signál ze všech jeho sond (tedy jak ze sond pro metylovanou variantu, tak ze sond pro nemetylovanou variantu) s fluorescenčním signálem pozadí (signál pozadí byl odhadnut z kontrolních negativních sond) a vypočtena p-hodnota nulové hypotézy, že jsou oba fluorescenční signály stejné.

Čím nižší je p-hodnota, tím je fluorescenční signál daného CpG místa spolehlivější. Průměrná p-hodnota pro každý vzorek umožňuje změřit obecnou kvalitu vzorků z hlediska celkové spolehlivosti signálu. Vzorky, které mají mnoho neúspěšných sond, mají vysoké průměrné p-hodnoty.

IV. Normalizace dat

Data byla normalizována metodou kvantilové normalizace, která vyrovnala rozdíly mezi hodnotami intenzit fluorescenčního signálu na jednotlivých čipech. Tato normalizace je nezbytná, protože ačkoli jsou všechny čipy skenovány stejným skenerem, není distribuce intenzit signálu mezi čipy stejná a srovnatelnosti intenzit mezi čipy může být dosaženo pouze mezi normalizovanými čipy. Normalizace byla provedena pomocí funkce `preprocessQuantile`, která je součástí balíku `Minfi` a je vhodná pro vzájemně si podobné vzorky.

V. Filtrace dat

Z dat byly odstraněny tyto sondy:

- a) sondy, u nichž nebyl fluorescenční signál dostatečně silný oproti signálu pozadí. Konkrétně jde o sondy, u kterých byla p-hodnota rozdílu signálu mezi sondou a pozadím větší než 0,01.

- b) sondy, které hybridizují s CpG místy nacházejícími se na pohlavních chromozomech. Tyto sondy byly odstraněny proto, že v souboru byly vzorky jedinců obojího pohlaví.
- c) sondy, které hybridizují s CpG místy, ve kterých byl zjištěn jednonukleotidový polymorfismus (SNP). Tyto sondy byly vyloučeny pomocí funkce `dropLociWithSnps` z balíku `minfi`.
- d) sondy, které hybridizují s více různými oblastmi genomu.

VI. Výpočet hodnot β

Po normalizaci a filtraci dat byly pomocí funkce `getBeta` balíku `minfi` vypočítány pro každé CpG místo hodnoty β , které určují míru metylace tohoto CpG místa.

$\beta = \text{intenzita metylovaného signálu} / (\text{intenzita nemetylovaného signálu} + \text{intenzita metylovaného signálu} + 100)$

Hodnota $\beta = 0$ značí zcela nemetylované CpG místo, zatímco blíží-li se β hodnotě 1, CpG místo je metylované na obou alelách většiny analyzovaných buněk, přičemž tyto hraniční hodnoty ukazují na homozygotní stav. Při heterozygotním stavu se β pohybuje kolem hodnoty 0,5.

3.3.3.9 Testování diferenciální metylace

Pro každý hodnocený faktor byly vzorky rozděleny do dvou skupin tak, že v jedné skupině byly vzorky s vysokou hodnotou daného faktoru a ve druhé skupině pak vzorky s jeho nízkou hodnotou. Následně byla testována diferenciální metylace mezi těmito dvěma skupinami.

K testování diferenciální metylace byl ve statistickém programu R použit balík `limma`. K tvorbě modelů byla využita funkce `lmFit` tohoto balíku. Diferenciální metylace pak byla vypočítána pomocí funkce `eBayes`, která využívá bayesovskou statistiku založenou na gaussovském modelu.¹⁴⁸

4 VÝSLEDKY

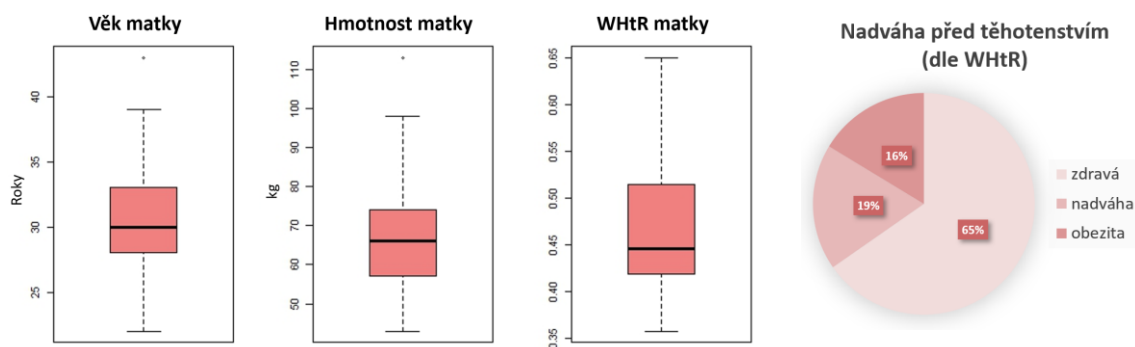
4.1 Účastníci studie

Základní charakteristiky studovaných skupin matek a jejich novorozenců jsou shrnuty v tab. 3.

Tabulka 3: Charakteristika matek a jejich novorozenců

| | N | Průměr ± SD | Medián (Min. – Max.) |
|---|---------|--------------|----------------------|
| Matky | | | |
| Věk (roky) | 49 | 30,8 ± 4,6 | 30 (22 - 43) |
| Délka těhotenství (týdny) | 49 | 39,3 ± 1,1 | 39 (37 - 41) |
| Váha (před těhotenstvím) | 49 | 67,3 ± 14,0 | 66,0 (43 - 113) |
| WHtR (před těhotenstvím) | 49 | 0,46 ± 0,07 | 0,45 (0,36 – 0,65) |
| BMI (před těhotenstvím) | 49 | 23,7 ± 4,6 | 22,2 (17,2 – 36,9) |
| Vzdělání (ZŠ/ SŠ/VŠ) | 0/20/29 | | |
| Doplňky stravy v posledním trimestru (ano/ne) | 27/22 | | |
| Novorozenci | | | |
| Porodní hmotnost (g) | 49 | 3432 ± 449,2 | 3360 (2650 - 4580) |
| Apgar skóre (body) | 49 | 9,8 ± 0,5 | 9,8 (8 – 10) |
| Pohlaví (M/Ž) | 28/21 | | |
| Průměrný časový interval mezi záznamem stravy a odběrem pupečnickové krve (dny) | 49 | 11,2 ± 7,4 | 10 (1 - 29) |

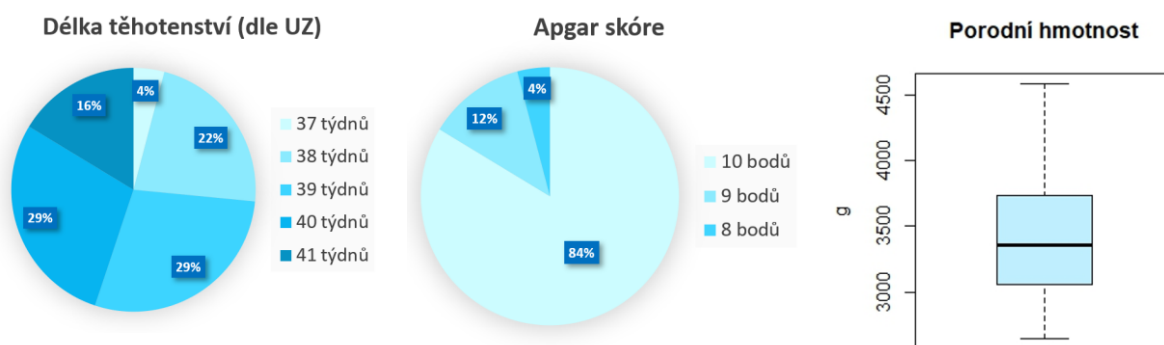
Všechny matky byly evropského původu, jejich průměrný věk byl 31 let (rozmezí = 22 - 43). Žádná žena neuváděla výrazné finanční problémy a 59 % bylo absolventkami vysoké školy. Matky se samy řadily mezi nekuřačky, čtyři z nich (tři z Českých Budějovic, jedna z Karviné) uváděly expozici pasivnímu kouření v době odběru pupečnickové krve. Hladiny kotininu byly pod limitem kvantifikace (LOQ) u 37 žen (76 %); maximální hladina byla 39 ng/mg kreatininu. Padesát pět procent matek (N = 27) užívalo v průběhu posledního trimestru těhotenství doplňky stravy. Průměrná reportovaná hmotnost před těhotenstvím byla 67 kg (medián 66 kg, rozmezí 43 – 113 kg), průměrný BMI před těhotenstvím 24 kg/m² (medián 22 kg/m², rozmezí 17 – 37 kg/m²) a průměrný poměr pasu k výšce před těhotenstvím (WHtR) 0,46 (medián 0,45, rozmezí 0,36 – 0,65). Dle WHtR byla hmotnost před těhotenstvím normální u 65 % matek (N = 32), 19 % matek (N = 9) mělo nadváhu a 16 % matek (N = 8) bylo obézních (obrázek 12).¹⁴⁹



Obr. 12: Věk matek v době porodu a jejich hmotnostní charakteristiky před těhotenstvím

Všechna těhotenství byla jednočetná, 43 % matek byly prvoroďičky a žádné těhotenství nebylo ukončeno předčasným porodem. Většina porodů byla vaginální (71 %).

Všechny děti se narodily mezi 37. a 41. týdnem těhotenství s normální porodní hmotností (průměr 3 432 g; rozmezí 2 650 – 4580 g), 41 novorozenců (83 %) mělo hodnotu Apgar skóre 10 bodů, šest novorozenců 9 bodů a dva novorozenci 8 bodů; 57 procent novorozenců bylo mužského pohlaví. (obrázek 13)



Obr. 13: Porodní charakteristiky

4.2 Kvalita stravy

4.2.1 Množství a nutriční kvalita stravy

Od 49 těhotných žen bylo získáno celkem 317 celodenních záznamů stravy.

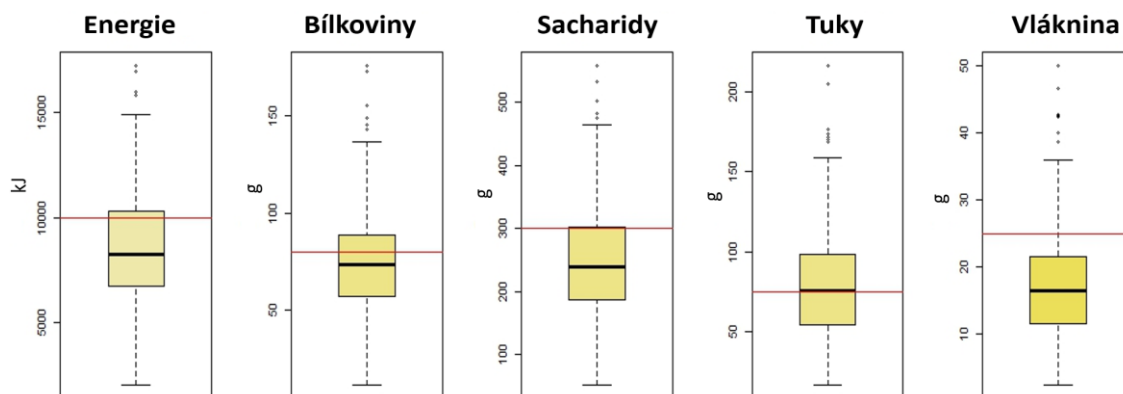
4.2.1.1 Množství a nutriční kvalita stravy v jednotlivých sledovaných dnech

Hodnoty nutričních parametrů získané pro 317 sledovaných dní jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4: Hodnoty faktorů stravy v jednotlivých dnech

| | Průměr ± SD | Medián (Min. – Max.) | Doporučený denní příjem ¹⁵⁰⁻¹⁵³ |
|--|--|--|--|
| Denní příjem | | | |
| Energie (kJ) | 8485 ± 2632 | 8263 (2080 – 17207) | 10000 kJ |
| Bílkoviny (g) | 74,4 ± 25,6 | 73,4 (12,0– 175,9) | 80 g |
| Sacharidy (g) | 246,5 ± 84,3 | 239,4 (52,8 – 558,5) | 300 g |
| Tuky (g) | 78,6 ± 33,4 | 75,68 (16,88 – 216,27) | 75 g |
| Vláknina (g) | 17,3 ± 8,1 | 16,4 (2,4 – 50,1) | 25 g |
| | | | |
| Potravinové skupiny | Procento dní s dostatečným příjmem (%) | Doporučený denní příjem | |
| Obiloviny | 83 | 3 porce | |
| Zelenina | 26 | 300 g | |
| Zelenina syrová | 19 | 200 g | |
| Ovoce | 56 | 200 g | |
| Ovoce syrové | 72 | 100 g | |
| Mléčné výrobky | 29 | 3 porce | |
| Maso, vejce, luštěniny | 79 | 1 porce | |
| | | | |
| Kvalita stravování | Procento dní s dostatečnou kvalitou (%) | Hodnocená kvalita | |
| Rozmanitost | 63 | Alespoň tři různé potraviny v alespoň třech různých výživových skupinách | |
| Časová distribuce příjmu stravy | 67 | Alespoň pět porcí jídla denně | |
| Preference nízkotučných potravin | 64 | Převaha netučných variant potravin nad variantami tučnými | |
| | | | |
| | Průměr ± SD | Medián (Min. – Max.) | |
| Celková denní kvalita stravy (max. 10 bodů) | 5,6 ± 1,9 | 6,0 (0 – 10) | |

Průměrný příjem energie a makroživin v jednotlivých dnech přibližně odpovídal doporučeným směrnicím.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Průměrný denní příjem vlákniny byl však pouze 17,3 g/den (medián 16,4 g/den), přičemž doporučená hodnota je 25 g /den¹⁵¹ (viz obrázek 14).

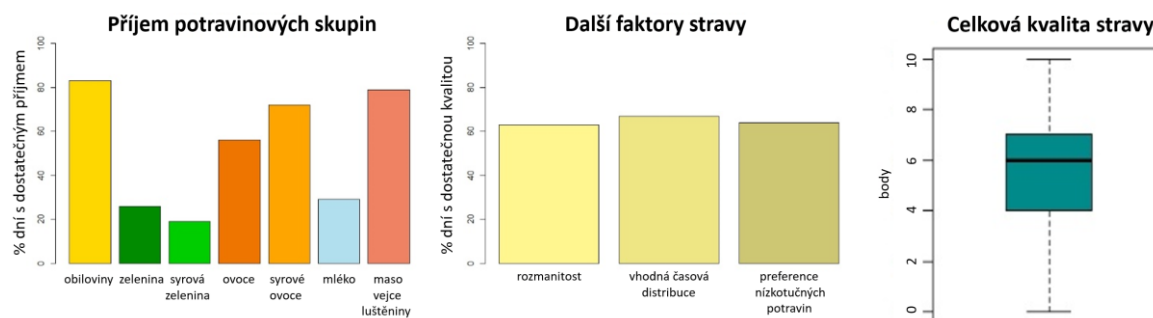


Obr. 14: Příjem energie, makroživin a vlákniny v jednotlivých dnech

Velké nedostatky byly zjištěny v příjmu některých potravinových skupin. Příjem mléčných výrobků byl dostatečný pouze ve 29 % dnů, zeleniny ve 26 % dnů. Výrazný nedostatek byl především v případě syrové zeleniny, jejíž příjem byl dostatečný pouze v 19 % dnů.

Rozmanitost stravy, časové rozložení příjmu potravy a preference nízkotučných potravin byly dostatečné ve dvou třetinách dnů.

Průměrná celková kvalita stravy daná součtem kladných odpovědí na deset otázek ano/ne v dotazníku KPT byla 5,6 bodu (medián 6 bodů, rozmezí 0 – 10 bodů) z maximálně 10 možných bodů (viz obrázek 15).



Obr. 15: Příjem potravinových skupin a kvalita stravy v jednotlivých dnech

4.2.1.2 Množství a nutriční kvalita stravy jednotlivých žen

Průměrné hodnoty faktorů stravy u jednotlivých žen jsou shrnuty v tabulce 5. Hodnota příjmu energie, bílkovin, sacharidů, tuků a vlákniny byla vypočtena jako průměr denního příjmu ze všech sledovaných dní. Dále bylo pro každou ženu vypočteno procento dní, ve kterých měla dostatečný příjem jednotlivých potravinových skupin, a procento dní s dostatečnou

rozmanitostí stravy, s vhodnou časovou distribucí jejího příjmu a s převahou nízkotučných variant potravin.

Tab. 5: Hodnoty faktorů stravy u jednotlivých žen

| | Průměr ± SD | Medián (Min. – Max.) |
|---|--------------------|-----------------------------|
| Průměrný denní příjem | | |
| Energie (kJ) | 8430 ± 2032 | 8176 (3488 -11974) |
| Bílkoviny (g) | 74,0 ± 16,9 | 72,2 (31,7 – 107,7) |
| Sacharidy (g) | 244,0 ± 67,4 | 238,8 (106,8 – 391,0) |
| Tuky (g) | 78,3 ± 21,1 | 77,2 (28,1 – 120,0) |
| Vláknina (g) | 17,2 ± 6,4 | 16,6 (6,3 - 37,6) |
| | | |
| Procento dní s dostatečným příjmem | | |
| Obiloviny (%) | 81,1 ± 23,7 | 85,7 (0 - 100) |
| Zelenina (%) | 26,0 ± 25,2 | 14,3 (0 - 100) |
| Zelenina syrová (%) | 18,7 ± 22,9 | 14,3 (0 – 85,7) |
| Ovoce (%) | 55,4 ± 29,0 | 57,1 (0 - 100) |
| Ovoce syrové (%) | 70,5 ± 25,2 | 71,4 (0 - 100) |
| Mléčné výrobky (%) | 29,4 ± 24,9 | 25,0 (0-85,7) |
| Maso, vejce, luštěniny (%) | 79,6 ± 17,8 | 83,3 (42,9-100) |
| | | |
| Procento dní s dostatečnou kvalitou | | |
| Rozmanitost (%) | 64,2 ± 29,7 | 71,4 (0 - 100) |
| Časová distribuce (%) | 65,5 ± 31,7 | 71,4 (0 - 100) |
| Preferenze nízkotučných potravin (%) | 64,0 ± 28.2 | 71,4 (0 - 100) |
| | | |
| | Průměr ± SD | Medián (Min. – Max.) |
| Průměrná kvalita stravy (max. 10 bodů) | 5,5 ± 1,4 | 5,9 (2,3 -9,0) |

Doporučený denní příjem energie ve třetím trimestru těhotenství je 10 000 kJ.¹⁵⁰ Dvacet šest žen (53 %) mělo průměrný denní příjem energie v rozmezí 8 000 – 12 000 kJ, u dvacet tři žen (47 %) byla tato hodnota nižší, u jedné ženy byl příjem pod 50 % doporučené hodnoty. U žádné z žen nepřesahoval průměrný denní příjem energie 12 000 kJ.

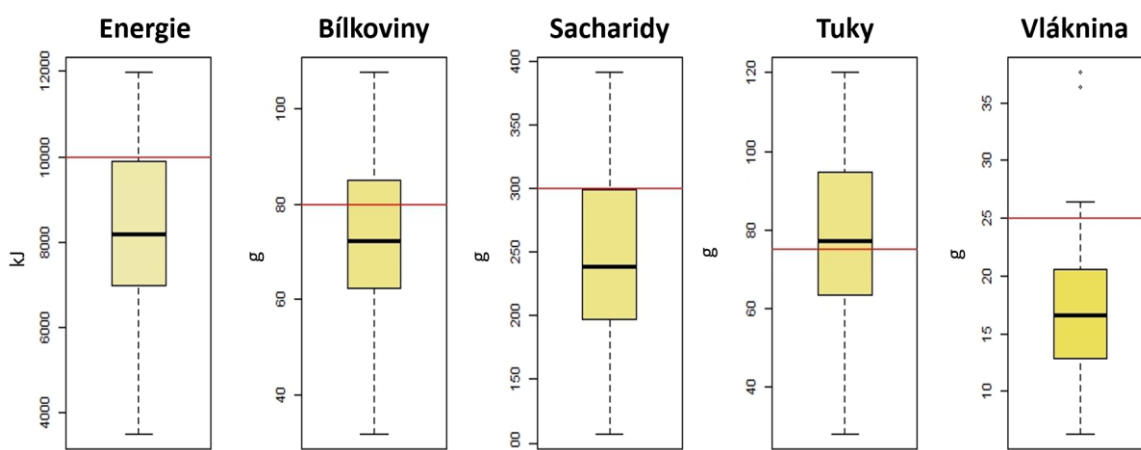
Doporučený denní příjem bílkovin ve třetím trimestru těhotenství je 80 g.¹⁵¹ Devatenáct žen (39 %) mělo průměrný denní příjem bílkovin v rozmezí 70 – 90 g/ den, dvacet jedna žen (43 %) mělo

příjem bílkovin nižší, jedna žena přijala menší než polovinu doporučené denní dávky. Devět žen (18 %) mělo příjem nad 90 g/den.

Doporučený denní příjem sacharidů je pro ženy ve třetím trimestru těhotenství 300 g.¹⁵² Osmnáct žen (37 %) mělo průměrný denní příjem v rozmezí 250 – 350 g, dvacet osm žen (57 %) mělo příjem nižší, pět z nich pak nižší než polovinu doporučeného příjmu. Tři ženy měly naopak průměrný denní příjem vyšší než 350 g.

Doporučený denní příjem tuků ve třetím trimestru těhotenství je 75 g.¹⁵⁴ Sedmnáct žen (35 %) mělo průměrný denní příjem v rozmezí 65 - 85 g. Třináct žen (27 %) mělo příjem nižší, dvě ženy pod 50 % doporučeného denního příjmu. Devatenáct žen (39 %) žen mělo příjem vyšší.

Pouze tři ženy měly dostatečný denní příjem vlákniny, jehož doporučená minimální hodnota je 25 g/den.¹⁴⁸ Devět žen (18 %) nedosáhlo ani poloviny této minimální hodnoty (viz_obrázek 16).

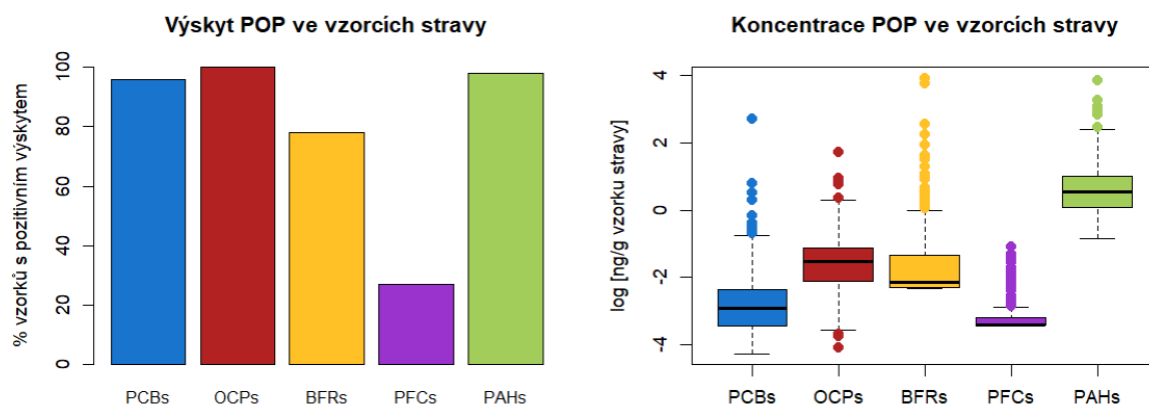


Obr. 16: Průměrný mateřský denní příjem energie, makroživin a vlákniny

Průměrná celková kvalita stravy matek se pohybovala od 2,3 do 9 bodů z maximálních 10 bodů.

Z potravinových skupin byl u většiny žen dostatečný příjem ve skupině obiloviny a ve skupině maso, vejce, luštěniny. Ženy průměrně dosáhly doporučeného příjmu potravin v 81 % sledovaných dní (obiloviny) a v 80 % dní (maso, vejce, luštěniny). Nejméně uspokojivý byl naopak příjem ve skupinách zelenina, do které byly započítávány i vařené brambory, a mléčné výrobky. Ženy měly dostatečný příjem zeleniny průměrně pouze ve čtvrtině sledovaných dní, přičemž příjem syrové zeleniny byl dostatečný pouze v pětině sledovaných dní. Mléčné výrobky ženy konzumovaly v dostatečné míře průměrně pouze v 29 % sledovaných dní. Žádná žena nepřijímala dostatečné množství syrové zeleniny a mléčných výrobků ve všech sledovaných dnech.

Výskyt a koncentrace jednotlivých skupin perzistentních organických polutantů ukazuje obrázek 19.

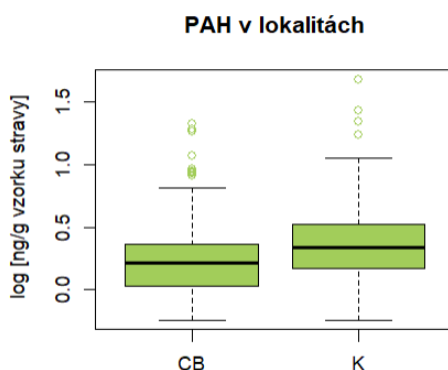


Obr. 19: Výskyt a koncentrace perzistentních organických polutantů ve vzorcích stravy

Celkové koncentrace OCP byly zjištěny nad mezí stanovitelnosti (LOQ) ve všech 317 vzorcích stravy. Ostatní skupiny POP byly detekovány nad LOQ v tomto počtu vzorků (řazeno od nejčastějšího výskytu): PAH 98 % vzorků, PCB 96 % vzorků, BFR 78 % vzorků a PFC 27 % vzorků.

Součty koncentrací PAH byly ze všech skupin POP nejvyšší, jejich medián byl 1,7 ng/g (max. 47 ng/g). Medián sumy koncentrací OCP byl 0,22 ng/g (max. 5,6 ng/g), medián sumy koncentrací BFR 0,12 ng/g (max. 50 ng/g), medián sumy koncentrací PCB 0,05 ng/g (max. 15 ng/g). Nejnižší koncentrace byly zjištěny u PFC, jejichž medián byl 0,03 ng/g (max. 0,33 ng/g).

Jedinými látkami, jejichž koncentrace se statisticky významně ($p = 2,54 \cdot 10^{-6}$) lišily v obou sledovaných lokalitách, byly polycyklické aromatické uhlovodíky (obrázek 20).

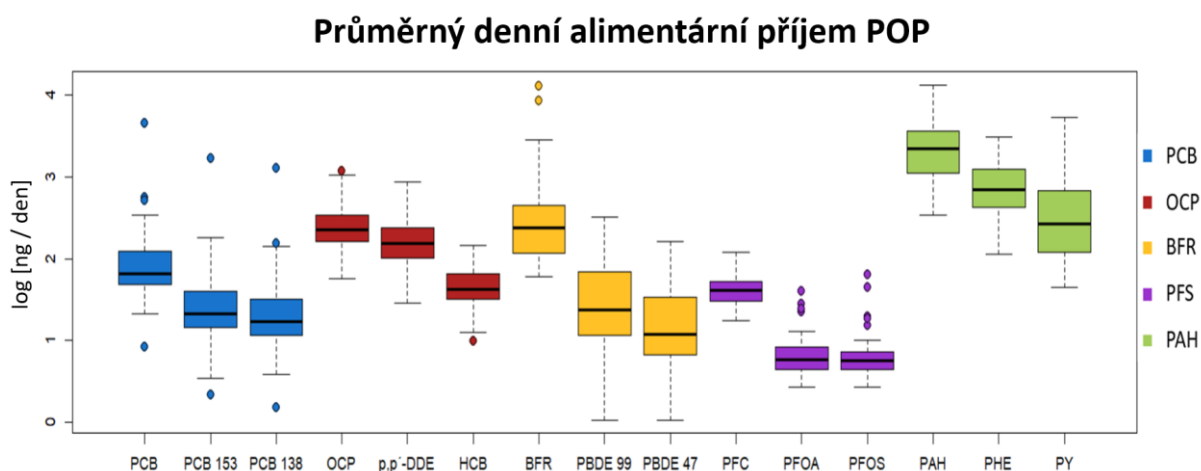


Obr. 20: Koncentrace polycyklických aromatických uhlovodíků (suma) ve vzorcích stravy z Českých Budějovic (CB) a Karviné (K).

4.2.2.2 Alimentární příjem POP

Nejprve byl vypočten alimentární příjem perzistentních organických polutantů v každém z 317 sledovaných dnů, a to vynásobením koncentrací POP ve vzorku stravy a celkové hmotnosti přijaté pevné stravy v daný den. Následně byl vypočten průměrný denní alimentární příjem POP každé ženy.

Nejvyšší průměrný denní alimentární příjem BFR a PAH se pohyboval v desítkách μg , příjem PCB a OCP v jednotkách μg a příjem PFC v desetínách μg . Obrázek 21 ukazuje denní příjem všech skupin POP a dvou jednotlivých polutantů s nejčastějším výskytem z každé skupiny.



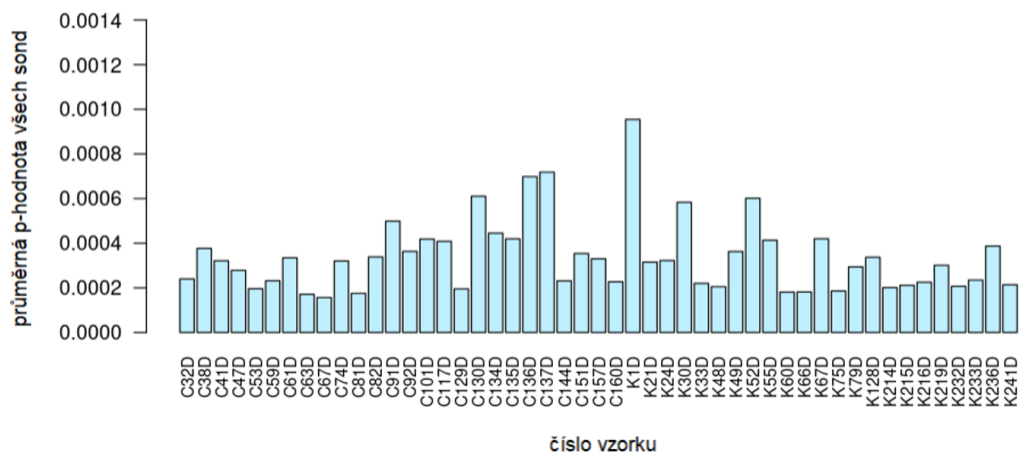
Obr. 21: Průměrný denní alimentární příjem POP jednotlivých žen

4.3 Metylace DNA novorozenců

4.3.1 Kvalita, normalizace a filtrace dat

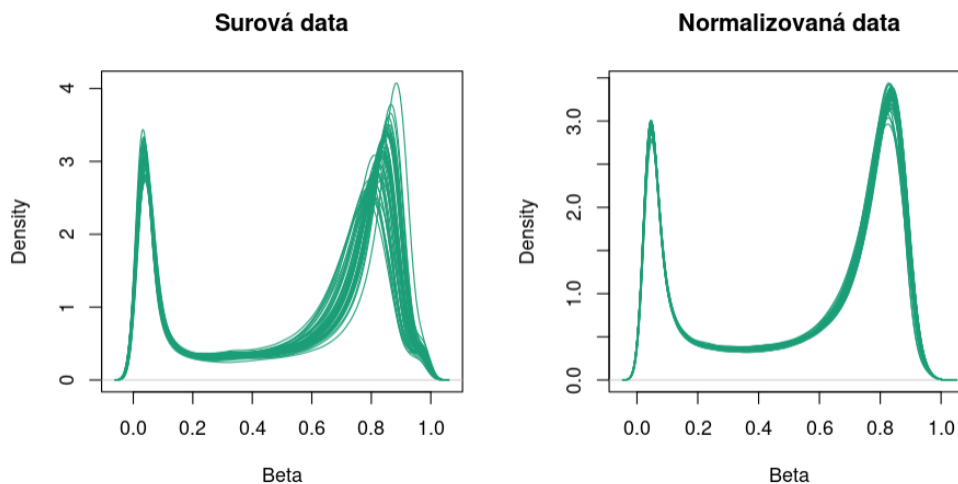
Celkem bylo analyzováno 1 051 539 sond, které měly dostatečný fluorescenční signál: průměrná p-hodnota nulové hypotézy o shodnosti jejich signálu se signálem pozadí byla u všech pod 0,05. Fluorescenční signály všech analyzovaných CpG míst bylo tedy možné pokládat za spolehlivé. Zároveň bylo možné konstatovat vysokou obecnou kvalitu všech vzorků z hlediska celkové spolehlivosti signálu, neboť průměrné p-hodnoty pro každý vzorek byly velmi nízké a nepřesahovaly hodnotu 0,005 (obrázek 22).

Průměrná p-hodnota všech sond jednotlivých vzorků



Obr. 22: Průměrné p-hodnoty všech sond jednotlivých vzorků

Po vyrovnání rozdílů mezi hodnotami intenzit fluorescenčního signálu na jednotlivých čípech metodou kvantilové normalizaci zůstalo v analýze 857 839 sond, které měly ve všech vzorcích p-hodnotu rozdílu signálu mezi sondou a pozadím pod 0,05 (obrázek 23).



Obr. 23: Hodnoty β surových a normalizovaných dat

Dále bylo odfiltrováno všech 18 941 sond hybridizujících s CpG místy na pohlavních chromozomech, 28 590 sond hybridizujících s úseky obsahujícími jednonukleotidové polymorfismy a 39 389 cross-reaktivních sond. Následně byly vypočteny hodnoty β pro každé CpG místo hybridizující se zbylými 770 919 sondami. Hodnoty β určují míru metylace CpG místa.

4.3.2 Testování diferenciální metylace

4.3.2.1 Faktory potenciálně ovlivňující metylom

Před samotným testováním každého z faktorů potenciálně ovlivňujících metylom byly vzorky rozděleny do dvou skupin. V případě binárních proměnných, tedy pohlaví dítěte, lokality (České Budějovice vs. Karviná), typu porodu (vaginální vs. císařský řez), vzdělání matky (bez VŠ vzdělání vs. vysokoškolsky vzdělané), přítomnosti starších sourozenců v rodině (ano vs. ne) a užívání doplňků stravy v posledním trimestru těhotenství (ano vs. ne) byly vzorky rozděleny dle kvality každého faktoru. U kvantitativních proměnných (porodní hmotnost, věk matky a BMI matky před těhotenstvím) pak proběhlo zařazení do skupin dle číselné hodnoty tohoto faktoru, přičemž v jedné skupině byly vzorky s hodnotou vyšší než medián, ve druhé skupině pak vzorky s hodnotou nižší než medián.

Jediným faktorem, u kterého byla na 5 % hladině významnosti zjištěna rozdílná úroveň metylace v obou porovnávaných skupinách, bylo pohlaví dítěte. Konkrétně se jednalo o rozdílnou úroveň metylace v 221 CpG místech. Faktor pohlaví byl tedy zahrnut do následného modelu použitého pro testování faktorů stravy.

4.3.2.2 Faktory stravy

U faktorů stravy (energetický příjem, bílkoviny, sacharidy, tuky, vláknina, obiloviny, zelenina, syrová zelenina, ovoce, syrové ovoce, rozmanitost stravy, preference netučných potravin, rovnoměrnost časové distribuce příjmu stravy, alimentární příjem jednotlivých POP i skupin POP) proběhly dva typy testování, které se lišily velikostí dvou porovnávaných skupin vzorků. Buď byly do obou porovnávaných skupin zařazeny všechny vzorky, přičemž jejich rozdělení proběhlo dle hodnoty mediánu příslušného faktoru, nebo bylo hodnoceno pouze přibližně deset vzorků s nejvyššími hodnotami daného faktoru oproti přibližně deseti vzorkům s hodnotami nejnižšími (viz tabulka 6).

Tab. 6: Jeden ze dvou typů rozdělení vzorků dle hodnot faktorů stravy do skupin pro diferenciální analýzu

| | Faktor stravy | Skupina s nejvyššími hodnotami | | Skupina s nejnižšími hodnotami | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | | Počet vzorků ve skupině | Hodnoty faktoru (od – do) | Počet vzorků ve skupině | Hodnoty faktoru (od – do) |
| Průměrný denní mateřský příjem | energetický příjem | 10 | 10596 – 11974 kJ | 10 | 3488 – 6656 kJ |
| | bílkoviny | 10 | 87 – 108 g | 10 | 32 – 57 g |
| | sacharidy | 10 | 314 – 391 g | 10 | 107 – 187 g |
| | tuky | 10 | 98 – 120 g | 10 | 28 – 59 g |
| | vláknina | 10 | 21 – 38 g | 10 | 6,3 – 13 g |
| Procento dní, v nichž měla matka dostatečný příjem | obiloviny | 20 | 100 – 100 % | 10 | 0 – 57 % |
| | zelenina | 9 | 50 – 100 % | 13 | 0 – 0 % |
| | zelenina syrová | 9 | 40 – 86 % | 20 | 0 – 0 % |
| | ovoce | 10 | 80 – 100 % | 12 | 0 – 29 % |
| | ovoce syrové | 11 | 100 – 100 % | 11 | 0 – 50 % |
| | mléko | 12 | 57 – 86 % | 10 | 0 – 0 % |
| | maso | 15 | 100 – 100 % | 9 | 40 – 60 % |
| Procento dní, v nichž měla matka dostatečnou kvalitu | rozmanitost | 12 | 100 – 100 % | 10 | 0 – 33 % |
| | vhodná časová distribuce | 12 | 100 – 100 % | 13 | 0 – 43 % |
| | preferenze netučných potravin | 9 | 100 – 100 % | 8 | 0 – 33 % |
| | celková kvalita stravy matky | 10 | 6,7 – 9 bodů | 12 | 2,3 – 4,4 bodů |

V případě perzistentních organických polutantů vyskytujících se u méně než poloviny vzorků bylo provedeno jen porovnání vzorků s koncentrací daného polutantu nad LOQ se vzorky s koncentrací pod mezí stanovitelnosti. U polutantů, které se nacházely u méně než 3 % vzorků, pak diferenciální analýza nebyla provedena (viz obrázek 8).

Při žádném typu testování nebyla u žádného faktoru stravy na 5 % hladině významnosti zjištěna rozdílná úroveň metylace.

5 DISKUZE

Kvalita, množství a zdravotní nezávadnost stravy těhotných žen je zásadním faktorem ovlivňujícím zdraví plodu.

Tato práce měla dva hlavní cíle: (1) získání dat o kvalitě a množství stravy těhotných žen, včetně jejich alimentární expozice perzistentním organickým polutantům; (2) analýza vztahu mezi stravou matek během těhotenství (včetně příjmu POP) a metylomem novorozenců.

5.1 Množství a nutriční kvalita stravy matek

Ženy ve sledovaném souboru měly oproti doporučeným hodnotám spíše nižší než nadbytečný příjem stravy. Nedostatečný byl především příjem některých zdrojů vlákniny a bílkovin.

5.1.1 Příjem energie, makroživin a vlákniny

Rozptyl mezi průměrným denním příjmem energie jednotlivých žen byl poměrně velký. Doporučený denní příjem energie ve třetím trimestru těhotenství je 10 000 kJ.¹⁵⁰ Téměř polovina žen (47 %) měla průměrný příjem pod 8 000 kJ, jedna žena pak dokonce méně než 5 000 kJ. Nižší energetický příjem se neodrazil v porodní hmotnosti, která byla u všech novorozenců v normě. S energetickým příjmem souvisí stupeň nadváhy před těhotenstvím, kdy mateřská obezita je spojena se zvýšeným rizikem nepříznivých výsledků těhotenství a s dlouhodobým dopadem na zdraví potomků způsobeným změnou metylací jejich DNA na specifických místech zapojených do metabolických funkcí.¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ Devatenáct procent žen z hodnoceného souboru mělo před těhotenstvím dle WHtR nadváhu, 16 % žen patřilo do kategorie obézních.

Denní příjem bílkovin, který by ve třetím trimestru těhotenství měl být 80 g¹⁵², byl u více než třetiny osob (39 %) pod 70 g. Nedostatečný, ale i nadměrný příjem bílkovin a masa v těhotenství přitom patří mezi nejvýznamnější faktory stravy, které mohou vést k nízké porodní hmotnosti.^{158,159} Oba tyto parametry vykazovaly ve studovaném souboru statisticky významný pozitivní vztah s porodní hmotností ($p = 0,012$ pro příjem bílkovin, $p = 0,023$ pro příjem masa, vajec, luštěnin). V mnohonásobném regresním modelu bylo 22 % variace hodnot porodní hmotnosti (adjustovaný koeficient determinace) vysvětleno společně příjmem bílkovin a hmotností matky před otěhotněním ($p = 0,001$), přičemž oba faktory přispěly k regresnímu modelu přibližně stejnou silou (příjem bílkovin $p = 0,009$, hmotnost před těhotenstvím $p = 0,007$).

Příjem bílkovin v této skupině matek a dětí také vykazoval negativní vztah s hladinou oxidačního poškození novorozenců.¹⁶⁰

Většina žen měla nedostatečný příjem vlákniny (medián 16,6 g oproti doporučenému dennímu minimu 25 g¹⁵³). I přes tyto nepříznivé výsledky jsou však hodnoty výrazně lepší oproti datům naší předchozí studie, provedené s podobnou kohortou těhotných žen o šest let dříve, v níž nedosáhla minimálního doporučeného příjmu vlákniny ani jedna studovaná osoba.¹⁶¹

5.1.2 Kvalita a příjem stravy u jednotlivých potravinových skupin

V žádném ze sledovaných dnů neměly ženy dostatečný příjem syrové zeleniny a mléčných výrobků

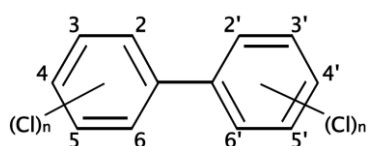
Celková průměrná kvalita stravy se u jednotlivých osob velmi lišila a dosahovala hodnot od 2,3 do 9 z maximálních deseti možných bodů. Nebyly však zjištěny rozdíly mezi lokalitami. Vzhledem k socioekonomickým rozdílům i k výsledkům naší předchozí studie se dala očekávat horší kvalita stravy v Karviné oproti Českým Budějovicím. Ve srovnání s předchozí studií zůstala kvalita stravy v Českých Budějovicích přibližně stejná, zatímco v Karviné se zlepšila.¹⁶¹

5.2 Alimentární příjem perzistentních organických polutantů

Alimentární příjem POP byl ve sledovaném souboru těhotných žen nízký a příjem těchto látek byl ve většině případů hluboko pod stanovenými limity.

5.2.1 Polychlorované bifenyly

Polychlorované bifenyly (obrázek 24) jsou velmi stabilní v tučích rozpustné sloučeniny, které jsou však špatně rozpustné ve vodě. Nepodléhají biologickému rozkladu, takže se hromadí v prostředí a v organismech. Vyráběly se od roku 1929 a používaly se v různých průmyslových odvětvích.¹⁶²



Zdroj: Autor: D.328 – Vlastní dílo, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1048994>

Obr. 24: Struktura polychlorovaných bifenyly

Hlavním zdrojem expozice PCB jsou pro běžnou populaci kontaminované potraviny, a to zejména ty živočišného původu, tedy maso, vejce, mléko a živočišné tuky.¹⁶³ Výrobu PCB zakázala v roce 2004 Stockholmská úmluva, kterou ratifikovalo 184 zemí světa.²⁹ Koncentrace PCB v životním prostředí, a tím i v potravinách proto pomalu klesají.

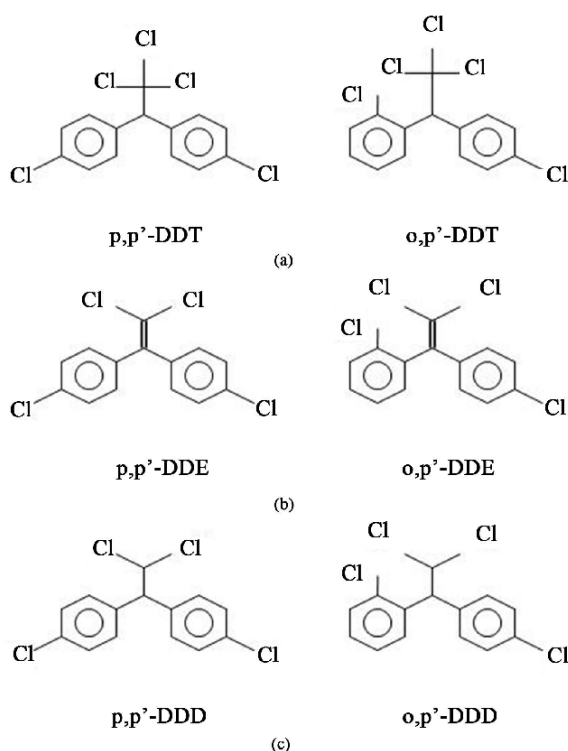
V bývalém Československu bylo od roku 1959 do roku 1984, kdy byla produkce zastavena, vyrobeno asi 21 500 tun PCB. Expozice populace PCB je v České republice zjišťována od roku 1994 v rámci Human Projekt Biomonitoring (CZ-HBM), který je součástí celorepublikového systému monitorování kvality životního prostředí a který sleduje vybrané PCB v mateřském mléce a podkožním tuku.¹⁵⁷

Od roku 1999 je kvantifikováno sedm tzv. indikátorových kongenerů PCB (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180). Denní alimentární příjmy sumy těchto látek a kongeneru PCB 170 na kilogram hmotnosti (počítána hmotnost ženy před těhotenstvím) byly téměř ve všech sledovaných dnech řádově nižší (medián 0,76 ng/kg) než tolerovatelný denní příjem (TDI), který je v České republice 0,4 µg/kg tělesné hmotnosti¹⁶⁴. TDI byl těsně překročen pouze během jednoho dne u jedné ženy z oblasti Karviné (0,47 µg/kg tělesné hmotnosti).

Kongener PCB 153 mívá ze všech PCB kongenerů nalezených v lidském organismu nejvyšší koncentrace.¹⁶⁵ Bývá proto používán jako indikátor celkové expozice PCB. Medián jeho denního příjmu byl ve sledovaném souboru 0,25 ng/kg tělesné hmotnosti, což je méně, než bylo zjištěno v populaci těhotných žen v Norsku (0,81 ng/kg tělesné hmotnosti).¹⁶⁶ Důvodem by mohla být skutečnost, že významným zdrojem PCB jsou ryby, jejichž konzumace je v České republice oproti Norsku výrazně nižší.

5.2.2 Organochlorové pesticidy

Organochlorové pesticidy jsou velmi stabilní látky, například DDT (obrázek 25) může přetrvávat v těle po dobu 50 let.



Obr. 25: Chemická struktura izomerů DDT a jejich metabolitů: (a) DDT, (b) DDE and (c) DDD.¹⁶⁷

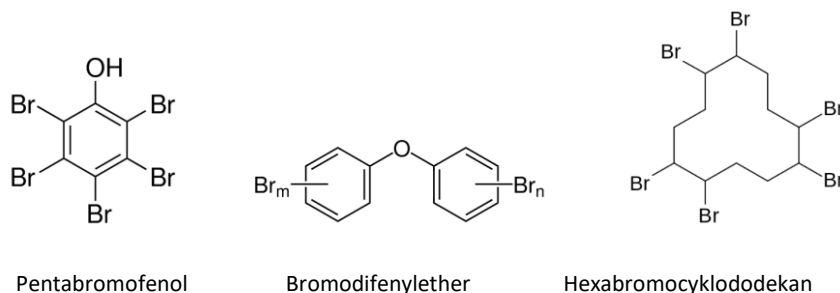
Užívání DDT je od roku 2004 omezeno Stockholmskou úmluvou pouze na boj s malárií. Přesto se však v některých oblastech dodnes používá v zemědělství, což je možné prokázat poměrem DDT k jeho metabolitům v zemědělských produktech.¹⁶⁸

Ve sledovaném souboru byl průměrný denní alimentární příjem sumy DDT a jeho metabolitů 0,004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti (max. 0,058 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti) a byl řádově nižší než dočasný tolerovatelný denní příjem (PTDI), který je 0,01 mg/kg tělesné hmotnosti.^{169,170}

V současnosti jsou lidé více než samotnému DDT vystaveni jeho metabolitu DDE. Navzdory téměř padesátiletému zákazu používání DDT v ČR (od roku 1974) byl p,p'-DDE jedinou ze všech 67 měřených škodlivin, která se s jednou výjimkou vyskytovala ve všech analyzovaných vzorcích stravy. Medián jeho denního příjmu (1,8 ng/kg tělesné hmotnosti) byl však ve sledovaném souboru o dva řády nižší než odhadnutý průměrný denní příjem v čínské populaci (0,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti). To je pravděpodobně způsobeno tím, že v Číně se DDT vyrábělo až do roku 2003 a jeho koncentrace v prostředí jsou tam tedy vyšší.¹⁷¹

5.2.3 Bromované zpomalovače hoření

Bromované zpomalovače hoření (BFR) jsou sloučeniny přidávané do produktů ke zmírnění průběhu požáru (obrázek 26). Používají se v mnoha různých výrobcích, zejména v elektronice, textilu a nábytku.



Autor: Leyo, Rhododendronbusch – Vlastní dílo, Volné dílo,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1731812>

Obr. 26: Chemická struktura bromovaných zpomalovačů hoření

Použití BFR se v České republice rozšířilo před třiceti lety. V současné době je jejich výroba v ČR zakázána na základě Stockholmské úmluvy, na jejíž seznam byly tyto látky přidány v roce 2009. Stále se však vyskytují ve starších výrobcích a ve výrobcích z recyklovaných materiálů. BFR se poměrně snadno uvolňují z různých materiálů při zvýšených teplotách nebo při intenzivním slunečním záření, takže byly nalezeny ve všech částech životního prostředí.¹⁷² Do lidského těla se dostávají kontaktem s kůží, vdechováním nebo konzumací potravy.

Medián denního příjmu sumy kongenerů PBDE byl ve sledovaném souboru 0,8 ng/kg tělesné hmotnosti (max. 1,29 µg/kg tělesné hmotnosti), což je srovnatelné s odhadem denního alimentárního příjmu v populaci 20-39 letých žen v USA (0,9 ng/kg tělesné hmotnosti)¹⁷³ i s odhadem příjmu u švýcarské populace (0,68 ng/kg tělesné hmotnosti)¹⁷⁴.

Medián denního alimentárního příjmu sumy izomerů HBCD (15 ng/den) je rovněž srovnatelný s odhadem příjmu v USA (16 ng/den)¹⁷⁵, avšak dvakrát vyšší než odhad příjmu v Belgii (7,2 ng/den)¹⁷⁶.

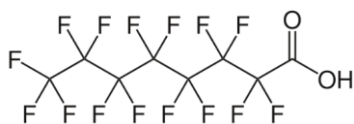
Příjem PBP v jediný den, kdy byla jeho koncentrace nad LOQ, byl 1,5 ng/kg tělesné hmotnosti.

Pro BFR neexistují žádné týdenní ani denní limity příjmu, ale na základě studií by zjištěné dávky neměly mít toxické účinky.¹⁷⁷

5.2.4. Perfluorované látky

Perfluorované látky se v současnosti používají v mnoha průmyslových odvětvích, neboť odpuzují vodu a mastnotu. Nacházejí tak široké uplatnění v papírových obalech potravin, teflonovém nádobí, outdoorovém voděodpujícím oblečení, ale například i v kobercích a hasicích pěnách. Do lidského organismu pronikají především s potravou a vodou, nejsou v něm metabolizovány a hromadí se v tkáních.¹⁷⁸ Nejdůležitějšími potravními zdroji jsou ryby, maso, vejce, ovoce a zelenina.¹⁷⁹

Stockholmská úmluva omezuje použití dvou z těchto tří PFAS, které vykazovaly výraznější výskyt v našich vzorcích stravy (viz obr. 19 v kapitole výsledky) – kyseliny perfluoroktanové (PFOA) a kyseliny perfluoroktansulfonové (PFOS). (Obrázek 27)



kyselina perfluoroktanová (PFOA)

Autor: Edgar181

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3025773>



kyselina perfluoroktansulfonová (PFOS)

Autor: Leyo, Rhododendronbusch

<https://images.app.goo.gl/FNbPqY5Qexjrqd6t6>

Obr. 27: Kyselina perfluoroktanová (PFOA) a kyselina perfluoroktansulfonová (PFOS)

Dřívější expoziční testy odhalily čtyři sloučeniny, které představují více než 90 % detekovatelných PFAS u dospělých v průmyslových zemích, konkrétně kyselinu perfluoroktansulfonovou (PFOS), kyselinu perfluoroktanovou (PFOA), kyselinu perfluorhexansulfonovou (PFHxS) a kyselinu perfluorononanovou (PFNA).¹⁸⁰ V roce 2020 zveřejnil Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovisko, které stanovilo tolerovatelný týdenní příjem (TWI) na 4,4 ng/kg tělesné hmotnosti za týden pro součet kyseliny perfluoroktanové (PFOA), kyseliny perfluorononanové (PFNA), kyseliny perfluorhexansulfonové (PFHxS) a kyseliny perfluoroktansulfonové (PFOS). Expozice ze stravy v mnoha evropských zemích překračuje tento tolerovatelný týdenní příjem.^{179, 181}

Z 39 žen, od kterých byly k dispozici vzorky stravy ze všech sedmi dnů, byl PFAS TWI překročen u tří (dvě ženy z Českých Budějovic, jedna matka z Karviné). PFAS TWI byl překročen také u jedné ženy z Českých Budějovic, která odebírala vzorky potravin pouze 4 dny. Během těchto 4 dnů byl její dietní příjem Σ PFOS+PFOA+PFNA+PFHxS 5,26 ng/kg tělesné hmotnosti.

Kyselina perfluorobutanová (PFBA) byla zjištěna pouze v osmnácti vzorcích stravy (5,7 %). Všechny tyto vzorky byly z Českých Budějovic z období od 3. prosince 2019 do 11. ledna 2020 a byly odebrány od 7 různých žen. U dalších třiceti vzorků od těchto sedmi žen nebyla PFBA detekována. Detailní pohled do všech záznamů stravy z tohoto období v Českých Budějovicích nezjistil žádný významný rozdíl mezi dny s detekovanou PFBA a dny s koncentrací PFBA pod mezí stanovitelnosti. Jedinou skupinou potravin společnou pro všechny vzorky s PFBA byly mléčné výrobky. Mléčné výrobky jsou zřejmě významným zdrojem chronické expozice PFAS, přičemž jejich kontaminace by mohla pocházet jak ze zpracování a balení finálních produktů, tak z přenosu PFAS z krmiva na krávy.¹⁸²

5.2.5. Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou běžnou součástí životního prostředí, neboť vznikají při spalování jakékoliv organické hmoty. Významnou cestou expozice těmto sloučeninám je kromě znečištěného ovzduší i požití kontaminovaných potravin. PAH se do potravin dostávají z půdy, vzduchu a vody a také vznikají přímo v potravinách při jejich zpracování za vysokých teplot.

V analyzovaných vzorcích se koncentrace PAH statisticky významně ($p < 0,001$) lišily v obou sledovaných lokalitách (obrázek 20). Obě oblasti jsou od sebe vzdáleny pouhých 300 km, jejich obyvatelstvo a kulturní zvyklosti jsou podobné a dá se předpokládat, že se nijak významně neliší ani strava a způsoby přípravy jídel. Kvalita ovzduší je však rozdílná. Zatímco v Českých Budějovicích byla v roce 2020 průměrná roční koncentrace BaP v ovzduší $0,5 \text{ ng/m}^3$, v Karviné byly naměřeny 3 ng/m^3 .^{183,184} Lze tedy předpokládat, že rozdílné koncentrace PAH v potravinách v obou lokalitách jsou způsobeny odlišnou kvalitou prostředí, nikoli odlišnými stravovacími zvyklostmi.

Koncentrace PAH v potravinách je v různých zemích kontrolována limitními hodnotami buď pro sumu PAH nebo pro samotný BaP. Například nařízení Komise (EU) 2020/1255 stanoví maximální limity PAH v potravinových prášcích používaných při přípravě nápojů - BaP: $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$; $\Sigma\text{BaP+BbFA+CHR}$: $50 \text{ } \mu\text{g/kg}$.¹⁸⁵ V analyzovaných vzorcích stravy byla průměrná celková koncentrace sumy PAH $2,8 \text{ } \mu\text{g/kg}$ vzorku stravy, maximální naměřená koncentrace byla $47 \text{ } \mu\text{g/kg}$ vzorku stravy.

Indikátorem expozice PAH je BaP. Ve sledovaném souboru byl medián jeho denního příjmu $0,39 \text{ ng/kg}$ tělesné hmotnosti, což je výrazně méně než odhad denního příjmu v USA (8 ng/kg tělesné hmotnosti).¹⁸⁶ Tyto hodnoty jsou o mnoho řádů menší než hodnoty zvyšující riziko karcinogeneze, které se pohybují řádově v mg/kg tělesné hmotnosti.¹⁸⁷

5.3 Diferenciální metylace

5.3.1 Faktory potenciálně ovlivňující metylom

Navzdory publikovaným poznatkům¹⁸⁸⁻¹⁹¹ i našim dosud nezveřejněným výsledkům ze souboru 500 novorozenců¹⁹², nebyl v této disertační práci zjištěn žádný statisticky významný vztah mezi věkem matky, její váhou, typem porodu nebo lokalitou a metylomem novorozenců. Toto pozorování může souviset s malým počtem subjektů ve sledovaném souboru.

Nebyl také zjištěn žádný vztah mezi metylomem novorozenců a užíváním potravinových doplňků v posledním trimestru těhotenství. Na rozdíl od výše uvedených zjištění je však tento závěr v souladu s dosavadními poznatky, které naznačují, že suplementace mikroživinami před a v průběhu těhotenství může napravit nedostatek živin u matky, ale účinky na zdravotní stav dítěte nejsou nijak zásadní.¹⁹³

V souladu s výsledky dalších autorů byl i po vyloučení sond hybridizujících s pohlavními chromozomy faktor pohlaví identifikován jako proměnná významně ovlivňující metylom novorozenců.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

5.3.2 Množství a nutriční kvalita stravy

Strava v těhotenství, a to jak její kvalita, tak množství, se podílí na fetálním metabolickém programování potomků prostřednictvím epigenetických změn.¹⁹⁷⁻²⁰¹ Navzdory tomuto faktu nebyl ve sledovaném souboru zjištěn žádný významný vztah mezi mateřskou stravou a metylomem novorozenců. Soubor nebyl příliš velký, přesto lze tento výsledek považovat za překvapivý. Skutečnost lze však připsat faktu, že ačkoli strava žen ve sledovaném souboru plně neodpovídala všem výživovým doporučením, je z celosvětového pohledu její kvalita poměrně dobrá. Žádná z žen neuváděla výraznější finanční problémy a vzhledem k husté a celoročně velmi dobře zásobované síti obchodů v obou sledovaných regionech měly zřejmě všechny ženy snadný přístup k vysoce kvalitním potravinám.

5.3.3 Perzistentní organické polutanty ve stravě

Perzistentní organické polutanty, kterým je jedinec ve zvýšené míře vystaven během raného věku, včetně prenatálního období, mění nastavení jeho metylomu.²⁰²⁻²⁰⁴ Ve sledovaném souboru však žádné statisticky významné vztahy mezi mateřským alimentárním příjmem perzistentních organických polutantů a metylomem novorozenců zjištěn nebyl. Kromě malého souboru může hrát roli velmi nízký mateřský alimentární příjem téměř všech POP, který nepřesahoval stanovené limity. Jedinou výjimkou tvořily perfluorované látky, jejichž týdenní alimentární příjem byl nadlimitní u čtyř žen. Ani u

novorozenců těchto žen však nebyly zjištěny žádné změny v metylomu, a to navzdory skutečnosti, že perfluorované látky zřejmě prochází přes placentu ²⁰⁵. Na druhou stranu je třeba podotknout, že stanovený limit nebyl u žádné z žen nijak výrazně překročen.

6 ZÁVĚR

Strava v těhotenství je velmi důležitým faktorem, ovlivňujícím zdraví matky i dítěte. Zdravá a vyvážená strava těhotných žen může přispět k prevenci řady zdravotních problémů u dítěte v pozdějším věku a může ovlivnit i jeho kognitivní vývoj a psychické zdraví.

Pro správný růst a vývoj dětí je strava důležitá jak z hlediska nutriční kvality, tak zdravotní nezávadnosti. Proto je důležité, aby těhotné ženy nekonzumovaly stravu kontaminovanou látkami, které mohou mít škodlivý vliv na lidské zdraví. Mezi takové sloučeniny patří i perzistentní organické polutanty, jejichž výskytem ve stravě těhotných žen se tato práce zabývala. Tyto látky se hromadí v životním prostředí, mohou se dostat do lidského potravního řetězce a nakonec proniknout až k plodu. Expozice POP během těhotenství je spojena s řadou rizik, včetně zdravotních problémů dětí v pozdějším věku.

Nutriční faktory stravy i kontaminující látky mohou způsobit epigenetické změny v genomu novorozence, které mohou následně ovlivnit jeho zdraví v pozdějším životě. Studium epigenetických parametrů u novorozenců může tedy poskytnout informace o tom, jaké konkrétní faktory mohou mít vliv na jejich zdraví a jaká opatření by bylo vhodné přijmout, aby se minimalizovala možná rizika související se stravou matky v těhotenství. Například vysoký nebo naopak nedostatečný příjem látek, které jsou zdrojem metylové funkční skupiny, může vést k nevhodné expresi některých genů. Podobně mohou perzistentní organické polutanty ovlivnit metylaci DNA a další epigenetické mechanismy, což může způsobit různé zdravotní problémy.

Epigenetické změny u novorozenců lze zkoumat různými metodami; jednou z nejčastěji používaných je analýza DNA metylace, kterou se zabývala i tato disertační práce. Z výsledků dosavadních výzkumů hodnotících vztah mezi stravou těhotných žen a změnami v metylomu novorozenců vyplývá, že z epigenetického hlediska je důležitý zejména příjem některých vitamínů a minerálů, jejichž zdrojem jsou především ovoce a zelenina. Zdá se, že existuje vztah mezi příjmem bílkovin v těhotenství a metylací DNA novorozenců, ten však není zcela objasněn a vyžaduje další výzkum. Také expozice POP během těhotenství může vést ke změnám v metylaci DNA novorozenců, avšak většina studií zabývajících se těmito vztahy ukazuje pouze korelaci mezi expozicí POP a změnami v metylomu novorozenců a k určení přesného mechanismu, jakým tyto látky ovlivňují metylaci DNA, jsou zapotřebí specializované studie.

V souboru analyzovaném v této práci nebyly nalezeny žádné statisticky významné vztahy mezi stravou těhotných žen a metylomem novorozenců. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s poměrně malou velikostí analyzovaného souboru. Dalším důvodem by mohla být skutečnost, že ženy v analyzovaném souboru mají celoročně přístup k nutričně kvalitním a z hlediska kontaminace POP

nezávadným potravinám. Jejich strava sice vykazuje určité rezervy ve výběru nutričně vyvážených komponent, zejména co se týče příjmu zeleniny a mléčných výrobků, přesto však zřejmě z hlediska metylace DNA poskytuje plodu dostatečné množství potřebných živin.

Ačkoli je stále zapotřebí dalšího výzkumu k lepšímu pochopení přesnějších mechanismů, kterými strava v těhotenství ovlivňuje epigenetické parametry u novorozenců, je zřejmé, že je třeba v těhotenství dbát na příjem nutričně vyvážené stravy a minimalizovat expozici plodu persistentním organickým polutantům a jiným látkám, které by mohly ovlivnit epigenetické nastavení, a tím přispět k různým zdravotním problémům v dospělosti. Je tedy nezbytné, aby ženy dostávaly včasné informace o významu stravy v těhotenství a jejím vhodném složení, neboť takto bude možné snížit riziko vývojových poruch u dětí a zajistit jim zdravý start do života.

LITERATURA

1. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr.* 2012 Jan;3(1):21-38. doi: 10.3945/an.111.000992. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22332098; PMCID: PMC3262611.
2. (Mahmoud AM, Ali MM. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients.* 2019 Mar 13;11(3):608. doi: 10.3390/nu11030608. PMID: 30871166; PMCID: PMC6471069.
3. Selvakumar P, Badgeley A, Murphy P, Anwar H, Sharma U, Lawrence K, Lakshmikuttyamma A. Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Nutrients.* 2020 Mar 13;12(3):761. doi: 10.3390/nu12030761. PMID: 32183060; PMCID: PMC7146477.
4. Boachie J, Adaikalakoteswari A, Samavat J, Saravanan P. Low Vitamin B12 and Lipid Metabolism: Evidence from Pre-Clinical and Clinical Studies. *Nutrients.* 2020 Jun 29;12(7):1925. doi: 10.3390/nu12071925. PMID: 32610503; PMCID: PMC7400011.
5. van den Dungen MW, Murk AJ, Kok DE, Steegenga WT. Persistent organic pollutants alter DNA methylation during human adipocyte differentiation. *Toxicol In Vitro.* 2017 Apr;40:79-87. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.011. Epub 2016 Dec 20. PMID: 28011154.
6. Watson EM. Diet and nutrition: nutritional requirements during pregnancy. *Canadian Medical Association Journal.* 1938 Jun;38(6):586-8
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC538427/?page=1>
7. Burke B. S., Beal V. A., Kirkwood S. B., Stuart H. C.. Nutrition Studies during Pregnancy. IV. Relation of Protein Content of Mother's Diet during Pregnancy to Birth Length, Birth Weight, and Condition of Infant at Birth. *The Journal of Pediatrics.* 1943 November; 23(5):506-515
[http://www.jpeds.com/article/S0022-3476\(43\)80253-5/abstract](http://www.jpeds.com/article/S0022-3476(43)80253-5/abstract)
8. Becker JE, Bickerstaff HJ, Eastman NJ. Nutrition in Relation to Pregnancy and Lactation. *American Journal of Public Health and the Nation's Health.* 1941 Dec;31(12):1263-70
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1531024/>
9. Arnell R. E., Goldman D. W., Bertucci F. J., Protein deficiencies in pregnancy. *The Journal of the American Medical Association.* 1945 April 28; 127(17):1101-1107
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=273837>
10. The People's League of Health. The nutrition of expectant and nursing mothers in relation to maternal and infant mortality and morbidity. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 1946 Dec;53(6):498-509.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.1946.tb05778.x/abstract>
11. Brzezinski A., Bromberg Y.M., Braun K.: Riboflavin Deficiency in Pregnancy: Its Relationship to the Course of pregnancy and to the Condition of the Foetus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth.* 1947 April; 54(2):182-6
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.1947.tb05400.x/abstract>
12. Khalil, A., Waly, G. Vitamin C in the nutrition of infants, pregnant, and lactating women. *The Journal of the Egyptian Medical Association.* 1949 Feb-Mar;32(2-3):158-71
<http://www.cabdirect.org/abstracts/19501400962.html;jsessionid=6E3ADB3ED15CA6AB187A5F2FFCC5A186>
13. Hibbard BM, Hibbard ED, Jeffcoate TN. Folic acid and reproduction. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 1965;44(3):375-400.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3109/00016346509155874/abstract>

14. Miyamoto K, Stephanides LM, Bernsohn J. J. Incorporation of [1-¹⁴C]linoleate and linolenate into polyunsaturated fatty acids of phospholipids of the embryonic chick brain. *Journal of Neurochemistry*. 1967 Feb;14(2):227-3 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1967.tb05898.x/abstract>
15. Jaffe NR, Johnson EM. Alterations in the ontogeny and specific activity of phosphomonoesterases associated with abnormal chondrogenesis and osteogenesis in the limbs of fetuses from folic acid-deficient pregnant rats. *Teratology*. 1973 Aug;8(1):33-42 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tera.1420080106/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER
16. Dallman PR, Manies EC. Protein deficiency: contrasting effects on DNA and RNA metabolism in rat liver. *The Journal of nutrition*. 1973 Sep;103(9):1311-8. <http://jn.nutrition.org/content/103/9/1311.long>
17. Srivastava US. Nucleic acid and protein metabolism in undernutrition and protein deficiency. *Progress in food & nutrition science*. 1985;9(1-2):63-107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2418460>
18. Drillien CM. The incidence of mental and physical handicaps in school age children of very low birth weight. *Pediatrics*. 1961 March;27(3):452-64 <http://pediatrics.aappublications.org/content/27/3/452.short>
19. Hughes JT. Low birth weight and intelligence. *British Medical Journal*. 1964 Aug 15;2(5406):401 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1815985/pdf/brmedj02563-0015a.pdf>
20. Sinclair JC, Coldiron JS. Low birthweight and postnatal physical development. *Developmental medicine & child neurology*. 1969 Jun;11(3):314-29. Review http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1469-8749.1969.tb01438.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER
21. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992 Jul;35(7):595-601 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644236>
22. Poulsen P, Vaag AA, Kyvik KO, Møller Jensen D, Beck-Nielsen H. Low birth weight is associated with NIDDM in discordant monozygotic and dizygotic twin pairs. *Diabetologia*. 1997 Apr;40(4):439-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112021>
23. Hibbeln JR, Davis JM, Steer C, Emmett P, Rogers I, Williams C, Golding J. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet*. 2007 Feb 17;369(9561):578-85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307104>
24. Emmett Pauline M. , Jones Louise R. , Golding Jean. Pregnancy diet and associated outcomes in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Nutrition Reviews*. 2015 Oct; 73(Suppl 3): 154–174 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586451/>
25. Simmons RA. Developmental origins of diabetes: the role of epigenetic mechanisms. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2007 Feb;14(1):13-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940413>
26. http://www.who.int/nutrition/publications/programming_chronicdisease.pdf

27. Moody L, Chen H, Pan YX. Early-Life Nutritional Programming of Cognition-The Fundamental Role of Epigenetic Mechanisms in Mediating the Relation between Early-Life Environment and Learning and Memory Process. *Adv Nutr.* 2017 Mar 15;8(2):337-350. doi: 10.3945/an.116.014209. PMID: 28298276; PMCID: PMC5347110.
28. Carson, R., Darling, L., & Darling, L. (1962). *Silent spring*.
29. Lallas, P. (2001). The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *American Journal of International Law*, 95(3), 692-708. doi:10.2307/2668517
30. Roncati L, Pisciolli F, Pusioli T. The endocrine disruptors among the environmental risk factors for stillbirth. *Sci Total Environ.* 2016 Sep 1;563-564:1086-7. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.214. Epub 2016 May 20. PMID: 27216966.
31. Aye IL, Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Oct 13;112(41):12858-63. doi: 10.1073/pnas.1515484112. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26417088; PMCID: PMC4611638.
32. Cerf ME, Herrera E. High Fat Diet Administration during Specific Periods of Pregnancy Alters Maternal Fatty Acid Profiles in the Near-Term Rat. *Nutrients.* 2016 Jan 4;8(1):25. doi: 10.3390/nu8010025. PMID: 26742067; PMCID: PMC4728639.
33. Rebelato HJ, Esquisatto MA, de Sousa Righi EF, Catisti R. Gestational protein restriction alters cell proliferation in rat placenta. *J Mol Histol.* 2016 Apr;47(2):203-11. doi: 10.1007/s10735-016-9660-9. Epub 2016 Jan 16. PMID: 26779652.
34. Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J.* 2009 Jan;23(1):271-8. doi: 10.1096/fj.08-116889. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18827021; PMCID: PMC2626621.
35. Thornburg KL, Marshall N. The placenta is the center of the chronic disease universe. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Oct;213(4 Suppl):S14-20. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.030. PMID: 26428494; PMCID: PMC4593619.
36. DuBois BN, O'Tierney-Ginn P, Pearson J, Friedman JE, Thornburg K, Cherala G. Maternal obesity alters fetoplacental cytochrome P4501A1 activity. *Placenta.* 2012 Dec;33(12):1045-51. doi: 10.1016/j.placenta.2012.09.008. Epub 2012 Oct 6. PMID: 23046808; PMCID: PMC3504187.
37. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):635-8. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006. PMID: 17320500.
38. van der Wijst MG, Rots MG. Mitochondrial epigenetics: an overlooked layer of regulation? *Trends Genet.* 2015 Jul;31(7):353-6
39. Cavalcante GC, Magalhães L, Ribeiro-Dos-Santos Â, Vidal AF. Mitochondrial Epigenetics: Non-Coding RNAs as a Novel Layer of Complexity. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 6;21(5):1838
40. Thorsell A, Nätt D. Maternal stress and diet may influence affective behavior and stress-response in offspring via epigenetic regulation of central peptidergic function. *Environ Epigenet.* 2016 Aug 20;2(3):dvw012. doi: 10.1093/eep/dvw012. PMID: 29492293; PMCID: PMC5804527.
41. Izquierdo V, Palomera-Ávalos V, Pallàs M, Griñán-Ferré C. Resveratrol Supplementation Attenuates Cognitive and Molecular Alterations under Maternal High-Fat Diet Intake: Epigenetic Inheritance over Generations. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 1;22(3):1453. doi: 10.3390/ijms22031453. Erratum in: *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 25;22(17): PMID: 33535619; PMCID: PMC7867164.

42. Urbonaite G, Knyzeliene A, Bunn FS, Smalskys A, Neniskyte U. The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. *Front Neurosci.* 2022 Jul 22;16:909762. doi: 10.3389/fnins.2022.909762. PMID: 35937892; PMCID: PMC9354026.
43. Tain YL, Hsu CN. Maternal High-Fat Diet and Offspring Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 25;23(15):8179. doi: 10.3390/ijms23158179. PMID: 35897755; PMCID: PMC9332200.
44. Vyskot B. Epigenetika. Univerzita Palackého v Olomouci. 2010; 16-24
45. Zheng X, Li Z, Wang G, Wang H, Zhou Y, Zhao X, Cheng CY, Qiao Y, Sun F. Sperm epigenetic alterations contribute to inter- and transgenerational effects of paternal exposure to long-term psychological stress via evading offspring embryonic reprogramming. *Cell Discov.* 2021 Oct 27;7(1):101
46. Fernandez-Twinn DS, Hjort L, Novakovic B, Ozanne SE, Saffery R. Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2019 Oct;62(10):1789-1801. doi: 10.1007/s00125-019-4951-9. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31451874; PMCID: PMC6731191.
47. Burton NO, Willis A, Fisher K, Braukmann F, Price J, Stevens L, Baugh LR, Reinke A, Miska EA. Intergenerational adaptations to stress are evolutionarily conserved, stress-specific, and have deleterious trade-offs. *Elife.* 2021 Oct 8;10:e73425
48. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol.* 2013;11(8):e1001631. doi: 10.1371/journal.pbio.1001631. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23976878; PMCID: PMC3747981.
49. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* 2016 Mar 22;6:23129. doi: 10.1038/srep23129. PMID: 27001291; PMCID: PMC4802384.
50. Hullar MA, Fu BC. Diet, the gut microbiome, and epigenetics. *Cancer J.* 2014 May-Jun;20(3):170-5. doi: 10.1097/PPO.000000000000053. PMID: 24855003; PMCID: PMC4267719.
51. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv Nutr.* 2019 Jan 1;10(suppl_1):S17-S30. doi: 10.1093/advances/nmy078. PMID: 30721960; PMCID: PMC6363528.
52. Franzago M, Fraticelli F, Stuppia L, Vitacolonna E. Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child. *Epigenetics.* 2019 Mar;14(3):215-235. doi: 10.1080/15592294.2019.1582277. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30865571; PMCID: PMC6557546.
53. Peluso M et al. White blood cell DNA adducts and fruit and vegetable consumption in bladder cancer. *Carcinogenesis.* 2000 Feb;21(2):183-
<http://carcin.oxfordjournals.org/content/21/2/183.full.pdf+html>
54. Palli D et al. Diet, metabolic polymorphisms and dna adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. *International journal of cancer.* 2000 Aug 1;87(3):444-51
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0215\(20000801\)87:3%3C444::AID-IJC21%3E3.0.CO;2-%23/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0215(20000801)87:3%3C444::AID-IJC21%3E3.0.CO;2-%23/epdf)
55. Vineis P. DNA adducts and the protective role of fruits and vegetables. *IARC scientific publications.* 2002;156:469-74. Review.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12484236>

56. Palli D et al. Biomarkers of dietary intake of micronutrients modulate DNA adduct levels in healthy adults. *Carcinogenesis*. 2003 Apr;24(4):739-46. <http://carcin.oxfordjournals.org/content/24/4/739.full.pdf>
57. Nilsson R et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in women from Poland, Serbia and Italy--relation between PAH metabolite excretion, DNA damage, diet and genotype (the EU DIEPHY project). *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2013 Mar;18(2):165-73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384313>
58. Duarte-Salles T, Mendez MA, Morales E, Bustamante M, Rodríguez-Vicente A, Kogevinas M, et al. Dietary benzo(a)pyrene and fetal growth: effect modification by vitamin C intake and glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Environ Int*. 2012;45:1–8.
59. Pedersen M et al. Environmental, dietary, maternal, and fetal predictors of bulky DNA adducts in cord blood: a European mother-child study (NewGeneris). *Environmental Health Perspectives* 2015 Apr;123(4):374-80.
60. Farmer PB. Carcinogen adducts: use in diagnosis and risk assessment. *Clinical chemistry* 1994 Jul;40(7 Pt 2):1438-43. <http://www.clinchem.org/content/40/7/1438.full.pdf>
61. Binkova B et al. DNA-adducts and atherosclerosis: a study of accidental and sudden death males in the Czech Republic. *Mutation research* 2002 Apr 25;501(1-2):115-28 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510702000192>
62. Dusinska M et al. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutation research* 2001 Oct 1;482(1-2):47-55., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535248>
63. Tang JJ et al. The common variant in the GSTM1 and GSTT1 genes is related to markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease: a case-only study. *Mol Biol Rep*. 2010 Jan;37(1):405-10. doi: 10.1007/s11033-009-9877-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19823950>
64. Gladys Block et al. Serum vitamin C and other biomarkers differ by genotype of phase 2 enzyme genes GSTM1 and GSTT1^{1,2,3} *The American Journal Clinical Nutrition*. 2011 Sep; 94(3): 929–937. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155929/pdf/ajcn9430929.pdf>
65. Viuff AC, Pedersen LH, Kyng K, Staunstrup NH, Børghlum A, Henriksen TB. Antidepressant medication during pregnancy and epigenetic changes in umbilical cord blood: a systematic review. *Clin Epigenetics*. 2016 Sep 7;8(1):94. doi: 10.1186/s13148-016-0262-x. PMID: 27610205; PMCID: PMC5015265.
66. Jahreis S, Trump S, Bauer M, Bauer T, Thürmann L, Feltens R, Wang Q, Gu L, Grützmann K, Röder S, Averbeck M, Weichenhan D, Plass C, Sack U, Borte M, Dubourg V, Schüürmann G, Simon JC, von Bergen M, Hackermüller J, Eils R, Lehmann I, Polte T. Maternal phthalate exposure promotes allergic airway inflammation over 2 generations through epigenetic modifications. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Feb;141(2):741-753. doi: 10.1016/j.jaci.2017.03.017. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28392331.
67. Gabbianelli R, Bordoni L, Morano S, Calleja-Agius J, Lalor JG. Nutri-Epigenetics and Gut Microbiota: How Birth Care, Bonding and Breastfeeding Can Influence and Be Influenced? *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 16;21(14):5032. doi: 10.3390/ijms21145032. PMID: 32708742; PMCID: PMC7404045.
68. Li Y, Pollock CA, Saad S. Aberrant DNA Methylation Mediates the Transgenerational Risk of Metabolic and Chronic Disease Due to Maternal Obesity and Overnutrition. *Genes (Basel)*. 2021 Oct 20;12(11):1653. doi: 10.3390/genes12111653. PMID: 34828259; PMCID: PMC8624316.

69. Goodrich JM, Sánchez BN, Dolinoy DC, Zhang Z, Hernández-Ávila M, Hu H, Peterson KE, Téllez-Rojo MM. Quality control and statistical modeling for environmental epigenetics: a study on in utero lead exposure and DNA methylation at birth. *Epigenetics*. 2015;10(1):19-30. doi: 10.4161/15592294.2014.989077. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25580720; PMCID: PMC4622744.
70. Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 2:14-20. doi: 10.1159/000371628. Epub 2015 Jun 2. PMID: 26045324.
71. Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, Reese SE, Markunas CA, Richmond RC, Xu CJ, Küpers L., DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):680-96. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.02.019. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27040690; PMCID: PMC4833289.
72. Fall CHD, Kumaran K. Metabolic programming in early life in humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019 Apr 15;374(1770):20180123. doi: 10.1098/rstb.2018.0123. PMID: 30966889; PMCID: PMC6460078.
73. Johnson NM, Hoffmann AR, Behlen JC, Lau C, Pendleton D, Harvey N, Shore R, Li Y, Chen J, Tian Y, Zhang R. Air pollution and children's health-a review of adverse effects associated with prenatal exposure from fine to ultrafine particulate matter. *Environ Health Prev Med*. 2021 Jul 12;26(1):72. doi: 10.1186/s12199-021-00995-5. PMID: 34253165; PMCID: PMC8274666.
74. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*. 2006 Aug;82(8):485-91. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001. Epub 2006 Jul 28. PMID: 16876341.
75. Chen X, Zhao D, Mao X, Xia Y, Baker PN, Zhang H. Maternal Dietary Patterns and Pregnancy Outcome. *Nutrients*. 2016 Jun 7;8(6):351. doi: 10.3390/nu8060351. PMID: 27338455; PMCID: PMC4924192.
76. Ji S, Zhou W, Li X, Liu S, Wang F, Li X, Zhao T, Ji G, Du J, Hao A. Maternal hyperglycemia disturbs neocortical neurogenesis via epigenetic regulation in C57BL/6J mice. *Cell Death Dis*. 2019 Mar 1;10(3):211. doi: 10.1038/s41419-019-1438-z. PMID: 30824686; PMCID: PMC6397163.
77. Gruzieva O, Xu CJ, Yousefi P, Relton C, Merid SK, Breton CV, Gao L, Volk HE, Feinberg JL, Ladd-Acosta C. Prenatal Particulate Air Pollution and DNA Methylation in Newborns: An Epigenome-Wide Meta-Analysis. *Environ Health Perspect*. 2019 May;127(5):57012. doi: 10.1289/EHP4522. Epub 2019 May 31. PMID: 31148503; PMCID: PMC6792178.
78. Jia Y, Li R, Cong R, Yang X, Sun Q, Parvizi N, Zhao R. Maternal low-protein diet affects epigenetic regulation of hepatic mitochondrial DNA transcription in a sex-specific manner in newborn piglets associated with GR binding to its promoter. *PLoS One*. 2013 May 14;8(5):e63855. doi: 10.1371/journal.pone.0063855. PMID: 23691106; PMCID: PMC3653849.
79. Rodríguez-Cano AM, Calzada-Mendoza CC, Estrada-Gutierrez G, Mendoza-Ortega JA, Perichart-Perera O. Nutrients, Mitochondrial Function, and Perinatal Health. *Nutrients*. 2020 Jul 21;12(7):2166. doi: 10.3390/nu12072166. PMID: 32708345; PMCID: PMC7401276.
80. Abbas A, Witte T, Patterson WL 3rd, Fahrman JF, Guo K, Hur J, Hardman WE, Georgel PT. Epigenetic Reprogramming Mediated by Maternal Diet Rich in Omega-3 Fatty Acids Protects From Breast Cancer Development in F1 Offspring. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 10;9:682593. doi: 10.3389/fcell.2021.682593. PMID: 34179012; PMCID: PMC8222782.
81. Agosti M, Tandoi F, Morlacchi L, Bossi A. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *Pediatr Med Chir*. 2017 Jun 28;39(2):157. doi: 10.4081/pmc.2017.157. PMID: 28673078

82. Oh DL, Jerman P, Silvério Marques S, Koita K, Purewal Boparai SK, Burke Harris N, Bucci M. Systematic review of pediatric health outcomes associated with childhood adversity. *BMC Pediatr.* 2018 Feb 23;18(1):83. doi: 10.1186/s12887-018-1037-7. PMID: 29475430; PMCID: PMC5824569.
83. Bellver J, Mariani G. Impact of parental over- and underweight on the health of offspring. *Fertil Steril.* 2019 Jun;111(6):1054-1064. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.02.128. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31036339.
84. Antoun E, Kitaba NT, Titcombe P, Dalrymple KV, Garratt ES, Barton SJ, Murray R, Seed PT, Holbrook JD, Kobor MS, Lin DT, Maclsaac JL, Burdge GC, White SL, Poston L, Godfrey KM, Lillycrop KA; UPBEAT Consortium. Maternal dysglycaemia, changes in the infant's epigenome modified with a diet and physical activity intervention in pregnancy: Secondary analysis of a randomised control trial. *PLoS Med.* 2020 Nov 5;17(11):e1003229. doi: 10.1371/journal.pmed.1003229. PMID: 33151971; PMCID: PMC7643947.
85. Acevedo N, Alashkar Alhamwe B, Caraballo L, Ding M, Ferrante A, Garn H, Garssen J, Hii CS, Irvine J, Llinás-Caballero K, López JF, Miethe S, Perveen K, Pogge von Strandmann E, Sokolowska M, Potaczek DP, van Esch BCAM. Perinatal and Early-Life Nutrition, Epigenetics, and Allergy. *Nutrients.* 2021 Feb 25;13(3):724. doi: 10.3390/nu13030724. PMID: 33668787; PMCID: PMC7996340.
86. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB journal.* 1998 Aug;12(11):949-5 <http://www.fasebj.org/content/12/11/949.full.pdf>
87. van den Veyver IB Genetic effects of methylation diets. *Annual review of nutrition.* 2002;22:255-82 <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102932>
88. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology.* 2003 Aug;23(15):5293-300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165709/pdf/0019.pdf>
89. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition.* 2004 Jan;20(1):63-8. [http://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007\(03\)00215-6/abstract](http://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007(03)00215-6/abstract)
90. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environmental health perspectives.* 2006 Apr;114(4):567-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1440782/pdf/ehp0114-000567.pdf>
91. Green BB, Marsit CJ. Select Prenatal Environmental Exposures and Subsequent Alterations of Gene-Specific and Repetitive Element DNA Methylation in Fetal Tissues. *Current environmental health reports.* 2015 Jun;2(2):126-36. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40572-015-0045-0>
92. Vanhees K et al. Maternal intake of quercetin during gestation alters ex vivo benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation in adult offspring. *Mutagenesis.* 2012 Jul;27(4):445-51. <http://mutage.oxfordjournals.org/content/27/4/445.full.pdf>
93. Danielewicz H, Myszczyzyn G, Dębińska A, Myszkal A, Boznański A, Hirnle L. Diet in pregnancy-more than food. *Eur J Pediatr.* 2017 Dec;176(12):1573-1579. doi: 10.1007/s00431-017-3026-5. Epub 2017 Nov 3. PMID: 29101450; PMCID: PMC5682869
94. Adamu HA, Imam MU, Ooi DJ, Esa NM, Rosli R, Ismail M. Perinatal exposure to germinated brown rice and its gamma amino-butyric acid-rich extract prevents high fat diet-induced insulin resistance in first generation rat offspring. *Food Nutr Res.* 2016 Feb 2;60:30209. doi: 10.3402/fnr.v60.30209. PMID: 26842399; PMCID: PMC4740094.

95. Desai M, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. *Appetite*. 2016 Apr 1;99:193-9.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666316300228>
96. Casas-Agustench P, Iglesias-Gutiérrez E, Dávalos A Mother's nutritional miRNA legacy: Nutrition during pregnancy and its possible implications to develop cardiometabolic disease in later life. *Pharmacological research* 2015 Oct;100:322-34.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661815001851>
97. Jacometo CB et al. Maternal consumption of organic trace minerals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress. *Journal of dairy science*. 2015 Nov;98(11):7717-29
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00612-8/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00612-8/abstract)
98. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005 Jun 3;308(5727):1466-9.
<http://science.sciencemag.org/content/308/5727/1466.full.pdf+html>
99. Josep C. Jimenez-Chillaron et.al. Intergenerational Transmission of Glucose Intolerance and Obesity by In Utero Undernutrition in Mice. *Diabetes*. 2009 Feb; 58(2): 460–468.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2628621/pdf/460.pdf>
100. Hanafi MY, Saleh MM, Saad MI, Abdelkhalek TM, Kamel MA. Transgenerational effects of obesity and malnourishment on diabetes risk in F2 generation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016 Jan;412(1-2):269-80.
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11010-015-2633-6>
101. Claycombe KJ, Decreased beige adipocyte number and mitochondrial respiration coincide with increased histone methyl transferase (G9a) and reduced FGF21 gene expression in Sprague-Dawley rats fed prenatal low protein and postnatal high-fat diets. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2016 May;31:113-21.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316000395>
102. Igor Koturbash et al. Epigenetic Mechanisms of Mouse Interstrain Variability in Genotoxicity of the Environmental Toxicant 1,3-Butadiene. *Toxicological science*. 2011 Aug; 122(2): 448–456
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155089/pdf/kfr133.pdf>
103. Chu FF et al. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer research*. 2004 Feb 1;64(3):962-8.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/3/962.full.pdf>
104. Sivan A et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1084-9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4873287/pdf/nihms781960.pdf>
105. Ettinger G, Macdonald K, Reid G, Burton JP The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes*. 2014; 5(6): 719–728.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615746/pdf/kgmi-05-06-983775.pdf>
106. Griffin JL, Phil D, X, Phd, Stanley E. Does Our Gut Microbiome Predict Cardiovascular Risk? A Review of the Evidence from Metabolomics *Circulation. Cardiovascular Genetics*. 2015 Feb; 8(1): 187–191.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4333723/pdf/nihms648559.pdf>
107. Hansen TH, Gøbel RJ, Hansen T, Pedersen O. The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome medicine* 2015 Mar 31;7(1):33
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378584/pdf/13073_2015_Article_157.pdf

108. Cani PD et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1470-81. <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/diabetes/57/6/1470.full.pdf>
109. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013 Dec;28 Suppl 4:9-17. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jgh.12294/epdf>
110. Nastasi C et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Scientific reports* 2015 Nov 6;5:16148. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635422/pdf/srep16148.pdf>
111. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *PNAS*. 2014 Feb 11;111(6):2247-52. <http://www.pnas.org/content/111/6/2247.full.pdf>
112. Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC, Roeselers G. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. *mBio*. 2014 Aug 12;5(4):e01438-14. doi: 10.1128/mBio.01438-14. PMID: 25118238; PMCID: PMC4145684.
113. Dai Z, Wu Z, Hang S, Zhu W, Wu G. Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction. *Molecular human reproduction*. 2015 May;21(5):389-409. <http://molehr.oxfordjournals.org/content/21/5/389.full.pdf>
114. Gohir W et al. Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptual diet. *Gut Microbes* 2015 Aug;6(5):310-20. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19490976.2015.1086056?journalCode=kgmi20>
115. Astbury S, Mostyn A, Symonds ME, Bell RC. Nutrient availability, the microbiome, and intestinal transport during pregnancy. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*. 2015 Nov;40(11):1100-6. http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/apnm-2015-0117?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.V06bIDWLTIU
116. Romano-Keeler J, Weitkamp JH. Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. *Pediatric research* 2015 Jan;77(1-2):189-95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4289016/pdf/nihms646913.pdf>
117. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends in molecular medicine*. 2015 Feb;21(2):109-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464665/pdf/nihms695563.pdf>
118. Moon C et al. Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature*. 2015 May 7;521(7550):90-3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4425643/pdf/nihms-646815.pdf>
119. van Best N, Hornef MW, Savelkoul PH, Penders J. On the origin of species: Factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 2015 Dec;105(4):240-51. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdrc.21113/epdf>

120. Wright ML, Starkweather AR. Antenatal Microbiome: Potential Contributor to Fetal Programming and Establishment of the Microbiome in Offspring. *Nursing research* 2015 Jul-Aug;64(4):306-19.
<http://journals.lww.com/nursingresearchonline/pages/articleviewer.aspx?year=2015&issue=07000&article=00010&type=abstract>
121. Bouchaud G et al. Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy*. 2016 Jan;71(1):68-76.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12777/epdf>
122. Wallace JG, Gohir W, Sloboda DM The impact of early life gut colonization on metabolic and obesogenic outcomes: what have animal models shown us? *Journal of developmental origins of health and disease* 2016 Feb;7(1):15-24.
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=10076040&fileId=S2040174415001518>
123. Kozyrskyj AL, Kalu R, Koleva PT, Bridgman SL Fetal programming of overweight through the microbiome: boys are disproportionately affected. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2016 Feb;7(1):25-34.
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=10075992&fileId=S2040174415001269>
124. Zheng J et al. The programming effects of nutrition-induced catch-up growth on gut microbiota and metabolic diseases in adult mice. *Microbiologyopen*. 2016 Apr;5(2):296-306.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.328/epdf>
125. Soderborg TK, Borengasser SJ, Barbour LA, Friedman JE. Microbial transmission from mothers with obesity or diabetes to infants: an innovative opportunity to interrupt a vicious cycle. *Diabetologia*. 2016 May;59(5):895-906
126. Tochitani S et al. Administration of Non-Absorbable Antibiotics to Pregnant Mice to Perturb the Maternal Gut Microbiota Is Associated with Alterations in Offspring Behavior. *PLoS One*. 2016 Jan 20;11(1):e0138293
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4720425/pdf/pone.0138293.pdf>
127. Aye IL, Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth. *PNAS* 2015 Oct 13;112(41):12858-63
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4611638/pdf/pnas.201515484.pdf>
128. Cerf ME, Herrera E. High Fat Diet Administration during Specific Periods of Pregnancy Alters Maternal Fatty Acid Profiles in the Near-Term Rat. *Nutrients*. 2016 Jan 4;8(1).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728639/pdf/nutrients-08-00025.pdf>
129. Rebelato HJ, Esquisatto MA, de Sousa Righi EF, Catisti R. Gestational protein restriction alters cell proliferation in rat placenta. *Journal of molecular histology* 2016 Apr;47(2):203-11.
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10735-016-9660-9>
130. Jones HN et al. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB journal* 2009 Jan;23(1):271-8.
<http://www.fasebj.org/content/23/1/271.full.pdf>
131. Thornburg KL, Marshall N. The placenta is the center of the chronic disease universe. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S14-20.
[http://www.ajog.org/article/S0002-9378\(15\)00896-0/pdf](http://www.ajog.org/article/S0002-9378(15)00896-0/pdf)

132. Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology*. 2012;102(3):178-84. <http://www.karger.com/Article/Abstract/339182>
133. Longtine MS, Nelson DM. Placental dysfunction and fetal programming: the importance of placental size, shape, histopathology, and molecular composition. *Seminars in reproductive medicine* 2011 May;29(3):187-96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3682832/pdf/nihms469738.pdf>
VIEAU D et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Aug;32 Suppl 1:S16-20. [http://www.psyneuen-journal.com/article/S0306-4530\(07\)00128-X/pdf](http://www.psyneuen-journal.com/article/S0306-4530(07)00128-X/pdf)
134. Vieau D et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Aug;32 Suppl 1:S16-20. [http://www.psyneuen-journal.com/article/S0306-4530\(07\)00128-X/pdf](http://www.psyneuen-journal.com/article/S0306-4530(07)00128-X/pdf)
135. Lim JJ, Dutta M, Dempsey JL, Lehmler HJ, MacDonald J, Bammler T, Walker C, Kavanagh TJ, Gu H, Mani S, Cui JY. Neonatal Exposure to BPA, BDE-99, and PCB Produces Persistent Changes in Hepatic Transcriptome Associated With Gut Dysbiosis in Adult Mouse Livers. *Toxicol Sci*. 2021 Oct 27;184(1):83-103. doi: 10.1093/toxsci/kfab104. PMID: 34453844; PMCID: PMC8557404.
136. Maurice C, Dalvai M, Lambrot R, Deschênes A, Scott-Boyer MP, McGraw S, Chan D, Côté N, Ziv-Gal A, Flaws JA, Droit A, Trasler J, Kimmins S, Bailey JL. Early-Life Exposure to Environmental Contaminants Perturbs the Sperm Epigenome and Induces Negative Pregnancy Outcomes for Three Generations via the Paternal Lineage. *Epigenomes*. 2021 May 1;5(2):10. doi: 10.3390/epigenomes5020010. PMID: 34968297; PMCID: PMC8594730.
137. Lim JJ, Dutta M, Dempsey JL, Lehmler HJ, MacDonald J, Bammler T, Walker C, Kavanagh TJ, Gu H, Mani S, Cui JY. Neonatal Exposure to BPA, BDE-99, and PCB Produces Persistent Changes in Hepatic Transcriptome Associated With Gut Dysbiosis in Adult Mouse Livers. *Toxicol Sci*. 2021 Oct 27;184(1):83-103. doi: 10.1093/toxsci/kfab104. PMID: 34453844; PMCID: PMC8557404.
138. Singh V, Cortes-Ramirez J, Toms LM, Sooriyagoda T, Karatela S. Effects of Polybrominated Diphenyl Ethers on Hormonal and Reproductive Health in E-Waste-Exposed Population: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jun 25;19(13):7820. doi: 10.3390/ijerph19137820. PMID: 35805479; PMCID: PMC9265575.
139. Kim S, Cho YH, Won S, Ku JL, Moon HB, Park J, Choi G, Kim S, Choi K. Maternal exposures to persistent organic pollutants are associated with DNA methylation of thyroid hormone-related genes in placenta differently by infant sex. *Environ Int*. 2019 Sep;130:104956. doi: 10.1016/j.envint.2019.104956. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31272017.
140. Ouidir M, Mendola P, Buck Louis GM, Kannan K, Zhang C, Tekola-Ayele F. Concentrations of persistent organic pollutants in maternal plasma and epigenome-wide placental DNA methylation. *Clin Epigenetics*. 2020 Jul 11;12(1):103. doi: 10.1186/s13148-020-00894-6. PMID: 32653021; PMCID: PMC7371466.
141. Johanson SM, Swann JR, Umu ÖCO, Aleksandersen M, Müller MHB, Berntsen HF, Zimmer KE, Østby GC, Paulsen JE, Ropstad E. Maternal exposure to a human relevant mixture of persistent organic pollutants reduces colorectal carcinogenesis in A/J Min/+ mice. *Chemosphere*. 2020 Aug;252:126484. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126484. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32199166.
142. <https://www.kaloricketabulky.cz/>
143. Brazdova, Z. 2004. Nutrition of pregnant and lactating women: a guide.2. vyd. Brno: Department of Preventive Medicine MU. ISBN 80-901-4277-X

144. Pavlikova J, Ambroz A, Honkova K, Chvojkova I, Sram RJ, Rossner P Jr, Topinka J, Gramblicka T, Parizek O, Parizkova D, Schmuczerova J, Pulkrabova J, Rossnerova A. Maternal Diet Quality and the Health Status of Newborns. *Foods*. 2022 Dec 2;11(23):3893. doi: 10.3390/foods11233893. PMID: 36496701; PMCID: PMC9739031.
145. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215. PMID: 3344216; PMCID: PMC334765.
146. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Dijk S, Muhlhausler B, Stirzaker C, Clark SJ. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol*. 2016 Oct 7;17(1):208. doi: 10.1186/s13059-016-1066-1. PMID: 27717381; PMCID: PMC5055731.
147. Skopalová, Lenka. Využití metylací DNA při studiu historických populací a ve forenzní praxi [online]. Brno, 2020 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/tlqxc/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Dana FIALOVÁ.
148. <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/missMethyl/inst/doc/missMethyl.html#testing-for-differential-methylation-using-limma>
149. <https://shapeist.cz/whtr-kalkulacka-pomer-obvodu-pasu-a-vysky/>
150. Butte NF, King JC. Energy requirements during pregnancy and lactation. *Public health nutrition* 2005 Oct;8(7A):1010-27. http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FPHN%2FPHN8_7a%2FS136898000500131Xa.pdf&code=e526492b7c2dff9e892e95a86818a91c
151. EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010; 8(3):1462 [77 pp.] http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1462.pdf
152. EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal* 2012;10(2):2557 [66 pp.]. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2557.pdf
153. European Food Safety Authority; Outcome of the Public consultation on the Draft Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, Nutrition, and Allergies (NDA) on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010; 8(5):1508. [61 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1508. Available online: www.efsa.europa.eu
154. EFSA Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol *EFSA Journal* 2010; 8(3):1461 [107 pp.] http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1461.pdf
155. Godfrey KM, Cutfield W, Chan SY, Baker PN, Chong YS; NiPPeR Study Group. Nutritional Intervention Preconception and During Pregnancy to Maintain Healthy Glucose Metabolism and Offspring Health ("NiPPeR"): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017 Mar 20;18(1):131. doi: 10.1186/s13063-017-1875-x. PMID: 28320484; PMCID: PMC5359891.
156. Bellver J, Mariani G. Impact of parental over- and underweight on the health of offspring. *Fertil Steril*. 2019 Jun;111(6):1054-1064. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.02.128. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31036339.
157. Li Y, Pollock CA, Saad S. Aberrant DNA Methylation Mediates the Transgenerational Risk of Metabolic and Chronic Disease Due to Maternal Obesity and Overnutrition. *Genes (Basel)*. 2021 Oct 20;12(11):1653. doi: 10.3390/genes12111653. PMID: 34828259; PMCID: PMC8624316.

158. Marshall NE, Abrams B, Barbour LA, Catalano P, Christian P, Friedman JE, Hay WW Jr, Hernandez TL, Krebs NF, Oken E, Purnell JQ, Roberts JM, Soltani H, Wallace J, Thornburg KL. The importance of nutrition in pregnancy and lactation: lifelong consequences. *Am J Obstet Gynecol.* 2022 May;226(5):607-632. doi: 10.1016/j.ajog.2021.12.035. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34968458; PMCID: PMC9182711.
159. Barker DJ, Thornburg KL. The obstetric origins of health for a lifetime. *Clin Obstet Gynecol.* 2013 Sep;56(3):511-9. doi: 10.1097/GRF.0b013e31829cb9ca. PMID: 23787713.
160. Pavlikova J, Ambroz A, Honkova K, Chvojikova I, Sram RJ, Rossner P Jr, Topinka J, Gramblicka T, Parizek O, Parizkova D, Schmuczerova J, Pulkrabova J, Rossnerova A. Maternal Diet Quality and the Health Status of Newborns. *Foods.* 2022 Dec 2;11(23):3893. doi: 10.3390/foods11233893. PMID: 36496701; PMCID: PMC9739031.
161. Jitka Pavlíková, David Brebera, Radim J. Šrám, QUALITY OF DIET IN PREGNANT MOTHERS IN TWO DIFFERENT REGIONS, *Journal of Nursing, Social Studies, Public Health and Rehabilitation* » 2018 » num.1-2
162. Cerná M, Malý M, Grabic R, Batáriová A, Smíd J, Benes B. Serum concentrations of indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere.* 2008 Jul;72(8):1124-31. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.019. Epub 2008 Jun 10. PMID: 18547604.
163. EPA. ATSDR. 2016. Agency for toxic substances and disease registry - case studies in environmental medicine. PCBs toxicity. 2016.
164. <http://czvp.szu.cz/monitor/tds13c/63%20NDL-PCB.pdf>
165. Phillips MC, Dheer R, Santaolalla R, Davies JM, Burgueño J, Lang JK, Toborek M, Abreu MT. Intestinal exposure to PCB 153 induces inflammation via the ATM/NEMO pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018 Jan 15;339:24-33. doi: 10.1016/j.taap.2017.11.027. Epub 2017 Nov 29. PMID: 29197519; PMCID: PMC6021014.
166. Caspersen IH, Knutsen HK, Brantsæter AL, Haugen M, Alexander J, Meltzer HM, Kvalem HE. Dietary exposure to dioxins and PCBs in a large cohort of pregnant women: results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Environ Int.* 2013 Sep;59:398-407. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.001. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23911340.
167. Ramírez-Elías, M. , Córdova-Quiroz, A. , Cerón-Bretón, J. , Cerón-Bretón, R. , Osten, J. and Cortés-Simón, J. (2016) Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT) and Endosulfan in Sediments of Sabancuy Lagoon, Campeche, Mexico. *Open Journal of Ecology*, 6, 22-31. doi: 10.4236/oje.2016.61003.
168. Woldetsadik D, Simon MP, Knuth D, Hailu H, Gebresilassie A, Dejen A, Düring RA. Exposure to DDT and HCH congeners and associated potential health risks through khat (*Catha edulis*) consumption among adults in South Wollo, Ethiopia. *Environ Geochem Health.* 2021 Sep;43(9):3597-3613. doi: 10.1007/s10653-021-00846-w. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33594639; PMCID: PMC7886647.
169. <http://www.szu.cz/uploads/CZVP/organika.pdf>
170. Kirman CR, Aylward LL, Hays SM, Krishnan K, Nong A. Biomonitoring equivalents for DDT/DDE. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011 Jul;60(2):172-80. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.03.012. Epub 2011 Apr 3. PMID: 21466830.
171. Tang M, Zhao M, Zhou S, Chen K, Zhang C, Liu W. Assessing the underlying breast cancer risk of Chinese females contributed by dietary intake of residual DDT from agricultural soils. *Environ Int.* 2014 Dec;73:208-15. doi: 10.1016/j.envint.2014.08.001. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25160079.

172. Logerova H, Tuma P, Stupak M, Pulkrabova J, Dlouha P. Evaluation of the burdening on the Czech population by brominated flame retardants. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Oct 24;16(21):4105. doi: 10.3390/ijerph16214105. PMID: 31653098; PMCID: PMC6862665.
173. Schecter A, Päpke O, Harris TR, Tung KC, Musumba A, Olson J, Birnbaum L. Polybrominated difenylether (PBDE) levels in an expanded market basket survey of U.S. food and estimated PBDE dietary intake by age and sex. *Environ Health Perspect*. 2006 Oct;114(10):1515-20. doi: 10.1289/ehp.9121. PMID: 17035135; PMCID: PMC1626425.
174. Bedi M, von Goetz N, Ng C. Estimating polybrominated difenylether (PBDE) exposure through seafood consumption in Switzerland using international food trade data. *Environ Int*. 2020 May;138:105652. doi: 10.1016/j.envint.2020.105652. Epub 2020 Mar 21. PMID: 32208188.
175. Schecter A, Haffner D, Colacino J, Patel K, Päpke O, Opel M, Birnbaum L. Polybrominated difenylethers (PBDEs) and hexabromocyclodekan (HBCD) in composite U.S. food samples. *Environ Health Perspect*. 2010 Mar;118(3):357-62. doi: 10.1289/ehp.0901345. Epub 2009 Oct 28. PMID: 20064778; PMCID: PMC2854763.
176. Roosens L, Abdallah MA, Harrad S, Neels H, Covaci A. Exposure to hexabromocyclododekans (HBCDs) via dust ingestion, but not diet, correlates with concentrations in human serum: preliminary results. *Environ Health Perspect*. 2009 Nov;117(11):1707-12. doi: 10.1289/ehp.0900869. Epub 2009 Jul 13. PMID: 20049121; PMCID: PMC2801203.
177. Darnerud PO. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ Int*. 2003 Sep;29(6):841-53. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00107-7. PMID: 12850100.
178. <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/perfluorovane-a-polyfluorovane-latky-pfas>
179. Pasecnaja E, Bartkevics V, Zacs D. Occurrence of selected per- and polyfluorinated alkyl substances (PFASs) in food available on the European market - A review on levels and human exposure assessment. *Chemosphere*. 2022 Jan;287(Pt 4):132378. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132378. Epub 2021 Sep 27. PMID: 34592212.
180. Abraham K, El-Khatib AH, Schwerdtle T, Monien BH. Perfluorobutanoic acid (PFBA): No high-level accumulation in human lung and kidney tissue. *Int J Hyg Environ Health*. 2021 Aug;237:113830. doi: 10.1016/j.ijheh.2021.113830. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34450542.
181. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, Del Mazo J, Grasl-Kraupp B et al. Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA J*. 2020 Sep 17;18(9):e06223. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6223. PMID: 32994824; PMCID: PMC7507523.
182. Hill NI, Becanova J, Lohmann R. A sensitive method for the detection of legacy and emerging per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in dairy milk. *Anal Bioanal Chem*. 2022 Jan;414(3):1235-1243. doi: 10.1007/s00216-021-03575-2. Epub 2021 Aug 5. PMID: 34355253; PMCID: PMC8727491.)
183. Schreiberova M, Skachova H, Vlasakova L. Air quality in the Czech Republic in 2020 Preliminary evaluation II. part Evaluation of concentrations of benzo[a]pyrene, benzene and heavy metals (As, Cd, Ni, Pb), CHMI, 10. 5. 2021 [in Czech].
Web: https://www.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/interaktivni/zpravy/2021-04_manualniStanice2020/#chapter6
184. Hladky D, Volna V, Krejci B. Evaluation of measurements at monitoring stations Vernovice and Mizerov in 2020, CHMI, 31. 3. 2021 [in Czech].
https://www.chmi.cz/files/portal/docs/poboc/OS/OCO/prehledy/mizerov_vernovice/zprava_MSK_2020.pdf

185. Commission Regulation (EU) 2020/1255 of 7 September 2020, Official Journal of the European Union, 8.9.2020, L 293/1 Web: <http://data.europa.eu/eli/reg/2020/1255/oj>.
186. Benford D, Dinovi M, Setzer RW. Application of the margin-of-exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic e.g.: benzo[a]pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jan;48 Suppl 1:S42-8. doi: 10.1016/j.fct.2009.09.039. Epub 2009 Oct 8. PMID: 19818825.
187. Zheng Z, Park JK, Kwon OW, Ahn SH, Kwon YJ, Jiang L, Zhu S, Park BH. The Risk of Gastrointestinal Cancer on Daily Intake of Low-Dose BaP in C57BL/6 for 60 Days. *J Korean Med Sci.* 2022 Aug 1;37(30):e235. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e235. PMID: 35916047; PMCID: PMC9344036.)
188. Markunas CA, Wilcox AJ, Xu Z, Joubert BR, Harlid S, Panduri V, Håberg SE, Nystad W, London SJ, Sandler DP, Lie RT, Wade PA, Taylor JA. Maternal Age at Delivery Is Associated with an Epigenetic Signature in Both Newborns and Adults. *PLoS One.* 2016 Jul 6;11(7):e0156361. doi: 10.1371/journal.pone.0156361. PMID: 27383059; PMCID: PMC4934688.
189. Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, Nyirenda M, Jaddoe VW, Eriksson JG, Broekman BF. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Jan;5(1):53-64. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30107-3. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27743978; PMCID: PMC5245733.
190. Agarwal P, Morriveau TS, Kereliuk SM, Doucette CA, Wicklow BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018 Mar;55(2):71-101. doi: 10.1080/10408363.2017.1422109. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29308692.
191. Chen Q, Ming Y, Gan Y, Huang L, Zhao Y, Wang X, Liu Y, Zhang J. The impact of cesarean delivery on infant DNA methylation. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021 Mar 30;21(1):265. doi: 10.1186/s12884-021-03748-y. PMID: 33785011; PMCID: PMC8011183.
192. Honkova K. Epigenetic alterations in genome-wide DNA methylation in newborns from air-polluted industrial locality (in preparation)
193. Stephenson J, Heslehurst N, Hall J, Schoenaker DAJM, Hutchinson J, Cade JE, Poston L, Barrett G, Crozier SR, Barker M, Kumaran K, Yajnik CS, Baird J, Mishra GD. Before the beginning: nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health. *Lancet.* 2018 May 5;391(10132):1830-1841. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30311-8. Epub 2018 Apr 16. Erratum in: *Lancet.* 2018 May 5;391(10132):1774. PMID: 29673873; PMCID: PMC6075697.
194. Huen K, Yousefi P, Bradman A, Yan L, Harley KG, Kogut K, Eskenazi B, Holland N. Effects of age, sex, and persistent organic pollutants on DNA methylation in children. *Environ Mol Mutagen.* 2014 Apr;55(3):209-22. doi: 10.1002/em.21845. Epub 2013 Dec 26. PMID: 24375655; PMCID: PMC4410811.
195. Leung YK, Ouyang B, Niu L, Xie C, Ying J, Medvedovic M, Chen A, Weihe P, Valvi D, Grandjean P, Ho SM. Identification of sex-specific DNA methylation changes driven by specific chemicals in cord blood in a Faroese birth cohort. *Epigenetics.* 2018;13(3):290-300. doi: 10.1080/15592294.2018.1445901. Epub 2018 May 16. PMID: 29560787; PMCID: PMC5997167.
196. Lim JJ, Dutta M, Dempsey JL, Lehmler HJ, MacDonald J, Bammler T, Walker C, Kavanagh TJ, Gu H, Mani S, Cui JY. Neonatal Exposure to BPA, BDE-99, and PCB Produces Persistent Changes in Hepatic Transcriptome Associated With Gut Dysbiosis in Adult Mouse Livers. *Toxicol Sci.* 2021 Oct 27;184(1):83-103. doi: 10.1093/toxsci/kfab104. PMID: 34453844; PMCID: PMC8557404.
197. Ma RC, Tutino GE, Lillycrop KA, et al. Maternal diabetes, gestational diabetes and the role of epigenetics in their long term effects on offspring. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015;118:55–68.

198. Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, Nyirenda M, Jaddoe VW, Eriksson JG, Broekman BF. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Jan;5(1):53-64. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30107-3. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27743978; PMCID: PMC5245733.
199. Agarwal P, Morriveau TS, Kereliuk SM, Doucette CA, Wicklow BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018 Mar;55(2):71-101. doi: 10.1080/10408363.2017.1422109. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29308692.
200. Franzago M, Fraticelli F, Stuppia L, Vitacolonna E. Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child. *Epigenetics.* 2019 Mar;14(3):215-235. doi: 10.1080/15592294.2019.1582277. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30865571; PMCID: PMC6557546.
201. Monasso GS, Voortman T, Felix JF. Maternal plasma fatty acid patterns in mid-pregnancy and offspring epigenetic gestational age at birth. *Epigenetics.* 2022 Nov;17(11):1562-1572. doi: 10.1080/15592294.2022.2076051. Epub 2022 May 17. PMID: 35581922; PMCID: PMC9586633.
202. Huen K, Yousefi P, Bradman A, Yan L, Harley KG, Kogut K, Eskenazi B, Holland N. Effects of age, sex, and persistent organic pollutants on DNA methylation in children. *Environ Mol Mutagen.* 2014 Apr;55(3):209-22. doi: 10.1002/em.21845. Epub 2013 Dec 26. PMID: 24375655; PMCID: PMC4410811.
203. BMC Genomics 2016 Nov 25;17(1):976. doi: 10.1186/s12864-016-3310-1 Maternal smoking impacts key biological pathways in newborns through epigenetic modification in Utero Daniel M Rotroff 1 2, Bonnie R Joubert 3, Skylar W Marvel 1, Siri E Håberg 4, Michael C Wu 5, Roy M Nilsen 6, Per M Ueland 7 8, Wenche Nystad 4, Stephanie J London 9, Alison Motsinger-Reif 1 2 10 PMID: 27887572 PMCID: PMC5124223 DOI: 10.1186/s12864-016-3310-1
204. Song AY, Feinberg JI, Bakulski KM, Croen LA, Fallin MD, Newschaffer CJ, Hertz-Picciotto I, Schmidt RJ, Ladd-Acosta C, Volk HE. Prenatal Exposure to Ambient Air Pollution and Epigenetic Aging at Birth in Newborns. *Front Genet.* 2022 Jun 28;13:929416. doi: 10.3389/fgene.2022.929416. PMID: 35836579; PMCID: PMC9274082.
205. PFOS and PFOA in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality 29 September 2022 Version for public review

PROHLÁŠENÍ O PODÍLU ČINNOSTI

Prohlašuji, že Jitka Pavlíková zpracovala a vyhodnotila data získaná z mateřských záznamů a vzorků stravy. V laboratoři prováděla bisulfidickou konverzi DNA z buněk pupečnickové krve, částečně se podílela i na izolaci této DNA a její hybridizaci na čípech. Následně provedla vyhodnocení metylačních dat a jejich diferenciací analýzu ve vztahu k mateřské stravě.

RNDr. Pavel Rössner Jr., Ph.D.