

امضای مولتی اومیکس از اکسپوزوم انسان در اوایل زندگی

چکیده

برخورد با عوامل محیطی در اوایل زندگی نقش مهمی در سلامت طول زندگی ایفا می‌کند، با این حال فنوتیپ‌های مولکولی‌ای که تحت اثرات محیطی هستند، به خوبی شناخته شده نیستند. ما در پروژه اکسپوزوم اولیه زندگی انسان (HELIX)، ارتباط اکسپوزوم فردی متشکل از بیش از ۱۰۰ مواجهه شیمیایی، فضای باز، اجتماعی و سبک زندگی در دوران بارداری و کودکی را با پروفایل مولتی اومیکس بررسی می‌کنیم. ما ۱۱۷۰ ارتباط را شناسایی کردیم که ۲۴۹ مورد آن در بارداری و ۹۲۱ در دوران کودکی بود و پاسخ‌های بیولوژیکی بالقوه را نشان می‌دادند. اثرات محیطی زمان بارداری، از جمله سیگار کشیدن مادر، کادمیوم و مولیبدن، عمدتاً با تغییرات متیلاسیون DNA کودک مرتبط است. در مقابل، اثرات محیطی دوران کودکی با ویژگی‌هایی در تمام لایه‌های omics مرتبط است. منبع جامع و منحصربه‌فرد ما از همه ارتباطات (<https://helixomics.isglobal.org>) برای هدایت تحقیقات آینده در مورد آثار بیولوژیکی اکسپوزوم اولیه زندگی مفید خواهد بود.

مقدمه

اگرچه سهم محیطی در ریسک بیماری ۹۰-۷۰ درصد تخمین زده می‌شود، بخش بزرگی از عوامل خطرزای محیطی ناشناخته باقی مانده یا به خوبی تعریف نشده‌اند. بیش از یک دهه پیش، اصطلاح "اکسپوزوم" ابداع شد تا تمام عوامل محیطی (یعنی عوامل غیر ژنتیکی) را که انسان در طول زندگی در معرض آن‌ها قرار می‌گیرد، در بر بگیرد. از نظر تاریخی، مطالعات بهداشت محیطی تقریباً به طور انحصاری بر روی عواملی مانند آلودگی هوا، سرب



طاهره مهدی زاده^۱

۱-کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی بیومتریال، دانشگاه مازنجان

رویان، مازندران، ایران

پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن



دود تنباکو بیشترین بررسی را دارد. تا حدی کمتر، سایر مواجهه‌های مختلف، از فلزات و آلودگی هوا گرفته تا عوامل اجتماعی-اقتصادی، با متیلاسیون مرتبط هستند و در پایگاه‌های داده عمومی فهرست‌بندی شده‌اند (<http://www.ewascatalog.org>). اگرچه علائم اپی‌ژنتیک، رونویسی ژن و در نتیجه پروتئوم را تنظیم می‌کند، رابطه‌ی بین آنها و اکسپوزوم کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. متابولوم، که می‌تواند پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالیت میکروبیوم، و همچنین درونی‌سازی مستقیم مواجهه‌ها را منعکس کند، در تحقیقات اکسپوزومی مورد توجه ویژه قرار گرفته است. در این کار، هدف ما این بود که ارتباط اکسپوزوم اولیه زندگی را که در ۱۳۰۱ جفت مادر-کودک پرژه‌ی HELIX اندازه‌گیری شد، با داده‌های فنوتیپ مولکولی عمیق ارزیابی شده در دوران کودکی را بررسی کنیم. با مستندسازی سیستماتیک همه ارتباط بین اکسپوزوم و فنوتیپ‌های مولکولی، ما منبع منحصر به فردی (<https://helixomics.isglobal.org>) برای شناسایی بیومارکرهای جدید و اثرات بیولوژیکی اولیه در طول دوره‌های زندگی آسیب‌پذیر فراهم کردیم.

نتایج

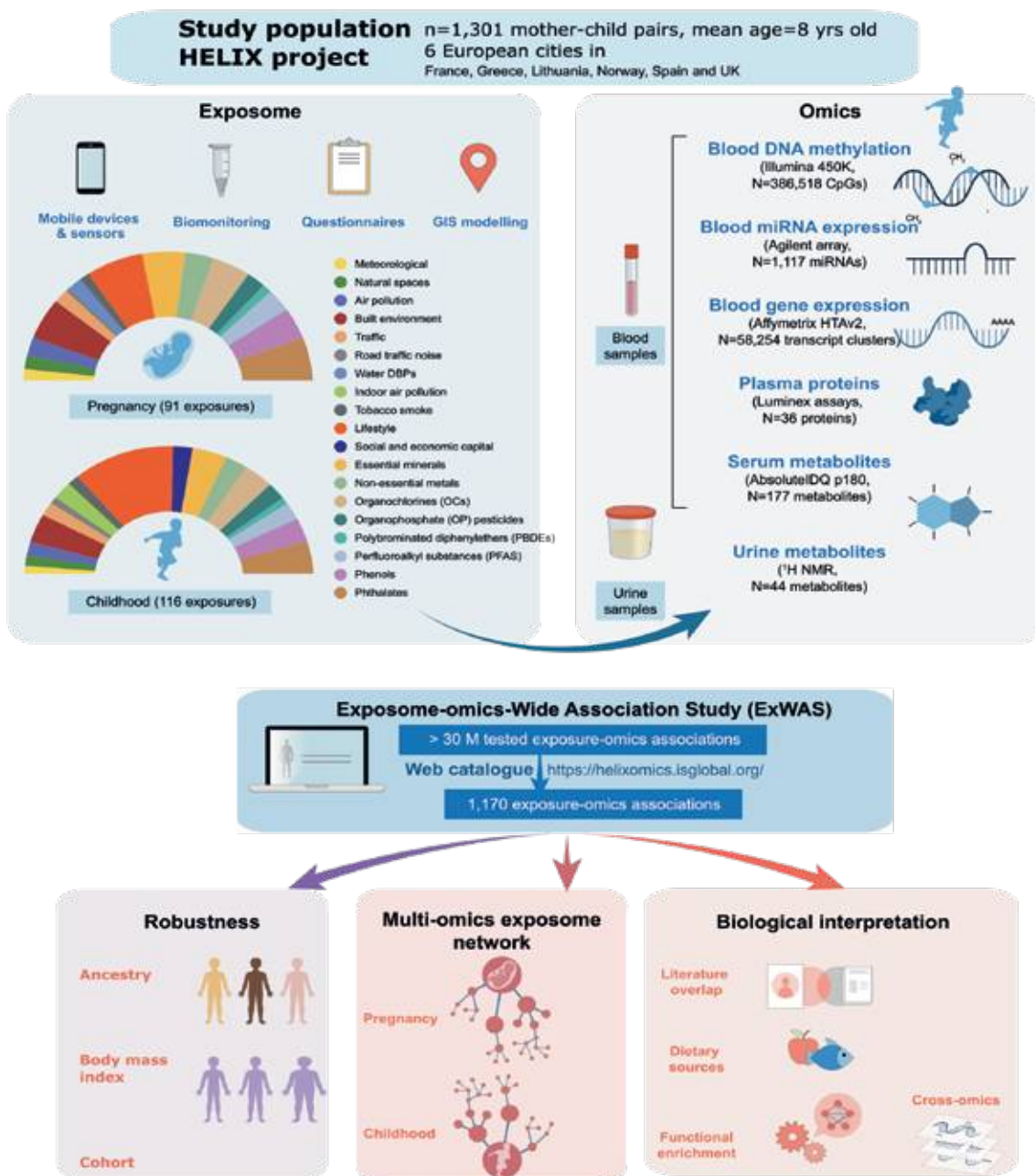
ایجاد اکسپوزوم اولیه و فنوتیپ‌های مولتی‌امیکس در کودکان HELIX

ما اکسپوزوم اولیه زندگی را در ۱۳۰۱ جفت مادر-کودک از پروژه HELIX، یک مطالعه کوهورت مبتنی بر جمعیت طولی چند مرکزی در ۶ مکان در اروپا (اسپانیا، انگلستان، فرانسه، لیتوانی، نورژ و یونان) ارزیابی کردیم (شکل ۱). ۹۱ مواجهه با عوامل محیطی را در دوران بارداری و ۱۱۶ مورد را در دوران کودکی زمانی که کودکان بین ۶ تا ۱۱ ساله بودند اندازه‌گیری کردیم. قرار مواجهه با عوامل محیطی در نوزده گروه شامل موارد رو به رو دسته‌بندی شد: عوامل هواشناسی، فضاهای طبیعی، آلودگی هوای داخلی و خارجی، محیط ساخته شده، ترافیک جاده، صدا، محصولات جانبی ضد عفونی آب، مصرف دخانیات، عوامل سبک زندگی (رژیم غذایی، فعالیت بدنی)، سرمایه اجتماعی و اقتصادی، مواد معدنی ضروری، آلاینده‌های شیمیایی (فلزات غیر ضروری، کلرهای ارگانیک، آفت کش‌های ارگانوفسفره، دی

یا آفت‌کش‌ها متمرکز بود. اصل اساسی مفهوم اکسپوزوم فراخوانی برای یک رویکرد جامع و سیستماتیک برای ارزیابی اثرات محیط بر سلامت است. علاوه بر این، اکسپوزوم نه تنها شامل مواجهه‌های خارجی، بلکه پاسخ‌های بیولوژیکی داخلی به این مواجهه‌ها از طریق بررسی داده‌های مولکولی با ابعاد بالا است.

تشخیص زودهنگام تغییرات فیزیولوژیکی در سطح مولکولی مربوط به برخورد با عوامل محیطی قبل از تظاهر علائم بالینی در جمعیت‌های سالم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. چنین اطلاعاتی ممکن است از محتلم بودن بیولوژیکی ارتباطات محیطی-سلامتی در مطالعات جمعیت‌پشتیبانی کند، به درک مکانیسم‌های سم‌شناسی کمک کند یا توضیح دهد که چگونه مواجهه‌های چندگانه ممکن است بر اساس تأثیر مشترک آنها بر مسیرهای بیولوژیکی (مانند التهاب) یا عامل محیطی (مانند رژیم غذایی) گروه‌بندی شوند. همچنین می‌تواند به شناسایی بیومارکرهایی برای پیش‌بینی مواجهه‌های فعلی و گذشته کمک کند. مطالعات یکپارچه پروفایل omics شخصی، جمع‌آوری داده‌های با کارایی بالا در لایه‌های مولکولی متعدد، نشان داده‌اند که پروفایل‌های مولکولی شخصی ممکن است برای ارزیابی خطر بیماری، تشخیص شرایط اولیه بالینی و شروع استراتژی‌های پیشگیرانه مفید باشد. رشد جنین و دوران کودکی پیامدهای مادام‌العمر دارد و برای بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله چاقی، بیماری‌های قلبی متابولیک اختلالات کمبود توجه و بیش‌فعالی (ADHD) و عملکرد ریه حیاتی است. بنابراین، زندگی اولیه دوره مهمی برای مطالعه محرک‌های بیولوژیکی اولیه بیماری است: مواجهه با عوامل محیطی در طول این دوره‌های آسیب‌پذیر رشدی ممکن است اثرات برجسته‌ای در سطح مولکولی داشته باشد که ممکن است تا بزرگسالی از نظر بالینی غیرقابل تشخیص باقی بماند.

عمدتاً مکانیسم‌های مولکولی حاصل از تأثیر عوامل محیطی از طریق لنز اپی‌ژنتیک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. تصور می‌شود که اپی‌ژنوم پاسخ‌های سلولی به آشفتگی‌های محیطی را تنظیم می‌کند و حافظه و انعطاف سلولی را فراهم می‌کند. در میان تمام علائم اپی‌ژنتیک، متیلاسیون DNA بیشترین مطالعه را در تنظیمات اپیدمیولوژیک دارد. و در بین همه مواجهه‌ها،



شکل ۱: مروری بر مطالعه مولتی اومیکس اکسپوزوم اولیه

هزار و سیصد و یک جفت مادر و کودک از پروژه HELIX در این مطالعه شرکت کردند. اکسپوزوم اولیه در دوران بارداری و کودکی با استفاده از روش های مختلف ارزیابی شد. نمودارهای دایره ای نشان دهنده نسبت مواجهه های ارزیابی شده در هر خانواده است. صفات مولکولی در کودک با استفاده از شش پلتفرم omics مختلف با استفاده از خون (سلول های خون، سرم یا پلاسما) یا ادرار اندازه گیری شد. سپس، یک مطالعه Exposome-omics-Wide Association (ExWAS) انجام شد، که امیکس تاثیرات محیطی را یک به یک مدلسازی کرد و برای عوامل مخدوش کننده تنظیم کرد. تمام نتایج خلاصه شده را می توان در <https://helixomics.isglobal.org/> یافت. در مجموع، ۱۱۷۰ رابطه ای اومیکس-تاثیرات محیطی آستانه های تصحیح چندگانه تست را پشت سر گذاشتند. پس از بررسی استحکام این ارتباط با اجداد، BMI و گروه، آنها از طریق اومیکس-تاثیرات تجسم شدند. در نهایت، ما تفسیر بیولوژیکی از جمله همپوشانی با مقالات قبلی، شناسایی منابع غذایی، تجزیه و تحلیل غنی سازی عملکردی و مقایسه های متقابل بیولوژیکی و ماتریس متقابل را انجام دادیم.



برای شناسایی ارتباط آماری معنی دار مواجهه-اومیکس، تصحیح برای مقایسه‌های چندگانه برای هر مواجهه در هر مجموعه داده اومیکس اعمال شد. برای این منظور، ما ارتباطات قابل توجهی را در نظر گرفتیم که با مقادیر p زیر نرخ کشف نادرست 0.05 (FDR) برای اومیکس در سطح ژنوم، و زیر یک نسخه اصلاح شده از برش Bonferroni برای پروتئین‌ها و متابولیت‌ها (که شامل تقسیم می‌شود) مقدار p اسمی توسط تعداد موثر تست (ENT) تعیین شده از ساختار همبستگی مجموعه داده با این معیارها، 1170 ارتباط مواجهه-اومیکس از نظر آماری معنی دار بود. و فنوتیپ‌های مولکولی در مجموع 249 شامل 52 مواجهه منحصر به فرد و 209 ویژگی مولکولی منحصر به فرد را شامل می‌شود، در حالی که 921 ارتباط با اکسپوزوم دوران کودکی با 84 مواجهه منحصر به فرد و 454 ویژگی مولکولی منحصر به فرد مطابقت دارد.

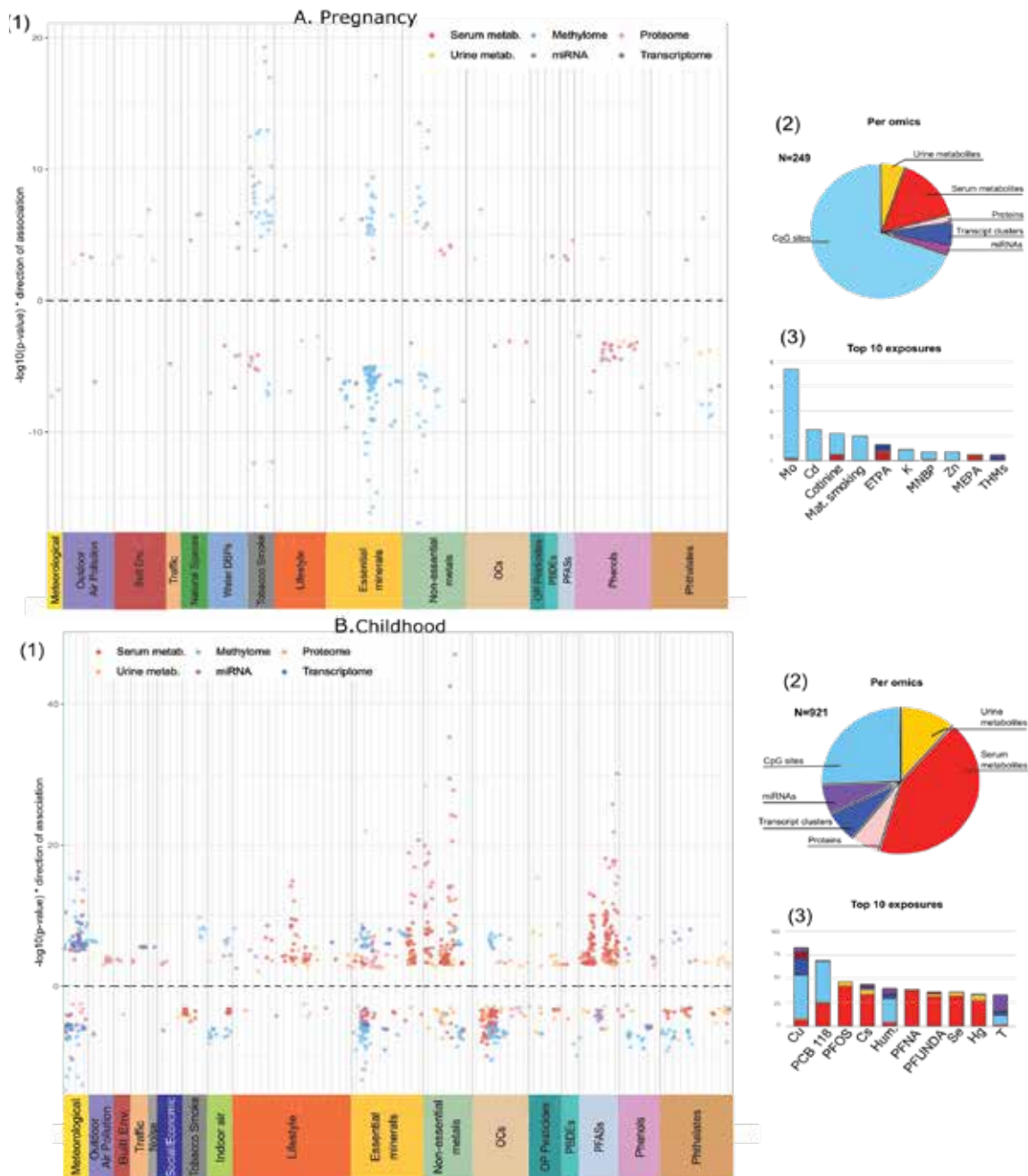
نمودارهای میامی، ارتباط اومیکس-تاثیرات محیط را با خانواده عوامل محیطی و لایه مولکولی نشان می‌دهند (شکل 2A1، B1). اکسپوزوم حاملگی عمدتاً با متیلاسیون DNA کودک همراه بود (70% از ارتباط‌های مشاهده شده) (شکل 2A2). در مقابل، اکسپوزوم دوران کودکی با تمام لایه‌های مولکولی همراه بود، با متابولوم سرم بالاترین تعداد ارتباط را نشان داد (43% از ارتباط‌های مشاهده شده) (شکل 2B2). مواجهه‌ها محیطی دوران بارداری در اکثر ارتباطات شامل مولیدن (Mo)، کادمیوم (Cd)، کوتینین (بیومارکر مواجهه با تنباکو) و سیگار کشیدن مادر (داده‌های پرسشنامه) بود (شکل 2A3). مواجهه دوران کودکی با بیشترین ارتباط شامل مس (Cu)، ترکیبات کلر آلی (PCB 118)، مواد پرفلوئوروآلکیل (PFOS)، سزیم (Cs) و رطوبت (شکل 2B3) بود. سایر مواجهه‌ها مانند آلودگی هوای بیرون، محیط ساخته شده، ترافیک جاده‌ای و سر و صدا، ارتباط کمی را نشان دادند. از بین 83 مواجهه اندازه‌گیری شده در دوران بارداری و دوران کودکی، 14 جفت مواجهه-اومیکس در دو دوره از نظر آماری معنی‌دار بودند: 6 CpG مربوط به سیگار کشیدن، و چندین اسید چرب با زنجیره بلند مربوط به کوتینین، هگزا کلروبنزن (HCB)، پرفلورانداکانات. (PFUnDA) و جیوه.

فنیل اترهای پلی برومینه، مواد پرفلوئوروآلکیل، فنل‌ها و فتالات‌ها (شکل 1). سطوح مختلف مواجهه عوامل محیطی در گروه‌های HELIX در جاهای دیگر بیشتر توضیح داده شده است. ابزار ارزیابی میزان مواجهه با عامل محیطی شامل اندازه‌گیری مبتنی بر طیف‌سنجی جرمی بیومارکرهای برخورد با مواد شیمیایی در ادرار و خون، مانیتورهای مواجهه، سنجش از دور و روش‌های مکانی، و مصاحبه‌های مبتنی بر پرسشنامه بود.

برای همین کودکان (بین 6 تا 11 سال) فنوتیپ مولکولی مولتی اومیکس عمیق، از جمله اندازه‌گیری متیلاسیون DNA خون (450K، Illumina)، بیان ژن خون (HTA، Affymetrix، v2.0)، بیان miRNA خون را انجام دادیم (شکل 1). در حالی که متیلاسیون DNA خون و ترانس کریپتومیکس در کل ژنوم با 58254 CpGs، 386518 خوشه رونوشت (TCs) و 1117 miRNA اندازه‌گیری شد. پروتئین‌های پلازما شامل 36 سیتوکین، آپولیپوپروتئین و آدیپوکین بود. متابولیت‌های سرم ($N=177$) شامل اسیدهای آمینه، آمین‌های بیوژنیک، آسید کارنیتین‌ها، گلیسروفسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و مجموع هگزوزها بودند که طیف وسیعی از آنالیت‌ها و مسیرهای متابولیک را در یک سنجش هدفمند پوشش می‌دهند. متابولیت‌های ادرار ($N=44$) عمدتاً شامل اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، نیکوتین‌امیدها، آمین‌ها و فنل‌های مشتق شده از میکروبی روده می‌شوند. حدود 91 درصد از کودکان داده‌های مولکولی حداقل از 4 پلتفرم اومیکس را داشتند.

نتایج مطالعه همبستگی گسترده اکسپوزومی - اومیکس (ExWAS)

ما ابتدا به طور سیستماتیک ارتباط بین هر متغیر محیطی و هر ویژگی مولکولی را به صورت متوالی و مستقل از طریق ExWAS با استفاده از یک رویکرد آماری مشابه با مطالعات ارتباطات گسترده ژنوم (GWAS) آزمایش کردیم (شکل 1). به طور کلی، بیش از 30 میلی‌متر ارتباط تاثیر محیطی-اومیکس را از طریق مدل‌های رگرسیون خطی تنظیم‌شده برای مجموعه‌ای از عوامل مخدوش‌کننده آزمایش کردیم: گروه، سن کودک، جنس، توده بدنی (zBMI)، اصل و نسب، تحصیلات مادر و متغیرهای کمی خاص اومیکس.



شکل ۲: نتایج مطالعه همبستگی گسترده Exposome-omics (ExWAS) برای اکسپوزوم‌های بارداری و دوران کودکی.

خلاصه‌ای از ارتباط بین اکسپوزوم حاملگی و چند آمیکس اندازه گیری شده در ۱۳۰۱ کودک: طرح میامی (۱)؛ نمودارهای دایره‌ای که نسبت ارتباط با لایه‌های مولکولی مختلف را نشان می‌دهد (۲). و ۱۰ تاثیر محیطی بارداری (۳). B خلاصه‌ای از همبستگی‌های اومیکس اکسپوزوم-کودک در دوران کودکی: طرح میامی (۱)؛ نمودارهای دایره ای که نسبت ارتباط با لایه‌های مولکولی مختلف را نشان می‌دهد (۲) و ۱۰ مواجهه برتر دوران کودکی (۳). در طرح‌های میامی، هر نقطه مربوط به یک ارتباط که آمیکس- تاثیرات محیطی است. محورهای y مقادیر $-\log_{10} p$ ضرب در جهت ارتباط (علامت ضریب رگرسیون) را نشان می‌دهند. و محور x تاثیرات محیطی را در امتداد ۱۹ خانواده تاثیرات محیطی گروه‌بندی می‌کند و هر خط عمودی نشان‌دهنده یک تاثیر محیطی جداگانه با مقداری ارزش برای جلوگیری از همپوشانی نقاط است. در منهن (نقطه)، نمودار دایره‌ای و هیستوگرام، رنگ‌ها لایه مولکولی را نشان می‌دهند.



دوران کودکی، قوی ترین تغییرات اثر برای جیوه، As، Se، PFAS و الگوهای غذایی (به عنوان مثال ماهی و امتیاز KIDMED)، برای PM داخل خانه و سیگار کشیدن والدین، و برای BPA و متغیرهای هواشناسی مشاهده شد. آنها در زیر با جزئیات بیشتر مورد بحث قرار می گیرند.

ادغام شبکه ای از شاخص مولتی اومیکس از اکسپوزوم

برای تجسم اینکه آیا یک ویژگی مولکولی به چندین تاثیر محیطی متصل است یا خیر و بالعکس، شبکه های اکسپوزومی مولتی اومیکس خاص دوره را بر اساس ۱۱۷۰ ارتباط آماری اکسپوزوم-اومیکس ساختیم. گره های این شبکه ها ۵۳۸ ویژگی مولکولی منحصر به فرد یا تاثیر محیطی درگیر در این ارتباط هستند و لبه ها ۱۱۷۰ ارتباط اکسپوزوم-تاثیر محیطی هستند.

شبکه اکسپوزوم حاملگی، که عمدتاً از CpG ها (۷۰٪) تشکیل شده است، به طور متوسط دارای ۱.۳ اتصال در هر گره (یعنی درجه) و میانگین کوتاه ترین طول مسیر ۱.۹ (شکل ۴) بود. این عدد نشان دهنده طول متوسط (تعداد گره ها) کوتاه ترین مسیر بین هر گره و هر گره دیگری است که ۱.۹ مقدار کمی است. این عدم اتصال را می توان با فاصله وسیع در امتداد ژنوم سایت های CpG که با آرایه 450 K ارزیابی شده و همبستگی نسبتاً کم آنها توضیح داد. شبکه اکسپوزوم حاملگی شامل ۳ جزء اصلی متصل، که بزرگترین آنها حاوی کمتر از ۳۰ درصد از گره ها بود. این ۳ خوشه از نظر اندازه، تعداد مواجهه محیطی و نوع داده های اومیکس که آن ها را تشکیل می دهند بسیار متفاوت بودند (جدول ۱).

شبکه اکسپوزوم دوران کودکی با میانگین ۱.۹ اتصال در هر گره و متوسط کوتاه ترین طول مسیر ۴.۳ به طور متراکم تری متصل بود. بزرگترین مؤلفه متصل شامل ۹۰٪ از تمام گره ها بود (شکل ۵). این اتصال، ماهیت مرتبط متابولوم سرم و ادرار را برجسته می کند، که نشان دهنده اکثر ارتباط های تاثیر محیطی-اومیکس شبکه است (به ترتیب ۴۳ و ۲۶ درصد). در بزرگترین مؤلفه متصل، ما ۱۱ جزء فرعی به هم پیوسته را با استفاده از روش خوشه بندی ساختاری بدون نظارت شناسایی کردیم (جدول ۱).

استحکام نتایج با توجه به zBMI کودک و گروه

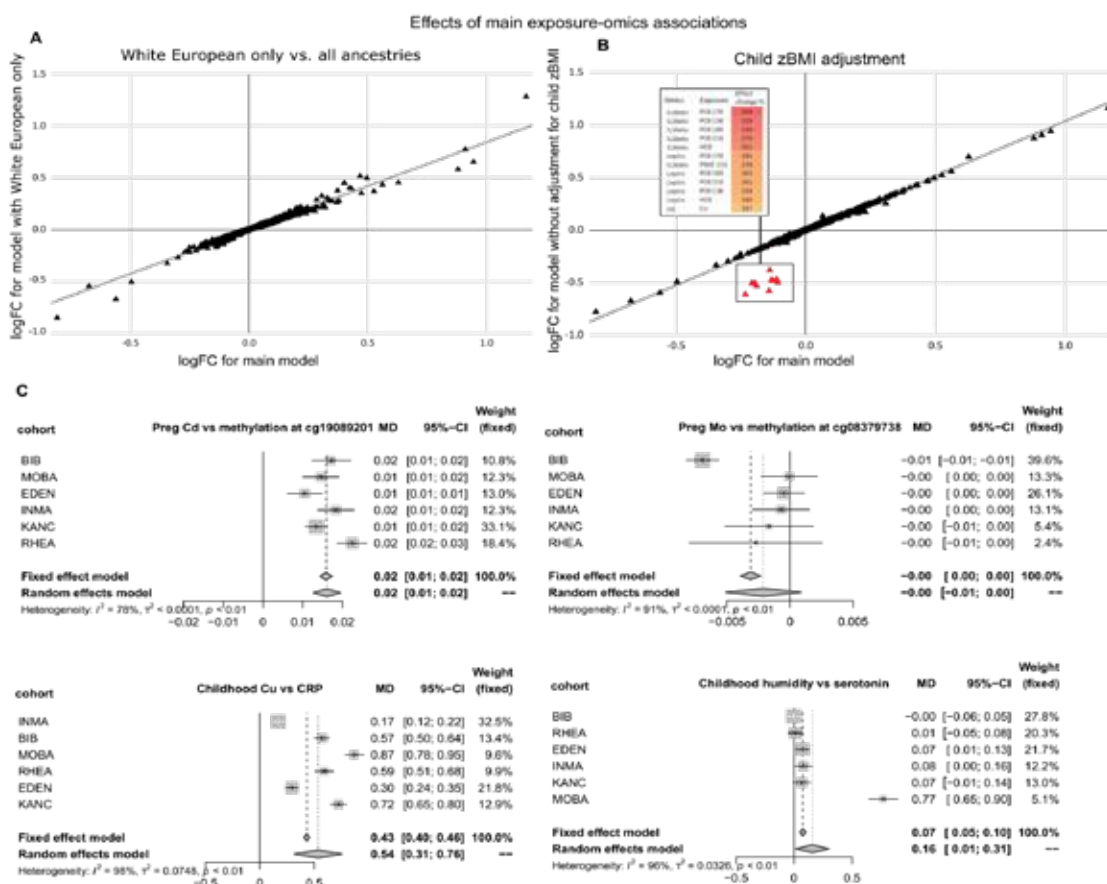
برای ۱۱۷۰ رابطه ای امیکس-مواجهه محیطی مهم، چندین تحلیل حساسیت انجام دادیم. اول، HELIX شامل ۱۱۷۱ کودک اجدادی اروپایی و بقیه از اجداد دیگر است. ما ExWAS را فقط در کودکانی که اصل و نسب اروپایی داشتند تکرار کردیم، و تفاوت قابل توجهی در اندازه اثر (یعنی بیش از دو برابر شدن) بین دو مدل مشاهده نکردیم. سپس، با توجه به تاثیر بالقوه چاقی کودک هم بر سطوح خونی آلاینده های چربی دوست و هم بر روی برخی ویژگی های مولکولی، ما ارتباط ها را با و بدون تنظیم برای zBMI کودک، به عنوان نماینده چاقی کودک مقایسه کردیم. ما مشاهده کردیم که ۱۲ همبستگی بیش از دو برابر در اندازه اثر داشتند (شکل ۳B). این موارد شامل مواد شیمیایی چربی دوست (PCB 170، PCB 153 و PCB 180) و پروتئین هایی بودند که توسط بافت چربی (IL1، لپتین و IL6) تولید می شوند.

در قدم بعدی، ناهمگونی را در بین گروه ها با اجرای ۱۱۷۰ ربط امیکس-مواجهه محیطی بررسی کردیم. حدود نیمی از همه همبستگی ها مقادیر ناهمگنی < 0.5 (I2) را با تغییرات دوره و لایه مولکولی ارائه کردند. علاوه بر آمار I2 که ممکن است در متا-آنالیز با تعداد کمی از مطالعات بیش از حد تخمین زده شود. در حالی که به نظر می رسد برخی از ارتباطات بین گروه ها، حتی با I2 بالا (مانند کادمیوم مادر و متیلاسیون در cg19089201)، بسیار سازگار هستند، برای برخی دیگر ناهمگنی بیشتری وجود دارد با برخی از گروه ها که به عنوان نقاط پرت عمل می کنند (مانند شرایط هواشناسی کودک و سروتونین) (شکل ۳C).

در نهایت، با توجه به ماهیت همبسته اکسپوزوم، مدل های چند تاثیر را برای آن ویژگی های اومیکس مرتبط با بیش از یک مواجهه اجرا کردیم، زمانی که این مواجهه ها همبستگی کمتر از ۰.۸ داشتند و به گروه های مواجهه متفاوت تعلق داشتند (به جز مواجهه های فردی که به رژیم غذایی تعلق داشتند، فلزات یا پارابن هایی که به عنوان گروه های جداگانه در نظر گرفتیم). برای مواجهه های دوران بارداری، قوی ترین تغییر اثر برای سطوح کادمیوم مادر (Cd) مشاهده شد که کاهش بیش از ۲۵٪ از ارتباط با تنظیم صفت مولکولی برای سیگار کشیدن را نشان داد. متغیرها برای تاثیر محیطی

و در مورد ارتباط متابولیت‌ها با الگوهای غذایی و آلاینده‌ها انجام شد (ExposomeExplorer31). شکل ۷). سپس، آنالیزهای غنی سازی عملکردی را با استفاده از چندین پایگاه داده عمومی صورت گرفت (شکل ۶B-D). در زیر، یافته‌های اصلی برای گروه‌های مواجهه را شرح می‌دهیم.

در مرحله بعد، ما با هدف ارزیابی تفسیر بیولوژیکی، ارتباط‌های مواجهه-امیکس موجود در ۳ بارداری و ۱۱ خوشه دوران کودکی را بررسی کردیم. ابتداء، جستجوی سیستماتیک از همپوشانی با مقالات مربوط به ارتباط متیلاسیون DNA با مواجهه‌ی محیطی و صفات (EWAS Atlas/Catalogue16,30، شکل ۶A-C)

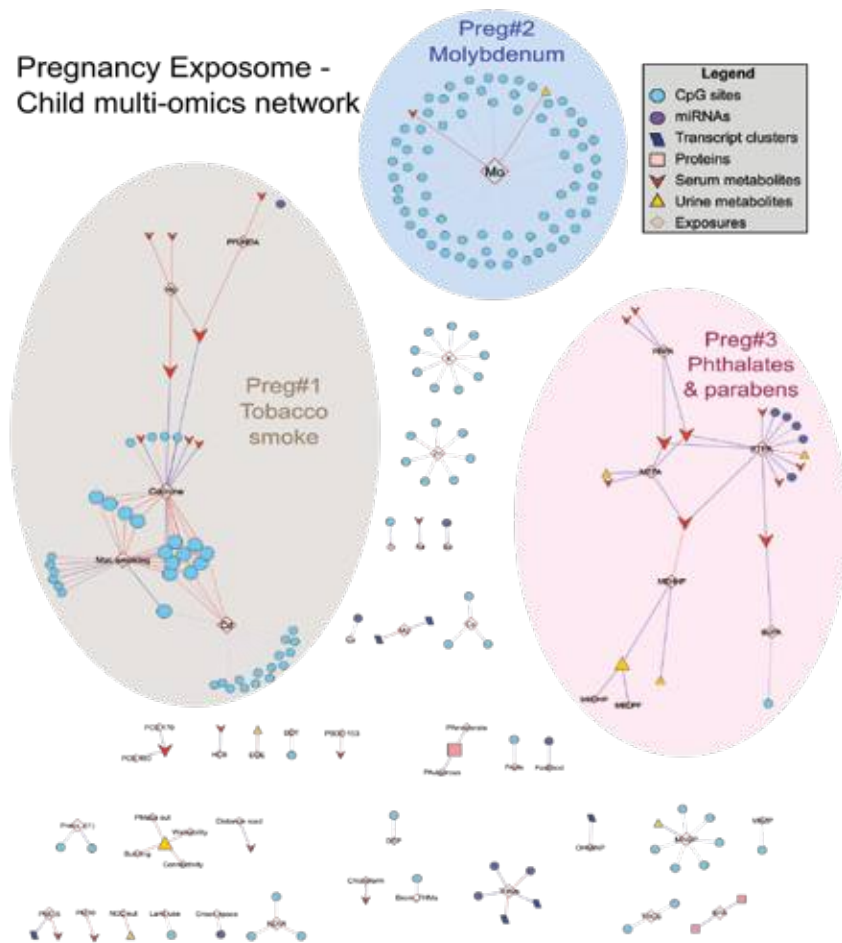


شکل ۳: استحکام ارتباطات اصلی اکسپوزوم-امیکس.

مقایسه اندازه‌های اثر ۱۱۷۰ ارتباط اکسپوزوم-امیکس مدل اصلی، که شامل همه کودکان است (N = 1301) و برای zBMI و اصل و نسب کودک تنظیم شده است، در مقابل اندازه‌های اثر مدل‌های جایگزین. هر مثلث نشان دهنده یک ارتباط است. محور x نشان دهنده اندازه اثر نوردی بر روی ویژگی omics در مدل اصلی است، در حالی که محور y نشان دهنده اندازه اثر در مدل جایگزین است. یک مدل جایگزین همه متغیرهای کمکی را شامل می‌شد اما به کودکان اجداد اروپایی محدود می‌شد (N = 1171) هیچ تفاوت عمده ای مشاهده نشد. B مدل جایگزین شامل همه کودکان بود و برای zBMI کودک تنظیم نشده بود. ارتباط امیکس - تاثیرات محیطی با درصد تغییر بین مدل‌های بالای ۱۰۰ درصد به رنگ قرمز است و شامل پروتئین‌ها و آلاینده‌های شیمیایی چربی دوست کودکان است که در جدول ذکر شده است. C نمودارهای جنگلی که متاآنالیزهای وزنی واریانس معکوس با اثرات ثابت و تصادفی را نشان می‌دهد: سطوح Cd مادر و متیلاسیون DNA کودک در CpG cg19089201 (زن n = 1173 MYO1G اثرات همسان)، سطح مس کودک و سطح CRP کودک در پلاسما (n = 1170)، با اثرات ثابت در گروه‌ها. سطوح Mo مادر و متیلاسیون DNA کودک در CpG cg08379738 (زن n = 1173 DENND1C)، که توسط یکی از گروه‌ها (BiB) هدایت می‌شود. رطوبت در دوران کودکی (۱ ماه قبل از نمونه‌برداری) و سطح سروتونین سرم کودک (n = 1198)، که توسط یکی از گروه‌ها (MoBA) هدایت می‌شود. هر گروه با یک تخمین نقطه ای نشان داده می‌شود که با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) برای اثر و وزن کوهورت به عنوان یک مربع خاکستری محدود شده است. ۹۵٪ CI حاصل از متاآنالیز اثرات ثابت و تصادفی به صورت الماس نشان داده شده است. اندازه اثر به عنوان تغییر log2 برابر omics (log2FC)، یا تفاوت در سطوح متیلاسیون، برای محدوده بین چارکی (IQR) متغیرهای مواجهه پیوسته گزارش می‌شود.



Pregnancy Exposome - Child multi-omics network



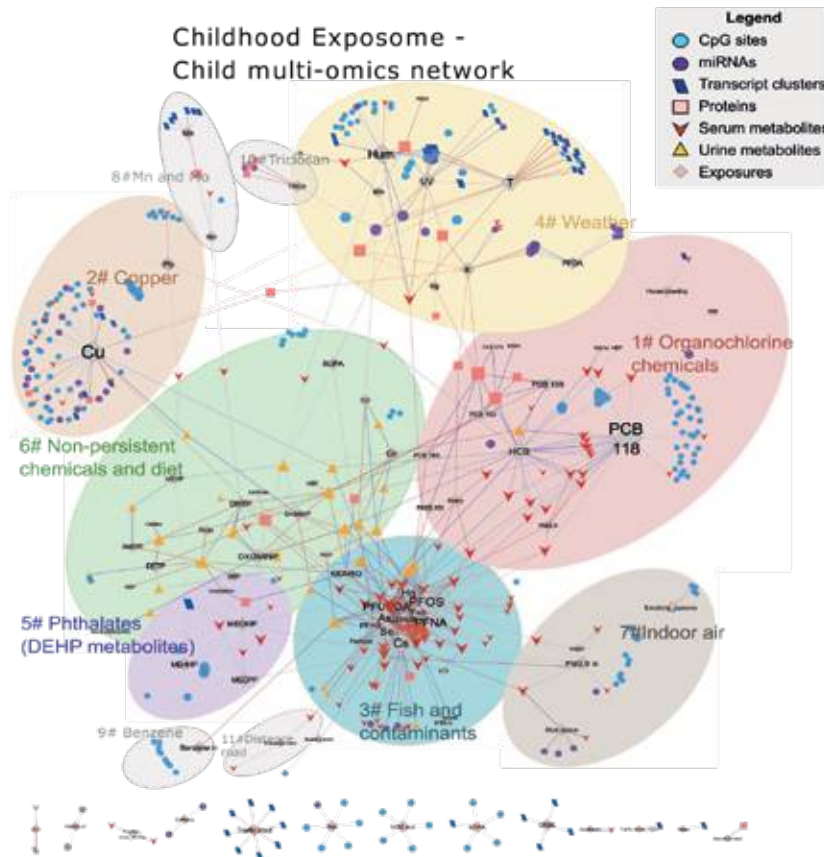
شکل ۴: نقشه شبکه از شاخص‌های مولتی اومیکس-تاثیر محیطی حاملگی.

تجسم شبکه ای از مطالعه ارتباط گسترده حاملگی (ExWAS). اگر ارتباط آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود، یک مواجهه‌ی محیطی و یک ویژگی مولکولی به هم متصل شدند (آبی اگر مثبت و قرمز اگر منفی بود). فقط اجزای متصل با حداقل دو ویژگی مولکولی نمایش داده شد. گره‌های شبکه بسته به اینکه تاثیر محیطی یا ویژگی‌های یک لایه مولکولی خاص باشند، با رنگ/شکل متفاوتی به تصویر کشیده می‌شوند. سه مولفه اصلی متصل تفسیر شدند که به دلیل اندازه، تعداد تاثیر محیطی و نوع اومیکس که آنها را تشکیل می‌دادند، بسیار متفاوت بودند. جدول خلاصه با ویژگی‌های خوشه را در جدول ۱ می‌توان یافت.



جدول ۱ خوشه‌های پر توده‌ی حاملگی و دوران کودکی بر اساس ارتباط با پروفایل‌های مولتی اومیکس اندازه‌گیری شده در دوران کودکی (N = ۱۳۰۱)

ویژگی مرتبط با اومیکس								تاثیر محیطی	خوشه‌ها
کل ژن‌های نامزد شده	کل	ادراک	سرم متاب	پروتئین‌ها	بیان miRNA	بیان ژن	متیلاسیون DNA		
دوره بارداری									
۹۱	۸۴	۰	۸	۰	۱	۰	۹۳	سی دی، کوتینین، سیگار کشیدن مادر، جیوه، PFUNDA	دود تنباکو
۴۷	۴۷	۱	۱	۰	۰	۰	۲۷	Mo	مولیبیدن
۱۴	۴۷	۲	۴۲	۳	۱	۱	۳۴	.MEHHP, .PRPA, .MEPA, .ETPA, .MEOHP, .MECPP, .BUPA	فتالات‌ها و پارابن‌ها
دوران کودکی									
۱۴	۴۷	۲	۴۲	۳	۱	۱	۳۴	PCB, 138 PCB, HCB, 118 PCB, 180 PCB, PM2.5, 153, 170 PCB, نان، DDE, چربی رژیم غذایی، MIBP, MEP	مواد شیمیایی آلی کلر
۹۸	۸	۱	۸	۶	۷۱	۵	۲۵	مس، سرب، کاربری زمین	مس
۵	۱۷	۸	۶۵	۲	۳	۰	۲	.PFUNDA, .Se, .PFNA, .Cs, .PFOS, .As, .Hg, .PFHXS, کوتینین، لبنیات، 153 PBDE، فست فود، .ETS, BTEX، شیرینی	ماهی و آلاینده‌ها
۵۶	۸۷	۰	۴	۵	۸۱	۱۲	۰.۳	.BPA, .Mg, .PFOA, .K, .UV, .T, .Hum, PM10, .Tl	آب و هوا
۰.۱	۶۱	۰	۷	۰	۰	۱	۸	.MECPP, .MEHHP, .MEOHP, .MEHP، تولیدات نانوایی	فتالات‌ها (متابولیت‌های DEHP)
۵۱	۸۳	۱۲	۱	۲	۱	۰	۳۱	.Co, .DMTP, .KIDMED, .OXOMINP, .Cd, .OHMiNP, .DETP, .BUPA, .DEP, سبزیجات، گوشت، غلات، مشارکت اجتماعی، DMP	مواد شیمیایی غیر ماندگار و رژیم غذایی
۲۱	۲۲	۰	۵	۰	۴	۰	۳۱	PM2.5 داخلی، سیگار کشیدن والدین، فضای عمگین، MNBP	هوای داخل خانه
۸	۰.۱	۰	۲	۱	۰	۶	۱	Mo, Mn	منگنز و مولیبیدن
۷	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۹	بنزن داخلی	بنزن
۵	۵	۰	۰	۳	۲	۰	۰	تریکلوزان	تریکلوزان
۰	۲	۰	۲	۰	۰	۰	۰	road Distance	road Distance



شکل ۵: نقشه شبکه ای از شاخص‌های مولتی اومیکس اکیسپوزوم دوران کودکی.

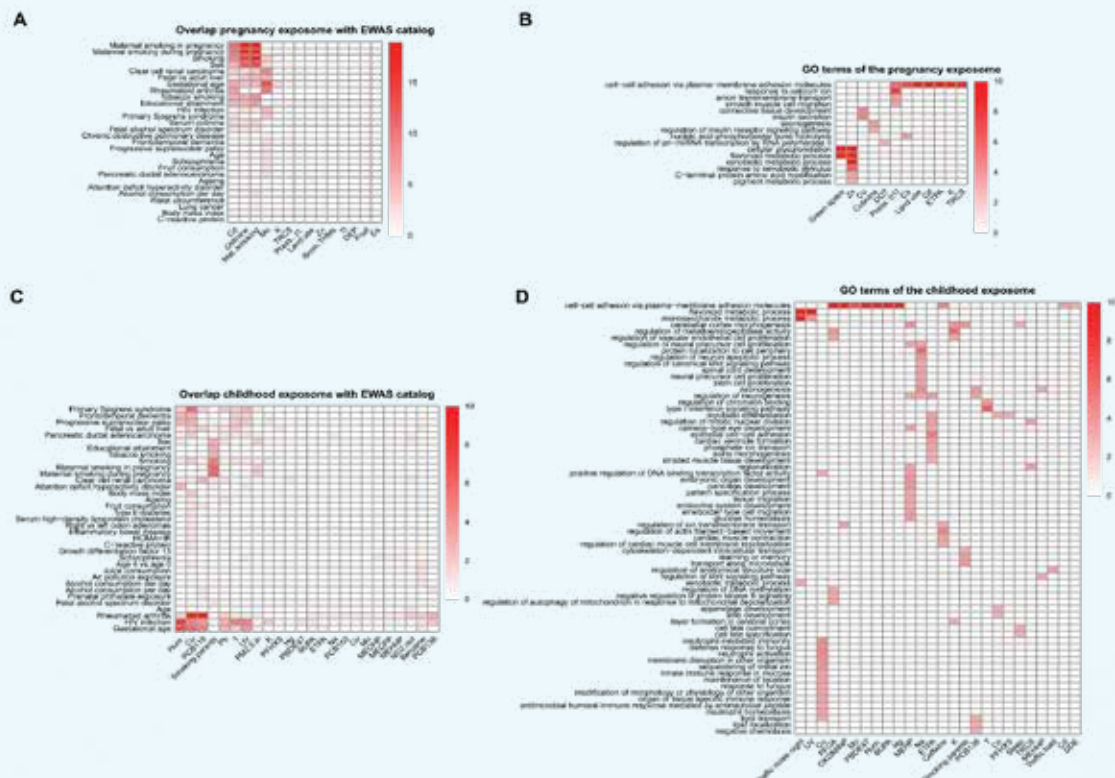
تجسم شبکه ای از مطالعه رابطه‌ی گسترده اکیسپوزوم-اومیکس در دوران کودکی (ExWAS). گره‌های شبکه بسته به اینکه تاثیر محیطی یا ویژگی‌های یک لایه مولکولی خاص باشند، با رنگ/شکل متفاوتی به تصویر کشیده می‌شوند. اگر ارتباط آنها از نظر آماری معنی‌دار بود، تاثیر محیطی و یک ویژگی مولکولی با یک لایه مرتبط بودند (آبی اگر مثبت و قرمز اگر منفی بود). فقط اجزای متصل با حداقل دو ویژگی مولکولی نمایش داده شد. اگر ارتباط آنها از نظر آماری معنی‌دار بود، تاثیر محیطی و یک ویژگی مولکولی به هم متصل می‌شدند و فقط اجزای متصل با حداقل دو ویژگی مولکولی نمایش داده شدند. شبکه اکیسپوزوم دوران کودکی از نظر ویژگی‌های اومیکس ارائه شده و سطح اتصال متقابل متنوع بود، با بزرگترین مؤلفه متصل شامل ۹۰٪ از تمام گره‌ها. در این شبکه، ۱۱ خوشه با استفاده از آنالیز خوشه ساختاری بدون نظارت شناسایی شدند، و در شکل مشروح شدند.

سیناپس کولینرژیک، سیگنال دهی انسولین، و چندین نوع سرطان (شکل B-D).
کادمیوم قبل از تولد (Cd)، یک فلز سنگین، با متیلاسیون خون کودک مرتبط بود و با سیگار کشیدن مادر در خوشه #1 preg ثبت شد. آنالیزهای چند تاثیر محیطی برخی از همپوشانی بین این سیگنال‌ها را پیشنهاد کرد. این را می‌توان تا حدی با این واقعیت توضیح داد که جزء تنباکو است و در داده‌های ما مادرانی که سیگار می‌کشیدند تقریباً دو برابر سطح Cd در مقایسه با غیر سیگاری‌ها نشان دادند. با این حال، ما ۱۴ CpG اضافی را شناسایی کردیم که منحصر به Cd بودند (شکل A, B). هنگام محدود کردن آنالیز ما از Cd مادر به مادران غیر سیگاری (۴۸) CpG، ۵۱ (۹۹۸ N جایگاه) شناسایی شد. اینها با اثرات شناخته شده سیگار کشیدن، و نه با CpG‌های مرتبط با Cd ادرار در خون بزرگسالان یا با Cd جفت در بافت جفت همپوشانی نداشتند. ما همچنین چندین ارتباط برای کیفیت هوا در دوران کودکی پیدا کردیم که بین آلاینده‌های بیرون و داخل

سیگار کشیدن مادر اثرات قوی و طولانی مدت بر متیلوم کودک نشان می‌دهد و نشانه‌های جدیدی برای کادمیوم قبل از تولد و آلودگی هوای داخل خانه شناسایی شده است.

شاخص متیلاسیون برای سیگار کشیدن مادر در سنین مختلف به خوبی ثبت شده است. در HELIX، سیگار کشیدن مادر در دوران بارداری با استفاده از پرسشنامه و سطوح کوتینین ادراری مادر مرتبط با ۲۴ CpG منحصر به فرد، که نشان‌دهنده ۹ جایگاه منحصر به فرد مشروح به ۸ زن است، که تا حد زیادی با CpG‌های حساس به سیگار توصیف شده همپوشانی دارند، ارزیابی شد. در EWAS Atlas/Catalogue (شکل A-C). مواجهه‌ی کودک با دود سیگار دیگران نیز با داده‌های قبلی همپوشانی دارد، اما به میزان کمتری نسبت به سیگار کشیدن مادر (خوشه ای شماره ۷). اثرات سیگار کشیدن دوره خاص در HELIX در جاهای دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. آنالیز غنی سازی عملکردی مسیرهای زیر را شناسایی کرد: توسعه آکسون، شناخت،





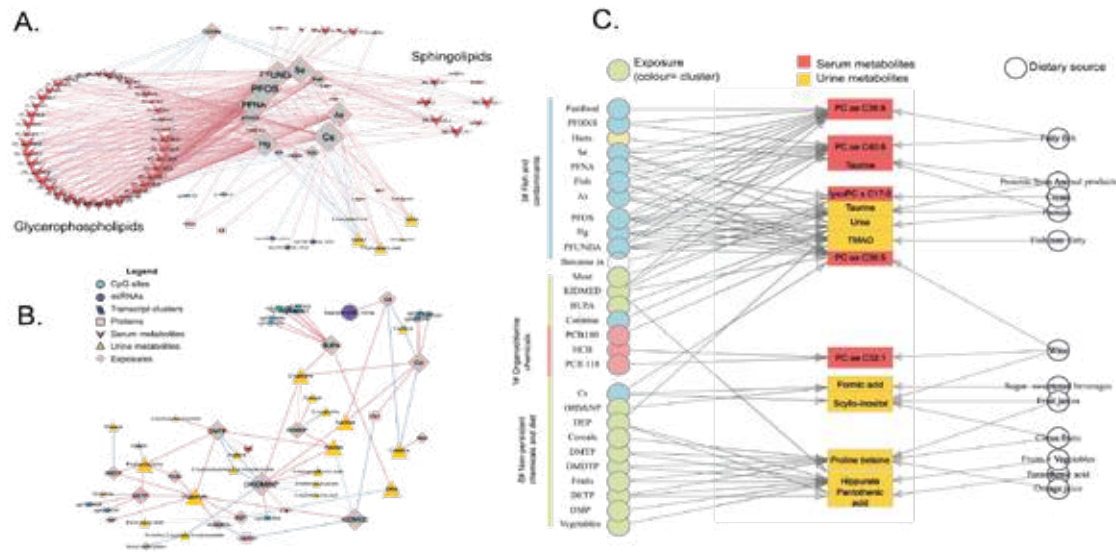
شکل ۶: تفسیر بیولوژیکی پیوندهای اکسپوزوم-اومیکس از طریق همپوشانی داده‌های پیشین و غنی سازی عملکردی.

الف) همپوشانی CpG‌های مرتبط با اکسپوزوم حاملگی (ستون‌ها) با CpG‌های مرتبط با صفات / مواجهه در کاتالوگ EWAS (ردیف‌ها).

ب) آنالیز غنی‌سازی عملکردی اکسپوزوم حاملگی (ستون‌ها) برای اصطلاحات (ردیف‌ها) اونتولوژی ژن (GO).

ج) همپوشانی CpG‌های مرتبط با اکسپوزوم (ستون‌ها) دوران کودکی با CpG‌های مرتبط با صفات/تاثیر محیطی در کاتالوگ EWAS (ردیف‌ها). د) تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی اکسپوزوم (ستون‌ها) دوران کودکی برای اصطلاحات GO (ردیف‌ها). متغیرهای مواجهه‌ی محیطی، صفات / تاثیر محیطی کاتالوگ EWAS، و اصطلاحات GO بر اساس خوشه بندی سلسله مراتبی مرتب شده اند. برای همپوشانی با کاتالوگ EWAS، رنگ تعداد CpG‌های همپوشانی را نشان می‌دهد. برای آنالیز غنی‌سازی عملکردی، رنگ نشان‌دهنده مقدار p تنظیم‌شده $-\log_{10}$ غنی‌سازی است. برای تسهیل تجسم، اصطلاحات GO مرتبط را حذف کردیم و مقادیر p تنظیم شده $-\log_{10} > 10$ به عنوان ۱۰ کدگذاری می‌شوند.





شکل ۷: شاخص متابولیت منابع غذایی و اکسپوزوم دوران کودکی.

الف) خوشه کودکی شماره ۳ شامل ارتباط قابل توجهی بین ماهی و چندین آلاینده (As، جیوه، PFOS) و متابولیت‌های سرم (عمدتاً گلیسرولفسفولیپیدها) است.

ب) خوشه کودکی شماره ۶ شامل ارتباط قابل توجهی بین رژیم غذایی (سبزیجات، میوه‌ها، غلات) و آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (OP) با متابولیت‌های ادراری است. برای قسمت الف و ب گرهِ‌های شبکه با رنگ/شکل متفاوتی به تصویر کشیده می‌شوند، بسته به اینکه آن‌ها تاثیر محیطی یا ویژگی‌های یک لایه مولکولی خاص باشند. اگر ارتباط آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود، تاثیر محیطی و یک ویژگی مولکولی با یک لایه مرتبط بودند (آبی اگر مثبت و قرمز اگر منفی بود).

ج) نمودارهای سه‌جانبه بر اساس وجود ارتباط بین متابولیت‌ها-قرار گرفتن در نمونه‌های HELIX (در سمت چپ) و متابولیت‌ها-دریافت رژیم غذایی بر اساس پایگاه داده ExposomeExplorer (در سمت راست). متابولیت‌های سرم و ادرار به ترتیب به رنگ‌های قرمز و زرد و مواجهه‌ی محیطی رنگ‌های آبی (ماهی و آلاینده‌ها)، قرمز (مواد شیمیایی آلی کلر) یا سبز (مواد شیمیایی غیر پایدار و رژیم غذایی) با توجه به خوشه‌ای که به آن تعلق دارند نشان داده می‌شوند.

(PFAS) و عناصر ضروری غیر سمی (سلنیوم (Se) و سزیم (=Cs)، همراه با لیپیدهای سرم حاوی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) و تری متیل آمین (N-اکسید ادراری (TMAO)، دی متیل آمین و هومارین (شکل ۷A). با استفاده از ارتباط سیستماتیک متابولیت-رژیم غذایی یافت شده در مطالعات جمعیتی قبلی که در ExposomeExplorer پایگانی شده بود، منشأ غذایی این ارتباط متابولیت مواجهه را تأیید کردیم، در این مورد، مصرف ماهی و محصولات حیوانی (شکل ۷C). علاوه بر این، مدل‌های چند مواجهه‌ی محیطی تأیید کردند که بیشتر این ارتباط‌ها به‌ویژه با جیوه، As و PFAS پس از تنظیم رژیم غذایی و سایر مواجهه‌های مشترک کاهش یافتند. این برای TMAO و As که حتی پس از تنظیم ارتباط‌ها باقی ماندند، صادق نبود.

به طور مشابه، خوشه کودکی شماره ۶ شامل ۲۱ متابولیت از ۴۴ متابولیت ادراری اندازه گیری شده بود، از جمله هیپورات، پرولین بتائین و N-متیل نیکوتینیک اسید که

همپوشانی نداشتند. در میان جالب‌ترین موارد، مواجهه با آلودگی هوای داخل خانه با بنزن با 9 CpG (دوران خوشه‌ای شماره ۹) مرتبط بود که یکی از آنها به سطوح PM2.5 در مطالعات قبلی مربوط می‌شد (شکل ۶C). علاوه بر این، سطوح جذب PM2.5 در داخل خانه، مارکر کربن سیاه/ عنصری ناشی از احتراق، با متیلاسیون ۹ CpG، از جمله دو مورد مشترک با مواجهه با تنباکو (شکل ۶C و A)، و با کاهش سطوح سرمی مرتبط بود. آمینو اسیدهای شاخه دار (BCAA)، آسیل کارنیتین C4 و دو اسفنگولیپید (خوشه کودکی شماره ۷). برخی از این ارتباطات پس از تنظیم برای سیگار کشیدن والدین کاهش یافت.

سرم و متابولوم ادرار مسیرهای اصلی قرار مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی را نشان می‌دهد.
خوشه کودکی شماره ۳ شامل مصرف ماهی (اطلاعات جمع آوری شده از طریق پرسشنامه)، فلزات سمی (جیوه (Hg) و آرسنیک (As))، مواد پر و پلی فلوروآلکیل



متیونین در دوران کودکی همراه بود. مس کودک با ۸۹ ویژگی مولکولی مرتبط بود که در لایه‌های مختلف اومیکس توزیع شده است (دوران خوشه‌های شماره ۲). یکی از ارتباطات با کمترین مقدار p با افزایش سطح پروتئین واکنشی (CRP)، نشانگر التهاب بود. علاوه بر این، CpG‌های مرتبط با مس قبلاً با چاقی، دیابت نوع ۲ و آرتریت روماتوئید، یک اختلال التهابی مزمن، در میان دیگران مرتبط بوده اند (شکل ۶C) مسیرهای غنی شده برای مس شامل: پاسخ ایمنی، ذخیره چربی و جداسازی یون‌های فلزی (شکل ۶D) تنظیم برای قرار گرفتن در معرض همزمان (به عنوان مثال سرب) به طور قابل توجهی این ارتباط را تغییر نداد. علاوه بر این، در دوران کودکی، سایر عناصر کمیاب ضروری با ویژگی‌های مولکولی متعدد بدون همپوشانی بین آنها همراه بودند، همانطور که انتظار می‌رفت به دلیل نقش‌های اساسی ذاتی آنها. به عنوان مثال، روی (Zn) با رونویسی بالاتر CA1 (کرنیک انیدراز ۱) مرتبط بود، که بیان آن تحت تأثیر در دسترس بودن Zn^2+ شناخته شده است و از Zn^2+ به عنوان یک کوفاکتور برای فعالیت آنزیمی خود استفاده می‌کند.

شرایط آب و هوایی با تأثیر در تمام لایه‌های اومیکس همراه است

شرایط آب و هوایی یا عوامل هواشناسی (دما، رطوبت، پوشش ابر و فشار اتمسفر)، به ویژه، زمانی که شدید، تعیین کننده قوی سلامت و مرگ و میر هستند. با این حال، هیچ مطالعه‌ای برای ارزیابی سیستماتیک تأثیر آنها بر فنوتیپ‌های مولکولی وجود ندارد. ما شرایط آب و هوایی را از طریق اطلاعات جغرافیایی همراه با داده‌های ایستگاه‌های هواشناسی تخمین زدیم. در دوران کودکی، شرایط آب و هوایی در طول یک ماه قبل از اندازه‌گیری اومیکس با تمام لایه‌های مولکولی، به جز متابولوم ادرار (دوران خوشه‌ای شماره ۴) مرتبط بود. متابولیت‌های سرمی مرتبط با متغیرهای هواشناسی شامل تورین، دی متیل آرژینین نامتقارن (ADMA)، آسپل کارنیتین C5 و سروتونین بودند که قبلاً به عنوان بیومارکر محرومیت از خواب، ریتم شبانه روزی و علت شناسی افسردگی گزارش شده بودند. آنها همچنین با سه پروتئین مرتبط بودند: آدیپونکتین، MCP1 و HGF آدیپونکتین، یک

بیومارکر شناخته شده مصرف میوه و سبزیجات هستند (شکل C، VB). این خوشه همچنین شامل آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (OP) اندازه‌گیری شده در ادرار بود که مسیر بالقوه مواجهه با عوامل محیطی را از طریق دریافت رژیم غذایی میوه‌ها و سبزیجات پیشنهاد می‌کند. همچنین در دوران کودکی خوشه شماره ۶، متابولیت‌های DiNP را یافتیم، اعضای خانواده فتالات که عمدتاً برای تولید پلاستیک‌های انعطاف‌پذیر مانند بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شوند. در مقابل، متابولیت‌های DEHP (MEOHP، MEHHP، MECPP، MEHP)، همچنین فتالات‌های موجود در پلاستیک، در دوران کودکی خوشه‌ای شماره ۵ ثبت شدند و با ۱۳ CpG همراه بودند، بدون همپوشانی واضح با صفات اقرارگیری‌های گزارش شده (شکل MEOHP، MECPP و ۶C). با تعدادی از اسفنگومیلین‌های سرم ارتباط منفی داشتند (SM C16:0، SM C18:0، SM C18:1، SM C20:2) با (SM (OH) C14:1 و SM (OH) C16:1). مواجهه‌ی با متابولیت‌های DEHP و پارابن‌ها، ترکیبات مصنوعی موجود در محصولات مراقبت شخصی، نیز ارتباط منفی با اسفنگومیلین‌ها (SM (OH) C16:1) و والین در کودکان نشان داد.

عناصر کمیاب ضروری اجزای کلیدی اکسپوزوم هستند

عناصر کمیاب ضروری در موجودات زنده برای اطمینان از رشد طبیعی و حفظ عملکردهای بیولوژیکی مورد نیاز هستند، اما در صورت وجود بیش از حد می‌توانند سمی باشند. ما ۹ عنصر ضروری را در خون کامل اندازه‌گیری کردیم (Co، Cu، Mn، Mo، Na، K، Mg، Zn، Se)، و تعداد قابل توجهی از ارتباط‌های تأثیر محیطی - اومیکس، عمدتاً با مولیبدن مادر (Mo)، و مس کودک یافتیم (Cu). مولیبدن مادر به سطوح متیلاسیون CpG 72 مربوط بود که نشان دهنده ۶۳ جایگاه بود. هیچ مجموعه ژن مرتبطی برای ژن‌های مشروح شده در این CpG 72 شناسایی نشد، اما ۱۳ مورد از آنها قبلاً مربوط به سن حاملگی بوده اند (شکل ۶A). مو به عنوان یک عامل مشترک از ۴ آنزیم انسانی که در واکنش‌های کلیدی مختلف از جمله تنظیم آمینو اسیدهای حاوی گوگرد مانند متیونین نقش دارند عمل می‌کند. در مجموعه داده ما، مو مادر با سطوح بالاتر

کمی با بیان سیس (eQTM)، به معنای همبستگی بین بیان ژن و متیلاسیون DNA را شناسایی کردیم. از 187 CpG مرتبط با اکسپوزوم دوران کودکی، ۹ مورد eQTM در مجموع ۱۱ ژن داشتند. با این حال، هیچ یک از این eQTM ها به طور اسمی با مواجهه های مشابه با سایت CpG همراه نبودند. همچنین با استفاده از ابزار miRwalk v3، ژن های هدفمند 49 miRNA مرتبط با اکسپوزوم دوران کودکی را جستجو کردیم. هفده ژن از ۱۲۶۷ ژن مورد نظر با همان مواجهه های miRNA اصلی و در جهت مورد انتظار (سطوح miRNA بالاتر - بیان ژن کمتر) مرتبط بودند. آنها شامل ۷ نوردهی منحصر به فرد (Cd، Cu، K، PFOA، عوامل هواشناسی) و 9 miRNA منحصر به فرد بودند.

همچنین همپوشانی ارتباطات مواجهه های دوران کودکی را برای ۱۲ متابولیت (اسیدهای آمینه، گلوکز، کارنیتین و کراتینین) که هم در ادرار و هم در سرم اندازه گیری شده بودند، مقایسه کردیم. در اهمیت اسمی، ۲۷.۳٪ از انجمن های ادرار در سرم تکرار می شود. و ۷٪ از انجمن های سرمی در ادرار تکرار می شود. جای تعجب نیست که پیوندهای تکراری متابولیت هایی با بالاترین همبستگی بین ماتریس ها (کارنیتین، گلیسین و کراتینین) را شامل می شود.

بحث

این اولین مطالعه اکسپوزومی است که به طور سیستماتیک طیف وسیعی از مواجهه های محیطی را در دوره های آسیب پذیر اولیه زندگی با تاثیر مولتی اومیکس در دوران کودکی مرتبط می کند. ما ۱۱۷۰ ارتباط منحصر به فرد بین مواجهه های محیطی و ویژگی های مولکولی، ۲۴۹ مربوط به بارداری و ۹۲۱ ارتباط با مواجهه های محیطی دوران کودکی را مشاهده کردیم. این مطالعه با تقسیم این ارتباطات به خوشه های شبکه برای تجسم و با انجام تفسیر بیولوژیکی سیستماتیک، پاسخ های بیولوژیکی بالقوه و منابع مواجهه های محیطی را نشان می دهد. یافته های ما تغییرات متیلاسیون مداوم مرتبط با سیگار کشیدن مادر در بارداری و منابع اصلی مواجهه های محیطی آلاینده های شیمیایی از طریق رژیم غذایی را بر اساس بیومارکرها مرتبط با غذا تأیید می کند. علاوه بر این، ما ارتباطات جدید به ویژه با عناصر کمیاب ضروری، شرایط آب و هوایی، کیفیت

تنظیم کننده ضروری گرمایی با رطوبت افزایش می یابد (در اروپا در زمستان بیشتر است) و با اشعه ماوراء بنفش کاهش می یابد (در تابستان بیشتر است). این مطابق با مطالعات قبلی است که نشان می دهد قرار گرفتن در معرض دمای سرد به مدت ۲ ساعت باعث افزایش سطح آدیپونکتین پلازما می شود. بزرگی برخی از این ارتباطات (کارنیتین، C5، آدیپونکتین، سروتونین) پس از مواجهه با بیسفنول A (BPA)، که قبلاً برای کاهش انتشار آدیپونکتین وجود داشت، بیش از ۵۰٪ کاهش یافت. در نهایت، CpG های مرتبط با شرایط آب و هوایی با CpG های گزارش شده برای عفونت، در میان دیگران همپوشانی دارند (شکل ۶C). و ژن های مربوط به دما برای پاسخ سلولی به اینترفرون نوع I غنی شدند (شکل ۶D). بیماری های عفونی از الگوهای فصلی پیروی می کنند و در شرایط خاص هواشناسی شیوع بیشتری دارند، همانطور که اخیراً در امواج مختلف همه گیری COVID-19 نشان داده شده است.

آلاینده های آلی پایدار (POPs) و تغییرات مولتی اومیکس در کودکان

ما دریافتیم که POPs در کودکان، به ویژه PCB ۱۱۸، شبه دیوکسین (۶۹ رابطه)، HCB (28) و PCB 138 (14)، با متیلاسیون DNA، متابولیت های سرم و پروتئین های پلازما (IL1B و لپتین) در گروه بندی خوشه های دوران کودکی مرتبط هستند (شکل ۵). قبلاً گزارش شده بود که CpGs در این خوشه به بیماری التهابی آرتریت روماتوئید مربوط می شود و IL1B و لپتین توسط بافت چربی همانطور که در بالا توضیح داده شد تولید می شوند. ما همچنین یک ارتباط مثبت منحصر به فرد PCB 180 و TMAO ادراری را مشاهده کردیم، بدون هیچ گونه ارتباط دیگری با سایر متابولیت های مرتبط با ماهی که در بالا توضیح داده شد.

تکرار ارتباط های اکسپوزر-ومیک در لایه های مولکولی و ماتریس های بیولوژیکی

ما بررسی کردیم که آیا ارتباط اکسپوزوم دوران کودکی با متیلاسیون DNA، بیان ژن و miRNA که همه در سلول های خون ارزیابی شده اند، به ژن های یکسانی اشاره می کنند یا خیر. برای هر CpG، ما متیلاسیون های صفت



انسان‌ها از طریق رژیم غذایی (در این مورد مصرف میوه و ماهی) به بدن منتقل می‌شوند، که اثر بیولوژیکی آن ممکن است توسط میکروبیوم روده تغییر کند و به پیچیدگی پروفایل‌های متابولومیک در نمونه‌های زیستی انسانی اضافه کند. ایجاد شبکه گسترده‌ای از فعل و انفعالات مواد مغذی-آلاینده که کاملاً ناشناخته باقی مانده و با روش‌های

ارزیابی مرسوم به خوبی تعریف نشده است. در میان مارکرهای مولکولی جدید شناسایی شده، شش گروه از مواجهه‌ی محیطی مکانیسم‌های بیولوژیکی قابل قبولی برای بیماری را برجسته می‌کنند. اول، مس یک عنصر کمیاب ضروری برای فرآیندهای سلولی متعدد، از جمله تنفس میتوکندری، دفاع آنتی‌اکسیدانی، سنتز انتقال دهنده‌های عصبی، و متابولیسم آهن است. در مطالعات قبلی HELIX، مس با چندین پیامد سلامتی مانند عملکرد ضعیف‌تر ریه، BMI و فشار خون بالاتر، و افزایش علائم ADHD مرتبط بوده است، و در اینجا ما مسیرهای مختل بالقوه‌ای را نشان می‌دهیم که ممکن است این ارتباط‌ها را واسطه کند: پاسخ ایمنی، ذخیره چربی و جداسازی از یون‌های فلزی دوم، مسیرهای شناسایی شده برای دود تنباکو (توسعه آکسون، شناخت، سیناپس کولینرژیک، سیگنال دهی انسولین و چندین نوع سرطان) به طور مشابه با اثرات سیگار کشیدن مادر بر پیامدهای سلامتی شناسایی شده در کودکان HELIX (فشار خون و BMI بالاتر، و افزایش مشکلات رفتاری). ما تصدیق می‌کنیم که همانطور که متیلاسیون DNA در خون اندازه‌گیری شد، شناسایی مسیرهای مربوط به سایر بافت‌ها (به عنوان مثال رشد مغز و آکسون) باید با احتیاط مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. اگر مواجهه‌ی محیطی در اوایل رشد اتفاق بیفتد، ممکن است علائم متیلاسیون DNA در سراسر بافت‌ها حفظ شود یا ژن‌های یکسان در مسیرهای مختلف در بافت‌های مختلف دخیل باشند. سوم، کیفیت هوای داخل ساختمان در دوران کودکی با مارکرهای متابولیک (BCAA و آسپیل کارنیتین) مرتبط بود. مطالعه HELIX اولین موردی بود که ارتباطی بین آلودگی هوای داخل خانه و چاقی کودکان پیدا کرد. متابولیسم نامنظم BCAA و آسپیل کارنیتین‌ها با چاقی و مقاومت به انسولین در مطالعات متعدد مرتبط بوده و در شرکت کنندگان چاق جوانی که در معرض آلودگی هوای نزدیک جاده قرار داشتند، شناسایی شده است.

هوای داخل ساختمان، آلاینده‌های پایدار، فتالات‌ها و پارابن‌ها شناسایی می‌کنیم. منبع جامع ما از همه ارتباطات (<https://helixomics.isglobal.org/>) اولین در نوع خود است و برای هدایت تحقیقات آینده در مورد آثار بیولوژیکی اکسیوزوم اولیه زندگی مفید خواهد بود. کاتالوگ وب ما چندین کاربرد دارد: ایجاد بیومارکرها، شناسایی منابع تأثیرات محیطی و درک مکانیسم‌های بیولوژیکی. داده‌های تولید شده در این مطالعه منبعی برای توسعه بیومارکرهای اپی‌ژنتیکی مواجهه‌های گذشته فراهم می‌کند. به عنوان مثال، به طور کلی اعتقاد بر این بود که عنصر ضروری مولیبدن (Mo) برای سلامت انسان بی‌خطر است. با این حال، شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد Mo بیش از حد با اثرات رشدی و با پیامدهای نامطلوب سلامتی مرتبط است. در این مطالعه، سطوح مادری Mo با تغییرات متیلاسیون در تعداد قابل توجهی از CpG‌ها مرتبط بود که حداقل تا دوران کودکی (زمانی که آنها را شناسایی کردیم) پایدار بود. متیلاسیون در این CpG‌ها می‌تواند برای پیش‌بینی سطوح تأثیر قبل از تولد استفاده شود.

همچنین، مطالعه ما توانایی متابولومیک را برای انعکاس دقیق منابع غذایی و اثر میکروبی روده بالقوه مواجهه‌ی محیطی نشان می‌دهد. قوی‌ترین و مهم‌ترین ارتباط در میان تمام اکسیوزومی‌های آزمایش شده برای As و Hg با تری‌متیل‌آمین-N-اکسید (TMAO) و گلیسروفسفولیپیدها پیدا شد. بسیاری از این روابط، به جز رابطه‌ی TMAO-As، پس از تنظیم برای مصرف ماهی و سایر ترکیبات مرتبط با ماهی ضعیف شدند. در واقع، قبلاً ثابت شده بود که TMAO بین مصرف کم ماهی تفاوت قائل است، در حالی که هومارین (یک متابولیت موجود در ماهیچه صدف‌ها) برای مصرف زیاد/غیر صدف در جمعیت‌هایی با مصرف غذاهای دریایی بالا مانند اسپانیا و ژاپن بود. TMAO به عنوان ارتباطی که پس از تنظیم مواجهه با ماهی، قوی‌ترین ارتباط باقی ماند، نقش مستقل میکروبیوم روده را نیز نشان می‌دهد. این یافته مطالعه قبلی ما را بر روی زنان باردار از گروه INMA اسپانیا تأیید می‌کند. شواهد دیگر نشان می‌دهد که میکروبیوم روده ممکن است متابولیسم آرسنیک و حساسیت رشد عصبی را نسبت به این مواجهه تغییر دهد. نکته مهم این است که در این مطالعه نشان می‌دهیم که بسیاری از مواد شیمیایی

بیولوژیکی در طراحی مطالعات اکسپوزومی کلیدی است. بیشتر ارتباط هایی که ما برای اکسپوزوم حاملگی پیدا کردیم، متیلوم بود (۷۰٪ از ارتباط های مشاهده شده). این مطابق با مقالات قبلی است که نشان می دهد اپی ژنوم به عنوان منبع اصلی "حافظه" و پلاستیسیته سلولی عمل می کند. اگر چه، ممکن است تا حدی ماهیت طراحی مطالعه و پوشش اومیکس ما را منعکس کند (یعنی تعداد مارکرهای تحلیل شده در هر لایه اومیکس و همبستگی های درون اومیکس آنها). در مقابل، مواجهه های اخیر در دوران کودکی با ویژگی هایی در تمام لایه های اومیکس همراه بود. شواهد تا به امروز نشان می دهد که متابولوم به طور خاص به شدت تحت تأثیر محیط مستقیم قرار دارد و بنابراین ممکن است برای تشخیص ارتباط در تنظیمات مقطعی حساس تر باشد. با این وجود، بسیاری از ارتباطات مقطعی با متیلوم یافت شد و، اگر چه کمتر، ارتباط طولانی مدت با سایر اومیکس نیز یافت شد. علاوه بر این، مطابقت کم بین متیلوم و miRNAome با رونوشت پیچیدگی بالای تنظیم رونویسی را برجسته می کند و نشان می دهد که هر لایه مولکولی ممکن است پنجره ای از اثرات اکسپوزوم را بگیرد. یافته های ما همچنین اهمیت ماتریس بیولوژیکی را نشان می دهد. اگر چه به دلیل استفاده از پلتفرم های مختلف برای ارزیابی آنها، نمی توانیم مقایسه جامعی از متابولوم های ادرار و سرم انجام دهیم، در میان متابولیت های قابل مقایسه، تنها تعداد کمی از آنها ارتباط ثابتی با اکسپوزوم در هر دو ماتریس بیولوژیکی نشان دادند. بنابراین، هم ماتریس های بیولوژیکی و هم ماتریس های دیگر باید به طور ایده آل در مطالعات اکسپوزوم مورد بررسی قرار گیرند و اطلاعات تکمیلی را ارائه دهند. در نهایت، ما همپوشانی کمی را در ارتباط برای مواجهه با حاملگی و دوران کودکی مشاهده کردیم، که احتمالاً به دلیل همبستگی کم مواجهه بین دوره ای، تفاوت در مسیر مواجهه ی محیطی یا دوز بین دوره ها، و پویایی پاسخ مولکولی است (یعنی مطالعه ما قادر به ثبت پاسخ های بلند مدت اکسپوزوم حاملگی است اما فقط پاسخ های کوتاه مدت اکسپوزوم دوران کودکی). این امر اهمیت پنجره های مواجهه و انتخاب چارچوب دوره زندگی برای مطالعات اکسپوزومی را برجسته می کند. مطالعه ما دارای نقاط قوت متعددی است. اول، ارزیابی جامع مواجهه های محیطی در دو دوره زمانی حیاتی توسعه، از جمله بیومارکرهای بسیار حساس برای

تغییر متابولیسم BCAA و آسید کارنیتین ممکن است یک بیومارکر مهم برای مطالعه بیشتر در رابطه با آلودگی هوا و خطر بیماری قلبی-متابولیک در زندگی بعدی باشد. چهارم، POPها به طور مداوم با پیامدهای نامطلوب بهداشتی مرتبط بوده اند. علاوه بر ارتباطی که احتمالاً با توزیع چربی در کودکان مرتبط است، ما همچنین یک ارتباط مثبت بین PCB 180 و TMAO، محصول میکروبیوتای روده و فعالیت آنزیم مونوکسیژناز حاوی فلاوین کبدی (FMO3) مشاهده کردیم. این ارتباط قبلاً در حیوانات و انسان گزارش شده بود و مستقل از منابع غذایی مشترک بالقوه PCBs و TMAO و BMI ظاهر شد. در حال حاضر، TMAO به عنوان یک عامل ایجاد کننده بیماری قلبی عروقی پیشنهاد شده است، اما تحقیقات بیشتری در مورد پیوند مکانیکی بین PCB، فعالیت / بیان FMO3 و پیامدهای قلبی عروقی مورد نیاز است. پنجم، ما ارتباط هایی با فتالات ها و پارابن ها با وزن مولکولی بالا پیدا کردیم، این ترکیبات مصنوعی هستند که به سرعت در بدن متابولیزه می شوند و مشکوک به اختلالات غدد درون ریز هستند و به شیوه ای خاص بر سلامتی تأثیر می گذارند. مواجهه با فتالات ها بیشتر از طریق رژیم غذایی، بلعیدن گرد و غبار و تا حدودی از طریق استنشاق اتفاق می افتد. امضای متابولیک فتالات ها و پارابن ها به وضوح به الگوهای غذایی مربوط نمی شود، بلکه به یک مسیر متابولیک درون زه، اسفنگوامیلین ها، که اجزای لیپیدی ساختاری مهم غشای سلولی در گیر در سیگنال دهی هستند و در بسیاری از اختلالات دخیل هستند، مربوط می شود. گزارش شده است که واسطه های بیوسنتز اسفنگوکوزین و والین در زنان باردار در معرض فتالات و پارابن افزایش یافته است. ششم، نتایج ما همچنین بینش هایی درباره مکانیسم های بالقوه عمل برای شرایط آبوهوایی ارائه می دهد: به نظر می رسد که اثرات مستقیم (مانند تنظیم گرمایی) و اثرات غیرمستقیم (مثلاً تعیین سایر مواجهه ها مانند بقای ویروس) دارند، یا می توانند نشان دهنده ی متغیرهای دیگر باشند. (به عنوان مثال ساعات روشنایی روز یا تغییرات رژیم غذایی به دلیل تغییرات فصلی). بررسی شرایط هواشناسی در مجموعه داده های اومیکس طولی بزرگتر که الگوهای فصلی را پوشش می دهند برای روشن کردن مکانیسم های علی نهایی مورد نیاز است. مطالعه ما نشان می دهد که انتخاب لایه مولکولی و ماتریس



بر دود تنباکو، کادمیوم ممکن است منشأهای دیگری مانند برنج، سیب زمینی و گندم داشته باشد، زمانی که به طور مکرر در مقادیر زیاد مصرف شود. هدف رویکردهای مخلوط یا چند آلاینده برای مقابله با این موضوع به طور سیستماتیک است، با این حال، اینها هنوز برای مجموعه داده‌های اومیکس با ابعاد بالا مانند ما مناسب نیستند. سوم، مقایسه ما با ادبیات قبلی و تحلیل‌های غنی‌سازی عملکردی توسط سوگیری موجود در پایگاه‌های داده عمومی محدود شده است. چهارم، اگرچه اکثر مطالعات اپیدمیولوژیک از نمونه‌های بیولوژیکی استفاده می‌کنند که به آسانی برای اندازه‌گیری پروفایل‌های اومیکس در دسترس هستند، اما اینها ممکن است بافت هدف ایده‌آل برای پیامدهای سلامت مربوطه نباشند. پنجم، برخی از ارتباط‌ها ناهمگونی بالایی را در بین گروه‌ها (مانند رطوبت و سروتونین) نشان دادند. این را می‌توان با سطوح مختلف مواجهه، همبستگی متفاوت با عوامل مخدوش‌کننده، یا حجم نسبتاً کوچک نمونه در هر گروه توضیح داد. در نهایت، اگرچه مدل‌های ما برای عوامل مخدوش‌کننده تنظیم شده‌اند، ممکن است همچنان مخدوش‌کننده باقیمانده وجود داشته باشد و پیوندهای علی باید از طریق مداخلات، تحلیل‌های تصادفی‌سازی مندلی، مطالعات متقابل متنی یا مدل‌های *in vivo/in vitro* اثبات شوند.

برای نتیجه‌گیری، این اولین مطالعه جامع از شاخص مولتی اومیکس اکسپوزوم اولیه زندگی نشان می‌دهد که فنوتیپ‌های مولکولی می‌توانند پاسخ‌های بیولوژیکی یا منابع مواجهه‌های محیطی را در زمان اولیه زندگی نشان دهند. علاوه بر یافته‌های اصلی شرح داده شده در اینجا، کل کاتالوگ نتیجه در دسترس عموم است (<https://helixomics.isglobal.org/>) که امکان کاوش در فهرست کامل روابط اکسپوزوم-اومیکس را فراهم می‌کند. با اطلاعات غنی از اکسپوزوم و مولکولی موجود، ما منبع ارزشمندی را در اختیار جامعه علمی برای توسعه و اعتبار سنجی بیومارکرهای مواجهه و پاسخ، شناسایی منابع غذایی، بهبود درک خود از علت شناسی بیماری و در نهایت ارتقای سیاست‌های سلامت عمومی قرار می‌دهیم.

منبع:

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-34422-2>

بسیاری از مواجهه‌های شیمیایی و مدل‌سازی فضایی وسیع از محیط بیرون و محیط ساخته شده. دوم، ارزیابی گسترده مولتی اومیکس فنوتیپ‌های مولکولی. سوم، پوشش جغرافیایی گسترده و حجم نمونه نسبتاً بزرگ که توانستیم بسیاری از نوردهی‌ها و ویژگی‌های اومیکس را اندازه‌گیری کنیم. در نهایت، ما چندین آنالیز حساسیت را انجام دادیم که تأیید می‌کردند یافته‌ها از نظر اجداد و zBMI قوی هستند، به استثنای برخی از ترکیبات مواجهه چربی دوست و ویژگی‌های مولکولی خاص.

مطالعه ما نیز محدودیت‌هایی دارد. اول، پلتفرم‌های اومیکس دارای سوگیری پوشش و مسائل تفسیرپذیری بیولوژیکی هستند. به عنوان مثال، روش LC-MS/MS (Biocrates) پوشش کم دارد و ترکیب زنجیره جانبی اسید چرب خاصی را برای لیپیدها ارائه نمی‌دهد، اما به طور گسترده در مطالعات کوهورت بزرگ استفاده می‌شود و اندازه‌گیری‌های قابل تکرار با حاشیه نویسی بدون ابهام را ارائه می‌دهد که به راحتی قابل مقایسه با مطالعات دیگر ما متذکر شدیم که لایه‌های مولکولی اضافی و فناوری‌های اومیکس مورد علاقه برای مطالعات اکسپوزومی آینده وجود دارد که در مطالعه ما گنجانده نشده‌اند، مانند متازنوم روده، طیف‌سنجی جرمی با وضوح بالا حساس یا روش‌های تک سلولی. علاوه بر این، تأثیر تنوع ژنتیکی، به تنهایی یا در ترکیب با اکسپوزوم، در این مطالعه در نظر گرفته نشد. دوم، تأثیرات مختلف با انواع و سطوح مختلف خطای اندازه‌گیری اندازه‌گیری می‌شوند. به عنوان مثال، سطوح ادرار مواد شیمیایی غیر پایدار دارای تنوع درون فردی بالایی است و انتظار می‌رود که به‌ویژه از خطای اندازه‌گیری کلاسیک که منجر به سوگیری میرایی می‌شود، رنج ببرد. استراتژی‌های نمونه‌گیری مکرر و طرح‌های طولی، ممکن است به از هم گسیختگی اثرات متابولیک پایدار مختل‌کننده‌های غدد درون ریز پیشنهاد شده در مطالعه ما کمک کند. انتظار می‌رود مواجهه‌های اندازه‌گیری شده توسط مدل‌ها و پرسشنامه‌ها از انواع دیگر خطاهای اندازه‌گیری با اثرات قابل پیش‌بینی کمتر رنج ببرند. علاوه بر این، ماهیت همبسته اکسپوزوم، شناسایی مواجهه باراندگی را دشوار می‌کند. در اینجا ما سعی کردیم اثرات را با مدل‌های متقابل تنظیم شده یا طبقه‌بندی شده جدا کنیم. به عنوان مثال، با اجرای مدل‌های طبقه‌بندی شده در مادران غیر سیگاری، اثرات اختصاصی Cd را شناسایی کردیم. علاوه