

# Genetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u Downovom sindromu

## Genetic Factors in the Etiology of Congenital Heart Defects in Down Syndrome

Dijana Majstorović<sup>1\*</sup>, Anita Barišić<sup>2</sup>, Jadranka Vraneković<sup>2</sup>

**Sažetak.** Downov sindrom najčešća je aneuploidija kromosoma 21. Neurorazvojni poremećaji i tipične kraniofacijalne dismorfije prisutne su u različitim stupnjevima u svih osoba. Prirodne srčane greške najčešća su kongenitalna anomalija, s prevalencijom 40-55%. Najčešće prirodne srčane greške u osoba s Downovim sindromom jesu septalni defekti. Uzrok prirođenih srčanih grešaka do danas nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavka je da polimorfizmi gena uključeni u metabolizam folata i homocisteina utječu na obrazac metilacije DNA, što može rezultirati razvojem prirodne srčane greške. Cilj rada je kroz pregled literature istražiti ulogu polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba s Downovim sindromom.

**Ključne riječi:** metilacija DNA; Downov sindrom; folna kiselina; homocistein; polimorfizam jednog nukleotida; prirodne srčane greške

**Abstract.** Down syndrome is the most common aneuploidy of chromosome 21. Neurodevelopmental abnormalities and typical craniofacial dysmorphism are present to varying degrees in all individuals. Congenital heart defects are the most common congenital anomaly, with a prevalence of 40-55%. The most common congenital heart defects in individuals with Down syndrome are septal defects. The cause of congenital heart defects is still largely unknown. Polymorphisms of genes involved in folate and homocysteine metabolism are thought to influence the pattern of DNA methylation that may lead to congenital heart defect. The aim of this study is to evaluate the role of *MTHFR*, *MTRR* and *DNMT* gene polymorphisms in the etiology of congenital heart defects in individuals with Down syndrome based on a literature review.

**Keywords:** DNA Methylation; Down Syndrome; Folic Acid; Heart Defects, Congenital; Homocysteine; Polymorphism, Single Nucleotide

<sup>1</sup>Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Medicinski fakultet, Pula, Hrvatska

<sup>2</sup>Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Zavod za medicinsku biologiju i genetiku, Rijeka, Hrvatska

**\*Dopisni autor:**

Dijana Majstorović, mag. med. techn.  
Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Medicinski fakultet  
Zagrebačka 30, 52100 Pula, Hrvatska  
E-mail: dmajstorov@unipu.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## DOWNOV SINDROM

Downov sindrom (DS) (OMIM 190685) nastaje kao posljedica trisomije kromosoma 21, s incidencijom 1 : 700 živorođene djece<sup>1</sup>.

Regularni tip trisomije 21 prisutan je u 95 % slučajeva<sup>2</sup>. Treći kromosom 21 nalazi se u svim stanicama<sup>3</sup>, najčešće kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 tijekom oogeneze, posebno tijekom prve mejotičke diobe<sup>4</sup>. U 3 – 5 % slučajeva prisutan je mozaični kariotip<sup>2</sup>, najčešće

Prirođene srčane greške najčešća su vrsta prirodnih anomalija s incidencijom od 17,9/1000 u općoj populaciji i vodeći uzrok smrti u dječjoj dobi, s mortalitetom od 24,1 %. Prevalencija prirodnih srčanih grešaka u Downovom sindromu kreće se između 40 i 55 %.

s dvjema staničnim linijama. Nastaje kao posljedica pogreške u podjeli kromosoma tijekom mitotske diobe zigote<sup>5</sup>. Translokacijski tip prisutan je u 4 % slučajeva, u obiteljskom (25 %) ili *de novo* (75 %) obliku<sup>2</sup>. Najčešći oblik jest translokacija kromosoma 14/21. Ostali tipovi trisomije 21 vrlo su rijetki i prisutni su u oko 1 % slučajeva<sup>2</sup>.

Uzrok nepravilnog razdvajanja kromosoma još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Starija životna dob majke i promjene u položaju rekombinacije dva su poznata čimbenika rizika<sup>6,7</sup>. Brojna istraživanja nastoje razjasniti uzroke nerazdvajanja kromosoma i kliničku sliku DS-a, kako genetskim tako i epigenetskim modelima<sup>8-15</sup>. Pojedinačni doprinos svakog od čimbenika rizika teško je izdvojiti<sup>16</sup>.

Klinička slika DS-a složena je i varijabilna. Pojedina obilježja, kao što su neurorazvojni poremećaji i tipične kraniofacijalne dismorfije, javljaju se u svih osoba, dok se određena stanja i bolesti, poput prirodnih srčanih grešaka (50 %), opstruktivne apneje (54 – 90 %), Alzheimerove demencije (77 %), poremećaja rada štitnjače (> 50 %), epilepsije (8 %) i leukemije (5 – 30 %), pojavljuju samo u nekih pojedinaca s Downovom sindromom<sup>17</sup>.

Različitost kliničke slike, prema hipotezi genske doze, rezultat je povećane ekspresije određenih gena na kromosomu 21. Nadalje, hipoteza o genskoj homeostazi pretpostavlja da tri kopije kromosoma 21 utječu na ekspresiju gena na

drugim kromosomima. Hipoteza o kritičnoj regiji ukazuje da je DS kritična regija odgovorna za različitu fenotipsku ekspresiju<sup>18-21</sup>. Nadalje, fenotipskoj varijabilnosti pridonose različiti genetički i epigenetički čimbenici, kao što su aktivnost transkripcijskih faktora, varijacija broja kopija, regulatorne molekule RNA te metilacija DNA<sup>22</sup>.

## PRIROĐENE SRČANE GREŠKE

Prirođene srčane greške (PSG) razvojno su i klinički heterogena skupina strukturnih i funkcionalnih prirodnih malformacija srca i/ili velikih krvnih žila, koje nastaju uslijed nepotpunog pregrađivanja srca tijekom embrionalnog razdoblja<sup>23</sup>. Razvoj srca počinje početkom trećeg tjedna gestacije. Organogeneza srca složen je i precizno reguliran proces, koji zahtijeva složene stanične interakcije i metaboličke puteve kroz visoko koordinirane faze razvoja<sup>24,25</sup> (Slika 1).

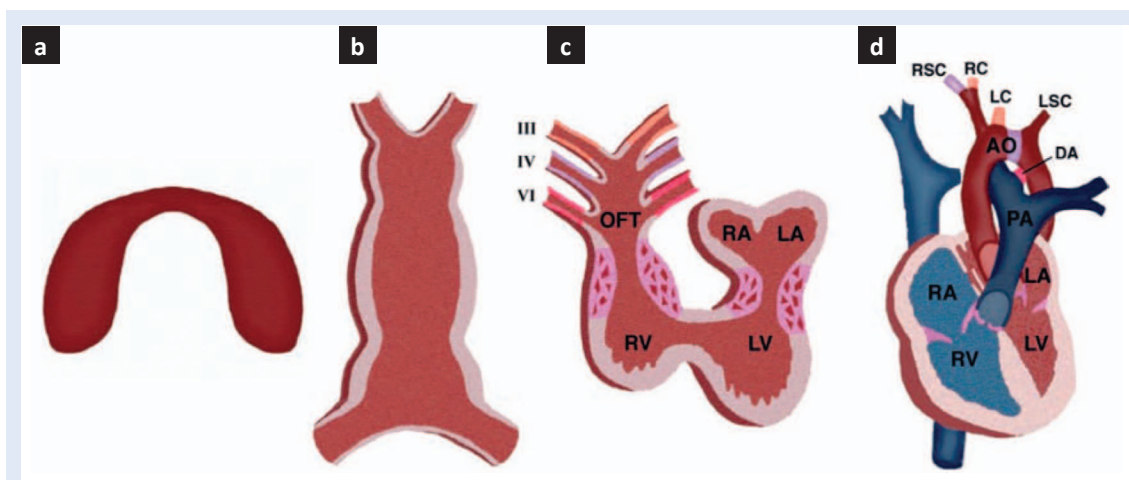
Prirođene srčane greške najčešća su vrsta prirodnih anomalija s incidencijom od 17,9/1000 u općoj populaciji<sup>26</sup> i vodeći uzrok smrti u dječjoj dobi, s mortalitetom od 24,1 %<sup>27</sup>. Većina PSG-a pojavljuje se kao izolirana malformacija, dok je 25 – 30 % udruženo s drugim anomalijama<sup>28</sup>. Primarne malformacije nastaju tijekom rane faze kardiovaskularne morfogeneze, dok deformacije nastaju nakon završene morfogeneze i uzrokovane su okolišnim čimbenicima tijekom intrauterinog života<sup>29</sup>. Rizik za razvoj PSG-a nakon izloženosti teratogenu ovisi o dozi, razdoblju i trajanju izloženosti<sup>17</sup>.

Prema anatomskim i hemodinamskim promjenama, PSG se klinički klasificira u različite podvrste ovisno o stupnju složenosti<sup>30</sup>. Modificirana Clarkova klasifikacija PSG-a temelji se na pretpostavci da je složenost i heterogenost PSG-a posljedica multifaktorijalne etiologije, koja uključuje interakciju embrioloških, genetskih i okolišnih čimbenika<sup>29</sup>.

Kromosomske promjene uzrokuju 10 – 12 % PSG-a u živorođene djece<sup>31,32</sup>, promjene u samoj sekvenciji gena prisutne su u 10 % PSG-a<sup>33</sup>, a oko 2 % nastaje djelovanjem okolišnih čimbenika<sup>34</sup>. Etiologija u većini slučajeva ostaje nepoznata.

## PRIROĐENE SRČANE GREŠKE I DOWNOV SINDROM

Povezanost između DS-a i PSG-a prvi put je dokumentirao Garrod<sup>35</sup>. Prevalencija PSG-a kod osoba



**Slika 1.** Faze srčane morfogeneze: (a) Srčani polumjesec – 15. dan gestacije – formiranje prvog kardiogenog područja; (b) Linearna srčana cijev – 21. dan gestacije – formiranje drugog kardiogenog područja, obostrano simetrične primordijalne stanice srca migriraju do središnje linije; (c) Srčana petlja – 28. dan gestacije – rast i savijanje srčane cijevi u srčanu petlju, pozicionirajući atrijske iznad ventrikula; (d) Srčane komore – tijekom 6. i 7. tjedna gestacije – razvoj srčane pregrade, razdvaja srce u četiri različite komore i zajednički izlazni trakt, septiran u aortu i plućnu arteriju, rezultira plućnom i sistemskom cirkulacijom; opsežno remodeliranje zalisaka i rast ventrikula označava zrelo razvijeno srce\*

AO – aorta; DA – arterijski duktus (engl. *ductus arteriosus*); LA – lijeva pretklijetka (engl. *left atrium*); LC – lijeva karotidna arterija (engl. *left carotid artery*); LV – lijeva klijetka (engl. *left ventricle*); LSC – lijeva potključna arterija (engl. *left subclavian artery*); OFT – izlazni trakt srca (engl. *outflow tract*); PA – plućna arterija (engl. *pulmonary artery*); RA – desna pretklijetka (engl. *right atrium*); RC – desna karotidna arterija (engl. *right carotid artery*); RSC – desna potključna arterija (engl. *right subclavian artery*); RV – desna klijetka (engl. *right ventricle*)

\* Prema: Garg (2006)<sup>25</sup>

s DS-om kreće se između 40 i 55 %<sup>36</sup>. Najčešće prirodne srčane greške su atrioventrikularni septalni defekt (AVSD; 51 %), ventrikularni septalni defekt (VSD; 25 %), atrijski septalni defekt (ASD; 9 %) i Fallotova tetralogija (TF; 7 %)<sup>37</sup>. Distribucija PSG-a prema spolu i etničkim razlikama uvjetovana je vrstom srčane greške<sup>38</sup>.

Uzrok PSG-a u osoba s DS-om do danas nije razjašnjen. Budući da više od 50 % osoba s Downovim sindromom ima normalno građeno srce, PSG se ne može smatrati isključivo posljedicom trisomije 21<sup>39</sup>, za razvoj PSG-a potrebno je međudjelovanje različitih genetskih i epigenetskih čimbenika rizika<sup>40</sup>.

Korenberg i sur. (1992.) prvi su predložili koncept DS-PSG kritične regije (engl. *critical region*; DS-CHD) na kromosomu 21<sup>41</sup>. Pretpostavka je da geni (*DSCAM*, *KCNJ6*) koji se nalaze u navedenoj kritičnoj regiji predstavljaju čimbenike rizika za razvoj PSG-a u osoba s DS-om<sup>40,41</sup>. Nadalje, za razvoj PSG-a odgovorni su mnogobroji geni na drugim kromosomima, mikroRNA, varijante broja kopija, negenetički faktori, signalni putevi, poli-

morfizmi jednog nukleotida i promjene u metabolizmu folata<sup>40</sup>. Nekoliko studija u različitim geografskim područjima i potvrdna metaanaliza istraživale su potencijalni utjecaj perikonceptijskog unosa folata i polimorfizama gena uključenih u taj metabolizam<sup>42-45</sup>. Rezultati istraživanja protektivnog učinka perikonceptijske primjene folne kiseline u cilju prevencije PSG-a su proturječni<sup>46,47</sup>. Promijenjen metabolizam folata, kao rezultat prisutnosti polimorfizama gena i neadekvatnog unosa folata dovodi do porasta razine homocisteina i time utječe na obrazac metilacije<sup>48</sup>. Hiperhomocisteinemija i hipometilacija prepoznati su čimbenici rizika za razvoj PSG-a<sup>49</sup>.

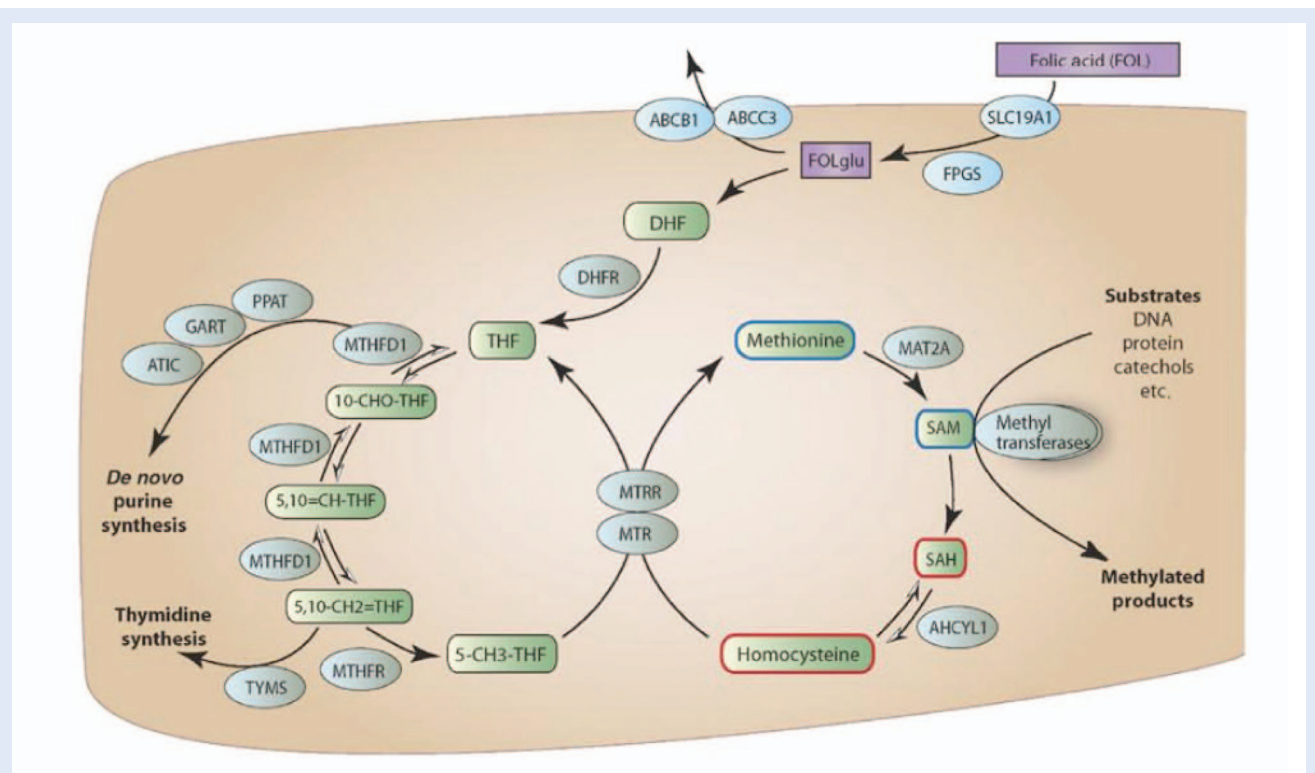
#### METABOLIZAM FOLATA I HOMOCISTEINA

Metabolizam folata i homocisteina međusobno su povezani metabolički putevi, u kojima se stvaraju metilne skupine za brojne reakcije metilacije, kako DNA tako i proteina<sup>50</sup>.

Metilentrahidrofolat reduktaza (MTHFR) ključni je enzim u metabolizmu folata, kodiran genom *MTHFR* koji se nalazi na kromosomu 1p36.3. te

katalizira konverziju 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF), glavnu formu cirkulirajućeg folata za remetilaciju homocisteina. Reakciju remetilacije katalizira enzim metionin-sintetaza, u kojoj nastaje tetrahidrofolat (THF) i metionin. Metionin služi za sintezu S-adenozil-L-metionina, donora metilne skupine za reakcije metilacije u stanici, a THF ulazi u put folata kao receptor novih ugljikovih atoma. Sljedeći ključan regulatorni enzim je 5-metiltetrahidrofolat-homocistein methyltransferasa reduktaza (MTRR), kodiran genom *MTRR*, smješten na kromosomu 5p15.31, koji katalizira konverziju inaktivnog oblika metionin-sintetaze u aktivni oblik, uz kofaktor vitamin B12 (*kobalamin*), i time značajno pridonosi prijenosu metilne skupine<sup>50, 51</sup> (Slika 2).

Metilne skupine osnovni su supstrat za metilaciju DNA koja predstavlja osnovni epigenetički mehanizam uključen u regulaciju brojnih staničnih mehanizama, tijekom normalnog razvoja organizma, ali i bolesti<sup>52</sup>. Metilacija DNA regulira brojne gene koji sudjeluju u kardiogenezi<sup>53</sup>. Promjena u obrascu metilacije DNA može utjecati na ekspresiju gena relevantnih za razvoj srca, što može rezultirati specifičnim kliničkim fenotipovima PSG-a u osoba s DS-om<sup>54-58</sup>. Izvršni enzimi u procesu metilacije DNA jesu metiltransferaze DNA (engl. *DNA methyltransferases*; DNMT)<sup>59</sup>. Tri obitelji metiltransferaza DNA (DNMT) sudjeluju u prijenosu metilnih grupa s donora S-adenozil-L-metionina na peti ugljikov atom nukleotida citozina: DNMT1, DNMT2 i DNMT3 (3A,



**Slika 2.** Metabolizam folata/homocisteina

Ljubičasti pravokutnici prikazuju folnu kiselinu i poliglutamilnu folnu kiselinu (FOLglu), plavi ovali prikazuju gene, a zeleni zaobljeni pravokutnici prikazuju supstrate i produkte metabolizma folata. ABCB1, *P-glycoprotein*; ABCC3, *multidrug-resistant protein 3*; ATIC, *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase*; AHCYL1, *S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1*; DHFR, *dihydrofolate reductase*; FPGS, *folylpolyglutamyl synthase*; GART, *phosphoribosylglycinamide formyltransferase*; MAT2A, *methionine adenosyltransferase II alpha*; MTHFD1, *trifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase, synthase*; MTHFR, *methylenetetrahydrofolate reductase*; MTR, *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*; MTRR, *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase*; PPAT, *phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase*; SLC19A1, *solute-carrier family 19 (folate transporter), member 1*; TYMS, *thymidylate synthase*; DHF, *dihydrofolate*; FOL-glu, *polyglutamylated folic acid*; SAM, *S-adenosylmethionine*; SAM, *S-adenosylmethionine*; THF, *tetrahydrofolate*; 5-CH3-THF, *5-methyl tetrahydrofolate*; 5,10-CH2=THF, *methylene tetrahydrofolate*; 5,10=CH-THF, *methenyl tetrahydrofolate*; 10-CHO-THF, *10-formyl tetrahydrofolate*

(preuzeto: [www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA2039&objCls=Pathway](http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA2039&objCls=Pathway))

3B i 3L)<sup>60</sup>. Enzimi DNMT3A i DNMT3B kataliziraju uspostavu novog obrasca metilacije, uz prisustvo kofaktora DNMT3L, dok održavanje naslijeđenog obrasca metilacije provodi enzim DNMT1.

**POLIMORFIZMI GENA *MTHFR*, *MTRR* I *DNMT*: RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ PRIRODNIH SRČANIH GREŠAKA U DOWNOVOM SINDROMU**

Dva su najčešća polimorfizma gena *MTHFR*, *MTHFR* 677C>T (rs1801133) i 1298A>C (rs1801131)<sup>61</sup>. Polimorfizam *MTHFR* 677C>T kodira supstituciju alanina u valin te dovodi do termolabilne varijante *MTHFR*, enzima sa smanjenom enzimskom aktivnošću, što posljedično dovodi do smanjenja količine 5 metil-THF i neadekvatne remetilacije homocisteina i pojave hiperhomocisteinemije<sup>62</sup>. Enzimska aktivnost homozigota *MTHFR* 677TT je 30 %, a heterozigota 65 % u odnosu na divlji genotip<sup>51</sup>. Junker i sur. (2001.) prvi su predložili genotip *MTHFR* 677TT kao čimbenik rizika za PSG u djece<sup>63</sup>. Međutim, rezultati istraživanja povezanosti polimorfizma *MTHFR* 677C>T i PSG-a u osoba s DS-om su nedosljedniji<sup>9, 64–66</sup>. Jedna studija pokazala je da se povećana metilacija promotora gena *MTHFR* povezuje s PSG-om u novorođenčadi s DS-om<sup>67</sup>. Drugi polimorfizam gena *MTHFR*, *MTHFR* 1298A>C kodira supstituciju glutamata u alanin, no to ne mijenja značajno aktivnost i termolabilnost enzima u odnosu na divlji tip<sup>51</sup>. Metaanaliza iz 2018. godine provedena na 47 studija, na općoj populaciji i ispitanicima s DS-om pokazala je da polimorfizmi *MTHFR* 677C>T i *MTHFR* 1298A>C mogu biti čimbenik rizika za PSG<sup>68</sup>. Najčešći polimorfizam gena *MTRR*, *MTRR* 66A>G (rs1801394) dovodi do supstitucije isoleucina u metionin te se smanjuje aktivnost enzima za remetilaciju homocisteina u metionin<sup>69</sup>. Istraživanja pokazuju da pojedinci s genotipom *MTRR* 66AA imaju povišenu razinu homocisteina u odnosu na pojedince drugih genotipova<sup>70, 71</sup>, dok istraživanje O'Leary i sur. (2002.) ukazuje da genotip nije značajan prediktor razine homocisteina<sup>72</sup>. Određeni broj studija ukazuje da polimorfizam *MTRR* 66A>G može biti čimbenik rizika za PSG u općoj populaciji<sup>68, 73, 74</sup> i u osoba s DS-om<sup>67</sup>, ali rezultati nisu konzistentni<sup>64, 75</sup>.

Nadalje, i genetske varijante gena *DNMT*, kao i razina ekspresije gena, mogu pridonijeti predispoziciji za razvoj PSG-a<sup>54, 55, 57</sup>. Studije na eksperimentalnim organizmima pokazuju da je DNMT uključen u reprogramiranje metilacije DNA tijekom diferencijacije kardiomiocita<sup>76, 77</sup>. *Dnmt1* utječe na kardiomiocite u embrionalnom razvoju, reguliranjem metilacije DNA, ekspresije gena i funkcije stanice<sup>78</sup>. Nadalje, studije ukazuju da su polimorfizmi gena *DNMT1*, *DNMT1* 97T>C (rs16999593) i 327A>G (rs2228612) povezani s

Promijenjen metabolizam folata, kao rezultat prisutnosti polimorfizama gena i neadekvatnog unosa folata, dovodi do porasta razine homocisteina i time utječe na obrazac metilacije. Promjena u obrascu metilacije utječe na ekspresiju gena relevantnih za razvoj srca, što može rezultirati specifičnim kliničkim fenotipovima prirodnih srčanih grešaka u Downovom sindromu.

rizikom za razvoj PSG-a<sup>55</sup>. Smanjena ekspresija *DNMT1* ima važnu ulogu u patogenezi Fallotove tetralogije (TF)<sup>54</sup>, dok *DNMT1* 97T>C smanjuje rizik od transpozicije velikih arterija<sup>57</sup>. Reguliranjem ekspresije gena, morfologije i funkcije kardiomiocita embrija *Dnmt3a* igra važnu ulogu u razvoju srca<sup>77</sup>. Nalazi istraživanja sugeriraju o postojanju korelacije između *DNMT3A* i Fallotove tetralogije<sup>54</sup>. Smanjena regulacija *RASSF1A* (engl. *Ras association domain family 1 isoform A*) u srčanoj fibrozi povezana je s *Dnmt3a*<sup>79</sup>. *DNMT3B* je jedan od najaktivnijih enzima, visoko izražen u ranim embrionalnim stadijima<sup>80</sup>. Dva uobičajena polimorfizma poznata su u promotorskoj regiji *DNMT3B* -149C>T (rs2424913) i -579G>T (rs1569686)<sup>81</sup>. Uloga polimorfizma *DNMT3B* -149C>T jest reguliranje ekspresije gena *DNMT3B*. Alel T povećava aktivnost promotora za 30 %<sup>82, 83</sup> i utječe na mjesto vezivanja miRNA<sup>84</sup>. Funkcionalna uloga polimorfizma *DNMT3B* -579G>T još nije jasno definirana, nekoliko je mogućih mehanizama kojima taj polimorfizam može utjecati na ekspresiju gena<sup>10, 82, 84</sup>. Dodatno, na temelju dokaza dobivenih studijama na životinjama, pokazano je da *knockdown Dnmt3b* uzrokuje smrt miševa zbog srčanih ventrikularnih defekata<sup>80</sup>. Chamberlain i sur. (2014.) ukazuju da

**Tablica 1.** Genetički čimbenici u etiologiji prirodnih srčanih grešaka

Gen	Polimorfizam	Referencija
<i>MTHFR</i>	677C > T (rs1801133) 1298A > C (rs1801131)	[9, 40, 45, 50, 51, 62-68, 72, 74]
<i>MTRR</i>	66A > G (rs1801394)	[40, 45, 50, 51, 64, 68-70, 72-75]
<i>DNMT</i>	97T > C (rs16999593)	[54, 55, 57, 76-86]
<i>DNMT1</i>	327A > G (rs2228612)	
<i>DNMT3A</i>	- 149C > T (rs2424913)	
<i>DNMT3B</i>	- 579G > T (rs1569686)	

*Dnmt3b* regulira metilaciju DNA esencijalnih gena srca<sup>76</sup>, te u kombinaciji s *Dnmt3a* uzrokuje potiskivanje ekspresije fetalnih srčanih gena<sup>85</sup>. Nadalje, istraživanje Zhang i sur. pokazalo je da *Dnmt3b* kontrolira ekspresiju oko 60 % gena koji su usmjereni na vezivanje transkripcijskog faktora REST (engl. *repressor element 1*; RE1, *silencing transcription factor*) u srčanoj embriogenezi<sup>86</sup> (Tablica 1).

#### ZAKLJUČAK

Iako postoje jasni dokazi da promjena u obrascu metilacije utječe na ekspresiju gena koji sudjeluju u kardiogenezi, i dalje je nejasan mehanizam nastanka PSG-a. Rezultati istraživanja povezanosti polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR*, *DNMT* i PSG-a u osoba s Downovim sindromom nisu jednoznačni. S obzirom na složenu interakciju genetičkih i okolišnih čimbenika u nastanku PSG-a, s ciljem razjašnjavanja doprinosa spomenutih polimorfizama potrebno je nastaviti istraživanja.

#### Zahvale

Ovaj je rad financiran projektom Epigenetički i genetički čimbenici u etiologiji prirodnih srčanih grešaka u osoba s Downovim sindromom (918.10.0230/uniri.-biomed 18-120).

**Izjava o sukobu interesa:** Autori izjavljuju kako ne postoji sukob interesa.

#### LITERATURA

1. Antonarakis SE. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat Rev Genet* 2017;18:147-163.
2. Gardner RJM, Sutherland RG, Shaffer GL. *Oxford Monographs on Medical Genetics, Chromosome abnormalities and Genetic counseling*. 4<sup>th</sup> Edition. Oxford: Oxford University Press, 2012;281.

3. Antonarakis SE. Human chromosome 21: genome mapping and exploration, circa 1993. *Trends Genet* 1993; 9:142-8.
4. Vraneković J, Božović IB, Grubić Z, Wagner J, Pavlinić D, Dahoun S et al. Down syndrome: parental origin, recombination, and maternal age. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16:70-3.
5. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. Down syndrome: an insight of the disease. *J Biomed Sci* 2015;22:41.
6. Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen* 2002;9:2-6.
7. Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J et al. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996;14: 400-5.
8. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
9. Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 2009;149:2080-7.
10. Coppèdè F, Bosco P, Tannorella P, Romano C, Antonucci I, Stuppia L et al. *DNMT3B* promoter polymorphisms and maternal risk of birth of a child with Down syndrome. *Hum Reprod* 2013;28:545-50.
11. Jaiswal SK, Sukla KK, Kumari N, Lakhota AR, Kumar A, Rai AK. Maternal risk for down syndrome and polymorphisms in the promoter region of the *DNMT3B* gene: a case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2015;103:299-305.
12. Moura CM, Bastos PR, Ribeiro JSV, Ribeiro MG, Amorim MR, Costa-Lima MA. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B (*DNMT3B*) polymorphism and risk of Down syndrome offspring. *Saudi J Biol Sci* 2018;25:101-104.
13. Coppèdè F, Denaro M, Tannorella P, Migliore L. Increased *MTHFR* promoter methylation in mothers of Down syndrome individuals. *Mutat Res* 2016;787:1-6.
14. Božović IB, Stanković A, Živković M, Vraneković J, Kapović M, Brajenović-Milić B. Altered LINE-1 Methylation in Mothers of Children with Down Syndrome. *PLoS One* 2015;27;10:0127423.
15. Keen C, Hunter JE, Allen EG, Rocheleau C, Waters M, Sherman SL. **The association between maternal occupation and down syndrome: A report from the national Down syndrome project.** *Int J Hyg Environ Health* 2020;223:207-213.
16. Coppèdè F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutat Res* 2009;682:54-70.
17. Antonarakis SE, Skotko BG, Rafii MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW et al. Down syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:9.
18. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 2004;5: 725-38.

19. Sinet PM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouch Z, Blovin JL, Prier M et al. Mapping of Down syndrome phenotype on chromosome 21 at the molecular level. *Biomed Pharmacother* 1994;48:247-52.
20. Epstein CJ, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001;1223-56.
21. Pritchard MA, Kola I. The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 1999;57:293-303.
22. Patterson D. Genetic mechanisms involved in the phenotype of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007;13:199-206.
23. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy MK, Li N et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol* 2019;48:455-463.
24. Reamon-Buettner SM, Spanel-Borowski K, Borlak J. Bridging the gap between anatomy and molecular genetics for an improved understanding of congenital heart disease. *Ann Anat* 2006;188:213-20.
25. Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1141-8.
26. Wu W, He J, Shao X. Incidence and mortality trend of congenital heart disease at the global, regional, and national level, 1990-2017. *Medicine Balt* 2020;99:20593.
27. Gilboa SM, Salemi JL, Nembhard WN, Fixler DE, Correa A. Mortality resulting from congenital heart disease among children and adults in the United States, 1999 to 2006. *Circulation* 2010;122:2254-63.
28. Digilio MC, Marino B. What Is New in Genetics of Congenital Heart Defects? *Front Pediatr* 2016;4:120.
29. Rojnić-Putarek N, Malčić I. Patogenetički mehanizmi nastanka prirođenih srčanih grešaka. In: Malčić I et al (eds). *Pedijatrijska kardiologija – odabrana poglavlja*. Zagreb: Medicinska naklada, 2001;17-29.
30. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res* 2017;120:923-940.
31. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol* 2011;32:1147-57.
32. Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *Eur J Med Genet* 2014;57:402-13.
33. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature* 2013;498:220-3.
34. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2018;138:653-711.
35. Garrod AE. *On the association of cardiac malformations with other congenital defects*. London: St Bart Hosp Rep, 1894;53-61.
36. Santoro SL, Steffensen EH. Congenital heart disease in Down syndrome – A review of temporal changes. *J Congenit Heart Dis* 2021;5:1.
37. Pfitzer C, Helm PC, Rosenthal LM, Berger F, Bauer UMM, Schmitt KR. Dynamics in prevalence of Down syndrome in children with congenital heart disease. *Eur J Pediatr* 2018;177:107-115.
38. Versacci P, Di Carlo D, Digilio MC, Marino B. Cardiovascular disease in Down syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2018;30:616-622.
39. Ackerman C, Locke AE, Feingold E, Reshey B, Espana K, Thusberg J et al. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down-syndrome-associated atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 2012;91:646-59.
40. Zhang H, Liu L, Tian J. Molecular mechanisms of congenital heart disease in down syndrome. *Genes Dis* 2019;6:372-377.
41. Korenberg JR, Bradley C, Distechi CM. Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet* 1992;50:294-302.
42. Ionescu-Iltu R, Marelli AJ, Mackie AS, Pilote L. Prevalence of severe congenital heart disease after folic acid fortification of grain products. Time trend analysis in Quebec, Canada. *Brit Med J* 2009;338:1673.
43. Bean LJ, Allen EG, Tinker SW, Hollis ND, Locke AE, Druschel C et al. Lack of maternal folic acid supplementation is associated with heart defects in Down syndrome: a report from the National Down Syndrome Project. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:885-93.
44. Csáky-Szunyogh M, Vereczkey A, Kósa Z, Gerencsér B, Czeizel AE. Risk and protective factors in the origin of conotruncal defects of heart—a population-based case-control study. *Am J Med Genet A* 2013;161:2444-52.
45. Xu A, Wang W, Jiang X. The roles of *MTRR* and *MTHFR* gene polymorphisms in congenital heart diseases: a meta-analysis. *Biosci Rep* 2018;38:20181160.
46. Bedard T, Lowry RB, Sibbald B, Harder JR, Trevenen C, Horobec V et al. **Folic acid fortification and the birth prevalence of congenital heart defect cases in Alberta, Canada**. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2013;97:564-70.
47. Gildestad T, Bjørge T, Haaland ØA, Klungsøyr K, Vollset SE, Øyen N. Maternal use of folic acid and multivitamin supplements and infant risk of birth defects in Norway, 1999-2013. *Br J Nutr* 2020;124:316-329.
48. Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem NT, Lindemans J, Helbing WA, Ottenkamp J et al. **Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease**. *BJOG* 2006;113:1412-8.
49. Cao J, Wu Q, Huang Y, Wang L, Su Z, Ye H. The role of DNA methylation in syndromic and non-syndromic congenital heart disease *Clin Epigenetics* 2021;13:93.
50. Coppede F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet* 2015;6:223.
51. Wang B, Liu M, Yan W, Mao J, Jiang D, Li H et al. Association of SNPs in genes involved in folate metabolism with the risk of congenital heart disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:1768-77.
52. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol* 2005;204:21-35.
53. Chowdhury S, Cleves MA, MacLeod SL, James SJ, Zhao W, Hobbs CA. Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:69-76.
54. Wang F, Zhou S, Wang Y, Wang L, Zhou J, Wang H et al. Association of DNMT1 Gene Polymorphisms with Congenital Heart Disease in Child Patients. *Pediatr Cardiol* 2015;36:906-11.

55. Sheng W, Qian Y, Wang H, Ma X, Zhang P, Chen L et al. Association between mRNA levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MBD2 and LINE-1 methylation status in infants with tetralogy of Fallot. *Int J Mol Med* 2013;32:694-702.
56. Serra-Juhé C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez-Jurado LA. DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenetics* 2015;10:167-77.
57. Lei L, Lin H, Zhong S, Zhang Z, Chen J, Yu X et al. DNA methyltransferase 1 rs16999593 genetic polymorphism decreases risk in patients with transposition of great arteries. *Gene* 2017;615:50-56.
58. Dobosz A, Grabowska A, Bik-Multanowski M. Hypermethylation of *NRG1* gene correlates with the presence of heart defects in Down's syndrome. *J Genet* 2019;98:110.
59. Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005;10:631-47.
60. Gagliardi M, Strazzullo M, Matarazzo MR. DNMT3B Functions: Novel Insights From Human Disease. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:140.
61. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
62. Pereira AC, Xavier-Neto J, Mesquita SM, Mota GF, Lopes AA, Krieger JE. Lack of evidence of association between MTHFR C677T polymorphism and congenital heart disease in a TDT study design. *Int J Cardiol* 2005;105:15-8.
63. Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H, Halimeh S, Kosch A, Koch HG et al. Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 2001;51:251-4.
64. Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW, Cheong SY, Feingold E, Allen EG et al. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. *Genet Epidemiol* 2010;34:613-23.
65. Božović IB, Vraneković J, Cizmarević NS, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011;53:546-50.
66. Elsayed GM, Elsayed SM, Ezz-Elarab SS. Maternal MTHFR C677T genotype and septal defects in offspring with Down syndrome: a pilot study. *Egypt J Med Hum Genet* 2014;15:39-44.
67. Asim A, Agarwal S, Panigrahi I, Saiyed N, Bakshi S. MTHFR promoter hypermethylation may lead to congenital heart defects in Down syndrome. *Intractable Rare Dis Res* 2017;6:295-298.
68. Xu A, Wang W, Jiang X. The roles of *MTRR* and *MTHFR* gene polymorphisms in congenital heart diseases: a meta-analysis. *Biosci Rep* 2018;38:20181160.
69. Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2003;166:49-55.
70. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW et al. The methionine synthase reductase (*MTRR*) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-6.
71. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hübner U et al. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:698-704.
72. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002;107:151-5.
73. Cai B, Zhang T, Zhong R, Zou L, Zhu B, Chen W et al. Genetic variant in MTRR, but not MTR, is associated with risk of congenital heart disease: an integrated meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:89609.
74. Guo QN, Wang HD, Tie LZ, Li T, Xiao H, Long JG et al. Parental Genetic Variants, MTHFR 677C>T and MTRR 66A>G, Associated Differently with Fetal Congenital Heart Defect. *Biomed Res Int* 2017;2017:3043476.
75. Vraneković J, Slivšek G, Mastorović D. Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase gene and congenital heart defects in Down syndrome. *Genetics&Applications* 2020;4:1.
76. Chamberlain AA, Lin M, Lister RL, Maslov AA, Wang Y, Suzuki M et al. DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *J Am Heart Assoc* 2014;3:000976.
77. Fang X, Poulsen RR, Wang-Hu J, Shi O, Calvo NS, Simmons CS et al. Knockdown of DNA methyltransferase 3a alters gene expression and inhibits function of embryonic cardiomyocytes. *FASEB J* 2016;30:3238-55.
78. Fang X, Poulsen R, Zhao L, Wang J, Rivkees SA, Wendler CC. Knockdown of DNA methyltransferase 1 reduces DNA methylation and alters expression patterns of cardiac genes in embryonic cardiomyocytes. *FEBS Open Bio* 2021;11:2364-82.
79. Tao H, Yang JJ, Chen ZW, Xu SS, Zhou X, Zhan HY et al. DNMT3A silencing RASSF1A promotes cardiac fibrosis through upregulation of ERK1/2. *Toxicology* 2014;323:42-50.
80. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.
81. Zhu S, Zhang H, Tang Y, Liu P, Wang J. DNMT3B polymorphisms and cancer risk: a meta analysis of 24 case-control studies. *Mol Biol Rep* 2012;39:4429-37.
82. Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:4992-5.
83. Xiao Y, Word B, Hammons G, Lyn-Cook B. Transcriptional activity of DNMT3B in pancreatic cancer cells: effects of -149 (C>T) promoter polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;415:220-223.
84. Saradalekshmi KR, Neetha NV, Sathyan S, Nair IV, Nair CM, Banerjee M. DNA methyl transferase (DNMT) gene polymorphisms could be a primary event in epigenetic susceptibility to schizophrenia. *PLoS One* 2014;9:98182.
85. Gilsbach R, Preissl S, Grüning BA, Schnick T, Burger L, Benes V et al. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat Commun* 2014;5:5288.
86. Zhang D, Wu B, Wang P, Wang Y, Lu P, Nechiporuk T et al. Non-CpG methylation by DNMT3B facilitates REST binding and gene silencing in developing mouse hearts. *Nucleic Acids Res* 2017;45:3102-3115.