

Molekularna dijagnostika sindroma fragilnog x

Crvenković, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:696733>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Martina Crvenković

**Molekularna dijagnostika sindroma
fragilnog X**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Martina Crvenković

**Molekularna dijagnostika sindroma
fragilnog X**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Jadranke Sertić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS KRATICA

ADHD	poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje (prema eng. <i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i>)
CCG	citozin-citozin-gvanin
CGG	citozin-gvanin-gvanin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
FMR-1	prema eng. <i>fragile-X mental retardation 1</i>
FMR-2	prema eng. <i>fragile-X mental retardation 2</i>
FMRP	prema eng. <i>fragile X mental retardation protein</i>
FRAXA	sindrom fragilnog X-kromosoma
FTAX	sindrom tremora/ataksije povezanih s fragilnim X (prema eng. <i>fragile X-associated tremor/ataxia syndrome</i>)
FXPOI	preuranjeno zatajenje ovarija (prema eng. <i>fragile X-associated primary ovarian insufficiency</i>)
IQ	kvocijent inteligencije (prema eng. <i>Intelligence quotient</i>)
KBC	Klinički bolnički centar
KZLD	Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostik
mGluR5	metabotropni glutamatni receptor 5
MR	magnetna rezonanca
mRNA	glasnička RNA (prema eng. <i>messenger RNA</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (prema eng. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PWS	Prader Willi sindrom

SADRŽAJ

1. Sažetak	
2. Summary	
3. Uvod.....	1
3.1. Definicija.....	1
3.2. Epidemiologija	3
3.3. Genetička osnova	3
3.4. Patogeneza.....	6
3.5. Patologija.....	6
3.6. Klinička slika.....	6
3.6.1. Kognitivni simptom.....	7
3.6.2. Neuropsihijatrijska obilježja	7
3.6.3. FXPOI	8
3.6.4. Fenotipska obilježja.....	8
3.7. Diferencijalna dijagnoza	10
3.8. Dijagnoza	10
3.9. Liječenje	12
4. Cilj rada	12
5. Ispitanici i metode	12
5.1. Načelo postupka	13
5.2. Primarni uzorak	13
5.3. Potrebna oprema i reagensi	14
5.4. Postupak umjeravanja	14
5.5. Faze postupka	15
5.6. Analiza PCR produkta.....	17
6. Rezultati	17
7. Rasprava	19
8. Zaključak	20
9. Zahvale	21
10. Popis literature.....	22
11. Životopis.....	25

1. SAŽETAK

Molekularna dijagnostika sindroma fragilnog X

Martina Crvenković

Sindrom fragilnog X-kromosoma jedan je od najčešćih nasljednih oblika mentalne retardacije, a nasljeđuje se X-vezano dominantno sa nepotpunom penetrantnošću. Kliničkom slikom dominira blagi do težak oblik mentalne retardacije, ali se javljaju i neke anatomske anomalije kao što su velika lubanja, dugo lice, izbočeno čelo, klempave uši, makroorhidizam te poremećaji ponašanja. Uzrok bolesti je povećan broj trinukleotidnih CGG ponavljanja na *FMR-1* genu u kromosomskoj regiji Xq27.3. Specifično liječenje za ovu bolest za sada ne postoji.

Cilj rada bio je utvrditi učestalost i dužinu ponavljanja CGG tripleta kod pojedinaca sa sumnjom na sindrom fragilnog X-kromosoma čiji su uzorci krvi testirani u KBC-u Zagreb u vremenskom periodu od 2004. do 2015. godine.

Podaci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije i obrađeni deskriptivnom statistikom.

Analizom 1602 uzorka elektroforezom na gelu utvrđen je normalni broj ponavljanja tripleta CGG (5-54) u 1505 uzoraka (94%), broj uzoraka s premutacijama (55-200 CGG tripleta) iznosio je 41 (2%), a broj uzoraka s punom mutacijom (>200 CGG ponavljanja) iznosio je 56 (4%).

Ključne riječi: Sindrom fragilnog X-kromosoma, mentalna retardacija, trinukleotidna ponavljanja - genetika, CGG, elektroforeza na gelu.

2. SUMMARY

Molecular diagnosis of fragile X syndrome

Martina Crvenković

Fragile X syndrome is one of the most common X-linked dominant inherited form of mental retardation. It results in a spectrum of intellectual disabilities ranging from mild to severe as well as physical characteristics such as an elongated face, large or protruding ears, and large testicles (macroorchidism), and behavioral characteristics such as stereotypic movements and social anxiety. Fragile X syndrome is associated with the expansion of the CGG trinucleotide repeat affecting the *Fragile X mental retardation 1 (FMR-1)* gene on the X chromosome, resulting in a failure to express the fragile X mental retardation protein (FMRP), which is required for normal neural development. The selective therapy for fragile X syndrome is still non-existent.

The aim of the study has been to determine the frequency and the extension of CGG trinucleotide repeats in individuals suspected of having fragile X syndrome whose blood samples were tested in UHC Zagreb in time period from 2004 to 2015. The data for this study has been gathered from medical documentation and analysed by descriptive statistics.

Through the analysis of 1602 blood samples by gel electrophoresis, the normal amount of CGG trinucleotide repeat (5-54) was found in 1505 samples (94%), the number of samples with premutation (55-200 CGG trinucleotide repeat) was found in 41 patients (2%), and the number of samples with full mutation (>200 CGG trinucleotide repeat) was found in 56 patients (4%).

Key words: fragile X syndrome, mental retardation, trinucleotide repeats-genetics, CGG, gel electrophoresis.

3. UVOD

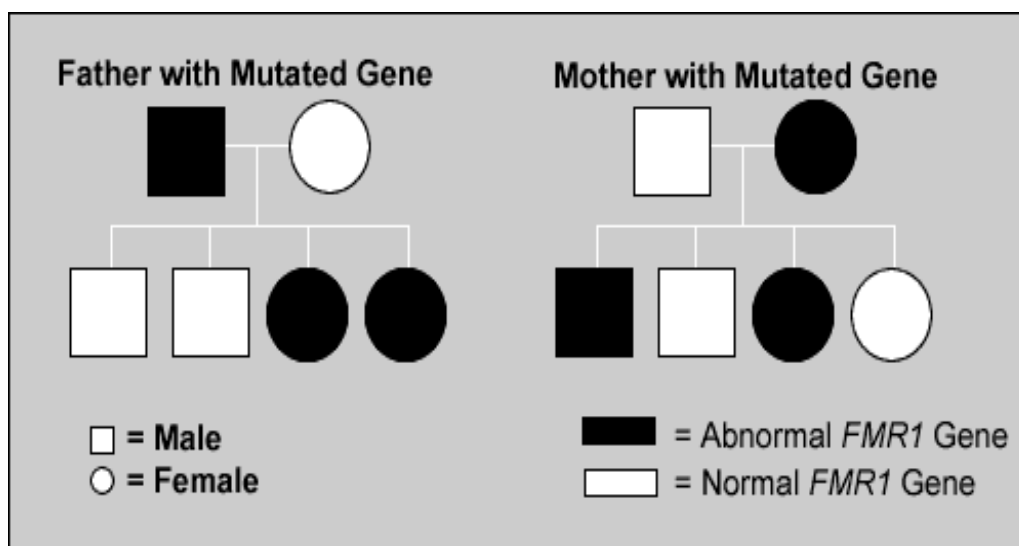
3.1. DEFINICIJA

Sindrom fragilnog X-kromosoma (FRAXA), poznat i kao Martin-Bellov sindrom, najčešći je (poslije Downova sindroma) nasljedni i prepoznatljivi uzrok umne zaostalosti u muškaraca, a rjeđe blaže zaostalosti i u žena. Bolest se nasljeđuje X-vezano dominantno s nepotpunom penetrantnošću.

Uzrok sindromu fragilnog X je neumjereno umnažanje CGG (citozin-gvanin-gvanin) tripleta na 5-nekodirajućem dijelu gena i abnormalna metilacija *FMR-1* (prema eng. *fragile-X mental retardation 1*) gena lociranog na dugom kraku kromosoma X u kromosomskoj regiji Xq27.3.

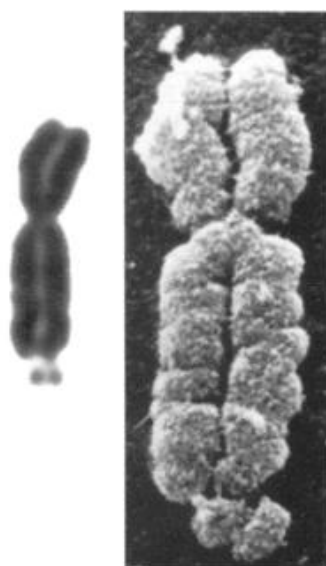
CGG slijed kod zdravih osoba iznosi 5-44 ponavljanja (normalni aleli), dok zahvaćene osobe sa sindromom fragilnog X imaju slijed veći i od 200 CGG tripleta (puna mutacija). Intermedijarni aleli broje od 45-54 ponavljanja i ne uzrokuju FRAXA, no 14% njih je nestabilno i može se proširiti u premutacijski alel kada se prenosi preko majke. Premutacijski aleli imaju od 55-200 ponavljanja te žene koje ih nose imaju rizik rađanja djeteta sa sindromom fragilnog X-kromosoma.

Premutacija može biti uzrok preuranjenog zatajenja ovarija u žena, a u muškaraca također može uzrokovati pojavu sindroma tremora/ataksije povezanog sa fragilnim X sindromom. Klinički, sindrom obilježavaju umna zaostalost s osobitim teškoćama u razvoju govora, hiperaktivno ponašanje, osebujna fizionomija, a mogu se pojaviti i neki elementi autističnog ponašanja. Za sada ne postoji učinkovito liječenje ove bolesti (Sertić et al., 2015.).



Slika 1. Obrazac nasljeđivanja sindroma fragilnog X-kromosoma

(izvor:http://www.ucdenver.edu/academics/colleges/medicalschoo/programs/fragilex/Pages/Gene_Adv.aspx)



Slika 2. Prikaz fragilnog mjesta

(izvor: <https://ehumanbiofield.wikispaces.com/Fragile+X+Syndrome+PK>)

3.2. EPIDEMIOLOGIJA

Sindrom fragilnog X-kromosoma je jedan od najčešćih nasljednih uzroka umne zaostalosti, drugi po pojavnosti iza Downova sindroma. Incidencija sindroma fragilnog X-kromosoma u muškaraca je 1:4000, dok u žena nalazimo incidenciju od 1:8000. U populaciji europskog podrijetla, premutacijski alel se pojavljuje s incidencijom od 1:1000 u muškaraca i 1:350 u žena. (Sertić et al., 2015.). FRAXA je opisan u svim rasama i etničkim skupinama, a čak 10% slučajeva prethodno nerazjašnjene etiologije mentalne retardacije u muškaraca i 3% prethodno nerazjašnjene etiologije mentalne retardacije u žena u SAD-u može se pripisati sindromu fragilnog X-kromosoma.

Žene su nositeljice abnormalnog gena 2-4 puta češće od muškaraca, iako, samo jedna trećina žena koje nose abnormalni gen pokazuje znakove umne zaostalosti. Prosječna dob postavljanja dijagnoze za muškarce je 35-37 godina, dok kod žena sa punom mutacijom ista prosječna dob iznosi čak 41 godinu (Bailey et al., 2009.).

3.3. GENETIČKA OSNOVA

U gotovo 100% pacijenata s FRAXA nalazi se neumjereno umnažanje CGG tripleta na 5-nekodirajućem dijelu gena te abnormalna metilacija *FMR-1* gena. Takve mutacijske promjene predstavljaju mutacijske promjene gubitka gena, a dovode do stišavanja transkripcije i sinteze proteina. U veoma malog broja pacijenata, kao uzrok ovog sindroma mogu se naći delecije i točkaste mutacije. *FMR-1* gen lociran je na dugom kraku X-kromosoma u kromosomskoj regiji Xq27.3 i sadrži 17 egzona koji obuhvaćaju 38 kb genomske DNA.

Lubs je 1969. godine prvi opisao abnormalnost dugog kraka X-kromosoma u pacijenata s mentalnom retardacijom, kao sekundarnu konstrikciju izgledom velikih satelita u regiji Xq27-q28. Pri kultivaciji stanica u mediju bez folata, dolazi do deficijencije timidin monofosfata i izražavanja sekundarne konstrikcije. Takva sekundarna konstrikcija naziva se fragilno mjesto (Sertić et al., 2015.).

Bolest se nasljeđuje X-vezano dominantno s nepotpunom penetrantnošću od 80%, jer 20% muškaraca nosilaca mutacije, nije klinički oboljelo, pa se označavaju kao zdravi prenosioci. Sukladno tipu nasljeđivanja, muškarci prenose mutaciju samo na kćeri, nikad na sinove. Neobično je da žene koje mutaciju gena naslijede od oca, uvijek nose samo

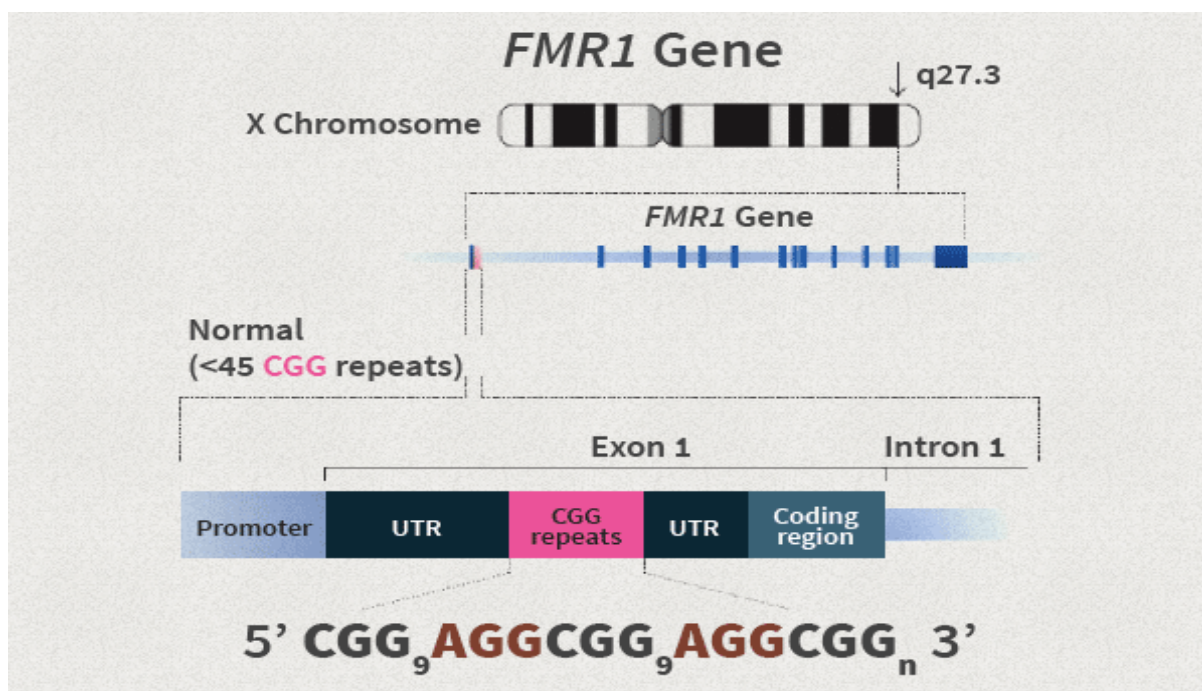
premutaciju. Suprotno tome, u žena koje mutaciju naslijede od majke, ona će se očitovati kao jako produljen CGG slijed (preko 250 tripleta) s odgovarajućom kliničkom slikom. To tumačimo tako jer produljivanje slijeda trinukleotida može nastati samo u gametama majke, no ne i u gametama oca (Mardešić et al., 2003.).

Prema broju umnoženih CGG tripleta u egzonu 1 i metilacijskom statusu ponavljajuće regije, *FMR-1* aleli dijele se četiri skupine. Prva skupina predstavlja *normalne (zdrave) alele* koji imaju od 5-44 ponavljanja. Drugu skupinu nazivamo *intermedijarnim alelima* i oni broje od 45-54 ponavljanja. Intermedijarni aleli ne uzrokuju FRAXA; međutim 14% njih je nestabilno i može se proširiti u premutacijski alel kada se prenosi preko majke. Do sada nisu opisani slučajevi širenja u punu mutaciju, a rizik za FRAXA nije značajno povišen u potomstvu.

Treću skupinu čine *premutacijski aleli* sa 55-200 ponavljanja i žene koje ih nose imaju rizik rađanja djeteta sa sindromom fragilnog X-kromosoma. U takvim obiteljima premutacija gena u majke često prelazi u punu mutaciju u djece zbog dinamičnosti tripleta i njihove ekspanzije iz generacije u generaciju, odnosno anticipacije bolesti. Rizik da majčina premutacija prijeđe u punu mutaciju u potomstvu ovisi o broju CGG tripleta. U nositelja premutacije 70-79 tripleta, rizik prelaska u punu mutaciju iznosi 31%, dok u onih s 90-99 tripleta iznosi oko 80%. Što je CGG slijed duži, to je pojava bolesti ranija, a klinička slika teža.

Četvrtu skupinu čini *puna mutacija alela* sa iznad 200 CGG ponavljanja i s abnormalnom metilacijom *FMR-1* promotorske regije. Sva muška djeca s punom mutacijom pokazuju blagi do teški oblik umne zaostalosti, dok je u 50% ženske djece prisutno intelektualno zaostajanje različitog stupnja. Uz punu mutaciju i potpunu metilaciju mogući su i tzv. mozaici dužine tripleta (u dijelu stanica nalazi se puna mutacija, a u drugom dijelu premutacija ili normalni aleli), te metilacijski mozaici (puna mutacija, ali nepotpuna metilacija, što ipak dovodi do stvaranja manje količine FMRP proteina) i njihove kombinacije (Sertić et al., 2015.; Barišić et al., 2007.).

Vjerojatnost prelaska u punu mutaciju u potomaka ovisi o ukupnom broju CGG ponavljanja, ali također i o broju prekida AGG trinukleotidnim slijedovima. Što je veći broj AGG prekida, to je manja vjerojatnost prelaska u punu mutaciju (Nolin et al., 2013.).



Slika 3. Prikaz *FMR-1* gena

(izvor: <http://www.fragilexcarrier.com/healthcare-provider/xpansion-interpreter/>)

Tablica 1. Odnos broja ponavljanja tripleta CGG i ekspresije FRAXA

(izvor: Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi, Sertić et al., 2015.).

Broj ponavljanja tripleta CGG	Ekspresija bolesti
5-44	Normalni (zdravi) aleli
45-54	Intermedijarni alel, ne uzrokuje FRAXA, međutim broj ponavljanja može se povećati pri prijenosu na potomstvo i prijeći u premutacijski alel
55-200	Premutacijski alel, žene koje ih nose imaju rizik rađanja djeteta s FRAXA
>200	Puna mutacija, mentalno zaostajanje u sve muške djece

3.4. PATOGENEZA

Produkt *FMR-1* gena je FMRP (prema eng. *fragile X mental retardation protein*), regulatorni protein koji veže mRNA u neuronima. FMRP protein ima veoma važnu ulogu u regulaciji sinteze bjelančevina u središnjem živčanom sustavu. Intenzivno se sintetizira u vrhovima dendritičnih nastavaka kao odgovor na sinaptičku aktivnost.

Kod pacijenata sa punom mutacijom, proizvodnja FMRP proteina izostaje zbog hipermetilacije u području *FMR-1* gena, te posljedično dolazi do poremećaja u razvoju mozga i nastajanja abnormalnih sinapsi. Mutacije *FMR-1* gena također dovode do prekomjerne aktivnosti metabotropnog glutamatnog receptora 5 (mGluR5), što u konačnici rezultira mnogim simptomima fragilnog X sindroma. FMRP je prisutan i u drugim tkivima u tijelu, međutim, njegova uloga nije još do kraja razjašnjena (Hagerman et al., 2009.; Barišić et al., 2007.).

3.5. PATOLOGIJA

Što se tiče neuroanatomije u osoba sa sindromom fragilnog X-kromosoma, MR glave u oboljelih je pokazala znatno povećanje nucleus caudatusa. S obzirom na ulogu nucleus caudatusa u kretanju, učenju i kompleksnom ponašanju, smatra se da je navedeno povećanje caudatusa povezano s promjenom ponašanja koju zapažamo u oboljelih (Masterman i Cummings, 1997.). Uočena je negativna korelacija između volumena caudatusa i razine FMRP proteina u male djece, ali i u odraslih s FRAXA, čime se sugerira da FMRP igra značajnu ulogu u povećanju nucleus caudatusa u osoba s fragilnim X sindromom (Hoeft et al., 2008.; Gothelf et al., 2008.).

3.6. KLINIČKA SLIKA

Klinička slika oboljelih varira, međutim u muškaraca simptomi bolesti su izraženiji. Glavna karakteristika kliničke slike je blagi do težak oblik mentalne retardacije, a kod mnogih osoba se pojavljuju i smetnje ponašanja, govora i učenja. U razdoblju poslije puberteta mogu se opaziti i kraniofacijalne osobitosti te makroorhidizam kod muškaraca. Oko 30% žena

nositelja pune mutacije pokazuje graničnu ili subnormalnu inteligenciju, a 10% ih ima djelomičnu fenotipsku ekspresiju na licu (Bago et al., 2004.; Sertić et al., 2015.).

Kao dio kliničke slike povezane s nositeljima premutacije, također se mogu javiti FXPOI (prema eng. *fragile X-associated primary ovarian insufficiency*), odnosno preuranjeno zatajenje ovarija vezano s fragilnim X u žena, te FTAX (prema eng. *fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*), odnosno sindrom tremora/ataksije vezan s fragilnim X u muškaraca (Biancalana et al., 2015.).

3.6.1. Kognitivni simptomi

Glavno obilježje fragilnog X sindroma je umna zaostalost. Nekoliko studija opisalo je korelaciju između kvocijenta inteligencije i razine FMRP proteina u oboljelih, pokazujući da je kognitivni deficit manji što je viša razina FMRP proteina izmjerena u limfocitima periferne krvi. U oboljelih muškaraca se općenito može zamijetiti zastoj rasta i razvoja govora unatoč normalnom funkcioniranju slušnog aparata.

Oboljele žene obično pokazuju manji stupanj kognitivnog deficita zbog prisustva jednog normalnog *FMR-1* alela na drugom X-kromosomu (Dykens 2000.; Tassone et al., 1999.). Kvocijent inteligencije u oboljelih ukazuje na blagu do tešku mentalnu retardaciju i može varirati od 35 do 70. Žene i muškarci sa blaže izraženom kliničkom slikom dosežu i do IQ-a 80 (Mardešić et al., 2003.).

3.6.2. Neuropsihijatrijska obilježja

Oboljeli se također mogu prezentirati s raznolikim neuropsihijatrijskim poremećajima. U 16-30% pacijenata mogu se zamijetiti elementi ponašanja iz autističnog spektra (slab kontakt očima, smanjen interes za interakciju s drugim ljudima, itd.). Sama dijagnoza autizma postavlja se u 20% žena i 30% muškaraca s fragilnim X sindromom. Često se u pacijenata može opaziti i ponašanje slično onome u ADHD-u. Od ostalih psihijatrijskih fenomena, također se mogu pojaviti depresija, anksioznost te opsesivno kompulzivni poremećaj.

Poseban klinički entitet čini FXTAS – sindrom tremora/ataksije vezanog s fragilnim X. To je neurodegenerativni poremećaj koji se očituje intencijskim tremorom i ataktičnim hodom, a može imati i simptome parkinsonizma, demencije, disautonomije i neuropatije.

FXTAS je uzrokovan premutacijom u genu *FMR-1* i vjerojatno je jedna od najčešćih monogenских neurodegenerativnih bolesti u muškaraca (Barišić et al., 2007.).

Učestalost epilepsije u sindromu fragilnog X varira od 9,14% ovisno o istraživanju. Najčešće se u oboljelih opisuju napadaji složenog parcijalnog tipa, dok su parcijalni motorni i generalizirani oblici rijetki. U većini slučajeva napadaji izbijaju iz frontalnih i temporalnih režnjeva i dobro reagiraju na antikonvulzivnu terapiju. Kod mlađih osoba sa sindromom fragilnog X nalaze se paroksizmalni obrasci ovisni o dobi, koji pokazuju obilježja vrlo slična onim prisutnim u centrottemporalnim šiljcima.

Praćenje evolucije karakterističnog paroksizmalnog EEG obrasca tijekom života osoba sa sindromom fragilnog X također pokazuje sličnost s benignom epilepsijom dječje dobi. Sama pojava epilepsije ovisna je o genotipu, kao što je to slučaj i kod drugih fenotipskih obilježja ovog sindroma. Pretpostavlja se da na pojavu epilepsije i karakterističnih EEG abnormalnosti u osoba sa sindromom fragilnog X utječu mozaicizam, odnosno veličina ekspanzije u jednom ili više tkiva, stupanj metilacije, te ukupan učinak drugih gena koji predisponiraju napadajima. (Cigit et al., 1999.).

3.6.3. FXPOI

FXPOI (prema eng. *fragile X-associated primary ovarian insufficiency*), odnosno sa sindromom fragilnog X-vezano preuranjeno zatajenje ovarija, pojavljuje se u oko 21% žena koje su nositeljice premutacijskog alela. FXPOI obilježava prijevremeni nastup menopauze, prije 40. godine, a pojavljuje čak u 21% žena sa premutacijskim alelom, što je značajno više u odnosu na postotak žena kod kojih je nastupila prijevremena menopauza u općoj populaciji (samo 1%) (Sherman 2000.).

3.6.4. Fenotipska obilježja

Fenotipska obilježja nisu uvijek upadljiva, posebno u mlađoj dobi bolesnika i kod ženske djece. Pri rođenju, djeca sa sindromom fragilnog X-kromosoma mogu biti nešto teža od zdrave djece, a također se može izmjeriti povećan opseg glave. Neke od karakterističnih dismorfičnih crta mogu uključivati relativnu makrokraniju, izduženo lice s prominentnom

maksilom i usnama, velike uške, izbočenu bradu te makroorhidizam. Ovi znakovi su izraženiji nakon nastupa puberteta, ali mogu biti prisutni i u djetinjstvu (Sertić et al., 2015.).

Ponekad se mogu naći i znaci slabosti veziva (slab tonus mišića, pojačana pokretljivost zglobova, uvučena prsa, spuštена stopala, a u kasnijoj dobi i slabost srčanih zalistaka) (Cigit et al., 1999.).



Slika 4. Fenotipska obilježja djeteta sa sindromom fragilnog X-kromosoma
(izvor:http://mmg-233-2014-genetics-genomics.wikia.com/wiki/Using_Drosophila_to_Study_Mental_Retardation_in_Humans)

Tablica 2. Fenotipske značajke muškarca s fragilnim X-kromosomom

(izvor: Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi, Sertić et al., 2015.).

Porodajna masa	obično u granicama normale (srednja vrijednost oko 70%)
Visina	u infantilitetu i djetinjstvu uglavnom između 50 i 97%; u odrasloj dobi većinom ispod 50%
Opseg glave	lagano povećan u djetinjstvu, iznad 50% u odrasloj dobi
Izgled lica	dugačko lice s prominentnim čelom i mandibularnim prognatizmom
Uške	dugačke i istaknute, lagano dismorfične
Genitalije	makroorhidizam u većini slučajeva u odraslih, katkad i u dječaka
Vezivno tkivo	hiperekstenzibilnost zglobova (posebno prstiju na rukama), fina koža sa strijama, ponekad prolaps mitralnog zaliska, visoko nepce, rascjep nepca, tortikolis, kifoskolioza, ingvinalna hernija, ravna stopala

3.7. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA

Pri razmatranju diferencijalne dijagnoze sindroma fragilnog X-kromosoma, u obzir dolaze sljedeća stanja sa sličnom kliničkom slikom:

1. Sotos sindrom
2. Prader Willi sindrom (PWS)
3. Autizam
4. ADHD
5. FRAXE (prema eng. *fragile XE syndrome*): karakteriziraju ga blaže intelektualne poteškoće; opisan je u muškaraca s neprimjerenim umnažanjem CCG (citozin-citozin-gvanin) trinukleotidnih slijedova u genu *FMR-2* na X-kromosomu
6. Parkinsonizam, tremor, ataksija, demencija, autonomna disfunkcija (Hall et al., 2005.).

3.8. DIJAGNOZA

Dijagnostički postupak temelji se na anamnezi, pogotovo detaljnoj obiteljskoj anamnezi, te kliničkom pregledu, a potvrđuje se metodama molekularno-genske dijagnostike. Molekularna dijagnostika preporučuje se pacijentima oba spola s umnom zaostalošću, autizmom, prisutnim fenotipskim karakteristikama, te u slučaju pozitivne obiteljske anamneze. Testiranje se također preporučuje ženama s nerazjašnjenim preuranjenim zatajenjem ovarija, te muškarcima iznad 50 godina starosti koje pate od cerebelarne ataksije i intencijskog tremora, osobito ako imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu. Otkrivanje nositelja premutacijskih alela i alela pune mutacije veoma je važno u pružanju informacija o nasljeđivanju i obiteljskim rizicima obolijevanja od fragilnog X sindroma .

Najčešće korištene metode uključuju PCR i Southern blot, koje su zlatni standard u dijagnostici. Genotipizacija se provodi umnažanjem interesnih DNA fragmenata PCR-om, nakon čega slijedi analiza rezultata elektroforezom u agaroznom gelu i vizualizacija veličine umnoženih PCR fragmenata. Broj CGG tripleta određuje se prema molekularnom biljevu veličine. Ako se za ženske osobe dobije samo jedan fragment umjesto dva ili ako za muške osobe PCR fragment na gelu nije vidljiv, PCR se ponavlja s enzimom 7-deaza-dGTP nakon

čega slijedi hibridizacija s oligonukleotidnom sondom dig-5(CGG) i određivanje broja CGG tripleta (Sertić et al, 2015.).

PCR je visoko osjetljiv za detekciju do 120 CGG ponavljanja, iako je nešto manje uspješan u detekciji većih premutacija i punih mutacija, dok je Southern blot uspješan u detekciji svih alela. Southern blotom se također mogu dobiti informacije o metilacijskom statusu *FMR-1* gena, odnosno informacije o stabilnosti mutacije (Chen et al., 2010.).



Slika 5.

Molekularna dijagnostika FRAXA (PCR/elektroforeza u agaroznom gelu/hibridizacija) – prikaz autoradiograma. 1, 2 i 4 – DNA ulomci s ekspaniranim alelima CGG>200; 3, 5 i 6 – CGG ulomci s normalnim brojem tripleta (zdravi aleli); 7 – molekularni standard.

Senka Škaro, Klinička jedinica za molekularnu dijagnostiku, KBC Zagreb

3.8. LIJEČENJE

Za sada ne postoji učinkovito liječenje ove bolesti. Vrlo je važno otkrivanje nositelja premutacije i pune mutacije jer se na taj način kroz genetička savjetovališta mogu pružiti potrebne informacije o rizicima prijenosa i nasljeđivanja sindroma fragilnog X-kromosoma. Iako ne postoji mogućnost potpunog izlječenja, moguće je i potrebno provesti potpurnu terapiju oboljelima.

S obzirom na poznate intelektualne poteškoće, oboljeloj djeci potrebno je osigurati obrazovanje po posebnom i prilagođenom programu (rad u manjim razredima, rad "jedan na jedan", izbjegavanje naglih promjena), a kasnije im također treba omogućiti stručno osposobljavanje kako bi mogli što ravnopravnije sudjelovati u društvu.

Ukoliko su problemi u ponašanju izraženi i ometaju u socijalnim interakcijama, farmakoterapija je metoda izbora suportivnog liječenja i mora biti strogo individualna i redovito kontrolirana. Farmakoterapija je također poželjna u kupiranju ostalih popratnih stanja koja se mogu i moraju lijekovima držati pod kontrolom, kao što su to npr. GERB, epilepsija, hipertenzija, prolaps mitralne valvule, itd. (Utari et al., 2010.).

4. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je utvrditi učestalost ponavljanja CGG trinukleotidnih slijedova na kromosomu Xq27.3 u pacijenata sa sumnjom na fragilni X sindrom čiji su uzorci periferne krvi bili testirani na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb u vremenskom periodu od 2004. - 2015. godine.

5. ISPITANICI I METODE

U ovom radu se testirao broj ponavljanja CGG tripleta u osoba čija je klinička slika ukazivala na sumnju na sindrom fragilnog X-kromosoma, a genetska analiza radila se elektroforezom na gelu u razdoblju od 2004. do 2015. godine na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Podaci su prikupljeni iz baze podataka i ukupno je analizirano 1602 testiranih uzoraka.

Primarni uzorak u analizi bila je periferna venska krv u kojoj su se djelovanjem osmotskog tlaka razorili eritrociti radi lakšeg izdvajanja neoštećenih limfocita i izdvajanja DNA. DNA koja je dobivena pročišćuje se precipitacijom, a koncentracija DNA određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm za DNA i 280 nm za proteine (zbog eventualne zagađenosti uzorka proteinima). Uzorku DNA dodaje se etidijev bromid radi lakše vizualizacije pod UV svjetlom i dobivena se smjesa stavlja na 2% agarozni gel, te se elektroforezom provjerava kvaliteta dobivene DNA. Izdvojeni uzorci DNA stavljaju se u epruvete s imenom i prezimenom pacijenta, laboratorijskim brojem, vrstom pretrage i datumom, te se pohranjuju u hladnjaku na temperaturu od +4 °C.

5.1. Načelo postupka

Određivanje broja CGG tripleta provodi se umnažanjem DNA fragmenta od interesa lančanom reakcijom polimeraze – PCR. Analiza rezultata provodi se elektroforezom u agaroznom gelu i vizualizacijom na G-box uređaju.

5.2. Primarni uzorak

Primarni uzorak je venska krv čuvana u epruveti s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA za vensku krv.

5.3. Potrebna oprema i reagensi

Potrebna oprema i reagensi navedeni su u tablicama 3 i 4.

Tablica 3. Korištena oprema i reagensi

Redni broj	Reagens	Proizvođač	Kataloški broj
1.	Expand Long Template PCR System 5U/μL	Roche	11 681 842 001
2.	Deoxinucleotide Triphosphate Set PCR Grade, 4x25 μmol (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Roche	11 969 064 001
3.	DNA Molecular Weight Marker VII	Roche	11 669 940 910
4.	DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche	11 449 451 910
5.	DNA Molecular Weight Marker XIII 50 parova baza	Roche	11 721 925 001
6.	7-Deaza-dGTP, Li-salt (10mM/L)	Roche	10 988 537 001

Tablica 4. Korištene početnice

Početnice	Proizvođač
c 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3' f 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'	Tib-MolBiol

5.4. Postupak umjeravanja

Kao referentni materijal upotrebljava se pozitivna kontrola i negativna (vodena) kontrola. Da bi pretraga bila valjana, pozitivna kontrola mora biti proglašena pozitivnom, a negativna kontrola mora biti bez znakova kontaminacije.

5.5. Faze postupka

Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) započinje dodavanjem pročišćenog uzorka DNA reakcijskoj smjesi koja sadrži enzim DNA polimerazu, dvije oligonukleotidne početnice (eng. *primer*), pufer s MgCl_2 i smjesu četiri deoksiribonukleotida: dATP, dGTP, dCTP i dTTP. Reakcija se provodi u 20 do 30 ciklusa da bi se dobila dovoljna količina DNA za vizualizaciju na gelu.

Svaki ciklus PCR ima tri faze, od koje svaka zahtijevaju određeno vremensko trajanje i određenu temperaturu.

1. DENATURACIJA – razdvajanje dvolančane molekule DNA pod utjecajem visoke temperature
2. AMPLIFIKACIJA – spajanje oligonukleotidnih početnica na komplementarnu regiju denaturirane DNA
3. ELONGACIJA – produljenje lanca DNA uz pomoć enzima DNA polimeraze u smjeru 5'-3' i stvaranje nove dvostruke molekule DNA potpuno identične početnoj molekuli DNA

Tablica 5. PCR FRAXA bez 7-deaze-dGTP, sastojci reakcijske smjese (25 μL)

Mix:	Volumen (μL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
Sterilna destilirana voda	14,9	
10X PCR pufer (17,5 mM MgCl_2)	2,5	1,75
dNTP mix (10 mM)	1,5	0,6
FMR F (5 μM)	1,5	0,3
FMR R (5 μM)	1,5	0,3
DMSO	1,6	6,4
Expand Long (5U/ μL)	0,5	2,5 U
DNA (oko 50 ng/ μL)	1	50 ng

Tablica 6. PCR FRAXA sa 75%-tnom 7-deazom-dGTP, sastojci reakcijske smjese (25 µL)

Mix:	Volumen (µL)	Konc u reakcijskoj smjesi
Sterilna destilirana voda	13,1	
10X PCR pufer (17,5 mM MgCl ₂)	2,5	1,75 mM
dNTP (75% deaza-dGTP) 2,5 mM	3	0,4
FMR F (5 µM)	1,5	0,3
FMR R (5µM)	1,5	0,3
DMSO	1,9	1%
Expand Long (5U/µL)	0,5	2,5 U
DNA (oko 50 ng/µL)	1	50 ng

Tablica 7. Program korišten u postupku PCR

program: DENATURACIJA			
broj segmenta	temperature target	hold time (sec)	cycles
	(°C)		
1	98	600	1
program: AMPLIFIKACIJA			
broj segmenta	temperature target	hold time (sec)	cycles
	(°C)		
1	97	35	
2	65	45	10
3	68	240	
1	97	35	
2	65	35	20*
3	68	240	/+ 10s
program: FINALNA EKSTENZIJA			
broj segmenta	temperature target	hold time (sec)	cycles
	(°C)		
1	68	420	1

5.6. Analiza PCR produkta

Nakon umnažanja PCR produkata pripremi se 2% agarozni gel. Na gel nanosimo 10 μ L umnoženog PCR produkta pomiješanog sa 3 μ L Gel Loading buffera. U zadnju jažicu nanosimo 1,5 μ L molekularnog markera XIII pomiješanog sa 3 μ L Gel Loading buffera. Uz uzorke koji se ispituju mora se nalaziti i kontrolni uzorak heterozigotnog genotipa. Elektroforeza traje oko 45 minuta na 110 V. Određivanje veličine DNA fragmenata vrši se na G-box uređaju za snimanje gelova.

Nakon umnažanja PCR produkata sa 75%-tnom 7-deazom-dGTP-om pripremi se 1,4% agarozni gel. Na gel nanosimo 10 μ L umnoženog PCR produkta pomiješanog sa 3 μ L Gel Loading buffera. U dvije jažice nanosimo 3 μ L Dig-obilježenih molekularnih markera VII i VIII pomiješanih sa 3 μ L Gel Loading buffera i 4 μ L destilirane vode. Elektroforeza traje oko 3 sata na 140 V.

Veličina umnoženih odsječaka određuje se prema molekularnom biljegu, a broj trinukleotida CGG u svakom od njih prema formuli: $n(\text{CGG}) = \text{pb} - 221/3$.

Ukoliko za ženske osobe dobijemo samo jednu vrpca (umjesto dvije) ili ako se za muške osobe ne vidi vrpca, ponavlja se PCR sa 75%-tnom 7-deazom-dGTP-om, a zatim slijedi hibridizacija s oligonukleotidnom probom Dig-5(CG G).

6. REZULTATI

Na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb u razdoblju od 2004. do 2015. godine ukupno se genskom testiranju za sindrom fragilnog X-kromosoma metodom elektroforeze na gelu podvrgnulo 1602 pacijenta. Način interpretacije rezultata prikazan je u tablici 8. Dobiveni rezultati analize elektroforeze na gelu prikazani su u tablici 9.

Tablica 8. Interval izvještavanja rezultata.

Rezultat:	Broj tripleta CGG:
Normalni aleli:	5-44 CGG
Premutacijski aleli:	55-200 CGG
Puna mutacija:	>200 CGG

Tablica 9. Rezultati testiranja u KZLD, KBC Zagreb

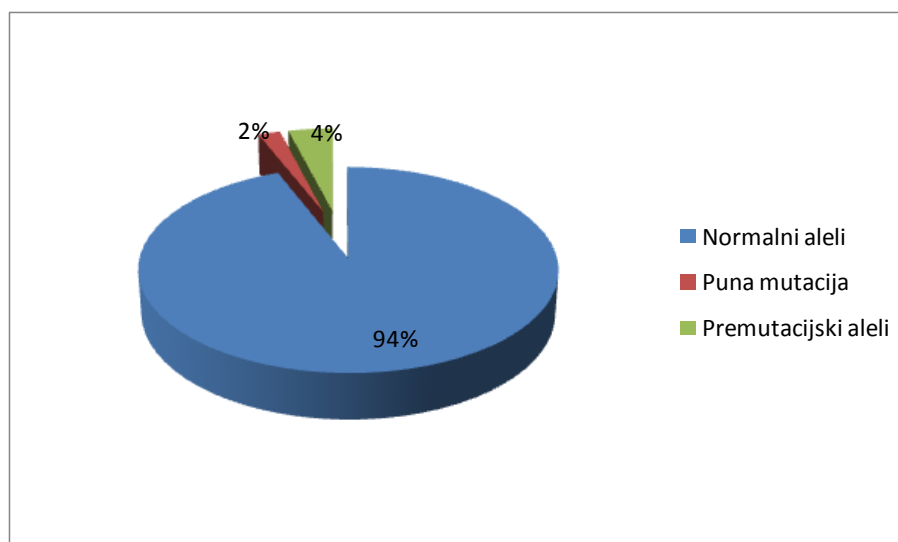
Ukupan broj testiranih:	1602	Udio (%)
Normalni aleli (5-54 CGG)	1505	94
Premutacijski aleli (55-200 CGG)	41	2
Puna mutacija (>200 CGG)	56	4

Kao što je vidljivo iz tablice 9, od 1602 testirana pacijenta, njih 1505 (94%) imalo je do 54 ponavljanja CGG tripleta i time spadaju u grupu pacijenata koji su zdravi i sukladno tome nema rizika pojavljivanja bolesti u potomstvu.

U 41 od 1602 (2%) testirana pacijenta broj ponavljanja CGG tripleta iznosio je 55-200. U tih pacijenata može doći do preuranjenog zatajenja ovarija (ako se radi o ženama), te do sindroma ataksije/tremora povezanih s fragilnim X (ako se radi o muškarcima). U tako zahvaćenim obiteljima premutacija gena u majke često prelazi u punu mutaciju u djece zbog dinamičnosti mutacije i anticipacije bolesti. Što je veći broj ponavljajućih CGG tripleta, rizik prelaska u punu mutaciju je veći. Muškarci koji nose premutaciju prenose je na sve svoje kćeri. Oni su tzv. prenositelji. U žena s premutacijskim alelima ekspresija određenih kliničkih osobitosti ovisi o procesu inaktivacije X-kromosoma.

U 56 od 1602 (4%) testirana pacijenta otkriveno je ponavljanje više od 200 CGG tripleta te se ti pacijenti smatraju bolesnima. Klinička slika u muškaraca je uglavnom teža.

Ukupan rezultat u postotcima svih testiranih pacijenata prikazuje **Slika 6.**



7. RASPRAVA

U ovom radu testirana su ukupno 1602 uzorka krvi u KZLD KBC-a Zagreb u razdoblju od 2004. do 2015. godine metodom elektroforeze na gelu. Od ukupno 1602 testiranih uzoraka u navedenom razdoblju, 94% (1505) ispitanika imalo je normalan broj ponavljanja CGG tripleta (5-54 CGG ponavljanja) i time su spadali u skupinu zdravih ispitanika.

2% ispitanih (ukupno njih 41) imalo je premutacijske alele (55-200 CGG ponavljanja) što znači da kod njih može doći do preuranjenog zatajenja ovarija (ako se radi o ženama), te do sindroma ataksije/tremora povezanih s fragilnim X (ako se radi o muškarcima). Premutacija gena u majke često prelazi u punu mutaciju u djece zbog dinamičnosti mutacije i anticipacije bolesti, a rizik prelaska u punu mutaciju povećava se s brojem ponavljajućih CGG tripleta. Muškarci koji nose premutaciju prenose je na sve svoje kćeri i spadaju u skupinu tzv. prenositelja. U žena s premutacijskim alelima ekspresija određenih kliničkih osobitosti ovisi o procesu inaktivacije X-kromosoma, čime ih čini somatskim mozaicima.

4% testiranih (ukupno 56 pacijenata) imalo je ponavljanje više od 200 CGG tripleta te se ti pacijenti smatraju bolesnima.

Strategija testiranja osobe s obiteljskom poviješću sindroma fragilnog X donekle se razlikuje od testiranja osobe s nespecifičnom duševnom zaostalosti nepoznate etiologije. Prema preporukama Američke udruge za medicinsku genetiku, osobe kod kojih bi trebalo u obzir uzeti molekularno genetičko testiranje su:

- osobe oba spola s duševnom zaostalosti, zaostajanjem u razvoju ili autizmom, osobito ako imaju:
 - a) ikakve karakteristike ponašanja ili fizičke osobine karakteristične za sindrom fragilnog X;
 - b) obiteljsku povijest sindroma fragilnoga X; ili
 - c) mušku ili žensku rodbinu s nedijagnosticiranom duševnom zaostalosti.
- osobe koje zatraže savjete vezane za reprodukciju, a imaju:
 - a) obiteljsku povijest sindroma fragilnoga X, ili
 - b) nedijagnosticiranu duševnu zaostalost.
- fetusi majki koji su poznati prenositelji
- osobe čiji rezultat citogenetskog testiranja fragilnoga X nije u skladu s njihovim fenotipom; tu su uključene osobe s jakom kliničkom indikacijom (uključujući i rizik da su prenositelji)

- te osobe koje imaju negativan ili dvosmislen rezultat citogenetičkog testa, kao i osobe s atipičnim fenotipom koje su imale pozitivan rezultat citogenetičkog testa.

8. ZAKLJUČAK

Sindrom fragilnog X-kromosoma jedan je od najčešćih nasljednih oblika mentalne retardacije, a nasljeđuje se X-vezano dominantno s nepotpunom penetrantnošću. Najčešći molekularni mehanizam sindroma fragilnog X-kromosoma je tzv. dinamička mutacija. Riječ je o proširenju regije CGG tripleta u egzonu 1 gena *FMR-1* u kromosomskoj regiji Xq27.3. Kliničku sliku obilježava blagi do teški stupanj mentalne retardacije, a pojavljuju se i anatomske anomalije kao što su velika lubanja, dugo lice, izbočeno čelo, klempave uši, veliki testisi i poremećaji ponašanja.

Osobe s FRAXA imaju produljen ponavljajući slijed tripleta CGG na X-kromosomu. Aleli u genu *FMR-1* smatraju se normalnima kada broj ponavljanja CGG tripleta iznosi od 5-44. Intermedijarni aleli imaju od 45-54 ponavljanja, ne uzrokuju FRAXA, no 14% njih je nestabilno i može se proširiti u premutacijski alel kada se prenosi preko majke. Premutacijski aleli imaju od 55-200 ponavljanja i žene koje ih nose imaju rizik rađanja bolesnog djeteta, ovisno o broju ponavljajućih CGG tripleta. Poremećaji vezani uz premutacijski alel su pojava prijevremenog zatajenja ovarija u žena i sindroma ataksije/tremora povezanih s fragilnim X u muškaraca. Puna mutacija alela je iznad 200 CGG ponavljanja i označava prisustvo bolesti sa prethodno opisanom kliničkom slikom koja je izraženija u muškaraca.

Analizom 1602 pacijenta u KZLD KBC-a Zagreb elektroforezom na gelu utvrđeno je u 1505 (94%) pacijenata ponavljanje od 5-54 CGG tripleta i oni su zdravi, u 41 (2%) pacijenata ponavljanje od 55-200 CGG tripleta te oni pokazuju rizik prijenosa bolesti na potomstvo, a u 56 (4%) pacijenata utvrđeno je ponavljanje preko 200 CGG tripleta i oni se svrstavaju među oboljele.

9. ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jadranki Sertić na predloženoj temi, pristupačnosti i uloženom trudu. Mentorica prof.dr.sc. Sertić omogućila mi je pristup potrebnoj dokumentaciji i literaturi, te je rado odgovarala na sva moja pitanja. Bilo mi je veliko zadovoljstvo raditi pod Njenim mentorstvom.

Zahvale idu i obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, ohrabivali su me i poticali da što brže i kvalitetnije napišem ovaj rad.

10. POPIS LITERATURE

Bago R, Hećimović S, Barišić I, Pavelić J. Dijagnostika sindroma fragilnog X kromosoma metodama molekularne medicine. *Paediatrica Croatica* (1330-724X) 48 (2004), suppl 2;24

Bailey DB Jr, Raspa M, Bishop E, Holiday D. No change in the age of diagnosis for fragile x syndrome: findings from a national parent survey. *Pediatrics*. 2009 Aug. 124(2):527-33.

Barišić, B. Marušić Della Marina. Genetske osnove razvojnog zaostajanja/mentalne retardacije. *Paediatr Croat* 2007;51:

Biancalana V, Glaese D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders *European Journal of Human Genetics* (2015) 23, 417–425; doi:10.1038/ejhg.2014.185; published online 17 September 2014

Chen L, Hadd A, Sah S, Filipovic-Sadic S, Krosting J, Sekinger E, Pan R, Hagerman PJ, Stenzel TT, Tassone F, Latham GJ. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for Southern blot analysis. *J Mol Diagn*. 2010;12:589–600.

Dykens EM. Genetics and Mental Retardation Syndromes: a New Look at Behavior and Interventions. Baltimore: Paul H Brookes Pub. Co; 2000.

Gothelf D, Furfaro JA, Hoelt F, et al. Neuroanatomy of fragile X syndrome is associated with aberrant behavior and the fragile X mental retardation protein (FMRP) *Ann Neurol*. 2008;63:40–51.

Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, et al. Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*. 2009 Jan. 123(1):378-90.

Hall DA, Berry-Kravis E, Jacquemont S, Rice CD, Cogswell J, Zhang L, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology*. 2005;65:299–301

Hoelt F, Lightbody AA, Hazlett HC, et al. Morphometric spatial patterns differentiating boys with fragile X syndrome, typically developing boys, and developmentally delayed boys aged 1 to 3 years. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65:1087–1097.

Mardešić D. Nasljedne i prenatalno stečene bolesti. Mardešić D i sur. *Pedijatrija*. Zagreb: Školska knjiga, 2003:105-107.

Nolin SL *et al*. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet* 2013; 161(4):771-8.

Nolin SL *et al*. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med* 2015 May;17(5):358-64.

Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000 Fall;97(3):189-94.

Stipoljev F, Karlović D, Čelić I, Sertić J. Sindrom fragilnog X-kromosoma. Sertić J i sur. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika u Kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada, 2015:161-164.

Tassone F, Hagerman RJ, Iklé DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, Oostra BA, Taylor AK. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1999;84:250–261.

Utari A, Adams E, Berry-Kravis E, Chavez A, Scaggs F, Ngotran L, Boyd A, Hessel D, Gane LW, Tassone F, Tartaglia N, Leehey MA, Hagerman RJ. Aging in the fragile X syndrome. *J Neurodev Disord*. 2010;2:70–6.

<http://emedicine.medscape.com/article/943776-overview>

<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/fragile-x-syndrome>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>

<http://www.health.harvard.edu/childrens-health/fragile-x-syndrome->

<http://www.ucdenver.edu/academics/colleges/medicalschoo/programs/fragilex/Pages/GeneAdv.aspx>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763414000098>

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. studenog 1988. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Dragutina Domjanića u Adamovcu, pohađala sam XV. gimnaziju u Zagrebu, prirodoslovnomatematičkog usmjerenja, poznatiju kao "MIOC". Za vrijeme osnovne i srednje škole bavila sam se rukometom i atletikom, te sam bila članica nekoliko izvannastavnih dodatnih grupa. Redovito sam sudjelovala na županijskim natjecanjima iz kemije i fizike. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 2007. godine. U slobodno vrijeme amaterski se bavim sportom.