

# MUTACIJE HFE GENA I SINDROM DOWN

---

**Đarmati, Rebeka**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:778810>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Rebeka Đarmati

MUTACIJE HFE GENA I SINDROM DOWN

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Rebeka Đarmati

MUTACIJE HFE GENA I SINDROM DOWN

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: doc.dr.sc. Jadranka Vraneković prof.,

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_ literaturnih navoda.

## SAŽETAK

Sindrom Down (DS) predstavlja jedan od vodećih uzroka intelektualne zaostalosti te usporenog kognitivnog razvoja u humanoj populaciji. Do četrdesete godine, osobe s DS razvijaju neuropatologiju i demenciju karakterističnu za Alzheimerovu bolest (AD). Brojna istraživanja povezala su metale, kao što je željezo, s patogenezom Alzheimerove bolesti. Jedan od mnogih proteina uključenih u održavanje homeostaze željeza u stanicama je protein za hemokromatozu (HFE). Promjene u ekspresiji HFE proteina su pronađene u mozgu oboljelih od AD. Istraživanja pokazuju da mutacije HFE gena, C282Y i H63D, doprinose neravnoteži željeza u organizmu. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati je li mutacije C282Y i H63D HFE gena, zasebno ili u kombinaciji, predstavljaju rizični čimbenik za razvijanje rano nastupajuće AD u osoba s DS.

Metode: Analiza HFE mutacija provedena je na uzorku od 180 osoba s DS i 200 zdravih kontrola pomoću PCR – RFLP metode. Statistička obrada podataka napravljena je koristeći  $\chi^2$  i Fisherov.

Rezultati: Rezultati su pokazali da nema statistički značajnih razlika u distribuciji i učestalosti ispitivanih alela i genotipova kao ni njihovh kombinacija između grupe ispitanika s DS i kontrole grupe.

Mutacije C282Y i H63D, HFE gena ne predstavljaju rizični čimbenik za prekomjerno nakupljanje željeza a time i razvoj ranonastupajuće AD u osoba s DS.

Ključne riječi: Down sindrom, Alzheimerova bolest, HFE gen, SNP, željezo

## ABSTRACT

Down syndrome (DS) is caused by trisomy of chromosome 21, and is the one of major genetic causes of intellectual disability. By the age of 40 all DS individuals develop neuropathology and dementia seen in Alzheimer's disease (AD). Numerous studies have implicated metals such as iron in the pathogenesis of AD. One of many proteins involved in maintaining iron homeostasis is the hemochromatosis protein (HFE). Alterations in the expression pattern of HFE protein were found in brains of AD patients. Mutations of HFE gene, C282Y and H63D, were shown to affect body iron status.

The aim of the study: C282Y and H63D mutations of HFE gene, individually or in combination, contribute to neurodegeneration and could be risk factors for early onset AD in DS individuals.

Genotyping was done in 180 DS individuals and 200 healthy controls using PCR-RFLP methods. The frequencies of alleles and genotypes are compared between groups using the  $\chi^2$  and Fisher's exact tests. The results don't show a statistically significant difference in distribution and frequency of alleles and genotypes between DS group and control group. We can conclude that H63D and C282Y mutation of HFE gene in our study group, were not associated with iron accumulation and early onset AD in DS individuals.

Key words: Alzheimer disease, Down syndrome, , HFE gene, SNP, iron

## Contents

1. UVOD.....	1
1.1. Genetika sindroma Down .....	1
1.1.1. Klinička slika sindroma Down.....	1
1.1.2. Nerodegeneracija kod osoba sa sindromom Down.....	2
1.1.3. Uloga željeza u neurodegeneraciji .....	3
1.3. Gen za hereditarnu hemokromatozu.....	6
1.3.1. Mutacije HFE gena .....	6
2. CILJ RADA .....	10
3. ISPITANICI I METODE.....	11
3.1. Ispitanici .....	11
3.2. Metode rada .....	12
3.2.1. Izolacija DNA .....	12
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	12
3.2.3. Restrikcija.....	13
3.2.4. Elektroforeza.....	15
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	15
4. REZULTATI.....	17
5. RASPRAVA .....	21
6. ZAKLJUČAK .....	23
7. LITERATURA .....	24
8. ŽIVOTOPIS .....	30

# 1. UVOD

## 1.1. Genetika sindroma Down

Down sindrom (DS) je jedna od najčešćih aneuploidija u humanoj populaciji. Razlikujemo tri tipa sindroma Down, regularni, translokacijski i mozaični. Regularni tip ili trisomija 21 je posljedica pogreške prilikom razdvajanja homolognih kromosoma tijekom mejoze. Regularna trisomija 21 posljedica je nerazdvajanja kromosoma tijekom gametogeneze. Najčešće do nerazdvajanja dolazi tijekom oogeneze (90 - 95%), te rjeđe tijekom spermatogeneze (4 - 10%). Tijekom oogeneze, pogreška u razdvajanju homologa češće se javlja u prvoj mejotičkoj diobi (76%) nego u drugoj (24%) [1].

Translokacijski tip DS nastaje kao posljedica Robertsonove translokacije koja uključuje kromosom 21. Može biti nasljeđena od roditelja ili nastati de novo te se javlja u 4% slučajeva DS-a. [2]

Mozaični tip DS javlja se u 2 - 3% slučajeva i posljedica je mitotskog nerazdvajanja kromosoma 21 u ranom fetalnom razvoju. Ovisno o tome kada se nerazdvajanje dogodi individua može imati više staničnih linija od kojih je jedna trisomična za kromosom 21. Klinička slika ovisi o postotku aberiranih stanica [3]. Svi oblici DS imaju prepoznatljivu kliničku sliku.

### 1.1.1. Klinička slika sindroma Down

Osobe s DS imaju karakterističan izgled koji je posljedica kraniofacijalnog dismorfizma, smanjen tonus mišića (hipotonija), smanjene intelektualne mogućnosti te usporeni kognitivni razvoj. DS



karakteriziraju i mnoge prirođene mane kao i sklonosti prema nekim bolestima. Prosječni životni vijek je 60 godina, no prirođene mane i mnoge bolesti, često imaju negativan utjecaj na životni vijek tih osoba. Najčešća prirođena greška u osoba s DS je prirođena srčana mana koja uključuje različite septalne defekte. Pojedinci razvijaju celijakiju (bolest intolerancije na gluten), gastroezofagealni refluks, smanjenje aktivnosti štitnjače (hipotiroizam). Nadalje, osobe s DS često imaju problema sa vidom i/ili sluhom [1,4]. Kod djece s DS se govor sporije razvija te, kada se razvije, može biti teže razumljiv. Usporeni kognitivni i intelektualni razvoj je često praćen biheviorističkim poteškoćama. Problemi u ponašanju se odnose na poremećaj pažnje, tvrdoglavost, oslabljenu koncentraciju te pojavu opsesivno - kompulzivnog poremećaja. Manji postotak osoba s DS boluje od autizma koji dodatno utječe na komunikaciju i socijalne vještine. [2] Znakovi demencije praćene patogenezom Alzheimerove bolesti, pojavljuju se već oko četrdesete godine života u gotovo svih osoba sa sindromom Down. [5]

### 1.1.2. Neurodegeneracija kod osoba sa sindromom Down

Neurodegeneracija podrazumijeva bilo koji patološki proces koji primarno zahvaća neurone uzrokujući gubitak funkcije i/ili strukture neurona. Neurodegenerativne bolesti čine veliku grupu neuroloških poremećaja s različitim simptomima, a u fokusu mnogih istraživačkih studija su Alzheimerova bolest (Alzheimer's disease - AD), Parkinsonova bolest (engl. Parkinson's disease - PD), Huntingtonova bolest (engl. Huntington's disease - HD) i amiotrofna lateralna skleroza (engl. amyotrophic lateral sclerosis – ALS). U zdravoj populaciji rizni faktor za razvoj neurodegenerativnih bolesti je starija životna dob. [7]

Očekivani životni vijek osoba sa sindromom Down je četrdesetih godina 20. stoljeća bio 12 godina, no razvojem medicine on je produžen na čak 60 godina. Produženjem životnog vijeka osoba sa DS primjećeno je da gotovo sve osobe razvijaju neuropatološke procese, odnosno demenciju koja se pojavljuje i u AD. Karakteristične neuropatološke promijene su povećanje ranog endosoma u određenim neuronima, beta-amiloidni plakovi, neurofibrilarni čvorovi koji sadrže tau protein te degeneracija neurona. Patologija AD u osoba sa DS je slična, ali se simptomi pojavljuju između 35. i 45. godine te bolest puno brže napreduje. Endosomalno povećanje u neuronima je kod osoba s DS otkriveno već u 28. tjednu trudnoće, u 12 godini započinje formacija difuznih plakova u moždanom tkivu koji tijekom tridesetih godina života napreduju do beta-amiloidnih plakova. Brojne studije ukazuju da metali kao što je željezo, bakar, cink i aluminj doprinose patogenezi neurodegenerativnih bolesti zbog njihove akumulacije u mozgu [5].

### 1.1.3. Uloga željeza u neurodegeneraciji

Ravnoteža željeza u mozgu je vrlo osjetljiva, manjak željeza može spriječiti stvaranje veza među neuronima kao i sintezu neurotransmitera te može dovesti do manjka energije što je posebno opasno za mozak u razvoju. S druge strane, višak željeza potiče stvaranje vrlo toksičnih kisikovih radikala odnosno dovodi do pojave oksidativnog stresa. Oksidativni stres je stanje do kojeg dolazi radi prekomjerne produkcije reaktivnih spojeva kisika i dušika ili radi smanjene reakcije antioksidansa. Nakupljanje navedenih toksičnih spojeva uzrokuje oksidaciju proteina i lipida te oštećuje DNA što tada vodi ka programiranoj staničnoj smrti. Sve ove promjene karakteristične su u neurodegenerativnim procesima [8].

Manjak željeza kod novorođenčadi povezuje se s različitim neurološkim bolestima i kliničkim manifestacijama u kognitivnom, motoričkom i socijalnom zaostajanju. Nadalje, postepeno nakupljanje željeza u mozgu je primjećeno kao normalna pojava kod starenja te je povezano ali je isto tako povezano i s ranijom progresijom Alzheimerove bolesti. Obzirom na kliničku sliku osoba s DS uloga željeza nije u potpunosti razjašnjena. Veliki nedostatak informacija odnosi se na stanje željeza u mozgu tih osoba. Analize željeza i proteina povezanih sa željezom u krvi ukazuju da osobe sa DS imaju promjene u metabolizmu željeza. Naime, utvrđene su povišene koncentracije feritina u serumu, ali i smanjenje razine transferina. Nadalje, povećane koncentracije slobodnog redoks aktivnog željeza, i u plazmi i u eritrocitima, govore u prilog poremećaja u metabolizmu željeza kod DS [9]. Također, pogoršanje kognitivnih funkcija u DS povezuje sa upravo s povišenim razinama željeza. Uspredba DS osoba koje imaju simptome AD i onih bez simptoma AD, ukazuju da bi rana pojava AD u DS mogla biti povezana s povećanim unosom i depozitima željeza koji su posljedica promjena u transportu željeza [5]. Povećane koncentracije transferina evidentirane su i u plodovoj vodi trudnica kojima je detektirana trisomija 21 u ploda, što sugerira također na promjene u metabolizmu željeza u ranoj trudnoći. [6]

## 1.2. Metabolizam željeza

Mnogi metabolički procesi u ljudskom organizmu koriste željezo. Ono se nalazi u sastavu eritrocita kao hem u hemoglobinu te je zaslužno za vezanje kisika. Uz to, željezo daje crveni pigment eritrocitima pa i krvi. Željezo nosi bitnu ulogu kao kofaktor enzimima te je esencijalan u sintezi DNA, RNA i proteina. Nadalje, izuzetno je važno pri formiranju i održavanju mijelinske ovojnice i neurotransmitera kao i za održavanje normalne neurološke funkcije. [8]

Željezo u organizam ulazi hranom, a apsorbira se u duodenumu. Kako bi iz duodenuma pomoću dvovalentnog metal transportera prešlo u enterocite, trovaletno željezo mora prijeći u dvovalentno uz vitamin C ili duodenalni citokrom b kao katalizatore. U enterocitima se višak željeza skladišti u obliku feritina, a ostatak se pomoću feroportina, koji je reguliran hepcidinom, vezuje za transferin te prenosi krvlju po tijelu. Transferin je molekula koja vezuje dva atoma željeza te se onda naziva holo-transferin. Stanice na svojoj membrani, uz mnoštvo drugih, imaju receptore za transferin. Kada se holo-transferin veže na receptore biva unesen u stanicu endocitozom. U nastalim vezikulama dolazi do snižavanja pH vrijednosti te se atomi željeza ispuštaju u citoplazmu. Receptor sa molekulom transferina se vraća na staničnu membranu. Molekula transferina bez željeza se naziva apo-transferin te se kao takva vraća u krvotok. Željezo koje je oslobođeno u citoplazmi stanice je pod daljnom kontrolom željezo regulatornih proteina 1 i 2 (IRP 1 i 2). IRP 1 i 2 kontroliraju ekspresiju različitih gena metabolizma željeza te na taj način optimiziraju raspodjelu željeza u stanici. [8]

Poremećaj u metabolizmu željeza može dovesti do razvoja anemije, odnosno manjka željeza ili do stanja prekomjernog nakupljanja željeza, hemokromatoze. Do anemije kao posljedice nedostatka željeza može doći radi nedovoljnog unosa željeza, povećane potrebe organizma (genetički faktor), povećanog gubitka krvi ili smanjene apsorpcije željeza. Anemiju može uzrokovati i upalni proces. Citokini koji se luče prilikom upalnog procesa dovode do prekomjerne ekspresije hepcidina koji ima ulogu inhibitora feroportina te se tako snižuje koncentracija željeza plazme i transferina. [8]

Nasljedna hemokromatoza (HH) je autosomalni recesivni poremećaj prilikom kojeg dolazi do prekomjerne apsorpcije željeza iz tankog crijeva. [10] Višak željeza se nakuplja u organima i

tkivima, te dovodi do oštećenja. Nakupljanje željeza može uzrokovati dijabetes, artritis, rak, impotenciju i sterilitet. Razlikujemo hemokromatozu tipa 1 odnosno hemokromatozu tipa 2. Tip 1 je povezan s mutacijom u HFE genu dok tip 2 nije. Dijagnoza HH vrši se utvrđivanjem zasićenosti transferina te očitanjem koncentracije feritina u serumu. Navedeni testovi nadopunjuju se genetičkim testiranjem. [8]

### 1.3. Gen za hereditarnu hemokromatozu

Gen za hereditarnu hemokromatozu (HFE) je homeostatski regulator željeza te njegova ekspresija dovodi do sinteze membranskog proteina za kontrolu apsorpcije željeza. Nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6 (6p22). Sastoji se od 7 egzona u duljini od 12kb. [11] Pojačana ekspresija HFE gena je primjećena u žučnom i mokraćnom mjehuru, nadbubrežnoj žlijezi i štitnjači. Humani HFE protein regulira interakciju transferina s receptorom za transferin. Interakcija s receptorom za transferin je selektivna i nekovalentna. [10] Ukoliko dođe do mutacije u HFE genu te posljedično do promijenjene strukture HFE proteina, on ne može obnašati svoju ulogu te se željezo nakuplja izvan stanica. Takva pojava dovodi do razvitka nasljedne hemokromatoze (HH). [12]

#### 1.3.1. Mutacije HFE gena

Mutacije HFE gena koji se povezuju s razvitkom HH su C282Y i H63D. Mutacija C282Y nastaje tranzicijom gvanina u adenin na 845. nukleotidu, što dovodi to zamijene cisteina s tirozinom na 282. mjestu u HFE proteinu. Druga značajnija mutacija HFE gena je H63D kod koje dolazi do zamijene histidina s asparaginom na aminokiselini 63 što je posljedica transverzije citozina u gvanin na nukleotidu 187. HH je najučestalija u populaciji sjeverne Europe. Dokazano je da su u

Ujedinjenom Kraljevstvu, 90% oboljelih od HH, homozigoti za mutaciju C282Y. Rasprostranjenost mutacija u Europi je podjednaka uz manje razlike između slavenske populacije i populacije sjeverne Europe. [12, 13] Mutacija H63D je prepoznata u populacijama sjeverne Afrike, Bliskog Istoka i Azije. Obje mutacije se zbog migracija u posljednjih 500 godina sporadično pojavljuju i u Americi, Novom Zelandu i Australiji. [13] Iz tablica 1 i 2 vidljivo je da je mutacija H63D ipak učestalija od C282Y no još uvijek je nepoznata direktna veza s nastankom HH. Pretpostavlja se da je mutacija H63D odgovorna za nastanak jednostavnijih oblika bolesti te se njen doprinos prepoznaje kod heterozigota C282Y/H63D. [12, 13]

Iako je C282Y mutacija manje zastupljena u općoj populaciji od H63D studije pokazuju da predstavlja faktor rizika za tumore prostate, dojke, kolorektalnog i mozga (14 - 17). Također, uočen je protektivan učinak C282Y mutacija za neurodegenerativne bolesti (19, 20). Suprotno tome, mutacija H63D predstavlja faktor rizika za nekoliko bolesti kao što je AD [21-25] i ALS [26, 27] i moždani udar [28]. Mutacija H63D pet puta je češća u bolesnika s AD-om mlađim od 70 godina u usporedbi s bolesnicima starijim od 80 godina [22]. Studije koje su uključivale analize slika magnetne rezonancije otkrile su povećanu akumulaciju željeza u heterozigota za HFE mutacije [29, 30].

Tablica 1. Prevalencija mutacije C282Y u različitim populacijama<sup>1</sup>

Populacija		Broj alelea	Ukupan broj ispitivanih alelea	Broj homozigota	Frekvencija alela
Europa	ukupno	7435	128950	243	0.05766
(bez Finske)	Sjeverozapadna	3845	50616	143	0.07596
	Južna	259	11600	4	0.02233
Finska		879	25108	17	0.03501
Latinska		494	35430	5	0.01394
Afrička		260	24962	1	0.01042
Istočna Azija		3	19952	0	0.0001504
Južna Azija		68	30616	0	0.002221

<sup>1</sup> Tablica preuzeta sa: <https://gnomad.broadinstitute.org/variant/6-26093141-G-A>

Tablica 2. Prevalencija mutacije H63D u različitim populacijama <sup>2</sup>

Populacija		Broj alelea	Ukupan broj ispitivanih alelea	Broj homozigota	Frekvencija alela
Europa	ukupno	18635	129168	1432	0.1443
(bez Finske)	Sjeverozapadna	7652	50814	601	0.1506
	Južna	1822	11610	166	0.1569
Finska		2598	25118	137	0.1034
Latinska		3556	35438	203	0.1003
Afrička		681	24960	10	0.02728
Istočna Azija		680	19952	11	0.03408
Južna Azija		2457	30616	115	0.08025

<sup>2</sup> Tablica preuzeta sa: <https://gnomad.broadinstitute.org/variant/6-26091179-C-G>



## 2. CILJ RADA

HFE gen kodira membranski protein zaslužan za kontrolu apsorpcije željeza u stanice interakcijom s transferinom i s receptorom za transferin. Prisustvo mutacija u HFE genu dovodi do nemogućnosti održavanja pravilne homeostaze željeza. Poznato je da su C282Y i H63D mutacije HFE gena povezane s razvojem nasljedne hemokromatoze koju karakterizirana nakupljanje željeza u tkivima te općom neravnotežom željeza u stanicama. Promjene u homeostazi željeza u stanicama mozga mogu dovesti do pojave oksidativnog stresa koji predstavlja rizični čimbenik za razvoj neurodegenerativnih bolesti. Mutacija H63D posebno se ističe kao mogući rizični čimbenik za razvoj neurodegenerativnih bolesti, a utvrđena je u značajno većoj frekvenciji kod oboljelih od AD u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, *postmortem* analize oboljelih od AD utvrdile su depozite željeza u različitim djelovima mozga što ukazuje na promjene u homeostazi željeza. Obzirom da se u osoba s DS, mnogo ranije nego u općoj populaciji, razvijaju neurodegenerativne promjene slične u AD bolesnika kao i demencija cilj ovog rada je utvrditi predstavljaju li C282Y i H63D mutacije HFE gena rizične čimbenike za nakupljanje željeza a time i u pojavi rano-nastupajuće Alzheimerove bolesti kod osoba s DS.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Ispitanici su (N=180) osobe sa sindromom Down koji su prikupljeni u suradnji s udrugama za sindrom Down koje djeluju na području Republike Hrvatske (Rijeka, Split, Pula, Osijek, Zadar, Karlovac, Čakovec i Zagreb) i Klinike za ginekologiju i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Među ispitanicima bilo je 94 muškaraca i 46 žena s potvrđenim aberiranim kariotipom trisomije 21, svih tipova.

Konrolnu skupinu čini 200 zdravih osoba (100 žena i 100 muškaraca) čiji su uzorci uzeti iz baze dobrovoljnih darivatelja krvi koja je pohranjena na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Medicinski podaci i humani materijal prikupljen je u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Svi su ispitanici bili upoznati sa svrhom i metodologijom istraživanja te su dali pismeni pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Izolacija DNA

Genomska DNA izolirana je iz periferne krvi (3 - 5 ml) dobivene venepunkcijom ili iz sline uzimanjem brisa bukalne sluznice ovisno o želji svakog ispitanika. Izolacija DNA izvedena je pomoću kitova za izolaciju, a prema protokolu koji navodi proizvođač (FlexiGene DNA Kit [uzorak: krv] i QIAamp DNA Micro Kit [uzorak: bukalna sluznica]; QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka). Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA određivana je spektrofotometrom prema uputama proizvođača (BioMate™3, Thermo electron corporation, SAD). Uzorci DNA bili su pohranjeni na -20 °C sve do analize.

### 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR metoda koristi se za umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule. Replikaciju DNA *in vitro* uvijetima omogućuje enzim DNA polimeraza. Spomenuta polimeraza je izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*, Taq polimeraza. Ona je termostabilna što je bitno zato što PCR metoda podrazumijeva oscilacije u temperaturama. Taq polimeraza, kako bi produžila lanac DNA treba slobodne nukleotide, DNA početnice (eng. *primeri*) i magnezijeve ione. Početnice se koriste za označavanje početka i kraja DNA fragmenta koji je potrebno umnožiti, to su kratki oligonukleotidi komplementarni sa početkom i krajem osnovnog lanca.

PCR se prvo vodi kroz tri koraka:

1. DENATURACIJA je faza u kojoj se temperatura podiže na 95° C kako bi se komplementarni lanaci DNA razvojili.

2. SLJEPLJIVANJE POČETNICA podrazumijeva vezanje početnica na kalup odvojenih lanaca. Odvija se na temperaturi između 40 i 65°C ovisno o temperaturi taljenja pojedine početnice.
3. ELONGACIJA je faza produljivanja lanaca Taq polimerazom pri 72°C. Polimeraza prepoznaje početnice te nadograđuje željeni ulomak DNA lanca.

Tablica 3: Reakcijska smjesa za PCR (konačni volumen 10  $\mu$ L)

	Količina/ $\mu$ L
10 $\times$ PCR pufer	1,5
50 mM MgCl	0,6
10 mM dNTP	0,2
10 $\times$ primer HFE-F	0,5
10 $\times$ primer HFE-R	0,5
Bidestilirana voda	6,57
Taq polimeraza	0,13
DNA	0,5

### 3.2.3. Restrikcija

Metoda restrikcije podrazumijeva cijepanje DNA lanca na točno određenim mjestima. Za cijepanje koriste se restrikcijske endonukleaze, enzimi koji prepoznaju specifične slijedove nukleotida. Enzim može prepoznati mutirano mjesto na lancu ili mutacija može biti odgovorna

za uklanjanje restrikcijskog mjesta. Za restrikciju se koristi 10 $\mu$ l PCR produkta, 2 $\mu$ l pufera, 0,2 $\mu$ l enzima i 7,8  $\mu$ l vode. Za detekciju C282Y mutacije koristi se *RasI* enzim, a za detekciju H63D mutacije *MboI* enzim.

U tablicama 4 i 5 prikazane su veličine PCR produkta i restrikcijskih fragmenata koji odgovaraju genotipovima za C282Y i H63D mutacije u HFE genu.

Tablica 4: Identifikacija C282Y mutacije u HFE genu.

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)
Wt/wt	343 bp	203, 140, 29
C282Y/wt		203, 140, 111, 29
C282Y/C282Y		203, 111, 29

Tablica 5: Identifikacija H63D mutacije u HFE genu

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)
Wt/wt	294 bp	57, 99, 138
H63D/wt		57, 99, 138, 237
H63D/H63D		57, 237

### 3.2.4. Elektroforeza

Elektroforeza se koristi za razdvajanje fragmenata DNA ovisno o veličini. Razdvajanje se odvija na agaroznom gelu kroz koji fragmenti prolaze pod djelovanjem električne struje. U gel se prije elektroforeze dodaje etidij bromid/Syber Red koji omogućuje vizualizaciju fragmenata nakon razdvajanja. Etidij bromid se ugrađuje u molekulu DNA te postaje vidljiv nakon obasjavanja ultraljubičastim svjetlom transiluminatora. Točnu veličinu fragmenta moguće je odrediti pomoću sintetičkih DNA markera poznatih veličina.

Agarozni gel priprema se zagrijavanjem 50 mL TAE pufera i 0.5 g, te se u smjesu dodaje 2.5uL etidij bromida. Nakon hlađenja, gel se izlije u kadu za elektroforezu. Uzorak DNA mješa se s brom fenol plavom bojom (eng. *Brom – phenol – blue* - BPB) prije stavljanja na gel, kako bi se vizualizirao tok elektroforeze. Elektroforeza se provodi pod naponom struje od 80 V i jakosti 2 A.

### 3.2.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvedena je pomoću računalnih programa Statistika 12.0 (StatSoft, Inc. 2018. STATISTICA, data analysis software system, version 8.0) i MedCalc (Copyrights 11.3.0.0. 2003-2010).

Za usporedbu učestalosti alela i genotipova u grupi ispitanika i kontrole koristio se  $\chi^2$  test i Fisherov egzaktni test. Procjena rizika genotipova i njihovih kombinacija temeljila se na omjeru izgleda (engl. odds ratios - OR) i pripadajućeg 95-postotnog raspona pouzdanosti (engl. confidence interval - CI).

Za izračunavanje očekivane frekvencije homozigota i heterozigota koristila se Hardy-Weinbergova jednačba:  $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ ; gdje p predstavlja frekvenciju alela divljeg tipa, a q frekvenciju mutiranog alela. Odstupanja od utvrđenih distribucija genotipova od onih predviđenih Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom ispitala su se  $\chi^2$  testom.

## 4. REZULTATI

Analiza mutacija C282Y i H63D izvedena je na uzorku od 180 osoba sa sindromom Down te 200 zdravih kontrola. Analizirane distribucije genotipova podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi za H63D mutaciju ( $P=0.3745$ ) kao i za mutaciju C282Y ( $P=0.093$ ).

Distribucija i učestalost genotipova i alela za H63D mutaciju u grupi ispitanika i kontrole prikazana je u tablici broj 6, a za C282Y u tablici 7.

Kod 43 (23,88%) osobe sa sindromom Down utvrđena je H63D mutacija, od toga je 39-ero ispitanika bilo heterozigota (21,67%) i samo četvero njih homozigota (2,22%). Mutacija C282Y detektirana je u svega 8 (4,44%) ispitanika koji su svi heterozigoti, homozigoti nisu detektirani ni u ispitanika ni u kontrolnoj skupini. Utvrđen je jedan ispitanik koji je dvostruki heterozigot, što znači da je heterozigot za obje mutacije, dok ih je u kontrolnoj grupi bilo 3. Razlike nisu statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu. Frekvencije alela za H63D i C282Y mutaciju nisu se statistički razlikovale između ispitanika i kontrolne skupine ( $P > 0,05$ ).



Tablica 6: Učestalost genotipova i alela H63D mutacija u osoba sa sindromom Down (N=180) i kontrolnih ispitanika (N=200)

Genotip: H63D	Ispitanici		Kontrola		OR (95%CI)	P
	N	%	N	(%)		
wt/wt	137	76,11	142	71	0.7863 (0.4980 - 1.2416)	0.3023
H63D/wt	39	21,67	51	25,5	0.8081( 0.5019 - 1.3011)	0.3806
H63D/H63D	4	2,22	7	3,5	0.6266 (0.1804 - 2.1770)	0.4620
Alel						
wt	313	86,94	386	96,5	0.8917 (0.5955 - 1.3354)	0.5780
H63D	47	13,06	65	16,25		

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 7: Učestalost genotipova i alela C282Y mutacija u osoba sa sindromom Down (N=180) i kontrolnih ispitanika (N=200)

Genotip C282Y	Ispitanici		Kontrola		OR (95%CI)	P
	N	%	N	%		
wt/wt	172	95,5	194	97	1,5 (0,51-4,42)	0,458
C282Y/wt	8	4,44	6	3		
C282Y/C282Y	0		0		-	-
Aleli						
wt	352/360	97,78	394/400	98,50	1.4924 (0.512 - 4.343)	0.4625
C282Y	8/360	2,22	6/400	1,5		

Raspodjela i učestalost kombinacije genotipova za mutacije C282Y i H63D prikazana je u tablici broj 8. Nije utvrđena statistička značajna razlika u frekvenciji kombinacije genotipova između ispitivane i kontrolne grupe ( $P > 0,05$ ).

Tablica 8: Učestalost kombinacije genotipova C282Y i H63D polimorfizama u osoba sa sindromom Down (N=180) i kontrolnih ispitanika (N=200)

Genotip: C282Y-H63D	Ispitanici		Kontrola		OR (95%CI)	P
	N	%	N	%		
wt/wt-wt/wt	130	72,2	139	69,5	0.3564 (0.0366- 3.4699)	0.3743
C282Y/wt-H63D/wt	1	0,5	3	16,6		
C282Y/C282Y-H63D/H63D	0		0			

## 5. RASPRAVA

Prisutnost mutacija HFE gena predstavlja rizični čimbenik za pojavu nasljedne hemokromatoze, bolesti prekomjernog nakupljanja željeza u organizmu koje ukoliko se nakuplja u neuronima može doprinjeti oštećenju istih. Prekomjerno nakupljanje željeza u stanicama mozga može rezultirati ranom pojavom neuropataloških stanja kao i demencije u osoba s DS. U ovom radu po prvi puta je ispitana distribucija i učestalost alela i genotipova za C282Y i H63D mutacije HFE gena u osoba sa sindromom Down u Hrvatskoj populaciji. Naša hipoteza temeljela se na *teoriji metala* kojom se nastoji objasniti rana pojava neurodegenerativnih promjena u osoba s DS a koje su vrlo slične onima u AD bolesnika.

Naši rezultati pokazuju da učestalost H63D mutacije u ispitanika i kontrole iznosi 13,06% (, odnosno 16,25% što ne predstavlja značajniju statističku razliku. Distribucija ove mutacije u osoba s DS ispitana je prema našim saznanjima samo u jednoj studiji u kojoj su uočili tendenciju neznatno veće prisutnosti ove mutacije u muških u odnosu na žene i to u grupi mlađe populacije ( Moalem et al. 2000). Što se tiče druge mutacije C282Y također nismo detektirali značajnije razlike u distribuciji i učestalosti te mutacije između ispitanika i kontrole. U našem ispitivanom uzorku nismo detektirali ni jednu osobu s mutacijom u homozigotnom obliku kako u grupi ispitanika tako ni u kontroli. Dobiveni rezultati su u skladu s učestalošću mutiranog alela u južnoj Evropi koja je izrazito niska(referenca tablic iz uvoda). Nadalje, u ispitivanom uzorku detektirani su samo heterozigoti za C282Y mutaciju. Obzirom da je učestalost C282Y mutacije relativno niska u skladu s tim je i učestalost heterozigota od 2,22% u ispitanika što se ne razlikuje odnosu na kontrolu (1,5%). Kombinirani genotip C282Y/ H63D, odnosno prisutnost objiju mutacija pronašli smo u jednog ispitanika s DS te u tri ispitanika iz kontrolne skupine (0,5%

/16,6%) što također ne ukazuje na razlike između ispitanika i kontrolne grupe. Dobiveni rezultati ukazuju da se distribucija mutacija HFE gena ne razlikuje između ispitanika i kontrole što ukazuje da iste ne predstavljaju rizične čimbenike za prekomjerno nakupljanje željeza u osoba s DS. Sukladno teoriji metala može se zaključiti da ove mutacije ne predstavljaju rizik ni za raniju pojavu neurodegenerativnih promjena u osoba s DS koje dovode do ranije nastupajuće demencije tipa AD. Neke studije pokazale su da je povećana akumulacija željeza u nosioca HFE mutacije [29, 30]. Uočena je povećana ekspresija HFE gena u mozgu AD pacijenata što sugerira da je HFE ekspresija možda povećana stanicama u blizini plakova i ukazuje da možda te stanice nastoje uspostaviti ravnotežu željeza, što je onemogućeno ukoliko je protein mutiran (Connoe i Lee, 2006). Iako naši rezultati ne ukazuju da postoji statistička značajnost u frekvenciji alela i genotipova za H63D i C282Y mutaciju između ispitanika i kontrola, nije isključeno da postoji promjena u ekspresiji mutiranog proteina u stanicama mozga kod osoba s DS.

Valja naglasiti da su u ovaj rad uključeni ispitanici sa vrlo uskog zemljopisnog područja (Hrvatska) te iste etničke skupine. Moguće je da kada bi se istraživanje ponovilo na većoj skupini ljudi s različitog područja te etničke pozadine da bi rezultati ipak bili drugačiji. Nadalje, na umu treba imati da za ravnotežu željeza u stanicama nije odgovaran jedino HFE gen već i niz drugih kao i različiti ostali čimbenici koji u kombinaciji doprinose homeostazi istog.

Prikazani rezultati ukazuju da se ispitivane mutacije HFE gena na lokusu 6p21.3, mutacije H63D i C282Y, ne razlikuju značajno s obzirom na kontrolne ispitanike te se može zaključiti da ne pridonose promjenama u homeostazi željeza koje mogu rezultirati ranijim neurodegenerativnim promjenama u osoba s DS.

## 6.ZAKLJUČAK

Istraživanjem HFE genskih mutacija H63D i C282Y provedenog u osoba s Down sindromom došlo se do slijedećih zaključaka:

1. Učestalost H63D mutacije u osoba sa DS je 43/23,89%. Utvrđeno je 39 (21,67%) heterozigota te su 4 (2,22%) osobe bile homozigoti za H63D mutaciju.
2. Učestalost heterozigota za C282Y mutaciju u osoba s DS je 8/4,44%, homozigoti nisu detektirani.
3. Nema statistički značajne razlike u distribuciji učestalosti alela i genotipova između 180 osoba s DS i 200 kontrolnih ispitanika.
4. Nema statistički značajne razlike u učestalosti dvostrukih heterozigota između DS osoba (0,5%) i kontrolne skupine (16,6%).
5. Mutacije H63D i C282Y, HFE gena ne predstavljaju rizične čimbenike za akumulaciju željeza u osoba s DS, stoga ne pridonose ranoj pojavi AD sličnih neurodegenerativnih promjena kao ni demenciji.

## 7. LITERATURA

[1] T. D. Gelehrter, F. S. Collins, D. Ginsburg, Principles of medical genetics, second edition, chapter 8

[2] Genetic Home Reference, *Down Syndrome*, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [cited 2019.05.15.] Dostupno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/down-syndrome#sourcesforpage>

[3] Len Leshin, *Mosaic Down Syndrome*, International Mosaic Down Syndrome Association, dostupno na: <https://www.imdsa.org/mosaic-down-syndrome>

[4] Samir Zaidi, Martina Brueckner, Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease, 17. ožujak, 2018., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5557504/>

[5] Malakooti N., Pritchard M.A., Adlard P.A., Finkelstien D.I.: *Role of metal ions in cognitive decline of Down syndrome*, Frontier in Aging Neuroscience, 2014. 6:136, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002847>

[6] Pe M., di Domenico F., Fiorini A., Cocciolo A., Giorgi A., Foppoli C.: *Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: a redox proteomics analysis of amniotic fluid*, Proteomics Clin. Appl. 5, 2011., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21360684>

[7] Przedborski S., Vila M., Jackson-Lewis V., *Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we?* The Journal of Clinical Investigation, 2003., 111(1): 3–10 dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151843/>

- [8] Kotze, M.J., Velden, D.P. Van, Rensburg, S.J. Van, Erasmus, R., n.d. *Pathogenic mechanisms underlying iron deficiency and iron overload: New insights for clinical application*, 20, 108–123.
- [9] Barone E, Arena A, Head E, Butterfield D.A, Perluigi M, *Disturbance of redox homeostasis in Down Syndrome: role of iron dysmetabolism*, *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 114:84-93, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28705658>
- [10] Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – 2019. Accession No. NC\_000006.12, HFE homeostatic iron regulator [ Homo sapiens (human) ]; [cited 2019.05.15]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3077>
- [11] Carol A. Bocchini C.A., Hamosh A.: *HFE gene; HFE*, OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man®, 2018, dostupno na: <https://www.omim.org/entry/613609#geneStructure>
- [12] Cukjati M, Vaupotič T., Rupreht R., Čurin-Šerbec V.: *Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay*, *Biomed central*, 2007., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2253505/>
- [13] Merryweather – Clarke A.T., Pointon J.J., Sherman J.D., Robson K.J.H., *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*, *Journal of Medical Genetics* 1997; 34: 275-278, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9138148>



- [14] Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJ: *Geography of HFE C282Y and H63D mutations*, Genet Test. 2000;4(2):183-98, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953959>
- [15] Shaheen N. J., Silverman L. M., Keku T., Lawrence L. B., Rohlfes E. M., Martin C. F., i sur., *Association between hemochromatosis (HFE) gene mutation carrier status and the risk of colon cancer*, J. Natl. Cancer Inst. 2003., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529348>
- [16] Syrjakoski K., Fredriksson H., Ikonen T., Kuukasjarvi T., Autio V., Matikainen M. P., i sur., *Hemochromatosis gene mutations among Finnish male breast and prostate cancer patients*, Int. J. Cancer 118 518–520, 2006., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003728>
- [17] Osborne N. J., Gurrin L. C., Allen K. J., Constantine C. C., Delatycki M. B., McLaren C. E., i sur., *HFE C282Y homozygotes are at increased risk of breast and colorectal cancer*, Hepatology 51 1311–1318, 2010., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3815603/>
- [18] Gannon P. O., Medelci S., Le Page C., Beaulieu M., Provencher D. M., Mes-Masson A. M., i sur., *Impact of hemochromatosis gene (HFE) mutations on epithelial ovarian cancer risk and prognosis*, Int. J. Cancer, 2011., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312916/>
- [19] Buchanan D. D., Silburn P. A., Chalk J. B., Le Couteur D. G., Mellick G. D. *The Cys282Tyr polymorphism in the HFE gene in Australian Parkinson's disease patients*, Neurosci. Lett., 2002., 327 91–94 dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12098643>

- [20] Correia A. P., Pinto J. P., Dias V., Mascarenhas C., Almeida S., Porto G. *CAT53 and HFE alleles in Alzheimer's disease: A putative protective role of the C282Y HFE mutation*. *Neurosci. Lett.* 457 129–132, 2009., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429178>
- [21] Moalem S., Percy M. E., Andrews D. F., Kruck T. P., Wong S., Dalton A. J., i sur., *Are hereditary hemochromatosis mutations involved in Alzheimer disease?* *Am. J. Med. Genet.* 93 58–66, 2000. dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861683>
- [22] Sampietro M., Caputo L., Casatta A., Meregalli M., Pellagatti A., Tagliabue J., i sur., *The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease*, *Neurobiol. Aging* 22563–568, 2001., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11445256>
- [23] Combarros O., Garcia-Roman M., Fontalba A., Fernandez-Luna J. L., Llorca J., Infante J., i sur., *Interaction of the H63D mutation in the hemochromatosis gene with the apolipoprotein E epsilon 4 allele modulates age at onset of Alzheimer's disease*. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 15151–154, 2003., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12584430>
- [24] Pulliam J. F., Jennings C. D., Kryscio R. J., Davis D. G., Wilson D., Montine T. J., i sur., *Association of HFE mutations with neurodegeneration and oxidative stress in Alzheimer's disease and correlation with APOE*, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 119B, 48–53, 2003., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707938>
- [25] Percy M., Moalem S., Garcia A., Somerville M. J., Hicks M., Andrews D., I sur., *Involvement of ApoE E4 and H63D in sporadic Alzheimer's disease in a folate-supplemented Ontario population*, *J. Alzheimers Dis.* 14 69–84, 2008., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525129>

- [26] Wang X. S., Lee S., Simmons Z., Boyer P., Scott K., Liu W., i sur., *Increased incidence of the HFE mutation in amyotrophic lateral sclerosis and related cellular consequences*. J. Neurol. Sci., 2004., 227 27–33 dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546588>
- [27] Goodall E. F., Greenway M. J., Van Marion I., Carroll C. B., Hardiman O., Morrison K. E., *Association of the H63D polymorphism in the hemochromatosis gene with sporadic ALS*, Neurology 65 934–937, 2005., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186539>
- [28] Ellervik C., Tybjaerg-Hansen A., Appleyard M., Sillesen H., Boysen G., Nordestgaard B. G., *Hereditary hemochromatosis genotypes and risk of ischemic stroke*, Neurology, 2007, 68 1025–1031, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389307>
- [29] Nielsen J. E., Jensen L. N., Krabbe K. *Hereditary haemochromatosis: a case of iron accumulation in the basal ganglia associated with a parkinsonian syndrome*, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1995., 59 318–321, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC486041/>
- [30] Berg D., Hoggenmuller U., Hofmann E., Fischer R., Kraus M., Scheurlen M., i sur., *The basal ganglia in haemochromatosis*, Neuroradiology, 2000., 42 9–13, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10663462>
- [31] Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, et al. (2000) *The DNA sequence of human chromosome 21*, Nature, 2000., 405: 311-319, dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830953>

[32] Alzheimer's association, *Down syndrome and Alzheimer's disease*, 2018, dostupno na:  
<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-dementia/types-of-dementia/down-syndrome>

[33] Ali-Rahmani F, Schengrund CL, Connor JR: *HFE gene variants, iron, and lipids: a novel connection in Alzheimer's disease*, *Front Pharmacol.* 2014, 5:165., dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071582>

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNJE INFORMACIJE

- Ime i prezime: Rebeka Đarmati
- Spol : Ž
- Datum rođenja: 9.5.1996. (Rijeka)
- Adresa: St. Vrh Ike 1, 51414 Ičići
- Državljanstvo: Hrvatica

### RADNO ISKUSTVO

- Prosinac 2017. do danas - rad na blagajni kazališta HNK I. pl. Zajc, Rijeka

### OBRAZOVANJE

- 2015.- 2019. – Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci – Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo
- 2011. – 2015. – Prva rječka hrvatska gimnazija Rijeka – Jezična gimnazija

### STUDENTSKE AKTIVNOSTI

- Sudjelovanje i organiziranje studentskog kongresa „Sanitas“
- Sudjelovanje u studentskom kongresu neuroznanosti „NEURI“

