

Современные аспекты эпидемиологии врождённых аномалий развития: методологические вопросы и трансляция результатов исследований в клиническую практику

Решетько О.В., Луцевич К.А.

ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Резюме. Достигнутые успехи в выявлении и характеристике факторов риска возникновения врождённых аномалий происходят в основном благодаря эпидемиологическим исследованиям, давшим многочисленные ассоциации между факторами риска и группами врождённых дефектов. Однако в клинической практике трансляция этих ассоциаций в качестве фактических причин остаётся весьма сложной. Характеристика и эпидемиологический анализ возможных факторов, в частности лекарственных средств, связанных с возникновением врождённых аномалий, имеют решающее значение для разработки профилактических мероприятий, оказывающих воздействие на распространённость дефектов. В дальнейшем уменьшению глобального бремени врождённых дефектов может способствовать интеграция исследований в области эпидемиологии, генетики и эпигенетики через персонализированные и популяционно ориентированные превентивные стратегии.

Ключевые слова: врождённые аномалии; классификация; методы исследования; причинно-следственная связь; тератогены; фактор риска; эпидемиология

Для цитирования:

Решетько О.В., Луцевич К.А. Современные аспекты эпидемиологии врождённых аномалий развития: методологические вопросы и трансляция результатов исследований в клиническую практику // *Качественная клиническая практика*. — 2018. — №3. — С.56—65. DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10051.

Modern aspects of epidemiology of congenital anomalies of development: methodological issues and the translation of research findings into clinical practice

Reshetko O.V., Lutsevich K.A.

FSBEI HE V.I. Razumovsky Saratov SMU MOH Russia, Saratov

Abstract. Progress achieved in the identification and characterization of the risk factors for congenital anomalies occur mainly from epidemiological studies, which gave many associations between risk factors and groups of birth defects. However, in clinical practice the transmission of these associations as the actual reasons remains very difficult. Characteristics and epidemiological analysis of possible factors, including drugs, associated with the occurrence of congenital anomalies, are crucial for the development of prevention activities that have an impact on the incidence of defects. To further reduce the global burden of birth defects can help the integration of studies in epidemiology, genetics and epigenetics through personalized and population oriented preventive strategies.

Keywords: causality; case classification; congenital anomalies; epidemiology; research methods; risk factor; teratogens

For citations:

Reshetko OV, Lutsevich KA. Modern aspects of epidemiology of congenital anomalies of development: methodological issues and the translation of research findings into clinical practice. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2018;3:56—65. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10051.

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), примерно 300 000 новорождённых ежегодно умирают в течение первых 28 дней жизни из-за врождённых аномалий (пороков развития) [1]. По оценке сотрудничающего с ВОЗ фонда «March of Dimes», в мире ежегодно 7,4 млн младенцев рождаются с серьёзными врождёнными анома-

лиями, что вносит вклад в более чем 3,3 млн смертей среди детей в возрасте до 5 лет [2]. В мае 2010 г. 63-я сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения (World Health Assembly, WHA) приняла резолюцию WHA 63.17, подчеркнув важность наблюдения, исследования, профилактики и медицинского вмешательства в развитие врождённых аномалий, учитывая их влияние на младенческую и детскую заболеваемость и смертность [3]. Резолюция призвала

государства-члены «к предотвращению врождённых аномалий по мере возможности, проведению программ скрининга и обеспечению непрерывного ухода за детьми с врождёнными аномалиями и поддержки их семьям».

Врождённые аномалии (congenital anomalies) являются структурными или функциональными нарушениями какого-либо органа с самого рождения, включая метаболические расстройства, и имеют пренатальное происхождение. В литературе часто встречаются также такие термины, как «врождённые дефекты» (birth defects, congenital abnormalities) и «врождённые пороки развития» (ВПР; congenital malformations). При этом последний используется в большей степени в случаях нарушения формирования какой-либо ткани или системы (например, нервной) в I триместре беременности.

Представляющие собой разнородную группу нарушений дородового происхождения, они могут быть вызваны дефектами одного гена, хромосомными расстройствами, многофакторным наследованием, экологическими тератогенами или недостатком микроэлементов в организме [4]. Отмечается, что примерно две трети всех случаев врождённых аномалий не могут быть связаны с конкретной причиной, что ведёт к отсутствию возможности принятия мер для их профилактики [5]. При этом существует особая сложность подходов в популяции беременных к поиску превентивных мер возникновения врождённых дефектов у потомства, так как принципы благоприятного баланса выгод и рисков трудно достижимы, когда необходимо одновременно рассматривать интересы матери и плода [6].

За два последних десятилетия среди предполагаемых факторов риска широкое распространение получили: генетические (например, кодирующий интерферон-регулирующий транскрипционный фактор 6 ген *IRF6* в возникновении врождённых несиндромальных орофациальных расщелин), экологические и связанные с образом жизни матери (например, ожирение, сигаретный дым, алкоголь, потребление питательных веществ), причём принято выделять изменяемые (табакокурение) и неизменяемые (генетические полиморфизмы) риски [7].

Достигнутые успехи в выявлении и характеристике факторов риска возникновения врождённых аномалий обусловлены в основном благодаря эпидемиологическим исследованиям, давшим многочисленные ассоциации между факторами риска и группами врождённых дефектов. Однако в клинической практике трансляция этих ассоциаций в качестве фактических причин остаётся весьма сложной. В этой связи для уточнения до сих пор неизвестных причин необходимы более эффективные стратегии, которые могут включать интеграцию ключевых элементов этиологии, морфологии и патогенеза в эпидемиологических исследованиях; расширение

сотрудничества между исследователями; и более эффективные способы объективной оценки воздействия фактора риска на плод [5]. Таким образом, характеристика и эпидемиологический анализ возможных факторов, в частности лекарственных средств, связанных с возникновением врождённых аномалий, имеют решающее значение для разработки профилактических мероприятий, оказывающих воздействие на распространённость дефектов.

Изучение причинности и факторов риска/предупреждения структурных дефектов

В эпидемиологии врождённых аномалий развития важная роль отводится анализу этиологических факторов конкретных дефектов. Основная цель их изучения содействовать профилактике через обозначение причин и факторов риска, которые можно избежать или изменить [8]. При этом высказано предположение о вполне возможном возникновении врождённых аномалий в основном как стохастических (и неизбежных) событий, когда попытки по расследованию их причины могут оказаться безрезультатными [9]. Хотя с текущим набором знаний может быть предсказана и/или предотвращена только небольшая часть дефектов, считается, что вряд ли остальные пороки развития с невыясненной этиологией являются просто случайным событием, для чего требуется проведение дальнейших исследований [9].

Вследствие того, что формирование врождённых аномалий изначально многофакторное, присутствие тератогенного агента является необходимой, но не достаточной причиной, ставя вопрос о степени повышенного риска. Для описания тератогенного эффекта могут использоваться три вида риска: абсолютный, относительный (или отношение шансов) и атрибутивный (дополнительный риск в популяции) [10]. Если в клинической практике при консультировании беременных женщин удобно использовать понятие абсолютного риска, то в эпидемиологических исследованиях предпочтительно воспользоваться относительными рисками, которые можно легко рассчитать методом логистической регрессии и скорректировать для других модифицирующих тератогенный эффект факторов.

Популяционный атрибутивный риск — это дополнительная доля лиц в группе подвергающихся воздействию конкретным лечением во время беременности в популяции в целом. Данное понятие риска в отличие от других его видов зависит от частоты экспозиции неблагоприятного фактора в популяции и помогает разработать наиболее важные профилактические мероприятия [10]. Таким образом, во время как сосредоточенные на оценке связей между отдельными воздействиями и врождёнными аномалиями исследования обеспечивают понимание этиологии, другие, используемые для оценки про-

гностической способности факторов риска, могут помочь выявить в популяции группы риска.

Современные достижения в области клинической тератологии делают актуальным стремление понять причинно-следственную связь формирования структурных дефектов. В частности, заслуживает внимания обсуждение различия между хорошо установленными тератогенами и внешнесредовыми факторами риска, предрасполагающими к появлению врождённых аномалий или играющих роль в их причинности [11]. Тератогенные агенты обычно вызывают характерный профиль узнаваемых пороков развития у человека (как связанных, так и несвязанных с ростом заболевания или гибелью плода). С другой стороны, факторы риска, включающие демографические характеристики и отдельные воздействия, играют роль в предрасположенности к структурным дефектам, вписываясь в традиционную модель многофакторной причинно-следственной связи. В эпидемиологических исследованиях тератогены, как правило, имеют относительно высокие уровни отношения шансов (например, вальпроевая кислота и дефекты нервной трубки), в то время как факторы риска ведут к более умеренным ассоциациям (например, табакокурение и гастрошизис) [11]. В более общем смысле, тератоген является известной причиной возникновения врождённых дефектов развития, т. е., причинность окончательно установлена (независимо от масштабов риска) на основе клинического исследования, зачастую при поддержке экспериментальных моделей. С факторами риска доказательство слабее, больше неопределённости, и связь воздействия с формированием дефекта развития у плода, вероятно, больше зависит от других факторов (многофакторная модель) [11].

Классификация выявленных случаев врождённых аномалий в эпидемиологических исследованиях

Этиологическая неоднородность факторов риска формирования врождённых дефектов (случаев) может осложнять анализ их выявления и, следовательно, для успешного проведения эпидемиологических исследований важное значение имеет процедура определения случаев с последующей их классификацией [12]. Как правило, эпидемиологические исследования включают фенотипы больших врождённых дефектов, например, открытое в отличие от скрытого расщепление позвоночника, поэтому критерии исключения для малых дефектов должны быть сформулированы на уровне определения случаев [13]. Классификация выявленных случаев включает систематизацию фенотипов дефектов в значимые для анализа категории, когда в целях повышения статистической мощности фенотипические подгруппы часто объединяют в композитный фенотип. Однако обоснованность использования композитных фе-

нотипов может находиться под вопросом, когда у сгруппированных дефектов часто связанные между собой факторы риска не являются общими [14]. И особенно проблемной, в связи со сложностью, является классификация отдельных врождённых пороков сердца [15]. Врождённые аномалии могут быть сформированы как изолированные (одиночные) или в сочетании с дефектами других систем организма (множественные), при этом этиология может отличаться [16]. Множественные врождённые пороки развития принято подразделять по этиологическому принципу на:

- а) синдромы, связанные с хромосомными нарушениями;
- б) моногенные (менделирующие) синдромы;
- в) синдромы, связанные с эмбриопатиями;
- г) неклассифицированные комплексы множественных ВПР.

Необходимо установить: является ли врождённый дефект у младенца изолированным явлением, либо он часть нескольких не связанных между собой (этиологически и патогенетически) дефектов, представляющих тератологическую ассоциацию, или это компонент синдрома, обозначающего устойчивое сочетание двух или более пороков развития, выявляемых в разных системах организма [17]. Таким образом, понятия «ассоциация» и «синдром» позволяют объяснить связь между разными типами аномалий развития. Ещё одно понятие «секвенция» (последовательность) используется, когда основной дефект сопровождается другими большими дефектами, возникшими в разных органах, системах или частях тела, т. е. приводит к каскаду множественных дефектов [18]. Наконец, ещё одна группа неслучайной ассоциации (VATER/VACTERL) представлена моделями известных пороков развития, для которых отсутствует понимание причины происхождения, и их изучение может помочь в биологической достоверности результатов [19]. Объяснением неслучайной ассоциации врождённых дефектов могут быть сходства в эмбриогенезе и/или сроках формирования различных аномалий, что не позволяет предложить общую причину, такую как, например, воздействие лекарственного средства. Среди младенцев с несколькими дефектами некоторые модели могут быть определены, в частности, VATER ассоциация [19], и оценены по отношению к конкретным видам воздействия, потенциально ведущего к идентификации ранее непризнанных синдрома или фенотипа, как например, в случае эмбриопатии, связанной с воздействием иммунодепрессанта микофенолата мофетил [20]. Отсутствие стандартного процесса для определения и классификации врождённых аномалий (случаев) затрудняет сравнение результатов, полученных в различных эпидемиологических исследованиях. Следовательно, принятие стандартных вариантов определения случаев и методов для

их рассмотрения и классификации может облегчить репликацию полученных результатов в различных популяционных исследованиях [21].

Вклад эпидемиологии в определение факторов риска/предупреждения врождённых аномалий развития

Наибольшую трудность вызывает проведение исследований с целью выявления изменяемых факторов риска возникновения врождённых аномалий [21]. Следует отметить, что через формирование различных видов внутриутробных пороков развития плода наблюдается широко варьируемое распределение исходов беременности. Одним из возможных объяснений наблюдаемой связи между воздействием и исходом является причинно-следственная обусловленность, хотя также необходимо учитывать наличие и выраженность как случайных (random error), так и систематических ошибок (systematic error). Последние могут быть представлены предвзятостью (смещение; bias) или влиянием вмешивающихся факторов (конфаундинг; confounding) [22]. Если предвзятость является характерной чертой дизайна исследования, то конфаундинг — это биологическая сторона связи, и правильно спланированное исследование позволяет устранить или скорректировать его влияние. К примеру, результаты исследований врождённых аномалий, дизайн которых ограничивается живорождёнными, могут быть предвзятыми в случае связи определяемого фактора риска с мёртворождением или прекращением беременности (ошибка отбора; selection bias) [23]. Вместе с тем в эпидемиологических исследованиях врождённых дефектов часто необходимо рассмотреть вопрос о дополнительных воздействиях на плод материнского курения, приёма алкоголя и сопутствующих препаратов в рекреационных целях (например, психотропных средств по собственной инициативе) и с учётом конфаундинга скорректировать результаты [24].

За последние десятилетия эпидемиологией врождённых аномалий развития достигнуты определённые успехи в проведении большого количества наблюдательных исследований (observational study) и существенном улучшении дизайна, определении воздействия и исходов, которые стали более конкретными и этиологически значимыми, а также появлении такого аналитического метода, как моделирование [25]. Прогнозирующее моделирование используется с целью предсказания риска врождённых дефектов у потомства, в частности пороков развития нервной трубки. Показано, что на уже известные факторы риска может приходиться < 50 % случаев и в оставшемся большинстве случаев формирование разных фенотипов дефектов (например, спинномозговой грыжи и анэнцефалии) объясняется присутствием пока ещё неизвестных факторов, которые предстоит изучить [26, 27].

Эпидемиологические исследования со структурированным сбором данных и контрольными группами заменили сообщения о клинических случаях/сериях случаев, которые ранее доминировали в этой области [25]. Кроме того, дескриптивная (описательная) эпидемиология демонстрирует для конкретных дефектов совершенно разные примеры уровней их формирования, детализируя фенотипы и предполагая более однородную этиологию, хотя при этом частота возникновения случаев уменьшается.

Наиболее часто используемыми дизайнами эпидемиологических исследований врождённых аномалий, оценивающих связь между воздействием и исходом, являются когортный и случай—контроль. Однако когортные исследования факторов риска для конкретных фенотипов врождённых дефектов, как правило, не располагают достаточным количеством субъектов, за исключением очень распространённых воздействий. И здесь отдаётся предпочтение исследованиям случай—контроль в качестве обнаружения и подтверждения факторов риска [28—31]. Исследования случай—контроль сравнивают частоту интересующего воздействия у беременных матерей на младенцев с конкретными врождёнными дефектами (случаи) или без них (контроли). При этом критика таких исследований направлена на то, что они имеют отношение к изолированным врождённым дефектам, а не к синдромам или профилям. В исследованиях случай—контроль довольно сложно достоверно выяснить причину воздействия, которая может быть основана на материнском воспоминании, оценке медицинских/аптечных записей или страховых претензий, что может повлиять на результаты исследования, предполагая их предвзятость. Трудность точного измерения ретроспективной экспозиции усугубляется относительно коротким периодом органогенеза, что требует воспоминания эпизодических воздействий на уровне дня или недели, для чего были разработаны такие инструменты, как календари и буклеты. И наряду с улучшением сбора данных, сегодня имеется более глубокое понимание причинно-следственных моделей, позволяющее оценить риски без ошибочной поправки принимаемых за конфаундинг промежуточных переменных [32, 33].

Современный список последовательных, надёжных и биологически вероятных причин или факторов риска врождённых аномалий остаётся относительно небольшим [34, 35]. Талидомид, дефицит фолиевой кислоты, изотретиноин, вальпроевая кислота, карбамазепин, метотрексат, микофенолат мофетил; материнские инфекции — краснуха и ветряная оспа во время беременности; такие состояния организма матери, как плохо контролируемый предгестационный сахарный диабет; связанные с образом жизни матери факторы, как курение сигарет и использование высоких доз алкоголя на ранних сроках беременности; вспомогательные репродуктивные технологии,

всё это можно считать причинными факторами, основанными на доказательствах, которые включают в себя несколько крупномасштабных исследований, подробные определения исходов, рассмотрение гестационного срока воздействия и/или соответствующее математическое причинное моделирование. С другой стороны, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), кортикостероиды, ингибиторы протонного насоса, опиоиды, аспирин, простуда, цинк, кокаин, кофеин, триметоприм/сульфаметоксазол и низкие дозы алкоголя можно рассматривать только в качестве факторов риска с более слабой базой доказательств из-за противоречивых результатов исследований, недостаточности данных и/или отсутствия биологической достоверности [36].

Эпидемиология врождённых аномалий развития в постгеномную эру: генетико-эпидемиологические исследования

Эпидемиологические исследования позволяют идентифицировать генетические и внешнесредовые риски возникновения врождённых аномалий на популяционном уровне, а также в ряде случаев могут оценить взаимодействие генов и факторов окружающей среды. Большинство структурных врождённых дефектов развития формируется в начале эмбриогенеза, в течение первых 10 нед. гестации, с пространственно-временной последовательностью действий, когда требуется сложная координация миграции, пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, что, в конечном итоге, определяет трёхмерные события в созревании и развитии эмбриона. При этом вовлечённые в сложную историю эмбрионального развития множественные гены и биологические пути восприимчивы к экзогенным воздействиям или состоянию материнского организма [37]. Этиология большинства врождённых аномалий представлена комплексными нарушениями, вызванных воздействием не полностью понятных сочетаний генетических и внешнесредовых факторов [38]. Между тем, в большинстве исследований этиологии врождённых дефектов у человека изучаются только генетические или внешнесредовые факторы и не рассматриваются взаимодействия между генами, различными факторами окружающей среды или между генетическими и внешнесредовыми факторами [39].

Наиболее распространённые типы врождённых аномалий, которые могут встречаться как изолированные состояния, либо являться симптомом наследственных синдромов, представлены орофациальными расщелинами, дефектами сердца, нервной трубки и конечностей [40]. Отмечается, что 10–20 % всех ВПР происходят в рамках самостоятельного синдрома [41], и таким образом, в большинстве случаев возникают изолированные формы, предполагая более важную роль в их формировании внеш-

несредовых факторов [42]. Тем не менее, врачи-дисморфологи, в первую очередь, должны быть готовы к диагностике синдромов: происходят ли они из-за лежащей в основе генетической вариации, либо в результате внешнесредового воздействия или состояния организма матери, таких как алкоголизм или диабет [42]. Значение изучения этих переменных стало необходимым после получения документального подтверждения, что внутриутробная экспозиция талидомидом не является основной причиной всех наблюдаемых пороков развития у младенцев [43].

Генетические факторы давно были признаны важной причиной формирования синдромальных и несиндромальных врождённых аномалий [28]. Несиндромальные врождённые дефекты определены как пороки развития, которые не связаны с известным или опознаваемым синдромом [44]. Этиология большинства таких врождённых дефектов остаётся не полностью понятной, и они, как считается, являются результатом сложного взаимодействия между генетическими, эпигенетическими, внешнесредовыми и связанными с образом жизни матери факторами [45]. Например, курение может изменять процессы развития и экспрессию ключевых генов развития, таких как *GATA4*, а влияние воздействия окружающей среды и образа жизни на развивающийся плод, в свою очередь, может зависеть от генетической восприимчивости матери и плода. Если ранние исследования этиологии несиндромальных врождённых дефектов были сосредоточены главным образом на изучении независимой роли внешнесредовых и связанных с образом жизни матери воздействий на фоне генетической предрасположенности, то в последнее время в формировании врождённых дефектов и многих других болезней человека уделяется повышенное внимание эпигенетической регуляции. Хотя исследования роли эпигенетики (изменения экспрессии генов или фенотипа клетки, вызванных механизмами, не связанными с изменениями нуклеотидной последовательности генома, но влияющими на уровень транскрипции генов) в формировании врождённых дефектов по-прежнему ограничены, они являются очень важными, поскольку могут помочь установить молекулярные основы взаимодействия генов и внешней среды [39].

Генетические исследования выявления этиологии несиндромальных врождённых дефектов в организме человека по большей части ограничиваются демонстрацией связи между аллельными вариантами генов и фенотипами дефектов. Такие исследования ассоциации являются наиболее легко сравнимыми с традиционными эпидемиологическими дизайнами случай—контроль. Популяционные выборки случаев и контролей или небольшие нуклеарные (ядерные) семьи (мать, отец и ребёнок), или те и другие включены в исследование, в котором сравниваются частоты конкретных генетических полиморфизмов

у затронутых и незатронутых лиц. Такие сравнения могут включать в себя исследуемых детей, а также одного или обоих родителей [45].

После того, как установлено, что генетические вариации влияют на возникновение конкретного врождённого дефекта, исследования предназначены для выявления и оценки «генов-кандидатов». Исследования ассоциативных генов-кандидатов врождённых дефектов основаны не только на результатах биологии развития, но также на полученных данных из эпидемиологических исследований. Например, подтверждение в начале 1990 годов, что периконцептуальное потребление фолиевой кислоты снижает риск дефектов нервной трубки [46]. Ранние генетические исследования были сосредоточены на тестировании ассоциации небольшого количества кандидатов однонуклеотидных полиморфных вариантов (single nucleotide polymorphism, SNP) с распространёнными дефектами. И для многих из этих исследований гены-кандидаты отбирались на основе модельного организма нормального и ненормального развития мыши [44]. Однако при отборе ассоциативных генов-кандидатов такой подход может быть уязвимым для случайного смещения, когда возможно, что значимая ассоциация обнаруживается по чистой случайности, вследствие чего важна репликация полученных результатов [44]. Опубликованные в последние годы обзоры исследований ассоциативных генов-кандидатов врождённых дефектов свидетельствуют, что в развитие дефектов орофациальных расщелин и нервной трубки, сердца и почек вовлечены сигнальные пути Wnt, BMP и Hedgehog, а также мутации в генах, кодирующие ключевые ферменты фолатного цикла [47—51].

Врождённые дефекты иногда группируются в семьи и имеют более высокий уровень рецидива среди полнородных сиблингов по сравнению с неполнородными. Это особенно верно для синдромальных врождённых дефектов, которые часто сегрегируются как аутомно-доминантные, аутомно-рецессивные или X-сцепленные признаки [52]. Напротив, генотип может играть только второстепенную роль во врождённых дефектах, вызванных воздействием на мать тератогенного фактора, например, изотретиноина [53]. Считается, что как обычные, так и редкие генетические варианты, способствуют риску несиндромальных врождённых дефектов. В отличие от исследований выявления гена-кандидата полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) не ограничен предварительным знанием и связан с исследованием ассоциаций между геномными вариантами и фенотипическими признаками. При этом под исследованиями методом GWAS часто подразумевают только поиск новых генов, вовлечённых в формирование предрасположенности к полигенным заболеваниям. Однако лишь немногие GWAS-исследования были направле-

ны на изучение конкретных врождённых дефектов [54—60]. Сделаны выводы о полезности применения метода GWAS для выявления новых хромосомных регионов, связанных с формированием врождённых дефектов. Однако для большинства GWAS-исследований необходимо избегать статистических ошибок I-го типа, проводя тщательную проверку полученных результатов с подтверждением найденных ассоциаций в репликационной фазе исследования. Тем не менее, для идентификации генетических факторов риска существует необходимость всестороннего изучения генома для выявления новых областей нахождения генов, связанных с врождёнными дефектами [61]. В дополнение к полиморфизмам имеются доказательства, что число копий вариантов в геноме может играть важную роль в этиологии некоторых врождённых дефектов. Вариация числа копий генов (copy number variation, CNV) — это вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов размером от 1 тыс. до нескольких млн пар оснований, возникающие в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации (удвоение). Подавляющая часть CNV выявляется при помощи сравнительной геномной гибридизации и при полногеномном SNP-генотипировании [62]. Предполагается, что ассоциации CNV с врождёнными дефектами выступают непосредственно причиной фенотипов в отличие от полиморфизмов, которые часто являются просто региональными маркерами [63].

Дальнейшего изучения требует обусловленность действия внешнесредовых факторов, вызванная либо путём прямого тератогенного влияния на формирование врождённого дефекта, или опосредовано через нарушение трансляции гена путём изменения в метилировании, или другого эпигенетического механизма [42]. Однако комбинированные эффекты генетики и эпигенетики во внутриутробной среде и последующее развитие плода недостаточно изучены и требуют дальнейших исследований. Альтернативным объяснением могут быть соматические мутации генов онтогенеза, когда мозаичность также может произойти гораздо чаще, чем ожидалось у больных с синдромами [64]. Это означает, что изучать причины формирования пороков развития необходимо не только с помощью методов нового поколения секвенирования (next generation sequencing, NGS) ДНК, полученной из лейкоцитов, но также проводить исследования метилирования в масштабах генома и изолированной из других тканей ДНК. Уровень мозаичности может быть чрезвычайно низким, и чтобы это обнаружить требуются тщательно разработанные подходы [65].

При этом исследования, рассматривающие взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов, требуют специального дизайна, особого сбора

данных и биологических образцов, помимо тех, которые необходимы для стандартного исследования только генетических или внешнесредовых факторов [66]. Кроме того, исследования, одновременно изучающие генетические и внешнесредовые факторы, обычно состоят из очень больших выборок и, таким образом, чрезвычайно дорогостоящие для выполнения [67, 68]. Эти вопросы могут быть ещё сложнее в ходе аналитического этапа ввиду необходимости рассмотрения сотен или тысяч комбинаций врождённого дефекта и экспозиции и сотен тысяч или миллионов генетических маркёров одновременно.

Методологические проблемы эпидемиологии врождённых аномалий: вектор в будущее

Несмотря на возросшее знание факторов риска, существует пробел в понимании причин формирования большинства врождённых дефектов. Кроме того, хотя суммарно врождённые дефекты широко распространены, некоторые из них — довольно редки и, вероятно, возникают при различных воздействиях, требующих отдельного изучения. В этой связи предлагается направить усилия учёных на получение и расширение знаний о непосредственном улучшении здоровья человека в рамках так называемой «консеквенциалистской эпидемиологии» (*consequentialist epidemiology*)¹ [25, 69]. С позиции общественного здравоохранения, кроме установления причин и изменяемых факторов риска врождённых дефектов, актуальными должны стать исследования с целью предотвращения или, по крайней мере, прогнозирования их возникновения [9]. По мере того, как эпидемиологические исследования не позволяют обнаружить причинные факторы для врождённых аномалий, противоречивость полученных результатов предполагает довольно сложный патогенез их развития [25]. В этой связи, чтобы понять нормальное и патологическое эмбриологическое развитие, необходимо провести метаболические, протеомические, геномные и эпигеномные исследования. Инструменты «омикс»-технологий быстро прогрессируют [70], однако в случае врождённых дефектов доступ к биомаркёрам ограничен сроком органогенеза в раннем эмбриональном периоде. По этой причине, в системе здравоохранения ключевыми факторами в предотвращении врождённых дефектов остаются планирование беременности и получение дородового ухода. Таким образом, признание характерных методологических трудностей в изучении формирования врождённых аномалий, когда первичная профилактика через понимание патогенеза и этиологии не представляется легко достижимой це-

лью, заставляет обратиться к парадигме «консеквенциалистской эпидемиологии» с её основной задачей улучшения здоровья [25].

Интерпретация и трансляция данных эпидемиологических исследований врождённых аномалий в клиническую практику

Предпринятый *Feldkamp ML, et al.* поиск в электронной базе данных PubMed выявил более 9000 англоязычных статей, опубликованных с 2010 по 2014 гг. и касающиеся причин и факторов риска развития структурных дефектов в организме человека, обратив внимание на три определяющие тенденции в научных работах [11]. Во-первых, показан рост использования лекарственных средств женщинами во время беременности, причём в I триместре более чем на 60 %, и приём 4 или более препаратов увеличился в три раза [71]. Во-вторых, среди женщин репродуктивного возраста чаще наблюдается ожирение до беременности, связанное с развитием широкого круга структурных дефектов у новорождённых (например, дефектов нервной трубки, аномалий сердечной перегородки, орофациальных расщелин) [72]. В-третьих, растущее количество работ с результатами, связанными со вспомогательной репродуктивной технологией, предполагает небольшое увеличение риска развития врождённых структурных аномалий, хотя в исследованиях имеются многочисленные ограничения [73, 74]. Эти новые тенденции, связанные с социальными изменениями в обществе, ведут к пониманию для будущих исследований потенциала внешнесредовых факторов риска. Некоторые из факторов риска изменяемые и несут возможность разработки стратегий для уменьшения их проявления, например, ожирение до беременности и табакокурение. Другие факторы, включая лекарственные средства, которые часто необходимы для лечения болезни матери (например, анти тиреоидные препараты при гиперфункции щитовидной железы), являются частично изменяемыми рисками, которые позволяют переход на наименее рискованный препарат в прекоцепционный период [11, 36, 75].

Следует отметить, что при изучении этиологии врождённых дефектов незначительные модификации в исследованиях также могут быть увязаны с консеквенциалистской повесткой. К примеру, так как профилактическое потребление фолиевой кислоты в США ниже у латиноамериканской популяции, методом имитационного моделирования (симуляции) проведена оценка потенциального воздействия обогащённого фолиевой кислотой теста из маисовой муки на распространение дефекта нервной трубки [76]. Сравнительные исследования эффективности лечения, например, противоэпилептическими препаратами с известными или предполагаемыми профилями риска врождённых дефектов, также дают

¹ Под «консеквенциализмом» понимается группа моральных теорий, где критерием нравственной оценки является результат (консеквент) поведения.

возможность для получения значимых и переносимых в клиническую практику данных, позволяющих информировать врачей и пациенток о рисках и преимуществах вариантов лечения [77, 78]. Повышенные риски формирования определённых врождённых дефектов, связанных с препаратами, преобразуемыми в организме матери в N-нитрозамины, также могут быть уменьшены среди женщин с высоким потреблением витамина С, известного ингибитора процесса нитрозирования [79]. Наконец, в качестве примера может служить исследование связи вспомогательных репродуктивных технологий и дефектов нервной трубки, в котором почти весь приблизительно удвоенный риск опосредуется через многоплодную беременность, предполагая, что перенос меньшего количества эмбрионов позволит снизить риск [80]. Таким образом, с целью принятия обоснованного клинического решения важна оценка потенциальных тератогенных рисков. С консеквенциалистской точки зрения является оправданным дальнейшее наблюдение за меняющимся ландшафтом материнских экспозиций, в частности новыми комбинациями лекарственных средств для лечения ожирения, несущих потенциальные риски формирования врождённых аномалий у потомства [25, 81].

Вместе с тем, для большинства ежегодно выходящих на рынок новых лекарственных средств отсутствует достаточное количество клинических и эпидемиологических данных, чтобы определить тератогенный риск [82]. Временные тенденции распространённости определённых врождённых дефектов находятся под влиянием многочисленных факторов, и снижение воздействия одного фактора риска может быть компенсировано увеличением другого. Например, в США распространённость курения сигарет во время беременности, фактора риска для некоторых врождённых дефектов, снизилась с 18,4 % в 1990 г. [83] до 12,3 % в 2010 г. [84]. Однако, распространённость ожирения, другого признанного фактора риска для некоторых врождённых дефектов, резко возрос-

ло для женщин репродуктивного возраста с 12,0 % в 1991 г. [85] до 35,7 % в 2009—2010 гг. [86]. С другой стороны, хотя распространённость традиционного курения снизилась, введение и расширение использования электронных сигарет во время беременности ведёт к увеличению воздействия никотина [87].

Заключение

Несмотря на многочисленность факторов риска в контексте материнской и внутриутробной среды, имеющийся опыт свидетельствует только о незначительном числе пренатальных воздействий, для которых имеются данные количественной оценки связанных с ними рисков развития врождённых дефектов. Современные эпидемиологические исследования имеют важное значение для выявления и глубокого понимания значимости экологических факторов риска и их взаимодействия в возникновении врождённых аномалий у человека, хотя также необходимы трансляционные исследования и междисциплинарное сотрудничество. Полученные знания о причинах возникновения врождённых аномалий позволяют женщинам и их лечащим врачам принимать более обоснованные решения о рисках пренатальных воздействий, приводящие к снижению числа пострадавших от врождённых дефектов беременностей. В дальнейшем уменьшить глобальное бремя врождённых дефектов может помочь интеграция исследований в области эпидемиологии, генетики и эпигенетики через персонализированные и популяционно ориентированные превентивные стратегии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Участие авторов. Луцевич К.А. — написание текста, редактирование; Решетько О.В. — написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Решетько Ольга Вилоровна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: reshetko@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-3107-7636

д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского
Минздрава России, Саратов

Луцевич Константин Александрович

к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО
Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского
Минздрава России, Саратов

Reshetko Olga

Corresponding author

e-mail: reshetko@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-3107-7636

MD, professor, Head of Department of Pharmacology,
FSBEI HE V.I. Razumovsky Saratov SMU MOH Russia,
Saratov

Lutsevich Konstantin

PhD, Assistant Professor of Department of Pharmacology,
FSBEI HE V.I. Razumovsky Saratov SMU MOH Russia,
Saratov

Литература / References

1. who.int [Internet]. World Health Organization. Congenital anomalies, Fact Sheet 370, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2016 [cited 2018 Aug 29]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/>
2. Christianson AL, Howson CP, Modell B. The March of Dimes Global Report on Birth Defects: The Hidden Toll of Dying and Disabled Children. New York: March of Dimes Birth Defects Foundation, White Plains, 2006.
3. who.int [Internet]. World Health Assembly resolution 63.17: birth defects [updated May 21 2010; cited 2018 Aug 29]. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63-REC1/WHA63_REC1-P2-en.pdf.
4. WHO/CDC/ICBDSR. Birth defects surveillance: a manual for programme managers [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014 [cited 2018 Aug 29]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefectscount/documents/bd-surveillance-manual.pdf>.
5. Feldkamp ML, Carey JC, Byrne JLB, et al. Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. *BMJ*. 2017;357:j2249. DOI: 10.1136/bmj.j2249
6. Goodrum LA, Hankins GDV, Jermain D, Chanaud CM. Conference report: complex clinical, legal, and ethical issues of pregnant and postpartum women as subjects in clinical trials. *J Womens Health (Larchmt)*. 2003;12(9):857-867. DOI: 10.1089/15409903770948087
7. Włodarczyk B, Palacios A, Chapa C, et al. Genetic basis of susceptibility to teratogen induced birth defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011;157C(3):215-226. DOI: 10.1002/ajmg.c.30314
8. Rasmussen SA, Erickson JD, Reef SE, Ross DS. Teratology: from science to birth defects prevention. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009;85(1):82-92. DOI: 10.1002/bdra.20506
9. Hernandez-Diaz S, Oberg AS. Are epidemiological approaches suitable to study risk/preventive factors for human birth defects? *Curr Epidemiol Rep*. 2015;2(1):31-36. DOI: 10.1007/s40471-015-0037-5
10. Friedman JM. Big risks in small groups: the difference between epidemiology and counselling. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009;85(8):720-724. DOI: 10.1002/bdra.20606
11. Feldkamp ML, Botto LD, Carey JC. Reflections on the etiology of structural birth defects: established teratogens and risk factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015;103(8):652-655. DOI: 10.1002/bdra.23392
12. Rasmussen SA, Olney RS, Holmes LB, et al. Guidelines for case classification for the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2003;67(3):193-201. DOI: 10.1002/bdra.10012
13. Holmes LB, Westgate MN. Inclusion and exclusion criteria for malformations in newborn infants exposed to potential teratogens. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011;91(9):807-812. DOI: 10.1002/bdra.20842
14. Lupo PJ, Symanski E, Waller DK, et al. Polytomous logistic regression as a tool for exploring heterogeneity across birth defect subtypes: an example using anencephaly and spina bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(8):701-705. DOI: 10.1002/bdra.20671
15. Botto LD, Lin AE, Riehle-Colarusso T, et al. Seeking causes: classifying and evaluating congenital heart defects in etiologic studies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007;79(10):714-727. DOI: 10.1002/bdra.20403
16. Correa A, Gilboa SM, Besser LM, et al. Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(3):237.e1-237.e9. DOI: 10.1016/j.ajog.2008.06.028
17. Khoury MJ. Commentary: contributions of epidemiology to the study of birth defects in humans. *Teratology*. 1995;52(4):186-189. DOI: 10.1002/tera.1420520403
18. Jones KL, Jones MC, Del Campo M. (eds.) Smith's recognizable patterns of human malformation. 7th ed. Saunders: 2013. 1019 p.
19. Solomon BD, Bear KA, Kimonis V, et al. Clinical geneticists' views of VACTERL/VATER association. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(12):3087-3100. DOI: 10.1002/ajmg.a.35638
20. Perez-Aytes A, Ledo A, Boso V, et al. In utero exposure to mycophenolate mofetil: a characteristic phenotype? *Am J Med Genet A*. 2008;146A(1):1-7. DOI: 10.1002/ajmg.a.32117
21. Tinker SC, Gilboa S, Reefhuis J, et al. Challenges in studying modifiable risk factors for birth defects. *Curr Epidemiol Rep*. 2015;2(1):23-30. DOI: 10.1007/s40471-014-0028-y
22. Scialli AR. The National Birth Defects Prevention Study: how to communicate data. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014;19(3):170-176. DOI: 10.1016/j.siny.2013.09.007
23. Howards PP, Johnson CY, Honein MA, Flanders WD. Adjusting for bias due to incomplete case ascertainment in case-control studies of birth defects. *Am J Epidemiol*. 2015;181(8):595-607. DOI: 10.1093/aje/kwu323
24. Kallen B. The problem of confounding in studies of the effect of maternal drug use on pregnancy outcome. *Obstet Gynecol Int*. 2012;2012:148616. DOI: 10.1155/2012/148616
25. Werler MM. Congenital malformations and consequential epidemiology. *Curr Epidemiol Rep*. 2015;2(1):8-12. DOI: 10.1007/s40471-014-0029-x
26. Agopian AJ, Lupo PJ, Tinker SC, et al. Working towards a risk prediction model for neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012;94(3):141-146. DOI: 10.1002/bdra.22883
27. Agopian AJ, Tinker SC, Lupo PJ, et al. Proportion of neural tube defects attributable to known risk factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2013;97(1):42-46. DOI: 10.1002/bdra.23100
28. Yoon P, Rasmussen SA, Lynberg M, et al. The National Birth Defects Prevention Study. *Public Health Rep*. 2001;116(Suppl 1):32-40. DOI: 10.1093/phr/116.S1.32
29. Rodriguez-Pinilla E, Mejias C, Prieto-Merino D, et al. Risk of hypospadias in newborn infants exposed to valproic acid during the first trimester of pregnancy: a case-control study in Spain. *Drug Saf*. 2008;31(6):537-543. DOI: 10.2165/00002018-200831060-00008
30. Werler MM, Louik C, Mitchell AA. Case-control studies for identifying novel teratogens. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011;157C(3):201-208. DOI: 10.1002/ajmg.c.30307
31. Poletta FA, Gili JA, Castilla EE. Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC): a model for health collaborative studies. *Public Health Genomics*. 2014;17(2):61-67. DOI: 10.1159/000356568
32. Hernán MA, Hernández-Díaz S, Werler MM, Mitchell AA. Causal knowledge as a prerequisite for confounding evaluation: an application to birth defects epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2002;155(2):176-184. DOI: 10.1093/aje/155.2.176
33. Wilcox AJ, Weinberg CR, Basso O. On the pitfalls of adjusting for gestational age at birth. *Am J Epidemiol*. 2011;174(9):1062-1068. DOI: 10.1093/aje/kwr230
34. Holmes LB. Human teratogens: update 2010. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011;91(1):1-7. DOI: 10.1002/bdra.20748
35. Obican S, Scialli AR. Teratogenic exposures. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011;157C(3):150-169. DOI: 10.1002/ajmg.c.30310
36. Simeone RM, Feldkamp ML, Reefhuis J, et al. CDC Grand Rounds: understanding the causes of major birth defects — steps to prevention. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;64(39):1104-1107. DOI: 10.15585/mmwr.mm6439a3
37. Srivastava D. Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:199-213. DOI: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100039
38. Zhu H, Kartiko S, Finnell RH. Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clin Genet*. 2009;75(5):409-423. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2009.01174.x
39. Friedman JM. Using genomics for birth defects epidemiology: can epigenetics cut the GxE Gordian knot? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011;91(12):986-989. DOI: 10.1002/bdra.22875
40. Parker SE, Mai CT, Canfield MA, et al. Updated National Birth Prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(12):1008-1016. DOI: 10.1002/bdra.20735
41. Carmichael SL. Birth defects epidemiology. *Eur J Med Genet*. 2014;57(8):355-358. DOI: 10.1016/j.ejmg.2014.03.002
42. Graham JM Jr, Hennekam RC. Genetics of common malformations. *Eur J Med Genet*. 2014;57(8):353-354. DOI: 10.1016/j.ejmg.2014.05.007
43. Martínez-Frías ML. Talidomida: 50 años después [The thalidomide experience: review of its effects 50 years later]. *Med Clin (Barc)*. 2012;139(1):25-32. DOI: 10.1016/j.medcli.2011.10.011. [Article in Spanish].
44. Webber DM, MacLeod SL, Bamshad MJ, et al. Developments in our understanding of the genetic basis of birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015;103(8):680-691. DOI: 10.1002/bdra.23385
45. Hobbs CA, Chowdhury S, Cleves MA, et al. Genetic epidemiology and nonsyndromic structural birth defects: from candidate genes to epigenetics. *JAMA Pediatr*. 2014;168(4):371-377. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2013.4858
46. Houk V, Oakley G Jr, Erickson JD, et al. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recomm Rep*. 1992;41(RR-14):1-7.
47. Leslie EJ, Murray JC. Evaluating rare coding variants as contributing causes to non-syndromic cleft lip and palate. *Clin Genet*. 2013;84(5):496-500. DOI: 10.1111/cge.12018
48. Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):R113-129. DOI: 10.1093/hmg/ddp347
49. Gelb B, Brueckner M, Chung W, et al. The Congenital Heart Disease Genetic Network Study: rationale, design, and early results. *Circ Res*. 2013;112(4):698-706. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300297
50. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011;12(3):167-178. DOI: 10.1038/nrg2933

51. Rana MS, Christoffels VM, Moorman AF. A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207(4):588-615. DOI: 10.1111/apha.12061.
52. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*. 2013;112(4):707-720. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300853
53. Rosa FW. Teratogenicity of isotretinoin. *Lancet*. 1983;2(8348):513.
54. van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, et al. Common variants in DGKK are strongly associated with risk of hypospadias. *Nat Genet*. 2011;43(1):48-50. DOI: 10.1038/ng.721
55. Geller F, Feenstra B, Carstensen L, et al. Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nat Genet*. 2014;46(9):957-963. DOI: 10.1038/ng.3063.
56. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2009;41(4):473-477. DOI: 10.1038/ng.333
57. Grant SF, Wang K, Zhang H, et al. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr*. 2009;155(6):909-913. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.06.020
58. Beaty TH, Ruczinski I, Murray JC, et al. Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate. *Genet Epidemiol*. 2011;35(6):469-478. DOI: 10.1002/gepi.20595
59. Garcia-Barceló MM, Yeung MY, Miao XP, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24.2. *Hum Mol Genet*. 2010;19(14):2917-2925. DOI: 10.1093/hmg/ddq196
60. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*. 2010;42(1):24-26. DOI: 10.1038/ng.506
61. Olshan AF, Hobbs CA, Shaw GM. Discovery of genetic susceptibility factors for human birth defects: an opportunity for a National Agenda. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(8):1794-1797. DOI: 10.1002/ajmg.a.34103
62. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444-454. DOI: 10.1038/nature05329
63. Zhang F, Gu W, Hurler ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:451-481. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164217
64. Huisman SA, Redeker EJ, Maas SM, et al. High rate of mosaicism in individuals with Cornelia de Lange syndrome. *J Med Genet*. 2013;50(5):339-344. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101477
65. Tapper WJ, Foulds N, Cross NC, et al. Megalencephaly syndromes: exome pipeline strategies for detecting low-level mosaic mutations. *PLoS One*. 2014;9(1):e86940. DOI: 10.1371/journal.pone.0086940
66. Glidewell J, Reefhuis J, Rasmussen SA, et al. Factors affecting maternal participation in the genetic component of the National Birth Defects Prevention Study — United States, 1997-2007. *Genet Med*. 2014;16(4):329-337. DOI: 10.1038/gim.2013.143
67. Dempfle A, Scherag A, Hein R, et al. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(10):1164-1172. DOI: 10.1038/ejhg.2008.106
68. Burton PR, Hansell AL, Fortier I, et al. Size matters: just how big is BIG?: Quantifying realistic sample size requirements for human genome epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2009;38(1):263-273. DOI: 10.1093/ije/dyn147
69. Galea S. An argument for a consequentialist epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2013;178(8):1185-1191. DOI: 10.1093/aje/kwt172
70. Horgan RP, Clancy OH, Myers JE, Baker PN. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG*. 2009;116(2):173-181. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2008.01997.x
71. Mitchell AA, Gilboa SM, Werler MM, et al. Medication use during pregnancy, with particular focus on prescription drugs: 1976-2008. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(1):51.e1-51.e8. DOI: 10.1016/j.ajog.2011.02.029
72. Correa A, Marcinkavage J. Pregnancy obesity and the risk of birth defects: an update. *Nutr Rev*. 2013;71(Suppl 1):S68—S77. DOI: 10.1111/nure.12058
73. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1803-1813. DOI: 10.1056/NEJMoa1008095
74. Okun N, Sierra S. Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *J Obstet Gynaecol Can*. 2014;36(1):64-83. DOI: 10.1016/S1701-2163(15)30685-X
75. Alwan S, Chambers CD. Findings from the National Birth Defects Prevention Study: interpretation and translation for the clinician. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015;103(8):721-728. DOI: 10.1002/bdra.23394
76. Tinker SC, Devine O, Mai C, et al. Estimate of the potential impact of folic acid fortification of corn masa flour on the prevention of neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2013;97(10):649-657. DOI: 10.1002/bdra.23158
77. Werler MM, Ahrens KA, Bosco JL, et al. Use of antiepileptic medications in pregnancy in relation to risks of birth defects. *Ann Epidemiol*. 2011;21(11):842-850. DOI: 10.1016/j.annepidem.2011.08.002
78. Hernandez-Diaz S, Smith CR, Shen A, et al. Comparative safety of antiepileptic drugs during pregnancy. *Neurology*. 2012;78(21):1692-1699. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182574f39
79. Shinde MU, Vuong AM, Brender JD, et al. Prenatal exposure to nitrosatable drugs, vitamin C, and risk of selected birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2013;97(8):515-531. DOI: 10.1002/bdra.23137
80. Benedum CM, Yazdy MM, Mitchell AA, Werler MM. Impact of periconceptual use of nitrosatable drugs on the risk of neural tube defects. *Am J Epidemiol*. 2015; 182(8):675-684. DOI: 10.1093/aje/kwv126
81. Kim GW, Lin JE, Blomain ES, Waldman SA. Antiobesity pharmacotherapy: new drugs and emerging targets. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95(1):53-66. DOI: 10.1038/clpt.2013.204
82. Adam MP, Polifka JE, Friedman JM. Evolving knowledge of the teratogenicity of medications in human pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011;157C(3):175-182. DOI: 10.1002/ajmg.c.30313
83. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking during pregnancy--United States, 1990-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004;53(39):911-915.
84. Tong VT, Dietz PM, Morrow B, et al. Trends in smoking before, during, and after pregnancy — Pregnancy Risk Assessment Monitoring System, United States, 40 sites, 2000-2010. *MMWR Surveill Summ*. 2013;62(6):1-19.
85. Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, et al. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA*. 1999;282(16):1519-1522. DOI: 10.1001/jama.282.16.1519
86. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity in the United States, 2009-2010. *NCHS Data Brief*. 2012;(82):1-8.
87. England LJ, Anderson BL, Tong VT, et al. Screening practices and attitudes of obstetricians-gynecologists toward new and emerging tobacco products. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(6):695.e1-7. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.05.041