

Plazmatski profil molekula mikro RNA pacijenata s uznapredovalim zatajenjem srca i ugrađenom mehaničkom potporom lijevog srca

Kuzmanović, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:105:765252>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Matej Kuzmanović

Plazmatski profil molekula mikro RNA pacijenata s uznapredovalim zatajenjem srca i
ugrađenom mehaničkom potporom lijevog srca

Diplomski rad



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Frane Paića. Predan je na ocjenu akademske godine 2022/2023.

ABECEDNI POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

ACEi – Blokator angiotenzin konvertirajućeg enzima

AGO – Argonaute proteini

ARB – Blokator angiotenzinskih receptora

BiVAD - Uređaj za mehaničku potporu obje klijetke (eng. *biventricular assist device*)

BNP – Moždani natriuretski peptid (eng. *brain natriuretic peptide*)

BTC - Premoštenje do kandidature (eng. *bridge to candidacy*)

BTD - Premoštenje do odluke (eng. *bridge to decision*)

BTR - Premoštenje do oporavka (eng. *bridge to recovery*)

BTT - Premoštenje do transplantacije (eng. *bridge to transplantation*)

CPB – Kardiopulmonalni bajpas

DGCR8 – Kofaktor u multi proteinskom kompleksu Mikroprocesora (eng. *DiGeorge critical region 8*)

DT – Odredišna terapija (eng. *destination therapy*)

DV – Desni ventrikul

EF – Ejekcijska frakcija

EKG – Elektrokardiogram

LV – Lijevi ventrikul

LVAD - Uređaj za mehaničku potporu lijeve klijetke (eng. *left ventricular assist device*)

LVEF – Ejekcijska frakcija lijeve klijetke

LVEF – Ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (eng. *left ventricular ejection fraction*)

MCS - Mehanička potpora cirkulaciji (eng. *Mechanical circulatory support*)

miRISC – miRNA inducirani utišavajući kompleks (eng. *miRNA-induced silencing complex*)

miRNA - Mikro RNA

miRNP – Mikro-ribonukleoprotein

mRNA - Glasnička RNA (eng. *messenger RNA*)

NSTEMI – Infarkt miokarda bez ST elevacije u EKG-u (eng. *Non-ST elevation myocardial infarction*)

NYHA - eng. *New York Heart Association*

pre-miRNA – Sekundarni prekursor mikro RNA

pri-miRNA – Primarna mikro RNA

RVAD - Uređaj za mehaničku potporu desne klijetke (eng. *right ventricular assist device*)

STEMI – Infarkt miokarda s prisutnom ST elevacijom u EKG-u (eng. *ST elevation myocardial infarction*)

TAH – Potpuno umjetno srce (eng. *total artificial heart*)

TRBP – TAR RNA vezujući protein (eng. *TAR RNA binding protein*)

UZV – Ultrazvuk

VAD – Uređaj za potporu klijetke (eng. *ventricular assist device*)

SADRŽAJ

SAŽETAK SUMMARY

| | |
|--|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 2. Zatajenje srca | 3 |
| 2.1. Etiologija..... | 3 |
| 2.2. Klasifikacija | 4 |
| 2.3. Dijagnostika i liječenje..... | 5 |
| 2.4. Uznapredovalo zatajenje srca..... | 6 |
| 3. Mehanička potpora cirkulaciji | 8 |
| 3.1. Povijest mehaničke potpore cirkulaciji..... | 8 |
| 3.2. Generacije LVAD uređaja..... | 9 |
| 3.3. LVAD indikacije i rezultati liječenja..... | 11 |
| 4. Mikro RNA (miRNA)..... | 14 |
| 4.1. Značaj miRNA | 14 |
| 4.2. Sinteza miRNA | 14 |
| 4.3. miRNA u zatajenju srca | 17 |
| 4.4. Cirkulirajuće miRNA povezane sa zatajenjem srca..... | 17 |
| 4.5. miRNA i mehanička potpora lijevog srca | 20 |
| 4.5.1. miRNA u tkivu miokarda | 20 |
| 4.5.2. miRNA u plazmi | 23 |
| 4.6. Uloga miRNA sa zapaženom promjenom u ekspresiji prilikom korištenja LVAD-a..... | 25 |
| 4.7. Uloga miRNA kao biomarkera | 26 |
| 5. Zaključak..... | 27 |
| 6. Zahvale | 29 |
| 7. Literatura..... | 30 |
| 8. Životopis | 37 |

SAŽETAK

Plazmatski profil molekula mikro RNA pacijenata s uznapredovalim zatajenjem srca i ugrađenom mehaničkom potporom lijevog srca

Matej Kuzmanović

Kardiovaskularne bolesti velik su javnozdravstveni problem i ulažu se velika sredstva u njihovo liječenje. S očekivanim porastom oboljelih u budućnosti, za očekivati je i veći broj najtežih bolesnika, onih s uznapredovalim zatajenjem srca. Zatajenje srca klinički je sindrom koji u svojoj uznapredovaloj fazi ima veliku smrtnost. Bolesnici u uznapredovaloj fazi iscrpe sve farmakološke opcije terapije i jedino što preostaje je transplantacija ili mehanička potpora cirkulaciji. Uređaj za mehaničku potporu lijevog srca (LVAD) može biti od velike pomoći takvim bolesnicima. Jedan od razloga je taj što ne ispunjavaju svi bolesnici kriterije za transplantaciju, a drugi je razlog ograničena dostupnost organa za transplantaciju. Trenutno se LVAD koristi u 4 indikacije, ali one nisu jasno odvojene jer pacijent koji započne liječenje LVAD-om po jednoj, može prijeći u drugu terapijsku indikaciju. Otkrićem mikroRNA molekula (miRNA) započela su intenzivna istraživanja o njihovoj ulozi u brojnim bolestima, pa tako i u kardiološkim. Brojne su nove spoznaje oko uloge miRNA u patofiziologiji zatajenja srca. S obzirom da se u liječenju takvih bolesnika upotrebljava i LVAD, novija se istraživanja bave ekspresijom miRNA prilikom upotrebe LVAD-a. Poznato je da liječenje LVAD-om ima prednosti i mane, a istraživanjima se nastoje utvrditi mehanizmi koji imaju ulogu u odgovoru na liječenje. Istraživanja mjere ekspresiju u tkivima, i ekspresiju miRNA u cirkulaciji. Upravo se od napretka u istraživanju cirkulirajućih miRNA puno očekuje, jer početni rezultati daju naslutiti da bi se cirkulirajuće miRNA mogle u budućnosti upotrebljavati kao biomarkeri, a možda jednog dana i u liječenju bolesti. Podaci prikupljeni ovim istraživanjem daju uvid u do sada otkrivene cirkulirajuće miRNA i njihov plazmatski profil u pacijenata sa srčanim zatajenjem koji su liječeni LVAD-om. Istraživanja u ovom području u svojim su počecima i potrebno je nastaviti s njihovim razvojem, da bi se moglo prijeći u kliničku primjenu.

Ključne riječi: Uznapredovalo zatajenje srca, LVAD, mikroRNA

SUMMARY

Plasma profile of micro RNA molecules in patients with advanced heart failure and implanted left ventricular mechanical support

Matej Kuzmanović

Cardiovascular diseases are a major public health problem, and significant resources are being invested in their treatment. With the expected increase in the number of patients in the future, a higher number of severe cases, specifically those with advanced heart failure, can be anticipated. Advanced heart failure is a clinical syndrome associated with high mortality rates. Patients in the advanced stage exhaust all pharmacological treatment options, and the only remaining options are transplantation or mechanical circulatory support. Left ventricular assist device (LVAD) can be of great help to such patients. One reason is that not all patients meet the criteria for transplantation, and the limited availability of organs is another factor. Currently, LVAD is used in four indications, but these are not clearly separated since a patient who starts LVAD treatment for one indication may transition to another therapeutic indication. The discovery of microRNA molecules (miRNA) has initiated intensive research on their role in various diseases, including cardiovascular conditions. Numerous new findings have emerged regarding the role of miRNA in the pathophysiology of heart failure. Considering that LVAD is used in the treatment of these patients, recent studies have focused on miRNA expression during LVAD use. It is known that LVAD treatment has advantages and disadvantages, and research efforts aim to determine the mechanisms that play a role in the response to treatment. Studies measure both miRNA expression in tissues and miRNA expression in circulation. The progress in the research of circulating miRNA holds great promise because initial results suggest that circulating miRNA could potentially be used as biomarkers in the future, and perhaps even in disease treatment. The data collected from this research provide insights into the circulating miRNA discovered so far and their plasma profiles in LVAD-treated patients with heart failure. Research in this field is still in its early stages, and further development is needed to progress towards clinical application.

Key words: Advanced heart failure, LVAD, microRNA

1. Uvod

Kardiovaskularne bolesti jedan su od najvećih javnozdravstvenih problema u modernom svijetu. Zbog modernog načina života, svjedoci smo da se svake godine povećava broj kardiovaskularnih bolesnika. Nažalost, porast se očekuje i u budućnosti. To je razlog velikog broja istraživanja i razvoja novih metoda liječenja. Klinički sindrom zatajenja srca rezultat je heterogene miokardne ili vaskularne bolesti uslijed koje srce ne može ispumpati količinu krvi koja je potrebna za potpuno zadovoljavanje potreba periferne cirkulacije za kisikom i hranjivim tvarima (1). To patološko stanje karakterizirano je vrlo visokom smrtnošću. 30-40% unutar prve godine od postavljanja dijagnoze, do čak 60-70% unutar pet godina od postavljanja dijagnoze zatajenja srca (2). Svoju primjenu u liječenju bolesnika s uznapredovalim stadijem zatajenja srca pronašla je i mehanička potpora cirkulaciji (MCS, eng. *Mechanical circulatory support*). Funkcija i svrha te potpore cirkulaciji je volumno rasterećenje srca, odnosno klijetke. Danas se najčešće koristi LVAD (eng. *left ventricular assist device*) - uređaj za mehaničku potporu lijeve klijetke. Postoji više generacija LVAD-a, a danas se koristi generacija s kontinuiranim protokom krvi. Osim LVAD-a, također postoje i RVAD (eng. *right ventricular assist device*) - uređaj za mehaničku potporu desne klijetke te BiVAD (eng. *biventricular assist device*) - uređaj za mehaničku potporu obje klijetke, no oni se puno rjeđe primjenjuju (3). Uređaji koji se danas primjenjuju su većinom uređaji treće generacije. Prednosti te generacije naspram prošlih su: manja dimenzija, baterije dužeg vijeka trajanja i u konačnici manja stopa komplikacija nakon ugradnje. Manja stopa komplikacija je rezultat unaprijeđenog dizajna uređaja treće generacije koji koriste centrifugalnu pumpu kontinuiranog protoka koja nema kontakt krvi i ležaja pumpe, te na taj način smanjuje mogućnost nastajanja tromboze i hemolize (4,5). Ovi uređaji mogu se koristiti u nekoliko indikacija. Indikacije su: Premoštenje do odluke (eng. *BTD - bridge to decision*), premoštenje do kandidature (eng. *BTC - bridge to candidacy*), premoštenje do transplantacije (eng. *BTT - bridge to transplantation*) te odredišna terapija (eng. *DT - destination therapy*). Bolesnici u kategoriji *BTD* privremeno se liječe *MCS* uređajima do odluke o konačnom liječenju koje može uključivati transplantaciju, *VAD* ili može nastupiti poboljšanje zdravlja tako da pacijent ne treba ništa od navedenog. U tom slučaju, za te pacijente, liječenje *VAD*-om zapravo je premoštenje do oporavka (*BTR* eng. *bridge to recovery*). Bolesnici u kategoriji *BTC*

trebaju transplantaciju, no u tom trenutku liječenja imaju kontraindikaciju za transplantaciju. Njihovim liječenjem VAD-om nastoji se otkloniti problem koji je uzrok kontraindikacije kako bi pacijent mogao na transplantaciju. Bolesnici u kategoriji BTT liječe se VAD-om dok se ne nađe odgovarajuće donorsko srce. Bolesnici u kategoriji DT koriste VAD kao zadnju terapijsku mjeru. Takvi bolesnici imaju ireverzibilne kontraindikacije za transplantaciju, ali nemaju kontraindikaciju za VAD, a takvo liječenje im stabilizira i pruža potporu cirkulaciji i na taj način im pomaže u ublažavanju simptoma bolesti (6). Cilj ovog rada je sustavan pregled dosadašnjih spoznaja o plazmatskom profilu miRNA (mikro RNA) molekula koje nalazimo u pacijenata liječenih VAD-om, konkretno LVAD-om. Smatra se da miRNA molekule reguliraju fiziološku, ali i patološku funkciju kardiovaskularnog sustava(7). MiRNA su jednolančane nekodirajuće RNA molekule građene od 22-23 nukleotida koje posreduju posttranslacijsku regulaciju gena, na način da se vežu za 3' netranslacijsku regiju mRNA (eng. *messenger RNA* - glasnička RNA) te negativno djeluju na ekspresiju mRNA. To postižu inhibicijom translacije ili degradacijom mRNA. Važnost miRNA leži u tome što mogu ciljano djelovati na stotine različitih gena koji su uključeni u regulaciju ponekad i cjelokupnih organskih sustava (8). Otkriće da u krvi nalazimo cirkulirajuće miRNA koje su stabilne i relativno lako ih se može detektirati, te da se njihova ekspresija mijenja u različitim bolestima, čini miRNA pogodnima za njihovo korištenje kao biomarkera ili za ciljano terapijsko djelovanje (9). Istraživanja nastoje utvrditi kako bismo mogli upotrijebiti miRNA u liječenju i kontroli brojnih bolesti, pa tako i u liječenju i kontroli zatajenja srca.

2. Zatajenje srca

2.1. Etiologija

Zatajenje srca je klinički sindrom u kojem se kod bolesnika javljaju: zaduha, edemi nogu, nepodnošenje napora, kašalj i edem pluća. Zatajenje može biti posljedica različitih etiologija, odnosno sve bolesti srca i njegovih funkcionalnih dijelova mogu biti uzrokom zatajenja, kao i sve bolesti koje imaju utjecaj na cirkulaciju. Prema tome, prilikom traganja za uzrokom zatajenja treba misliti i na kardiološke bolesti i na one nekardiološke. Potrebno je pronaći pravi uzrok kako bi liječenje moglo biti ciljano i učinkovito. Kod kardiološkog uzroka zatajenja srca treba misliti na sve anatomske strukture srca, koje uključuju pretkljetke, kljetke, zaliske i perikard. Također treba misliti i na provodni sustav srca jer i on može biti uzrok zatajenja. Svi ti poremećaji koji narušavaju funkciju srca kao pumpe postepeno i progresivno dovode do zatajenja (10). Od svih nabrojanih mogućih uzroka, najčešći je ishemijska bolest srca (11). Ishemijska bolest srca nastaje zbog aterosklerotskog plaka koji se nakuplja tijekom vremena. Kada plak suzi lumen koronarnih arterija do te mjere da protok krvi kroz njih postane nedovoljan za opskrbu miokarda, dolazi do ishemije miokarda. Ishemija također može biti uzrokovana trombom ili spazmom koronarnih arterija. Ishemija ovisno o duljini trajanja može dovesti do ireverzibilnih promjena miokarda koje smanjuju mogućnost kontrakcije srca i dovode do ishemijske kardiomiopatije (12). Akutni koronarni sindrom najčešći je oblik ishemijske bolesti srca. Pod taj pojam spadaju: nestabilna angina, infarkt miokarda bez ST elevacije u nalazu EKG-a (NSTEMI, eng. *Non-ST elevation myocardial infarction*) i infarkt miokarda sa ST elevacijom u nalazu EKG-a (STEMI, eng. *ST elevation myocardial infarction*) (13). Akutni koronarni sindrom je hitno stanje i važno ga je prepoznati i što ranije početi s liječenjem kako bi posljedice na srce bile što manje i u konačnici kako bi smo izbjegli nastajanje ishemijske kardiomiopatije. Europsko kardiološko društvo podijelilo je neishemijske kardiomiopatije na: dilatacijsku, hipertrofijsku, restriktivnu, aritmogenu i neklasificiranu kardiomiopatiju (14). Od svih nabrojanih najčešća je dilatacijska. Dilatacijska kardiomiopatija karakterizirana je povećanjem kljetke koje uzrokuje sistoličku i dijastoličku disfunkciju, a u pozadini se ne nalazi koronarna bolest koja bi do takvog stanja dovela. To stanje

ozbiljno narušava cirkulaciju i potrebno je liječenje koje u nekim slučajevima zahtjeva VAD (eng. *ventricular assist device*) – uređaj za potporu klijetke.

2.2. Klasifikacija

Prema konsenzusu svjetskih društava koja se bave zatajenjem srca, zatajenje srca klasificira se ovisno o e젝cijskoj frakciji lijeve klijetke (LVEF, eng. *left ventricular ejection fraction*) na: zatajenje srca sa smanjenom e젝cijskom frakcijom u kojem je $LVEF \leq 40\%$, zatajenje srca s umjereno smanjenom e젝cijskom frakcijom u kojem je $LVEF 41\%-49\%$, zatajenje srca s očuvanom e젝cijskom frakcijom u kojem je $LVEF \geq 50\%$ i zatajenje srca s povećanom e젝cijskom frakcijom (15). Osim podjele po e젝cijskoj frakciji, zatajenje srca možemo podijeliti ovisno o vremenu nastanka bolesti na akutno i kronično. Akutno srčano zatajenje naglo dovodi do pojave simptoma, a može biti uzrokovano novonastalom bolesti ili može nastati zbog akutizacije kroničnog srčanog zatajenja. Bolesnici ovisno o težini njihovih simptoma po NYHA klasifikaciji (eng. *New York Heart Association*) dijele se u 4 skupine. Bolesnici NYHA 1 klase mogu imati uobičajenu fizičku aktivnost bez da osjećaju iscrpljenost, zaduhu, palpitacije ili anginu. Bolesnici NYHA 2 klase imaju mala ograničenja u obavljanju uobičajene fizičke aktivnosti. Prilikom odmora nemaju simptoma, ali prilikom uobičajene fizičke aktivnosti osjećaju iscrpljenost, zaduhu, palpitacije ili anginu. Bolesnici NYHA 3 klase osjećaju iscrpljenost, zaduhu, palpitacije ili anginu prilikom manje fizičke aktivnosti, te stoga imaju veća ograničenja prilikom obavljanja fizičke aktivnosti. Prilikom odmora nemaju simptoma. Bolesnici NYHA 4 klase osjećaju iscrpljenost, zaduhu, palpitacije ili anginu čak i prilikom odmora, a bilokakva fizička aktivnost dovodi do pogoršanja simptoma. Prema tome takvi bolesnici nisu u stanju raditi nikakav fizički rad bez pogoršanja simptoma (16).

2.3. Dijagnostika i liječenje

Bolesnik sa zatajenjem srca može se prezentirati različitim simptomima. Simptomi mogu varirati od blagog pogoršanja bolesti, pa sve do kardiogenog šoka. Ipak, najčešći simptomi su: umor, zaduha, edemi, bol u prsima, netolerancija fizičke aktivnosti i naglo dobivanje na težini. Obrada pacijenta počinje kliničkim pregledom i anamnezom. Ortopneja i paroksizmalna noćna dispneja karakteristični su simptomi srčanog popuštanja za koje saznajemo iz anamneze. U kliničkom pregledu mogu se pronaći S3 galop, proširene jugularne vene, hepatojugularni refleks i edemi nogu. Kompletna krvna slika, acido-bazni status i troponini u krvi uobičajene su pretrage u dijagnostici. Natriuretski peptidi i određivanje njihove koncentracije možda su i najkorisniji biomarker zatajenja srca. Mjeri se koncentracija BNP-a (eng. *brain natriuretic peptide*) i NT-proBNP-a (eng.). Ako je izmjerena koncentracija niža od 100 pg/mL, srčano zatajenje je malo vjerojatno. U dijagnostički algoritam još spadaju i 12-kanalni EKG, rendgen toraksa i UZV srca. Nalaz 12-kanalnog EKG-a gotovo nikad nije normalan prilikom zatajenja srca, a pruža bitne informacije kao što su moguće aritmije ili hipertrofija miokarda, stoga je vrlo važan u dijagnostici. Rendgen toraksa može pokazati povećani vaskularni crtež, povećanu srčanu sjenu, intersticijski i alveolarni edem, kao i neki drugi uzrok dispneje. Zbog svega nabrojanog rendgen toraksa važan je korak u dijagnostici. Možda i ključna pretraga je ultrazvuk srca. Njime se može procijeniti ejekcijska frakcija, kolor dopplerom moguće je pratiti protok krvi kroz srce i pronaći eventualne probleme sa zaliscima. Ultrazvukom se mogu utvrditi i dimenzije srca i njegovih dijelova. Zbog svih informacija koje se njime dobivaju, ultrazvuk je nezamjenjiv u dijagnostici (17). Terapijski plan ovisan je ejekcijskoj frakciji. U obzir dolazi nekoliko grupa lijekova. Diuretici se koriste za olakšavanje simptoma kongestije. Ukoliko je potrebno u terapiju uvesti još jedan lijek osim diuretika, lijek izbora je ACEi. Ukoliko pacijent ne tolerira ACEi, umjesto njega se uvodi ARB. U terapiju se mogu uvesti β -blokatori ukoliko je potrebna dodatna medikacija. Ukoliko ni kombinacija svih ovih skupina lijekova nije dovoljna, dodaje se antagonist mineralokortikoidnih receptora. Ako pacijent i dalje nema odgovarajući odgovor na terapiju, ima $EF \leq 35\%$, sinus ritam i srčanu frekvenciju ≥ 70 u minuti, u terapiju se dodaje ivabradin. U konačnici ukoliko ništa ne daje odgovarajući odgovor, može se dodati digoksin u terapiju, pokušati liječiti LVAD-om ili transplantacijom srca (18). Nažalost čak ni sve ove terapijske opcije nisu dovoljne kako bi se spriječilo progrediranje bolesti u

uznapredovali stadij kod nekih bolesnika. S obzirom na više različitih definicija uznapredovalog stadija srčanog zatajenja, različite studije imaju različite podatke o prevalenciji. Prema procjenama, od 0.2% pa sve do 25% bolesnika s kroničnim srčanim zatajenjem je u uznapredovalom stadiju bolesti, ovisno o definiciji i istraživanoj populaciji (19).

2.4. Uznappedovalo zatajenje srca

Zatajenje srca progresivna je bolest koja kod nekih bolesnika progredira da završnog stadija. Da bi se bolesnika svrstalo u završni stadij bolesti potrebno je zadovoljiti sve slijedeće kriterije:

1. teški i perzistirajući simptomi srčanog zatajenja (bolesnik uznapredovale NYHA klase 3 ili bolesnik NYHA klase 4)
2. teška kardiološka disfunkcija definirana s LVEF $\leq 30\%$ ili izolirano zatajenje desne klijetke ili neoperabilne abnormalnosti zalistaka i/ili urođene srčane mane
3. epizode plućne ili sistemske kongestije koje zahtijevaju liječenje visokim dozama intravenoznih diuretika ili epizode nezadovoljavajućeg srčanog rada koji je zahtijevao liječenje inotropima i/ili vazoaktivnim lijekovima, a uzrokovale su neplanirane hospitalizacije unatrag godinu dana
4. ograničenost i nemogućnost obavljanja fizičke aktivnosti koja uključuje potpunu nemogućnost obavljanja ikakve fizičke aktivnosti ili rezultat slabiji od 300m u standardiziranom šestominutnom testu hoda ili niska vršna potrošnja kisika niža od 12-14 mL/kg/min za koju se smatra da je kardiološkog porijekla (20).

Takvi bolesnici iscrpili su farmakološke opcije liječenja i njihova bolest postala je refraktorna na farmakološko liječenje. U ovome stadiju samo je nekoliko opcija za nastavak liječenja. Opcije su: nastavak liječenja farmakološkom suportivnom terapijom, palijativno liječenje inotropima, ugradnja mehaničke potpore cirkulaciji ili transplantacija (21). Od nabrojanih opcija najbolja je transplantacija srca, no ona ima svoja ograničenja. Najveće ograničenje je broj dostupnih organa za transplantaciju, no ukoliko se pronađe donorsko srce, a primatelj ima mali broj komorbiditeta, očekivano 1-godišnje preživljenje je između 85%-90% (22). Vrlo dobre rezultate ima i ugradnja LVAD-a kao druga najbolja opcija. Za njegovu ugradnju bolesnici moraju zadovoljiti

neke kriterije, ali općenito govoreći LVAD je puno dostupnija terapijska opcija od transplantacije. Očekivano 1-godišnje preživljenje bolesnika s ugrađenim LVAD-om više je od 80% (23). Suportivno i palijativno liječenje očekivano ima puno manju stopu 1-godišnjeg preživljenja koja se kreće od 11% do 25% (24,25).

3. Mehanička potpora cirkulaciji

3.1. Povijest mehaničke potpore cirkulaciji

Moderno doba kardioloških operacija započelo je 1953. godine, tada je dr. Gibbon izveo prvu operaciju koristeći kardiopulmonalni bajpas (CPB). Operirao je atrijski septalni defekt (26). 1963. godine dr. Liotta i njegov tim u Houstonu prvi su prijavili upotrebu umjetnog ventrikula u liječenju pacijenta s kardiogenim šokom nakon operacije aortnog zaliska. Uređaj je bio intratorakalni i pružao je potporu pacijentovu srcu 4 dana do njegove smrti (27). Prva upotreba LVAD-a bila je 1966. godine kada je dr. DeBakey upotrijebio prvi pneumatski LVAD za pomoć pacijentu nakon operacije srca. LVAD je osiguravao protok od 1200 mL/min, a pacijentovim oporavkom i postupnim smanjivanjem protoka LVAD-a uspjeli su postići oporavak i uklanjanje LVAD-a 10. dan nakon operacije. Pacijent je otpušten u dobrom kliničkom stanju (28). Nakon prve transplantacije srca 1967. godine, MCS se počinje razmatrati kao opcija liječenja pacijenata koji čekaju transplantaciju (BTT), a ne samo kao metoda za oporavak srca (BTR) (26). Krajem 1970-ih ulažu se veliki naporni u razvitak tehnologije MCS. Napori su rezultirali razvojem potpuno umjetnog srca (TAH, eng. *total artificial heart*). TAH je prvi puta ugradio dr. DeVries 1982. godine na Sveučilištu u Utahu. Pacijent je preživio 112 dana (29). Iako su postojala velika očekivanja od TAH-a i njegove moguće dugotrajne primjene, pokazalo se da postoji visoka incidencija infekcija, tromboze TAH-a i moždanog udara. To je bio poticaj za razvoj što jednostavnijih uređaja kojima je cilj bio smanjiti incidenciju neželjenih nuspojava. Istraživanja su rezultirala razvojem novih uređaja koje možemo podijeliti u 3 generacije (26).

3.2. Generacije LVAD uređaja

MCS uređaji po dizajnu se dijele na uređaje s pulsirajućim protokom i uređaje s kontinuiranim protokom. Pumpe mogu biti smještene izvan tijela ili unutar tijela. Njihova primjena može biti kraća, do nekoliko dana ili tjedana, ili duža, tijekom nekoliko mjeseci do godina. Uređaji mogu pomagati rad jedne ili obje klijetke (26).

VAD uređaji prve generacije u svojoj osnovi pokušali su imitirati rad srca. Koristili su pulsirajući protok krvi i mogli su biti pogonjeni pneumatski ili električno. Radili su na način da su uz pomoć jednostranih ventila osiguravali istiskivanje zadanog volumena krvi u cirkulaciju. Uređaji su mogli biti izvantjelesni ili su mogli biti implantirani unutar toraksa. Imali su puno pomičnih dijelova koji su povećavali kompleksnost uređaja i samim time bili su podložni kvarovima. Velik broj pomičnih dijelova rezultirao je i velikim brojem neželjenih nuspojava zbog čega su uređaje prve generacije zamijenili uređaji druge i treće generacije.

VAD uređaji druge generacije po dizajnu nisu pokušavali imitirati fiziološke uvjete već su koristili kontinuirani aksijalni protok. Koristili su rotirajuću pumpu koja je pomoću jednog ležaja bila u kontaktu s pogonom. Rotor pumpe jedini je pokretni dio uređaja što je znatno smanjilo kompleksnost. Smanjenje kompleksnosti rezultiralo je manjom stopom mehaničkih kvarova, ali neželjene nuspojave što se tiče cirkulacije ostale su nepromijenjene zato što je i dalje postojao kontakt krvi i ležaja. Ovi uređaji kao i uređaji prve generacije mogli su biti izvantjelesni ili unutartjelesni.

VAD uređaji treće generacije uklonili su problem kontakta krvi i ležaja primjenom magnetske levitacije. Rotor je magnetskim silama levitiran u komori i pogonjen je bez kontakta s ležajem. To je rezultiralo manjom incidencijom neželjenih nuspojava poput hemolize i tromboze. Uređaji mogu imati aksijalni ili centrifugalni protok, ovisno o dizajnu impelera. Razlika između aksijalnog i centrifugalnog protoka je u načinu na koji lopatice impelera pokreću krv. Uređaji mogu stvarati i umjetne pulsacije promjenom brzine impelera, što za rezultat ima sprječavanje staze krvi unutar nekog dijela uređaja. Indikacije za primjenu uređaja treće generacije ostale su u osnovi iste kao i indikacije za primjenu uređaja druge generacije. U tablici 1 navedeni su najčešće korišteni LVAD uređaji kroz različite generacije i njihove karakteristike.

Tablica 1. Najčešće korišteni LVAD uređaji i njihove karakteristike. Modificirano prema *State of the Art Review: Evolution and Ongoing Challenges of Left Ventricular Assist Device Therapy*

| LVAD model | HeartMate II | HVAD | Jarvik 2000 | HeartMate III | MVAD |
|--------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| Mjesto ugradnje | Prsni koš ili abdomen | Perikard | Perikard | Perikard | Perikard |
| Vrsta protoka | Aksijalni | Centrifugalni | Aksijalni | Centrifugalni | Aksijalni |
| Ovjes impelera | Mehanički ležaj | Hibridni magnetno-hidrodinamični | Keramički ležaj | Magnetski levitiran | Magnetski levitiran |
| Težina | 281g | 160g | 90g | 220g | 78g |
| Maksimalni protok | 10L/min | 10L/min | 7L/min | 10L/min | 7L/min |
| Umjetna pulsacija | Ne | Ne | Da | Da | Da |

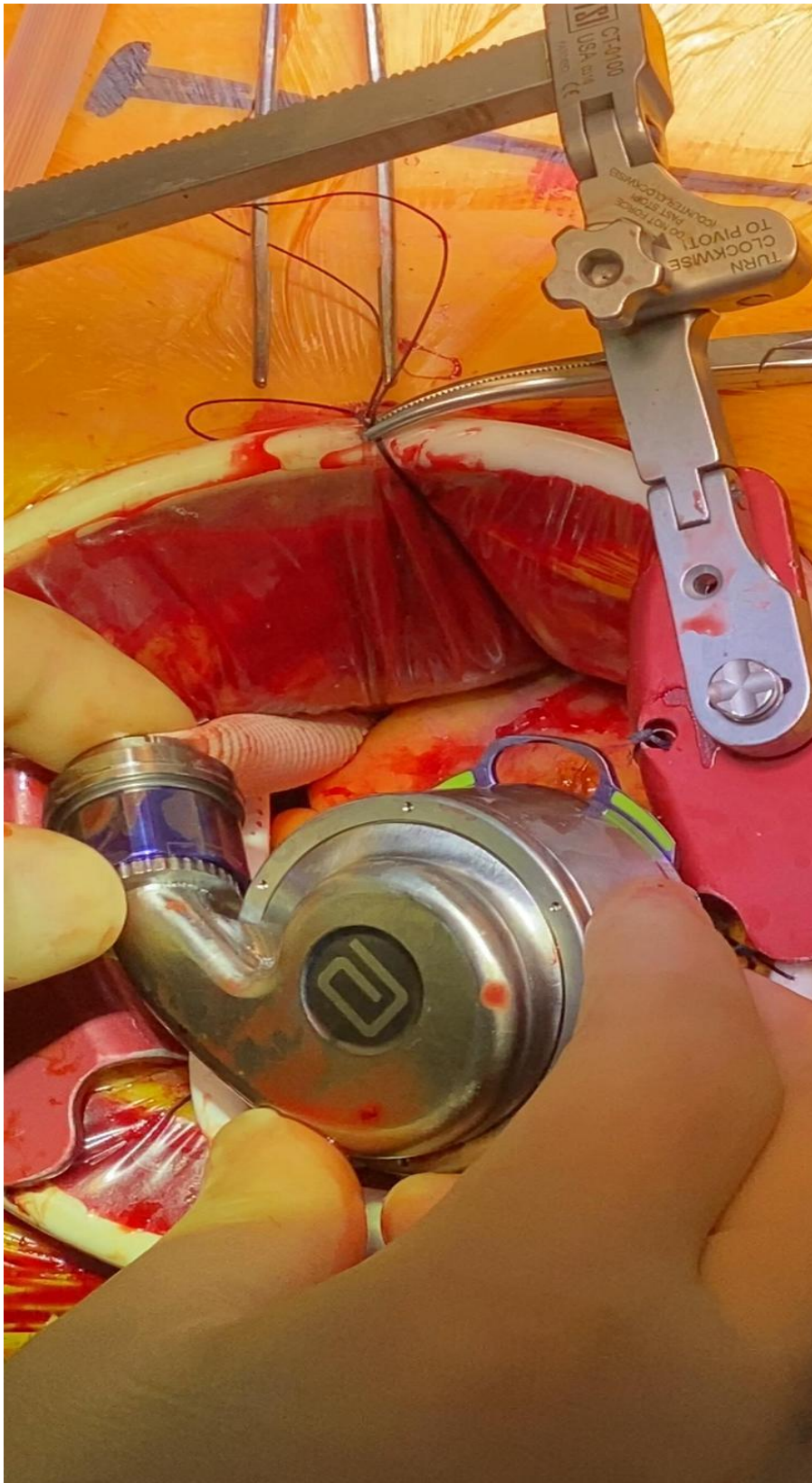
3.3. LVAD indikacije i rezultati liječenja

Indikacije za upotrebu LVAD-a su:

- BTT - Premoštenje do transplantacije (eng. *bridge to transplantation*),
- DT - Odredišna terapija (eng. *destination therapy*),
- BTC - Premoštenje do kandidature (eng. *bridge to candidacy*) ili
- BTR – Premoštenje do oporavka (eng. *bridge to recovery*).

Indikacije se mogu preklapati zato što je rezultat liječenja nepredvidiv i pacijent može tijekom liječenja promijeniti svoju indikaciju. Na primjer, pacijenti koji su u lošem stanju mogu se nakon primjene LVAD-a dovoljno oporaviti kako bi bili stavljeni na listu za transplantaciju, ali nažalost moguća je i obrnuta situacija u kojoj pacijent liječen LVAD-om po BTT indikaciji razvije komplikacije zbog kojih transplantacija više nije moguća. Teuteberg et al. u svojem su radu pokazali da nakon 2 godine liječenja LVAD-om 43.5% BTT pacijenata više nije na listi za transplantaciju, ali je i 29.3% BTC pacijenata stavljeno na listu za transplantaciju (30). Najčešća indikacija za LVAD je BTT s ukupno 53.5% svih indikacija za LVAD 2014. godine (31). Istraživanja pokazuju da LVAD osim što podiže kvalitetu života, doprinosi i većem preživljenju (23,26). Zbog manjka dostupnih organa za transplantaciju, velik je postotak bolesnika s DT indikacijom. Ta indikacija je 2014. godine činila skoro 46% ukupnih indikacija za LVAD (31). Pod tom indikacijom liječe se bolesnici koji ne zadovoljavaju uvjete za transplantaciju zbog nekog komorbiditeta. BTC indikacija je za bolesnike koji trenutno ne zadovoljavaju uvjete za stavljanje na listu za transplantaciju, ali korištenjem LVAD-a očekuje se da bi u budućnosti mogli biti stavljeni na listu zbog smanjenja komorbiditeta (32). Zadnja indikacija je BTR, to je indikacija za pacijente za koje se smatra da bi kratkotrajno liječenje LVAD-om bilo dovoljno za oporavak funkcije srca u toj mjeri da bi se LVAD mogao ukloniti. Takvo liječenje je korisno jer pacijent se oporavlja, a ne koristi se donorsko srce. Danas ne postoji pouzdana metoda kojom bi se unaprijed moglo procijeniti kako će pacijent reagirati na liječenje LVAD-om i sukladno tome hoće li mu liječenje LVAD-om biti dostatno za oporavak i bez transplantacije srca (33). Korištenjem uređaja treće generacije, stope preživljenja nakon jedne, odnosno nakon dvije godine od ugradnje LVAD-a su: 80%, odnosno 70% (31). Treća generacija

LVAD-a je tehnički naprednija u odnosu na prethodne i rezultat toga je manja stopa reoperacija zbog kvara uređaja. Uređaji s centrifugalnim protokom zbog svog dizajna imaju puno manje stope tromboze pumpe u odnosu na druge uređaje, ali stope ostalih komplikacija poput: zatajenja desnog srca, moždanog udara, infekcija i krvarenja približno su jednake uređajima s aksijalnim protokom (34,35). Slika 1 prikazuje LVAD treće generacije, HeartMate III, prilikom implantacije.



Slika 1. LVAD uređaj HeartMate III prilikom implantacije. Ustupljeno od associated professor Igor Gosev MD Ph.D., University of Rochester Department of Cardiac Surgery

4. Mikro RNA (miRNA)

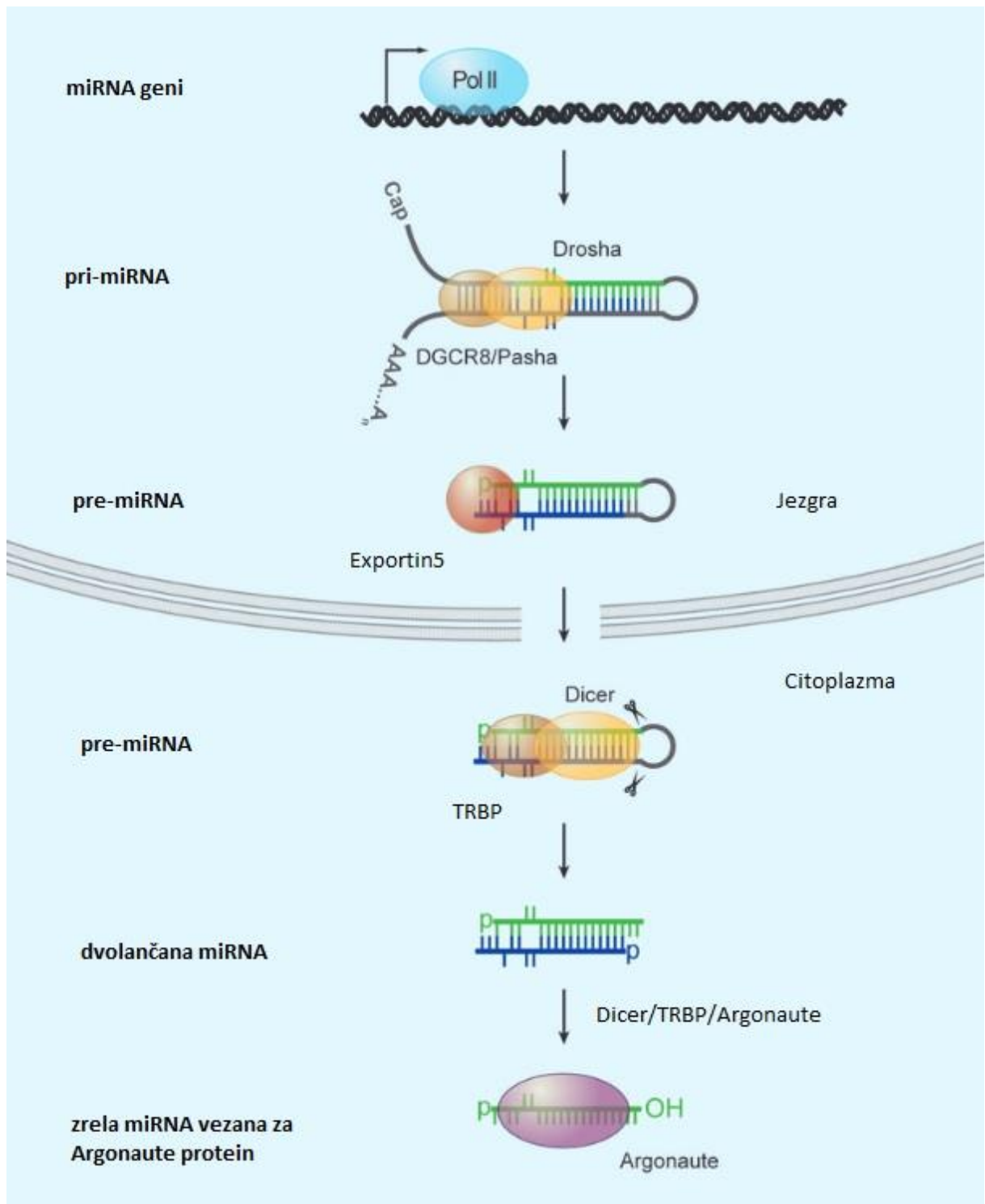
4.1. Značaj miRNA

Mikro RNA su jednolančane nekodirajuće RNA molekule građene od 22-23 nukleotida koje posreduju posttranslacijsku regulaciju gena, na način da se vežu za 3' kraj mRNA te negativno djeluju na ekspresiju mRNA. To postižu inhibicijom translacije ili degradacijom mRNA. Važnost miRNA leži u tome što mogu ciljano djelovati na stotine različitih gena koji su uključeni u regulaciju ponekad i cjelokupnih organskih sustava (8). Otkriće da u krvi nalazimo cirkulirajuće miRNA koje su stabilne i relativno lako ih se može detektirati, te da se njihova ekspresija mijenja u različitim bolestima, čini miRNA pogodnima za njihovo korištenje kao biomarkera ili za ciljano terapijsko djelovanje (9). Do sada se njihova primjena najviše proučavala u onkološkim bolestima, ali u zadnje vrijeme provode se brojna istraživanja u različitim područjima, pa tako i u kardiološkim bolestima. U istraživanjima zatajenja srca, između ostalog, utvrđuje se ekspresija miRNA, promjene u ekspresiji tijekom vremena i nastoji se utvrditi koje su miRNA prisutne u dobrom odgovoru na terapiju, kako primijeniti naučeno i postoji li možda neki način kako predvidjeti koji pacijenti će na LVAD dobro reagirati, te kako spriječiti loš odgovor na liječenje LVAD-om nekih pacijenata.

4.2. Sinteza miRNA

Mikro RNA molekule nastaju iz prekursorskih molekula. Sinteza počinje u jezgri transkripcijom primarne miRNA (pri-miRNA), pri-miRNA može nastati transkripcijom zasebnih miRNA gena ili može nastati iz dijelova introna protein-kodirajućih transkripata RNA polimeraze II. Jedna pri-miRNA često sadrži uputu za više miRNA molekula, a duga je nekoliko tisuća nukleotida. Pri-miRNA se savija u strukturu nalik na ukosnicu te se povezuje s multiproteinskim kompleksom koji se naziva Mikroprocesor, a čija je zadaća iz pri-miRNA dobiti sekundarni prekursor miRNA (pre-miRNA). Mikroprocesor se u sisavaca sastoji od RNA nukleazi nalik proteinu Drosha i kofaktora DGCR8 (eng. *DiGeorge critical region 8*). Drosha-DGCR8 kompleks izrezuje pri-miRNA na ≈ 70 nukleotida dugačku pre-miRNA, koja također ima strukturu nalik na

ukosnicu. Osim ovog, postoji i alternativni put nastanka pre-miRNA koji ne uključuje Mikroprocesorski kompleks, već pre-miRNA nastaje prekrajanjem iz introna koji su nazvani Mirtroni. Nastala pre-miRNA transportira se iz jezgre u citoplazmu preko proteina Exportin5. U citoplazmi iz pre-miRNA nastaje dvolančana miRNA veličine ≈ 20 parova baza. To nastaje djelovanjem RNAza III endonukleaze imena Dicer koji u kompleksu s TRBP (eng. *TAR RNA binding protein*) izrezuje pre-miRNA. Jedan lanac te dvolančane miRNA postaje zrela miRNA, dok drugi propada. Zrela miRNA se nakon toga ugrađuje u mikro-ribonukleoprotein komplekse (miRNP) ili u miRNA-inducirani utišavajući kompleks (miRISC, eng. *miRNA-induced silencing complex*). Ključna komponenta miRNP-a su Argonaute (AGO) proteini. Kod sisavaca postoje 4 grupe AGO proteina koje označavamo s AGO1-AGO4, a samo AGO2 protein ima sposobnost rascjepa molekula, dok ostali AGO proteini ometaju i inhibiraju translaciju. U miRNP kompleksu miRNA je zaslužna za vezanje s ciljanim mRNA molekulama, a AGO proteini su odgovorni za razgradnju, inhibiciju ili destabilizaciju ciljane mRNA molekule. Treba još napomenuti da interakcija između miRNA i mRNA u sisavaca ne zahtijeva potpunu podudarnost u parovima baza i gotovo nikada ni nisu u cjelosti komplementarne (36–38). Na slici 2 grafički je prikazana ovdje opisana sinteza miRNA.



Slika 2. Sinteza miRNA. Modificirano prema Bushati N. i Cohen S. (36)

4.3. miRNA u zatajenju srca

Otkrivene su brojne miRNA molekule koje su važni regulatori u nekoliko faza srčanog razvoja i potrebne su za normalan razvoj srca (39). Njihova važnost prvi je puta demonstrirana u miševa modifikacijom Dicer proteina koja je rezultirala ranom embrionalnom smrću (40). Nastavno na to istraživanje, modifikacija u Dicer proteinu koja je specifična za srce, neposredno nakon embrionalnog razvoja srca rezultirala je srčanim malformacijama, srčanim zatajenjem i u konačnici smrću miševa (41,42). Dokazano je i da delecija Dicer proteina u postnatalnom miokardu rezultira pregradnjom srca, povećanom veličinom pretkljetki i ranom smrtnošću (43). Ova istraživanja potaknula su brojna druga koja su za cilj imala pronaći miRNA molekule uključene u različite faze razvoja srca. Istraživanja su pronašla brojne miRNA uključene u patološke mehanizme koji vode prema srčanom zatajenju (44). Pronađeno je da u odgovoru na progresiju srčanog zatajenja, ekspresija miRNA varira i da je specifična za određen stadij zatajenja. Promjenom stadija mijenja se i ekspresija i to tako da promjenom stadija određena miRNA može postati više ili manje eksprimirana (39,45). Ova istraživanja upućuju na veliku važnost i ulogu miRNA molekula u srčanom zatajenju (39).

4.4. Cirkulirajuće miRNA povezane sa zatajenjem srca

2008. godine po prvi puta su pronađene cirkulirajuće miRNA molekule u krvotoku. Cirkulirajuće miRNA su stabilne molekule i podnose laboratorijske uvjete (39). Brojna istraživanja istaknula su određene miRNA kao važne u srčanom zatajenju. Razlikuju se promjene u ekspresiji miRNA kod akutnog i kod kroničnog srčanog zatajenja. U tablici 2 navedene su cirkulirajuće miRNA i opažene promjene u njihovoj ekspresiji kod akutnog zatajenja srca u odnosu na kontrole (46–49).

Tablica 2. *Cirkulirajuće miRNA i promjene u njihovoj ekspresiji u akutnom zatajenju srca*

| Cirkulirajuće miRNA | Promjena u ekspresiji | Literatura |
|----------------------------|------------------------------|-------------------|
| miR-18a-5p | Smanjena | (49) |
| miR-26b-5p | Smanjena | (49) |
| miR-27a-3p | Smanjena | (49) |
| miR-30b | Smanjena | (47) |
| miR-30e-5p | Smanjena | (49) |
| miR-103 | Smanjena | (47) |
| miR-106a-5p | Smanjena | (49) |
| miR-142-3p | Smanjena | (47) |
| miR-199a-3p | Smanjena | (49) |
| miR-342-3p | Smanjena | (47) |
| miR-423-5p | Povećana | (57) |
| miR-499 | Povećana | (48) |
| miR-652-3p | Smanjena | (49) |

U tablici 3 navedene su cirkulirajuće miRNA i opažene promjene u njihovoj ekspresiji kod kroničnog zatajenja srca u odnosu na kontrole (50–55).

Tablica 3. Cirkulirajuće miRNA i promjene u njihovoj ekspresiji u kroničnom zatajenju srca

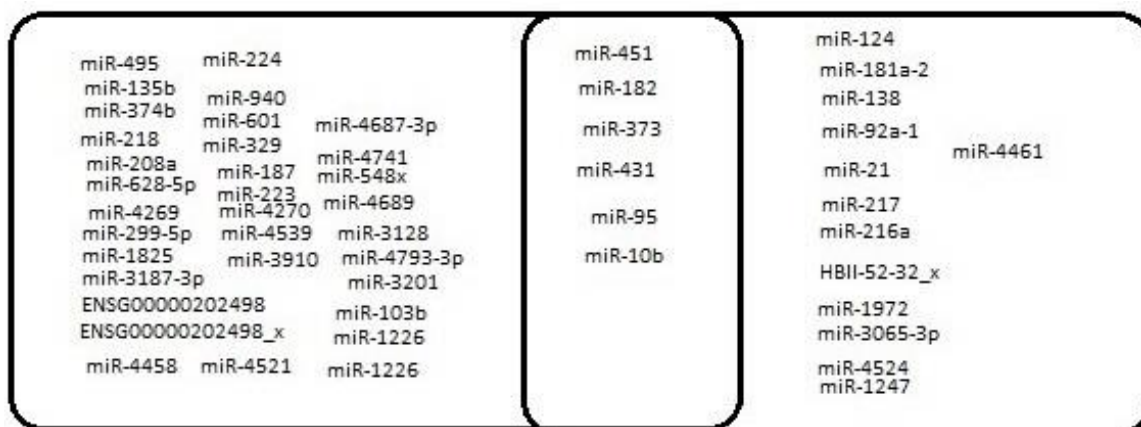
| Cirkulirajuće miRNA | Promjena u ekspresiji | Literatura |
|---------------------|-----------------------|------------|
| miR-22 | Povećana | (51) |
| miR-30c | Smanjena | (54) |
| miR-92b | Povećana | (51) |
| miR-107 | Smanjena | (52) |
| miR-139 | Smanjena | (52) |
| miR-142-5p | Smanjena | (52) |
| miR-146a | Smanjena | (54) |
| miR-183-3p | Smanjena | (55) |
| miR-190a | Smanjena | (55) |
| miR-193b-3p | Smanjena | (55) |
| miR-193b-5p | Smanjena | (55) |
| miR-203 | Smanjena | (50) |
| miR-210 | Povećana | (50) |
| miR-211-5p | Smanjena | (55) |
| miR-221 | Smanjena | (54) |
| miR-320a | Povećana | (51) |
| miR-328 | Smanjena | (54) |
| miR-375 | Smanjena | (54) |
| miR-423-5p | Povećana | (51) |
| miR-494 | Smanjena | (55) |
| miR-520d-5p | Povećana | (53) |
| miR-558 | Smanjena | (53) |
| miR-671-5p | Povećana | (55) |
| miR-1180 | Povećana | (50) |
| miR-1233 | Povećana | (55) |
| miR-1908 | Povećana | (50) |

4.5. miRNA i mehanička potpora lijevog srca

Spoznajom da se u različitim fazama zatajenja srca mijenja ekspresija pojedinih miRNA, počela su se raditi istraživanja u kojima su se pratile promjene miRNA u krvi kod odgovora na liječenje. LVAD kao jedna od metoda liječenja zatajenja srca također je postao fokusom takvih istraživanja. Ovakva istraživanja rade se unazad 10 godina. U njima su pronađene razne miRNA koje su mijenjale svoju ekspresiju prije, tijekom i nakon liječenja LVAD-om.

4.5.1. miRNA u tkivu miokarda

Parikh M. i suradnici u svojem su istraživanju pronašli 39 miRNA koje imaju različitu ekspresiju u lijevom ventrikulu (LV) bolesnog srca u odnosu na zdravo, te su za njih pretpostavili da su uključene u patološki odgovor. Od njih 39, za 21 (54%) nakon liječenja LVAD-om smanjila se ekspresija u odnosu na bolesnike koje nisu liječeni LVAD-om (Tablica 4). Pronašli su i 19 miRNA s različitom ekspresijom u desnom ventrikulu (DV) bolesnog srca u odnosu na zdravo. Od njih 19, za 5 (26%) nakon liječenja LVAD-om smanjila se ekspresija u odnosu na bolesnike koji nisu liječeni LVAD-om (Tablica 5). U usporedbi bolesnika liječenih LVAD-om i bolesnika koji nisu njime liječeni, pronađeno je da većina patoloških miRNA nije normalizirala svoju ekspresiju nakon liječenja LVAD-om. Samo 4 miRNA su nakon liječenja LVAD-om normalizirale svoju ekspresiju, a to su miR-4458, miR-21, miR-1972 i miR-4461. Njihovo istraživanje zaključilo je da liječenje LVAD-om pomaže u relativnom normaliziranju ekspresije patoloških miRNA, a za neke miRNA moguće je čak i potpuno normaliziranje ekspresije (56). Slika 3 prikazuje patološke miRNA koje su Parikh M. i suradnici pronašli u tkivu lijevog ventrikula (LV) i tkivu desnog ventrikula (DV) dilatiranih srca. U presjeku dva okvira nalaze se miRNA pronađene u tkivima oba ventrikula.



Patološke miRNA u LV

Patološke miRNA u DV

Slika 3. Patološke miRNA koje su Parikh M. i suradnici (56) pronašli u tkivima dilatiranih srca. LV- lijevi ventrikul, DV- desni ventrikul

Tablica 4. Popis miRNA koje su smanjile svoju ekspresiju u tkivu LV u bolesnika liječenih LVAD-om u odnosu na bolesnike koji nisu liječeni LVAD-om (56)

| | | | | |
|-------------|------------|-------------------|-----------------|---------|
| miR-182 | miR-299-5p | miR-4687-3p | miR-374b | miR-601 |
| miR-451 | miR-4539 | ENSG00000202498_x | ENSG00000202498 | |
| miR-3187-3p | miR-628-5p | miR-223 | miR-4689 | |
| miR-548x | miR-1226 | miR-10b | miR-1825 | |
| miR-4270 | miR-940 | miR-4741 | miR-3910 | |

Tablica 5. Popis miRNA koje su smanjile svoju ekspresiju u tkivu DV u bolesnika liječenih LVAD-om u odnosu na bolesnike koji nisu liječeni LVAD-om (56)

| |
|--------------|
| miR-182 |
| miR-451 |
| HBII-52-32_x |
| miR-181a-2 |
| miR-10b |

Schipper M. i suradnici su u svom istraživanju na tkivu miokarda pratili ekspresiju miR-1, miR-133a, miR-133b i miR-208. Pokazali su da se ekspresija miR-1, miR-133a i miR-133b u zatajenju srca snižava, ali da korištenje LVAD-a kod pacijenata koji imaju ishemijski uzrok zatajenja srca podiže ekspresiju tih miRNA. Porast ni nakon više od godinu dana korištenja LVAD-a ne dostiže vrijednosti koje nalazimo u zdravom srcu. Zanimljivo je da kod pacijenata s neishemijskim uzrokom zatajenja srca postoji tendencija daljnjeg snižavanja ekspresije tih molekula kod korištenja LVAD-a. Ekspresija miR-208 bila je preniska za statističku analizu (57).

4.5.2. miRNA u plazmi

Lok S. i suradnici u svojem su istraživanju testirali postoji li statistički značajna promjena u ekspresiji miRNA u plazmi kod LVAD-a s pulsirajućim protokom u odnosu na LVAD s kontinuiranim protokom krvi. U svojem su istraživanju zaključili da korištenjem LVAD-a kod pacijenata dolazi do promjene u ekspresiji miRNA u plazmi (tablica 6), ali da ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije miRNA ovisno o protoku koji LVAD stvara (5).

Tablica 6. Plazmatske miRNA molekule sa zapaženom promjenom u ekspresiji prilikom korištenja LVAD-a prema Lok. S i suradnici (5)

| |
|------------|
| miR-let-7i |
| miR-21 |
| miR-378 |
| miR-378 |
| miR-137 |

Adhikari N. i suradnici u svojem su radu pokazali da je ekspresija miR-16 u završnom stadiju zatajenja srca snižena, a korištenjem LVAD-a u liječenju nakon 7 dana ekspresija miR-16 je povećana (58).

Wang T. i suradnici u svojem su istraživanju pokazali da je ekspresija miR-155 povećana nakon korištenja LVAD-a. U svojem su istraživanju odlučili pratiti ekspresiju 23 od prije poznate miRNA uključene u patofiziologiju srčanog zatajenja (Tablica 7). Mjerili su ekspresije kod 40 pacijenata prije i nakon prosječno 96.5 dana od implantacije LVAD-a. Za sve miRNA osim miR-155 nisu pronašli statistički značajnu promjenu u ekspresiji. miR-155 u organizmu je uključena u upalne procese i u proces neovaskularizacije (59).

Tablica 7. Popis miRNA koje su Wang T. i suradnici analizirali u istraživanju (59)

| | | | | |
|-----------|-----------|------------|------------|-----------|
| miRNA-1 | miRNA-24 | miRNA-103 | miRNA-155 | miRNA-320 |
| miRNA-10a | miRNA-27a | miRNA-126 | miRNA-159a | miRNA-423 |
| miRNA-15b | miRNA-27b | miRNA-133a | miRNA-195 | miRNA-872 |
| miRNA-16 | miRNA-29a | miRNA-146a | miRNA-221 | |
| miRNA-21 | miRNA-92a | miRNA-146b | miRNA-222 | |

Dlouha D. i suradnici pokazali su da korištenjem LVAD-a ekspresija miR-126 i miR-146a raste. Oni su također u istraživanju odlučili mjeriti ekspresiju od prije poznatih miRNA osjetljivih na protok krvi (Tablica 8). Nakon ugradnje LVAD-a, mjerila se ekspresija svaka 3 mjeseca, do godinu dana od ugradnje. Mjerenja su pokazala statistički značajan porast miR-126 i miR-146a nakon ugradnje LVAD-a (60).

Tablica 8. Popis miRNA koje su Dlouha D. i suradnici analizirali u istraživanju (60)

| | | | | |
|---------|---------|----------|----------|----------|
| miR-10a | miR-21 | miR-146a | miR-155 | miR-663b |
| miR-10b | miR-126 | miR-146b | miR-663a | |

Lok S. i suradnici mjerili su razinu alfa-1-antikimotripsina tijekom liječenja LVAD-om i zaključili su da je smanjenje alfa-1-antikimotripsina direktno rezultat povećane ekspresije miR-137 tijekom liječenja LVAD-om (61).

Na kraju treba još istaknuti da je istraživanje u ovom području zapravo tek u svojim počecima. Nema jasnog kriterija koje miRNA molekule ulaze u istraživanje, istraživanja se provode na relativno malom broju pacijenata, ne postoji jedinstven protokol po kojem bi se radila ovakva istraživanja, biološki materijali koji se obrađuju jako variraju i mogu imati različite ekspresije unutar istog organizma. Zbog svega nabrojanog potrebno je raditi na unificiranju protokola kako bi se rezultati u budućnosti mogli lakše uspoređivati (39).

4.6. Uloga miRNA sa zapaženom promjenom u ekspresiji prilikom korištenja LVAD-a

Gore navedena istraživanja ekspresije miRNA kod primjene LVAD-a istaknula su određene miRNA koje zajedno s njihovim ulogama u organizmu nalazimo u tablici 6.

Tablica 6. miRNA i njihove uloge u organizmu

| miRNA | Uloga u organizmu | Literatura |
|-----------------|---|------------|
| miR-4458 | Inhibira proliferaciju stanica i potiče apoptozu u stanicama raka dojke i hemangioma. U srcu djeluje kao negativni modulator srčane hipertrofije. | (56) |
| miR-21 | Nije sa sigurnošću utvrđeno potiče li ili inhibira hipertrofiju kardiomiocita jer su radovi nesuglasni oko toga. | (56) |
| miR-1972 | Nije još istražena uloga u kardiovaskularnim bolestima. | (56) |
| miR-4461 | Nije još istražena uloga u kardiovaskularnim bolestima. | (56) |
| miR-16 | Jedna je od najzastupljenijih miRNA u cirkulaciji, nalazimo je u svim cirkulirajućim stanicama u krvotoku. | (58) |
| miR-155 | Ima važnu ulogu u upalnom odgovoru i arteriogenezi. | (59) |
| miR-126 | Regulira vaskularni integritet, angiogenezu i upalni odgovor. Jako je zastupljena u trombocitima. | (60) |
| miR-146a | Regulira upalni i imunološki odgovor. | (60) |
| miR-137 | Ima direktan utjecaj na razinu alfa-1-antikimotripsina. | (61) |
| miR-1 | Ima ulogu u hiperplaziji kardiomiocita. | (57) |
| miR-133a | Ima ulogu u hipertrofiji kardiomiocita. | (57) |
| miR-133b | Ima ulogu u hipertrofiji kardiomiocita. | (57) |

4.7. Uloga miRNA kao biomarkera

Iako je istraživanje miRNA relativno novo područje koje se istražuje, rezultati nekih istraživanja daju naslutiti da bi u budućnosti mogli koristiti miRNA kao biomarkere. Tijssen A. i suradnici u svojem istraživanju su pronašli da ekspresija miR-423-5p može razlučiti pacijente sa srčanim zatajenjem koje uzrokuje dispneju od pacijenata s drugim uzrokom dispneje (62). Qiang L. i suradnici su povezali niske razine miR-126 s kardiovaskularnom smrću kod pacijenata s ishemičnim zatajenjem srca, a visoke razine miR-508a-5p s kardiovaskularnom smrću kod pacijenata s neishemičnim zatajenjem srca (63). Morley-Smit A. i suradnici su pokazali da razina miR-1202 prije implantacije LVAD-a može razlučiti one pacijente koji će na njega dobro reagirati, od onih koji će loše reagirati na LVAD (64). Istraživanja koja idu u smjeru korištenja miRNA kao biomarkera su u svojim najranijim počecima, iako pokazuju potencijal korištenja miRNA kao biomarkera, potrebno je još dosta vremena i istraživanja prije nego li se započne s tom namjenom u kliničkim uvjetima (39).

5. Zaključak

Kardiovaskularne bolesti velik su javnozdravstveni problem, a zbog modernog načina života i starenja populacije, očekuje se daljnji porast kardiovaskularnih bolesti u budućnosti. Ulažu se veliki naponi u njihovo liječenje i razvijaju se različiti modaliteti liječenja. Nažalost, bolest je najčešće progresivnog karaktera i u nekih bolesnika dovodi do zatajenja srca. Zatajenje srca je klinički sindrom obilježen različitim simptomima, a u liječenju se provode modaliteti koji uglavnom uključuju farmakoterapiju. Nažalost i uz farmakoterapiju bolest može progredirati do te mjere da je potrebna transplantacija srca. Pošto organa za transplantaciju ima mali i ograničen broj, razvila se mehanička potpora cirkulaciji koja ima svoje prednosti ali i mane. LVAD je najkorišteniji oblik mehaničke potpore cirkulaciji i kroz svoje 3 generacije razvoja dosegao je današnju razinu. LVAD se koristi u 4 indikacije i u upotrebi je više od pola stoljeća. Otkrićem miRNA započelo je njihovo istraživanje i traženje mogućih primjena. U početku je istraživanje bilo usmjereno na maligne bolesti, ali danas postoje istraživanja u brojnim područjima, pa tako i u kardiovaskularnim bolestima. Pronađene su brojne miRNA koje mijenjaju svoju ekspresiju u različitim fazama srčanog zatajenja, pronadene su i one miRNA koje mijenjaju svoju ekspresiju ovisno o načinu na koji se zatajenje liječi. Istraživanjima je pronađeno i da korištenje LVAD-a uzrokuje promjenu u ekspresiji miRNA. Daljnjim istraživanjima potrebno je razumjeti patofiziološki mehanizam njihove interakcije u odgovoru na liječenje srčanog zatajenja s ciljem boljih ishoda liječenja u budućnosti. Pomalo su intrigantni rezultati koji ukazuju na velik potencijal miRNA u budućnosti. Nazire se da bi u budućnosti određene molekule miRNA mogle biti korištene kao biomarkeri i to kao biomarkeri u odgovoru na liječenje, biomarkeri u odluci za započinjanje nekog terapijskog modula kao što je korištenje LVAD-a ali i biomarkeri koji bi mogli ukazivati na razvoj bolesti prije nego li dođe do razvoja simptoma ili daljnje progresije. Možda u nekoj daljnjoj budućnosti dođe i do razvoja nekih lijekova koji bi iskorištavali principe interakcije miRNA u organizmu kako bi utjecali na patofiziološke mehanizme. Ali da bi došlo do bilo koje od ovih potencijalnih primjena, potrebno je još dosta istraživanja i stjecanja novih spoznaja

kako bi se moglo započeti s upotrebom u klinici. Trenutno su istraživanja u ovom području u samim začetcima, ali ono što se iz njih nazire, zasigurno ulijeva veliku nadu u budućnost.

6. Zahvale

Želim zahvaliti svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Frani Paiću na pomoći i savjetovanju u izradi ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom ovih 6 godina studija. Hvala im na svemu što su mi omogućili i napravili kako bi mi studij protekao što lakše i sretnije.

Hvala mojim kolegama s kojima sam stjecao nova iskustva tijekom studija i koji su ga znatno olakšali i učinili ljepšim. Posebno hvala mojim prijateljima Lei, Heleni, Viktoriji, Romani, Marjanu, Sandru, Bruni, Janu, Mateju i Ivanu.

I za kraj htio bi zahvaliti djevojci Jani na neizmjerne podršci, pomoći i razumijevanju tijekom našeg studija.

7. Literatura

1. Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Correa Da Rosa J, et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(30):11151–11156.
2. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina. IV*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
3. Molina EJ, Shah P, Kiernan MS, Cornwell WK, Copeland H, Takeda K, et al. The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2020 Annual Report. *Ann Thorac Surg*. 2021;111(3):778–792.
4. Nguyen DQ, Thourani VH. Third-Generation Continuous Flow Left Ventricular Assist Devices. *Innovations: Technology and Techniques in Cardiothoracic and Vascular Surgery*. 2010;5(4):250–258.
5. Lok SI, de Jonge N, van Kuik J, van Geffen AJP, Huibers MMH, van der Weide P, et al. MicroRNA Expression in Myocardial Tissue and Plasma of Patients with End-Stage Heart Failure during LVAD Support: Comparison of Continuous and Pulsatile Devices. *PLoS One*. 2015;10(10):e0136404.
6. Jakovljevic DG, Yacoub MH, Schueler S, MacGowan GA, Velicki L, Seferovic PM, et al. Left Ventricular Assist Device as a Bridge to Recovery for Patients With Advanced Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(15):1924–1933.
7. Rayner KJ. MicroRNA-155 in the Heart. *Circulation*. 2015;131(18):1533–1535.
8. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004;116(2):281–297.
9. Di Stefano V, Zaccagnini G, Capogrossi MC, Martelli F. microRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 2011;55(4):111–118.
10. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599–3726.

11. Savarese G, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano GMC, Coats AJS. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovasc Res.* 2023;118(17):3272–3287.
12. Severino P, D’Amato A, Pucci M, Infusino F, Adamo F, Birtolo LI, et al. Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8118.
13. Atwood J. Management of Acute Coronary Syndrome. *Emerg Med Clin North Am.* 2022;40(4):693–706.
14. Pasqualucci D, Iacovoni A, Palmieri V, De Maria R, Iacoviello M, Battistoni I, et al. Epidemiology of cardiomyopathies: essential context knowledge for a tailored clinical work-up. *Eur J Prev Cardiol.* 2022;29(8):1190-1199.
15. Lam CSP, Solomon SD. Classification of Heart Failure According to Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2021;77(25):3217–3225.
16. Bennett JA, Riegel B, Bittner V, Nichols J. Validity and reliability of the NYHA classes for measuring research outcomes in patients with cardiac disease. *Heart & Lung.* 2002;31(4):262–270.
17. Hunter BR, Martindale J, Abdel-Hafez O, Pang PS. Approach to Acute Heart Failure in the Emergency Department. *Prog Cardiovasc Dis.* 2017;60(2):178–186.
18. Mazurek JA, Jessup M. Understanding Heart Failure. *Card Electrophysiol Clin.* 2015;7(4):557–575.
19. Chaudhry SP, Stewart GC. Advanced Heart Failure. *Heart Fail Clin.* 2016 Jul;12(3):323–333.
20. Crespo-Leiro MG, Metra M, Lund LH, Milicic D, Costanzo MR, Filippatos G, et al. Advanced heart failure: a position statement of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2018;20(11):1505–1535.

21. Allen LA, Stevenson LW, Grady KL, Goldstein NE, Matlock DD, Arnold RM, et al. Decision Making in Advanced Heart Failure. *Circulation*. 2012;125(15):1928–1952.
22. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2015;34(10):1244–1254.
23. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, et al. Sixth INTERMACS annual report: A 10,000-patient database. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2014;33(6):555–564.
24. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, et al. Long-Term Use of a Left Ventricular Assist Device for End-Stage Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(20):1435–1443.
25. Rogers JG, Butler J, Lansman SL, Gass A, Portner PM, Pasque MK, et al. Chronic Mechanical Circulatory Support for Inotrope-Dependent Heart Failure Patients Who Are Not Transplant Candidates. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(8):741–7477.
26. Terzi A. Mechanical circulatory support: 60 years of evolving knowledge. *Int J Artif Organs*. 2019;42(5):215–225.
27. Liotta D, Hall CW, Henly WS, Cooley DA, Crawford ES, DeBakey ME. Prolonged assisted circulation during and after cardiac or aortic surgery. *Am J Cardiol*. 1963;12(3):399–405.
28. DeBakey ME. Left ventricular bypass pump for cardiac assistance. *Am J Cardiol*. 1971;27(1):3–11.
29. DeVries WC, Anderson JL, Joyce LD, Anderson FL, Hammond EH, Jarvik RK, et al. Clinical Use of the Total Artificial Heart. *New England Journal of Medicine*. 1984;310(5):273–278.

30. Teuteberg JJ, Stewart GC, Jessup M, Kormos RL, Sun B, Frazier OH, et al. Implant Strategies Change Over Time and Impact Outcomes. *JACC Heart Fail.* 2013;1(5):369–378.
31. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, et al. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2015;34(12):1495–1504.
32. Kutty RS, Parameshwar J, Lewis C, Catarino PA, Sudarshan CD, Jenkins DP, et al. Use of centrifugal left ventricular assist device as a bridge to candidacy in severe heart failure with secondary pulmonary hypertension. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2013;43(6):1237–1242.
33. Hetzer R, Müller JH, Weng Y guo, Meyer R, Dandel M. Bridging-to-recovery. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(3):S109–113.
34. Mehra MR, Naka Y, Uriel N, Goldstein DJ, Cleveland JC, Colombo PC, et al. A Fully Magnetically Levitated Circulatory Pump for Advanced Heart Failure. *New England Journal of Medicine.* 2017;376(5):440–450.
35. Rogers JG, Pagani FD, Tatroles AJ, Bhat G, Slaughter MS, Birks EJ, et al. Intrapericardial Left Ventricular Assist Device for Advanced Heart Failure. *New England Journal of Medicine.* 2017;376(5):451–460.
36. Bushati N, Cohen SM. microRNA Functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23(1):175–205.
37. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):102–114.
38. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development.* 2005;132(21):4645–4652.
39. Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, Pinto YM, Voors AA. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(5):457–468.

40. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* 2003;35(3):215–217.
41. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell.* 2007;129(2):303–317.
42. Saxena A, Tabin CJ. miRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(1):87–91.
43. da Costa Martins PA, Bourajaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, et al. Conditional *Dicer* Gene Deletion in the Postnatal Myocardium Provokes Spontaneous Cardiac Remodeling. *Circulation.* 2008;118(15):1567–1576.
44. Melman YF, Shah R, Das S. MicroRNAs in Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2014;7(1):203–214.
45. Bagnall RD, Tsoutsman T, Shephard RE, Ritchie W, Semsarian C. Global MicroRNA Profiling of the Mouse Ventricles during Development of Severe Hypertrophic Cardiomyopathy and Heart Failure. *PLoS One.* 2012;7(9):e44744.
46. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circ Res.* 2010;106(6):1035–1039.
47. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(10):1138–1147.
48. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3(6):499–506.
49. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, ter Maaten JM, Valente MAE, Liu LCY, et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(4):414–423.

50. Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Correa Da Rosa J, et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(30):11151–11156.
51. Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(2):147–154.
52. Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, et al. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics*. 2010;42(3):420–426.
53. Vogel B, Keller A, Frese KS, Leidinger P, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, et al. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *Eur Heart J*. 2013;34(36):2812–2823.
54. Watson CJ, Gupta SK, O’Connell E, Thum S, Glezeva N, Fendrich J, et al. MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(4):405–415.
55. Wong LL, Armugam A, Sepramaniam S, Karolina DS, Lim KY, Lim JY, et al. Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(4):393–404.
56. Parikh M, Shah S, Basu R, Famulski KS, Kim D, Mullen JC, et al. Transcriptomic Signatures of End-Stage Human Dilated Cardiomyopathy Hearts with and without Left Ventricular Assist Device Support. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2050.
57. Schipper MEI, van Kuik J, de Jonge N, Dullens HFJ, de Weger RA. Changes in Regulatory MicroRNA Expression in Myocardium of Heart Failure Patients on Left Ventricular Assist Device Support. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2008;27(12):1282–1285.
58. Adhikari N, Guan W, Capaldo B, Mackey AJ, Carlson M, Ramakrishnan S, et al. Identification of a New Target of miR-16, Vacuolar Protein Sorting 4a. *PLoS One*. 2014;9(7):e101509.

59. Wang T, O'Brien EC, Rogers JG, Jacoby DL, Chen ME, Testani JM, et al. Plasma Levels of MicroRNA-155 Are Upregulated with Long-Term Left Ventricular Assist Device Support. *ASAIO Journal*. 2017;63(5):536–541.
60. Dlouha D, Ivak P, Netuka I, Novakova S, Konarik M, Tucanova Z, et al. The effect of long-term left ventricular assist device support on flow-sensitive plasma microRNA levels. *Int J Cardiol*. 2021;339:138–143.
61. Lok SI, van Mil A, Bovenschen N, van der Weide P, van Kuik J, van Wichen D, et al. Post-transcriptional Regulation of α -1-Antichymotrypsin by MicroRNA-137 in Chronic Heart Failure and Mechanical Support. *Circ Heart Fail*. 2013;6(4):853–861.
62. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circ Res*. 2010;106(6):1035–1039.
63. Qiang L, Hong L, Ningfu W, Huaihong C, Jing W. Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2082–2088.
64. Morley-Smith AC, Mills A, Jacobs S, Meyns B, Rega F, Simon AR, et al. Circulating microRNAs for predicting and monitoring response to mechanical circulatory support from a left ventricular assist device. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(8):871–879.

8. Životopis

Rođen sam u Zagrebu 22.02.1999. godine. Pohađao sam Osnovnu školu „Stjepan Radić“ u Božjakovini. U to vrijeme aktivno sam se bavio rukometom. U Zagrebu sam završio V. gimnaziju, a Medicinski fakultet u Zagrebu upisao sam 2017. godine. Za vrijeme studija bio sam član košarkaške sekcije, član udruge CroMSIC, sudjelovao sam na nekoliko studentskih kongresa, a zadnje 3 godine radio sam na istraživanjima u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Frane Paića. Zadnje 3 godine aktivno učim njemački jezik, a osim njemačkog jezika, napredno se služim engleskim jezikom.