

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: **Biochemie a patobiochemie**

Studijní obor: **Biochemie a patobiochemie**



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Lenka Eremiášová**

**Studium nových rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění**

The study of new risk factors of the cardiovascular diseases

**Disertační práce/Doctoral thesis**

Školitel: doc. MUDr. Vilém Danzig, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Libor Vitek, Ph.D., MBA

Praha, 2021

## PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 18.4.2021

Lenka Eremiášová

## IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

**EREMIÁŠOVÁ, Lenka.** Studium nových rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. (*The study of new risk factors of cardiovascular disease*). Praha, 2021. 151s. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, II. Interní klinika/1. LF UK. Vedoucí práce Danzig, Vilém.

## **PODĚKOVÁNÍ:**

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování svému školiteli doc. MUDr. Vilému Danzigovi, Ph.D. za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé disertační práce. Velký dík patří zejména prof. MUDr. Liboru Vítkovi, Ph.D. za nezměrnou trpělivost a zejména pomoc při získání potřebných informací a podkladů k této práci. Bez jeho odborné rady a podpory by tato práce nevznikla.

Rovněž bych ráda poděkovala všem spoluautorům za spolupráci při získávání dat a cenné rady při jejich zpracování. V neposlední řadě děkuji své rodině za pochopení, podporu a zejména motivaci k dopsání této práce.

## **ABSTRAKT:**

Bilirubin je hlavní produkt katabolismu hemu v krevním řečišti s významnými antioxidačními vlastnostmi. Ty se uplatňují u chorob spojených se zvýšeným oxidačním stresem, mezi které patří zejména choroby srdce a cév i nádorová onemocnění.

V první části této práce jsem se zabývala zmapováním sérových koncentrací bilirubinu v běžné české populaci, které byly stanoveny na 1 % náhodně vybraném vzorku české populace, současně s prevalencí Gilbertova syndromu. Koncentrace bilirubinu byly stanoveny i v rámci jednotlivých polymorfismů genu *UGT1A1* (*OMIM\*191740*) řídícího biotransformaci bilirubinu v játrech, včetně jejich asociace se základními rizikovými faktory aterosklerózy. V rámci této studie jsme v české populaci zjistili i překvapivě vysokou prevalenci zvýšených aktivit jaterních enzymů, které představují další významný rizikový faktor vzniku kardiovaskulárních chorob. V další části této práce jsme stanovili i koncentrace bilirubinu u skupiny pacientů s akutním koronárním syndromem, které byly významně nižší v porovnání s běžnou populací.

V druhé části výzkumného projektu byl na polské větvi epidemiologické studie HAPIEE zkoumán vztah plazmatických koncentrací bilirubinu a jednotlivých variant polymorfismů genu *UGT1A1* na celkovou a kardiovaskulární mortalitu. Z výsledků vyplývá, že plazmatické koncentrace bilirubinu se významně podílejí zejména na celkové a nádorové mortalitě.

V závěru práce uvádím i dílčí výsledky dalších spoluautorských prací, které reflektují rizikový profil naší populace. Alarmující je zejména nárůst prevalence obezity včetně metabolického dopadu. Kromě tradičních epidemiologických ukazatelů nabývají na významu i nové, kromě sérových koncentrací bilirubinu se potentním biomarkerem jeví i koncentrace kyseliny močové.

**Klíčová slova:** Bilirubin, kardiovaskulární choroby, Gilbertův syndrom, promotorové varianty genu *UGT1A1*, mortalita

**ABSTRACT:**

Bilirubin is a major product of the heme catabolism in the vascular bed with substantial antioxidant properties. These importantly contribute to pathogenesis of diseases associated with increased oxidative stress, including cardiovascular or cancer diseases.

In the first part of this PhD project serum bilirubin concentrations were examined in the 1 % representative sample of the general Czech population, together with determination of the prevalence of Gilbert's syndrome. Bilirubin concentrations were determined also within individual polymorphisms of the *UGT1A1* gene (*OMIM\*191740*) responsible for bilirubin biotransformation in the liver, including their association with the basic risk factors for atherosclerosis. We also assessed the activity of the standard liver enzymes (representing another significant risk factor for the development of cardiovascular diseases) with surprisingly high proportion of subjects with elevated values. Simultaneously, we determined the concentrations of serum bilirubin in a group of patients with an acute coronary syndrome, who manifested with significantly lower concentrations as compared to general population.

In the second part of this research project, the relationship between plasma concentrations of bilirubin and individual variants of *UGT1A1* gene polymorphisms and total and cardiovascular mortality was investigated.

At the end of the work I present partial results of other co-author's works projects I have been co-authoring. The increase in obesity and its metabolic impact is particularly alarming. In addition to traditional epidemiological indicators, new ones are also gaining in importance; in addition to serum bilirubin concentrations, uric acid concentrations also appear to be a potent biomarker.

**Key words:** Bilirubin, cardiovascular diseases, Gilbert's syndrome, *UGT1A1* gene promoter variants, mortality

## OBSAH:

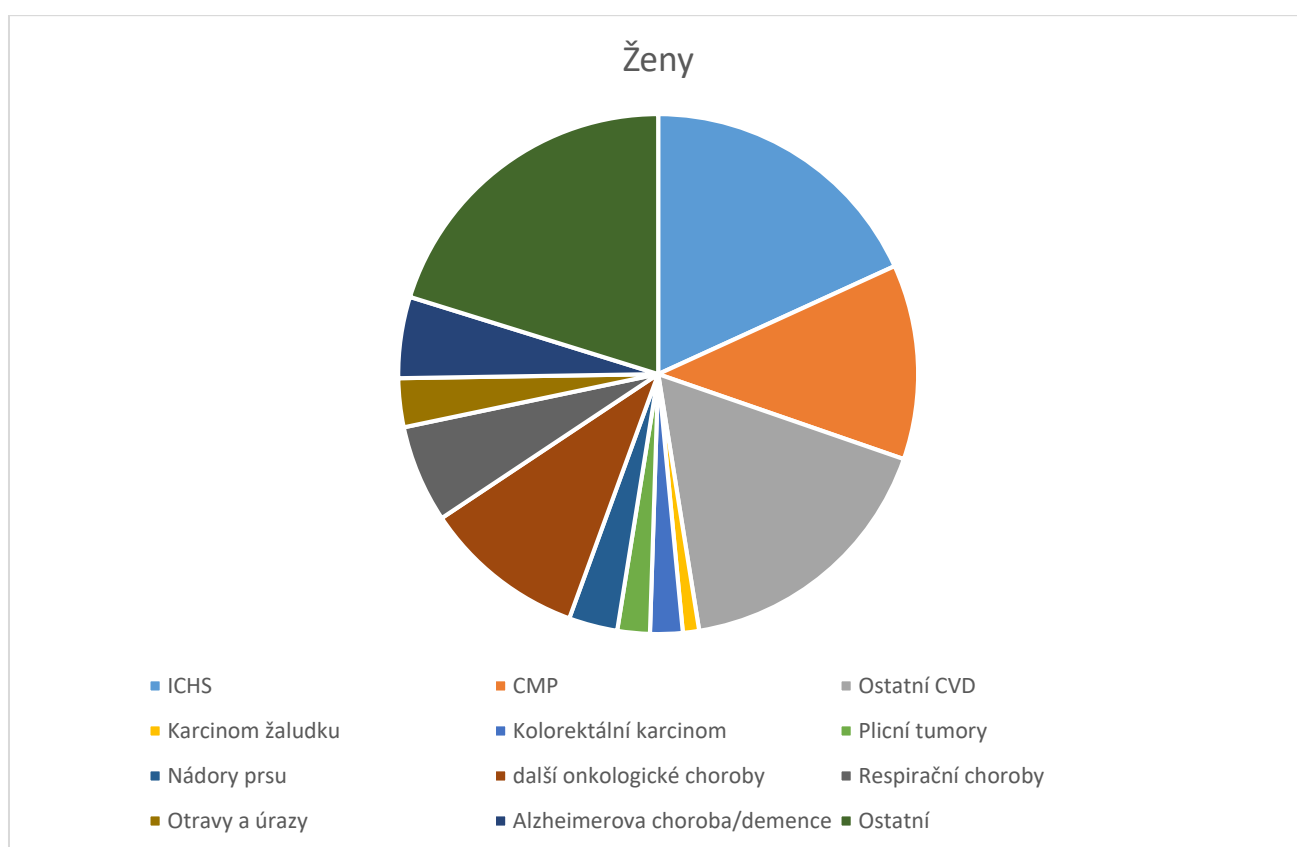
<b>1. ÚVOD</b> .....	8
1.1. Ateroskleróza.....	11
1.1.1. Proces aterogeneze.....	14
1.2. Oxidační stres .....	15
1.2.1. Reaktivní formy kyslíku .....	15
1.2.2. Reaktivní formy dusíku .....	17
1.3. Antioxidační mechanismy .....	17
1.3.1. Antioxidační enzymy.....	17
1.3.2. Antioxidační substráty .....	18
1.4. Katabolická dráha hemu .....	20
1.4.1. Hemoxygenáza 1 (HMOX1).....	21
1.4.2. Hemoxygenáza 2 (HMOX2).....	22
1.4.3. Biliverdinreduktáza.....	23
1.4.4. Biliverdín-bilirubinový cyklus.....	23
1.5. Bilirubin.....	25
1.5.1. Historie .....	25
1.5.2. Chemická struktura bilirubinu .....	26
1.5.3. Koncentrace bilirubinu v krevním séru .....	28
1.5.4. Transport bilirubinu v systémovém řečišti .....	30
1.5.5. Jaterní metabolismus bilirubinu.....	31
1.5.6. Konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou.....	33
1.5.6.1. Glukuronosyltransferáza (UGT).....	34
1.5.7. Sekrece bilirubinu do žluče .....	36
1.5.8. Střevní metabolismus a exkrece bilirubinu.....	37
1.5.9. Ikterus .....	38
1.5.9.1. Novorozenecká hyperbilirubinémie.....	39

1.6. Biologické vlastnosti bilirubinu.....	41
1.6.1. Bilirubin a kardiovaskulární onemocnění.....	43
1.6.2. Bilirubin a metabolický syndrom .....	45
1.6.3. Bilirubin a nádorová onemocnění.....	45
1.7. Gilbertův syndrom.....	46
1.7.1. <i>UGT1A1</i> *28 a kardiovaskulární onemocnění.....	47
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>48</b>
<b>3. BILIRUBIN A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....</b>	<b>49</b>
3.1. Metodika.....	50
3.2. Výsledky .....	53
3.3. Diskuse .....	55
3.4. Příloha .....	58
<b>4. BILIRUBIN A MORTALITA .....</b>	<b>63</b>
4.1. Metodika.....	64
4.2. Výsledky .....	66
4.3. Diskuse .....	67
4.4. Příloha.....	69
<b>5. KARDIOVASKULÁRNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY .....</b>	<b>75</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>78</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>79</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>98</b>
<b>9. SEZNAM PUBLIKACÍ .....</b>	<b>100</b>

## 1. ÚVOD

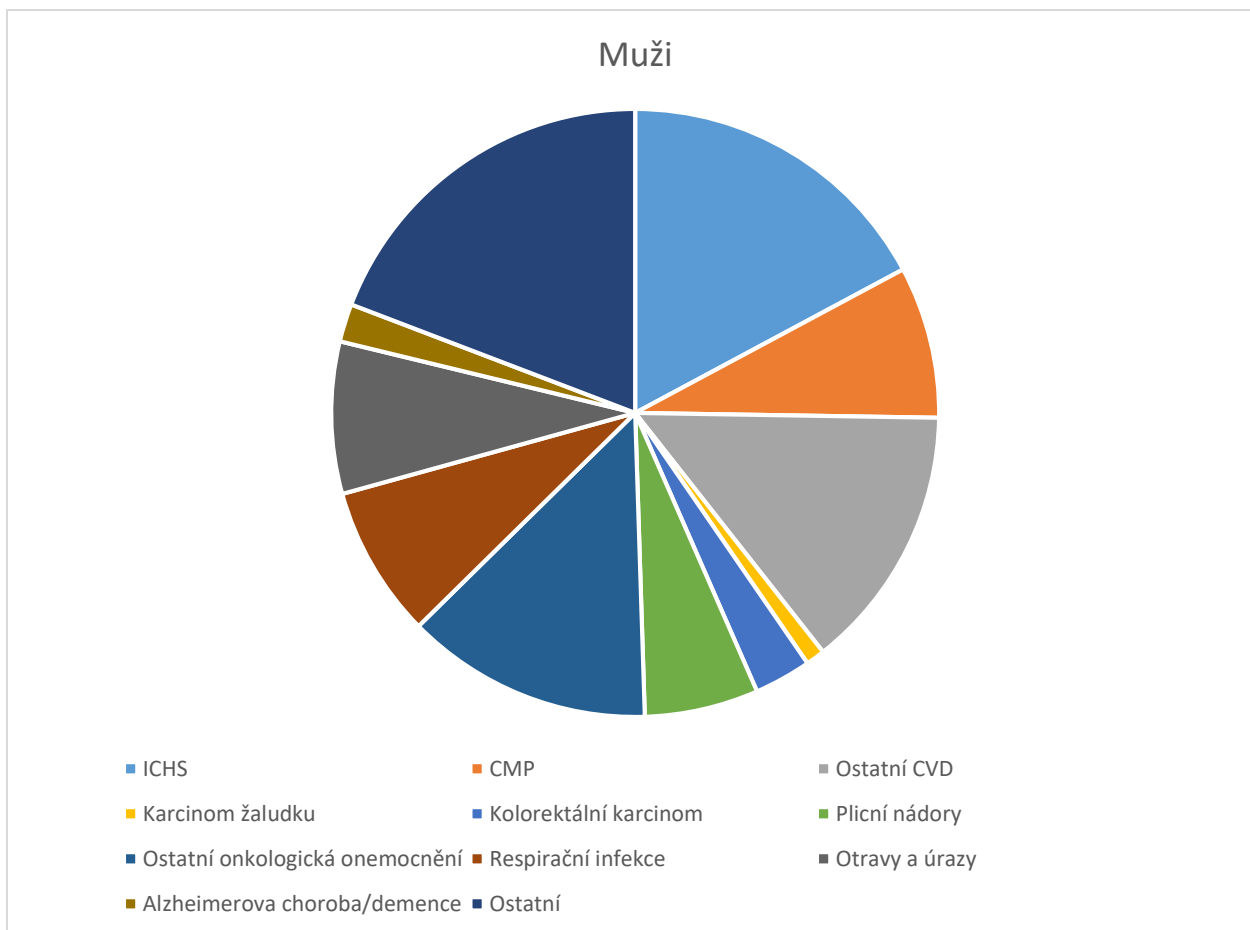
Kardiovaskulární choroby (CVD) jsou ve vyspělých zemích světa stále jednou z hlavních příčin mortality a morbidit, a to i přesto, že došlo ke zlepšení diagnostiky a léčby. Podle dat Evropské kardiologické společnosti (ESC) zveřejněných v r. 2019 zemřelo na nemoci srdce a cév přes 2,2 milionů žen a 1,9 milionu mužů (Obr. 1) [1, 2]. Mezi nejčastější příčinu smrti patří akutní infarkt myokardu (AIM) a cévní mozková příhoda (CMP)[1, 3].

**Obr. 1: Zastoupení jednotlivých příčin úmrtí**



**Obr. 1a: Procentuální zastoupení jednotlivých příčin úmrtí u žen v roce 2019.** Z celkového výčtu kardiovaskulárních chorob připadá u žen na ischemickou chorobu srdeční (ICHS) 38 %, na cévní mozkové příhody (CMP) 26 %. Ve statistice zahrnuty údaje ze všech Evropských států vyjma Kosova, dále z Kazachstánu a Kyrgyzstánu, Izraele, Egypta, Maroka a Tunisu. Zdroj: WHO Mortality Database, upraveno podle ref. [4].





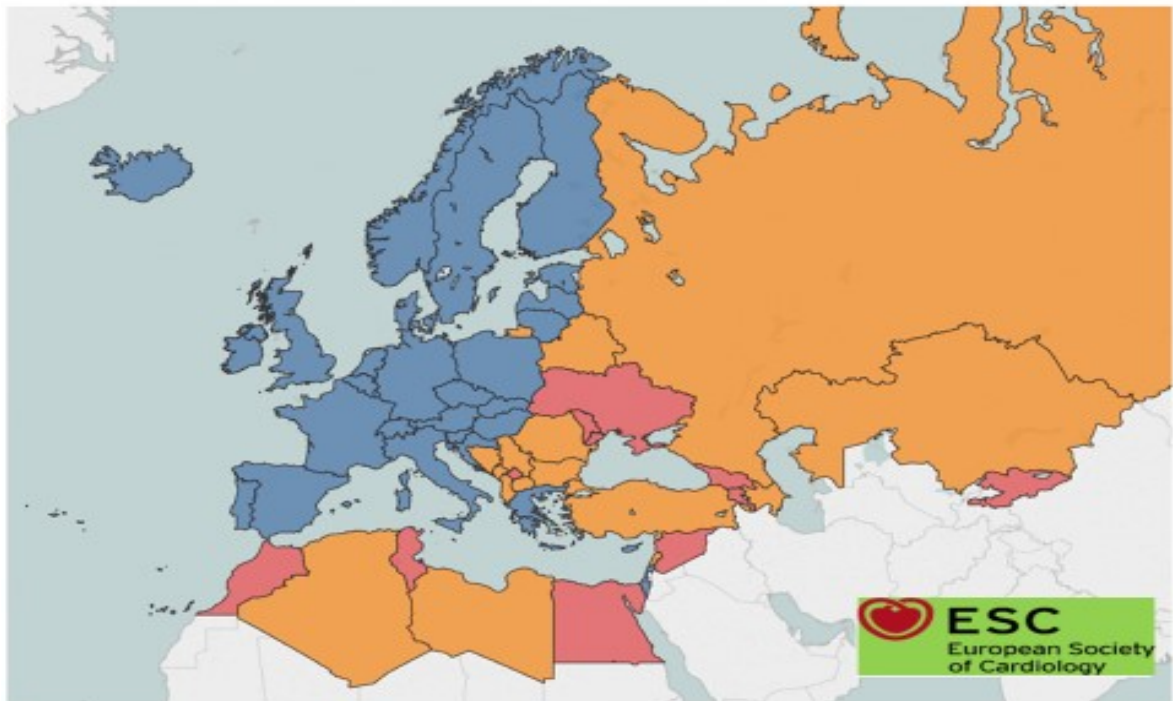
**Obr. 1b: Procentuální zastoupení jednotlivých příčin úmrtí u mužů v roce 2019.**

*Z celkového výčtu kardiovaskulárních chorob připadá u mužů na ICHS 44 % a na CMP 21 %. Ve statistice jsou zahrnuty údaje ze všech evropských států vyjma Kosova, dále asijských zemí Kazachstánu a Kyrgyzstánu, Izraele, Egypta, Maroka a Tunisu.*

*Zdroj: WHO Mortality Database, upraveno podle ref. [4].*

Dle posledních dat je kardiovaskulární mortalita vyšší v zemích s nižšími náklady na zdravotní péči. Možnou příčinou může být absence programů zaměřených na prevenci rizikových faktorů aterosklerózy nebo nižší dostupnost adekvátní lékařské péče. Obojí vede k opožděné diagnostice a pokročilejší formy onemocnění můžeme diagnostikovat již u mladších jedinců [2, 3, 5]. Rozložení členských zemí Evropské kardiologické společnosti (ESC) podle hrubého národního příjmu (HDP) zobrazuje Obr. 2.

**Obr. 2: Členské země ESC rozčleněné dle hrubého národního příjmu**



**Obr. 2: Členské země ESC rozčleněné dle HDP.** Světová banka definuje země s vysokými příjmy (modře) jako země, v nichž hrubý národní příjem na obyvatele činil 12 000 USD nebo více. Termín „země se středními příjmy (oranžově)“ v tomto případě představuje kombinaci členských zemí Evropské kardiologické společnosti s vyšším (oranžové) a nižším středním příjmem (červené). Upraveno podle ref. [2].

Naopak v některých zemích, zejména těch s vysokým podílem HDP na zdravotní péči (například Dánsko, Izrael, Nizozemí, Republika San Marino, Velká Británie, Švýcarsko, Belgie, Francie a další) převyšuje mortalita na onkologické choroby mortalitu na CVD. K poklesu kardiovaskulární mortality mohly přispět vyspělé diagnostické programy, které se opírají o zobrazovací metody, ale také znalost a využití laboratorních markerů. Právě na nové biochemické markery se upírá pozornost moderní preventivní medicíny. Ví se, že nemoci srdce a cév, stejně jako další civilizační choroby (např. diabetes mellitus či onkologická onemocnění), jsou spojeny se zvýšeným oxidativním stresem [6]. Při znalosti specifických biochemických markerů by bylo možné snáze stratifikovat jednotlivá rizika a včas zahájit adekvátní léčbu, ať již posílením preventivních opatření či zahájením specifické léčby.

## 1.1. Ateroskleróza

Patofyziologickým podkladem převážné většiny kardiovaskulárních chorob je ateroskleróza [7]. Tento složitý proces probíhá u každého jedince jinou rychlostí. Záleží nejen na genetickém profilu jedince, ale také na jeho expozici dalším rizikovým faktorům. První změny ve struktuře cévní stěny, tzv. lipidové proužky, lze pozorovat již krátce po narození. Postupem času prodělávají další změny a mění se na proužky fibrózní.

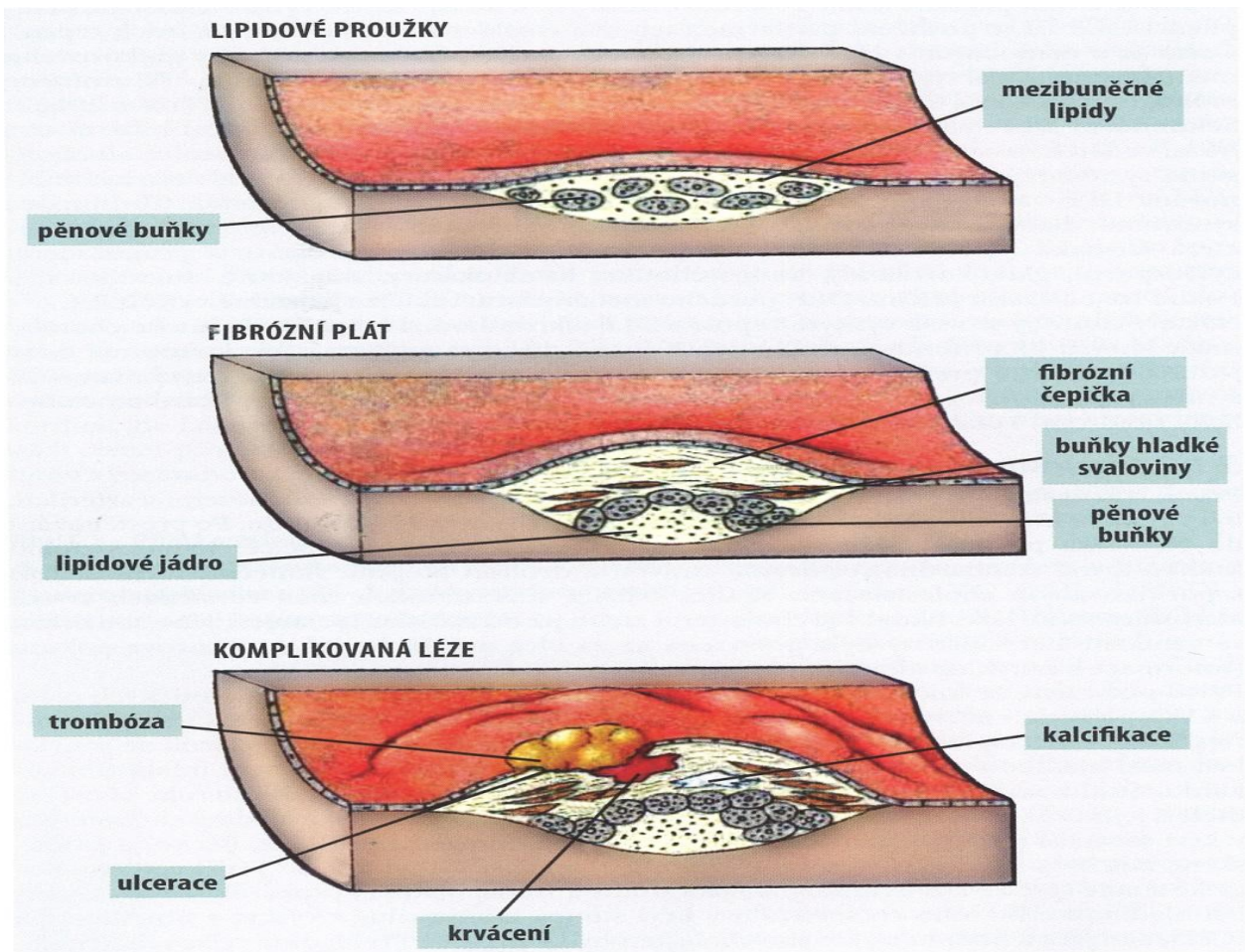
Při další expozici a působení rizikových faktorů aterosklerózy dochází k transformaci těchto plátů na komplikované aterosklerotické léze. Jejich nestabilní jádro s velkým obsahem tuků vede k ruptuře tenké fibrózní čepičky. Dochází k trombóze a okluzi tepny. Klinicky se tento stav nejčastěji manifestuje jako akutní infarkt myokardu (AIM) či cévní mozková příhoda (CMP). Vývoj aterosklerotických plátů je zobrazen na Obr. 3.

Abychom mohli předejít vzniku komplikovaných aterosklerotických lézí, je důležité aktivně pátrat po rizikových faktorech aterosklerózy. Rizikových faktorů aterosklerózy je dnes známo více než 250 a stále přibývají nové [8]. Při jejich znalosti lze odhadnout rizikový profil nemocného a podle výše rizika můžeme, změnou životního stylu či prostřednictvím farmakoterapie nebo ideálně kombinací obojího, aterosklerotický proces zpomalit (Tab. 1).

**Tab. 1: Základní rizikové faktory kardiovaskulárních chorob a základní doporučení zdravého životního stylu**

Životní styl	Rizikové faktory	
	ovlivnitelné	neovlivnitelné
vyvážená strava	arteriální hypertenze	věk
zákaz kouření	hyperlipidémie	pohlaví
pravidelná fyzická aktivita	hyperglykémie diabetes mellitus	rodinná anamnéza
snížit konzumaci alkoholu	nadváha/obezita	genetická predispozice
dostatek spánku	trombogenní faktory	
správné stravovací návyky	markery chronického zánětu	

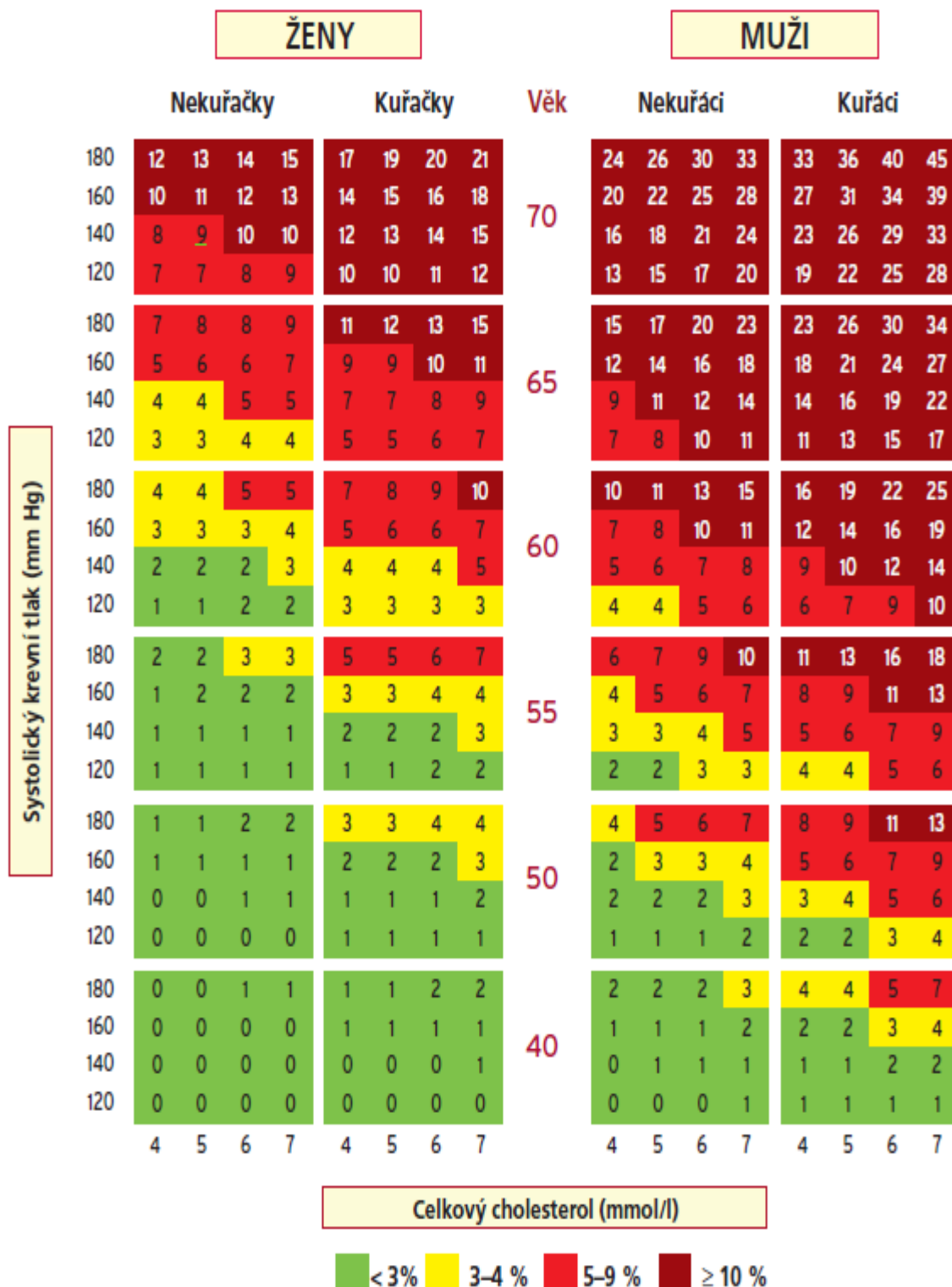
**Obr. 3: Vývoj aterosklerotických plátů**



**Obr. 3: Vývoj aterosklerotických plátů.** První změny, lipidové proužky, nacházíme krátce po narození. Při další expozici rizikovým faktorům vznikají komplikovanější léze. Velká akumulace lipidů uvnitř cévní stěny může způsobit rupturu tenkého fibrózního krytu. Vzniklý trombus může obturovat cévní lumen. Klinicky se tento stav nejčastěji projeví jako akutní koronární syndrom či CMP. Upraveno podle ref. [9].

V České republice se nejčastěji k odhadu kardiovaskulárního rizika fatální aterosklerotické příhody používá skórovací systém tabulek SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation)[10] (Obr. 4).

Obr. 4: Desetileté riziko fatální kardiovaskulární příhody v České republice



Obr. 4: Tabulka SCORE. Na základě základních rizikových faktorů (věk, hodnoty systolického krevního tlaku, koncentrace cholesterolu a usu kouření) lze spočítat odhad fatální aterosklerotické kardiovaskulární příhody v horizontu deseti let. Upraveno podle ref. [11].

Problém nastává u mladých lidí (<40 let) s vysokými hodnotami rizikových faktorů. Ti mají nízké absolutní, ale velmi vysoké relativní riziko aterosklerotické kardiovaskulární příhody. Pro tuto skupinu je doporučeno využít tabulku pro odhad relativního rizika (Obr. 5) [10].

**Obr. 5: Stanovení relativního rizika aterosklerotické kardiovaskulární příhody pro pacienty <40 let**

		Nekuřák					Kuřák				
		4	5	6	7	8	4	5	6	7	8
Systolický krevní tlak (mm Hg)	180	3	3	4	5	6	6	7	8	10	12
	160	2	3	3	4	4	4	5	6	7	8
	140	1	2	2	2	3	3	3	4	5	6
	120	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4
		Cholesterolemie (mmol/l)									

**Obr. 5: Relativní riziko aterosklerotické kardiovaskulární příhody.** Tabulka je rozdělena na dvě části v závislosti na kouření. V každé z nich je poté stanoveno relativní riziko v závislosti na hodnotách systolického krevního tlaku a koncentrace celkového cholesterolu. Konkrétně, jedinec vpravo nahoře má až 12x vyšší relativní riziko než ten, který je v tabulce umístěn vlevo dole. Upraveno podle ref. [12].

### 1.1.1. Proces aterogeneze

Existuje řada mechanismů zodpovědných za vznik aterosklerózy, z nichž mezi velmi významné patří zánět [13]. Aterosklerotický plát je tvořen modifikovanými lipoproteiny o velmi nízké hustotě (LDL) [14] [15]. Za tuto změnu LDL částic je zodpovědná peroxidace lipidů lipoproteinových částic [16, 17]. Oxidované LDL částice aktivují endotel a buňky monocytomakrofágového systému (Th-lymfocyty a makrofágy). Aktivované endoteliální buňky na svém povrchu exprimují řadu adhezivních molekul. Tím je umožněna migrace zánětlivých buněk a aktivovaných LDL částic do subendoteliálního prostoru arterie [18, 19]. Akumulované,

oxidované LDL částice, jsou aktivovanými makrofágy fagocytovány a přeměněny na tzv. pěnové buňky [20, 21] (Obr. 3). V počátečních fázích obsahují ateromy zejména Th1 subpopulaci lymfocytů, které produkují interferon gama ( $\text{INF}\gamma$ ), tumor necrosis faktor alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) a interleukin 2 (IL-2). U pokročilejších aterosklerotických změn nalézáme v ateromech Th2 subpopulaci lymfocytů s produkcí interleukinů (IL): IL-4, IL-5 a IL-6 [22]. Mimo výše uvedených, jsou v aterosklerotických plátech přítomny i další cytokiny (IL-1 a IL-8), metaloproteinázy, histamin a serotonin [23].

Zánětlivý proces se neodehrává jen v cévní stěně, ale zvýšené hodnoty zánětlivě působících interleukinů můžeme detekovat i v séru nemocných. Prostřednictvím těchto látek dochází ke stimulaci hepatocytů. Ty reagují zvýšenou produkcí proteinů akutní fáze (zvýšení hladin fibrinogenu, CRP proteinu či sérového amyloidu) [24, 25]. V organismu vzniká nerovnováha ve prospěch produkce oxidantů. Volné kyslíkové radikály, vznikající za podmínek zvýšeného oxidačního stresu, generují řadu dalších reaktivních molekul, jejichž přítomnost v organismu alteruje fyziologické funkce nejen cévní stěny, ale i jiných orgánů. Těmto mechanismům zabraňují antioxidantní systémy. Jedním ze skupiny endogenních oxidantů je i molekula bilirubinu.

## **1.2. Oxidační stres**

Oxidační stres je definován jako stav, ve kterém převažuje produkce volných radikálů nad možností antioxidantních systémů organismu tyto molekuly neutralizovat [26]. Mezi volné radikály patří reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS) [27, 28].

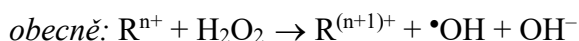
Volné radikály v lidském organismu nepůsobí jen negativně. Tyto velmi reaktivní molekuly mají i důležité fyziologické uplatnění, kdy se uplatňují například jako signální molekuly [29]. Zásadní postavení mají ROS v dýchacím řetězci, kde dochází prostřednictvím cytochromoxidázy k redukci 4 elektronů za vzniku 2 molekul vody a uvolnění energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) [30]. Významnou funkci mají ROS i v rámci imunitního systému. Zejména enzymy NADPH-oxidáza a myeloperoxidáza, která je přítomná v makrofázích, kde produkuje superoxid, peroxid vodíku a kyselinu chlornou, čímž chrání organismus před patogenními mikroorganismy.

### **1.2.1. Reaktivní formy kyslíku**

Volný radikál je z chemického pohledu jakákoliv molekula, atom nebo ion, který má ve své valenční vrstvě nepárový elektron, a je schopen krátkodobé samostatné existence. ROS jsou

vlastně meziprodukty redukčních reakcí kyslíku na vodu [31]. Mezi přední oxidanty se řadí superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), jehož hlavním místem produkce je dýchací řetězec a také NADPH-oxidáza (v rámci eliminace patogenů). Superoxid je spontánně nebo prostřednictvím antioxidačního enzymu (superoxiddismutázy) redukován na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Ten v lidském těle reaguje s redukovánými redoxně aktivními přechodnými kovy, jako jsou např. atomy železa ( $Fe^{2+}$ ) [32]. Tato tzv. Fentonova reakce [33] vede ke vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu ( $OH^{\cdot}$ ) (Obr. 6). Hydroxylový radikál je iniciátor lipoperoxidace biomolekul [34]. Tím dochází ke vzniku radikálové, řetězové reakce (volný radikál se stabilizuje vytržením elektronu z jiné struktury, a ta se mění na jiný radikál, čímž proces pokračuje). Přehled ROS a RNS včetně látek neradikálové povahy uvádí Tab. 2.

**Obr. 6: Schéma Fentonovy reakce:**



**Tab. 2: Reaktivní formy kyslíku a dusíku**

Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
<b>Reaktivní formy kyslíku</b>			
<b>Superoxid</b>	$O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku	$H_2O_2$
<b>Hydroxylový radikál</b>	$HO^{\cdot}$	Kyselina chlorná	$HOCl$
<b>Alkoxylový radikál</b>	$RO^{\cdot}$	Ozon	$O_3$
<b>Peroxylový radikál</b>	$ROO^{\cdot}$	Singletový kyslík	$^1O_2$
<b>Reaktivní formy dusíku</b>			
<b>Oxid dusnatý</b>	$NO^{\cdot}$	Peroxyinitrit	$ONOO^-$
<b>Oxid dusičitý</b>	$NO_2^{\cdot}$	Dusitany	$NO_2^-$
		Dusičnany	$NO_3^-$
		Nitrosyl	$NO^+$

*Upraveno podle ref. [35].*

Pokud není produkce ROS správně regulována prostřednictvím antioxidačních systémů, dojde k vychýlení z oxidačně-antioxidační rovnováhy a k narušení jednotlivých fyziologických funkcí. To se může projevit vznikem různých chorob, jako jsou například onemocnění nádorová



[36], autoimunitní [37], kardiovaskulární [38] či neurodegenerativní [39]. Vliv ROS je dáván i do souvislosti s procesem stárnutí [40].

### **1.2.2. Reaktivní formy dusíku**

RNS jsou sloučeniny odvozené od molekuly oxidu dusnatého (NO). Vznikají reakcí NO s volnými radikály (Tab. 2). Tuto skutečnost nejlépe dokládá reakce NO s  $O_2^-$  za vzniku peroxinitritu ( $ONOO^-$ ). Peroxynitrit je však nestabilní a izomeruje na dusičnany [41]. Stejně jako ROS mají i RNS za fyziologických podmínek své důležité postavení. Například molekula NO je signální molekulou, která působí jako lokální mediátor s vazodilatačními a neuromodulačními účinky [42]. V případě vychýlení z rovnovážného stavu se mohou RNS podílet na patogenezi řady chorob (thiolová oxidace proteinů tvorbou thiyl radikálů) [43, 44].

## **1.3. Antioxidační mechanismy**

Zvýšenému oxidačnímu stresu zabráňují antioxidační mechanismy. Jsou to redoxní systémy, které brání oxidaci důležitých biologických molekul [45, 46]. Antioxidační mechanismy lze rozdělit na antioxidační enzymy a antioxidační substráty.

### **1.3.1. Antioxidační enzymy**

Enzymové antioxidační systémy jsou vývojově velmi staré. Jsou to metaloproteiny, které mají v aktivním centru přechodný kov (např. fylogeneticky nejstarší superoxiddismutáza obsahuje měď a zinek, kataláza obsahuje prostetickou protoporfyrinovou skupinu s  $Fe^{3+}$ ). Jejich cílem je vytvořit méně toxický produkt, který buď předávájí dále, nebo ho přímo rozkládají. Přehled antioxidačních enzymů je uveden v Tabulce č. 3.

**Tab. 3: Antioxidační enzymy a jejich funkce**

<b>Antioxidační enzymy</b>	<b>Funkce</b>
<b>Superoxiddismutáza</b>	dismutace superoxidu na peroxid vodíku a kyslík
<b>Glutathionperoxidáza</b>	eliminace peroxidu vodíku redukcí glutathionu
<b>Glutathiontransferáza</b>	odstranění lipoperoxidů vazbou na glutathion
<b>Kataláza</b>	dismutace peroxidu vodíku na vodu a kyslík
<b>Hemoxygenáza</b>	produkce biliverdinu
<b>Biliverdinreduktáza</b>	produkce bilirubinu

*Upraveno podle ref. [47].*

### **1.3.2. Antioxidační substráty**

Antioxidační substráty inaktivují volné radikály přeměnou na méně toxické produkty. Ty jsou poté schopny exkrece nebo dalšího metabolismu.

Dělíme je na substráty:

**membránové** – tokoferoly, karotenoidy (retinol)

**extracelulární** – kyselina askorbová, glutathion, thioly, cystein, ceruloplazmin, transferin, albumin, kyselina močová, **bilirubin**, ferritin

Jiné dělení je na substráty nízkomolekulární (Tab. 4) a tzv. bílkoviny s neenzymatickou antioxidační aktivitou (Tab. 5).

**Tab. 4: Přehled nízkomolekulárních substrátů**

<b>Antioxidant</b>	<b>Funkce</b>
<b>Bilirubin</b>	přenáší radikálové reakce z membránových lipidů do hydrofilního prostředí
<b>Kyselina askorbová</b>	redukuje železo na aktivní formy
<b><math>\alpha</math>-tokoferol (vitamin E)</b>	inaktivuje radikály mastných kyselin
<b>Ubichinol (koenzym Q)</b>	regenerují tokoferolový radikál
<b>Karotenoidy (vitamin A)</b>	zháší singletový kyslík
<b>Glutathion, taurin, kyselina lipoová</b>	součástí redoxního pufru buňky a regenerují tokoferol a askorbát
<b>Kyselina močová</b>	silný endogenní antioxidant

*Upraveno podle ref. [48, 49].*

**Tab. 5: Antioxidační substráty s neenzymatickou antioxidační kapacitou**

<b>Bílkoviny</b>	<b>Funkce</b>
<b>Transferin, laktoferin, ferritin</b>	váže tranzitní kovy a inhibují Fentonovu reakci
<b>Haptoglobin</b>	vazba hemoglobinu
<b>Ceruloplazmin</b>	váže měď, která oxiduje $Fe^{2+}$ na $Fe^{3+}$
<b>Chaperony</b>	podílí se na správném prostorovém uspořádání bílkovin
<b>Albumin</b>	váže přechodné kovy a mění tak jejich redoxní vlastnosti, váže oxid dusnatý, přenáší bilirubin

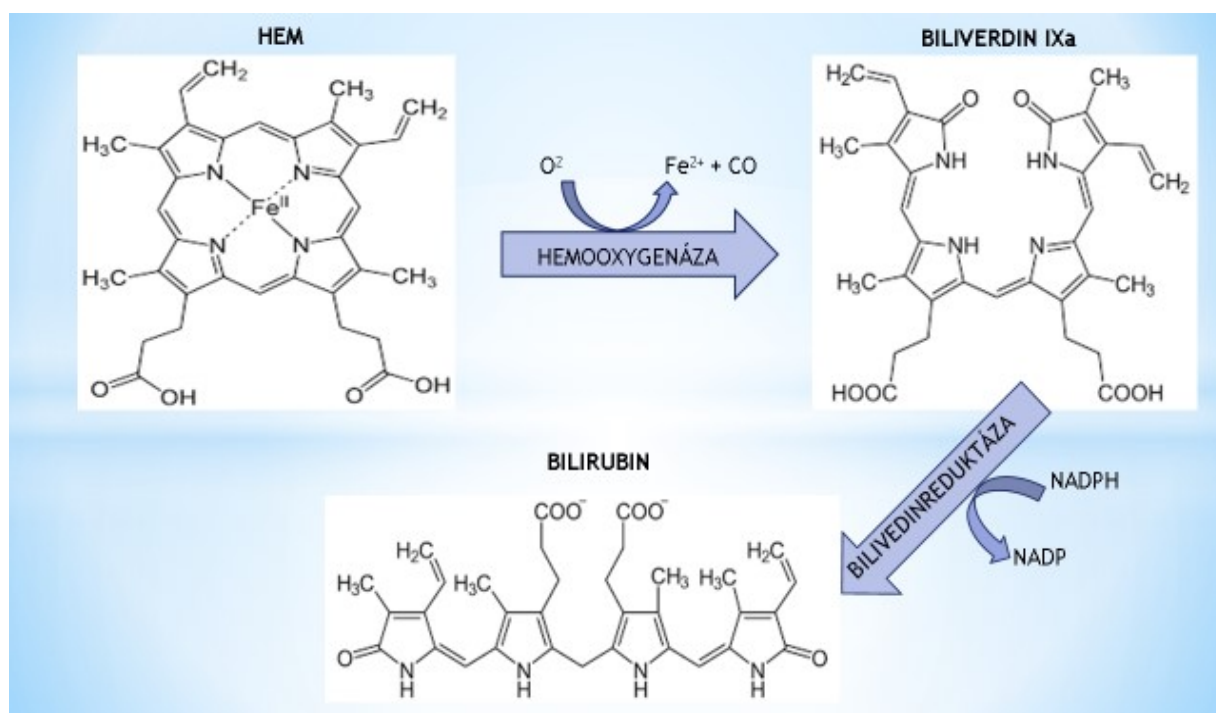
*Upraveno podle ref. [49, 50].*

Mezi nejdůležitější endogenní antioxidanty séra se řadí molekula bilirubinu [51, 52].

#### 1.4. Katabolická dráha hemu

Většina bilirubinu (80 %) pochází z degradace hemoglobinu, uvolněného z rozpadajících se erytrocytů (Obr. 7). Zbylá část je produktem katabolické dráhy ostatních hemoproteinů (myoglobin, kataláza, peroxidázy, jaterní cytochromy) [53]. Denně vzniká u dospělého jedince přibližně 450-600  $\mu\text{mol}$  bilirubinu (u dospělého člověka přibližně 7,5  $\mu\text{mol}$  (tj. 4,4 mg) na kilogram tělesné hmotnosti) [54].

Obr. 7: Schéma katabolické dráhy hemu



**Obr. 7: Katabolická dráha hemu.** Působením enzymu hemoxygenázy nastává oxidativní štěpení  $\alpha$ -methenylového můstku mezi kruhy A a D hemu [55]. Alfa uhlík můstku je uvolněn ve formě oxidu uhelnatého (CO) a z hemu vzniká zelený lineární tetrapyrrol biliverdin. Při reakci se uvolňuje dvojmocné železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ). K degradaci hemu vyžaduje hemoxygenáza kofaktory; molekulární kyslík a nikotinamid dinukleotidfosfát (NADPH). Biliverdin je dále pomocí biliverdinreduktázy redukován na bilirubin IXa (methenylový můstek hemu mezi kruhy B a C biliverdinu IXa) [56, 57]. Upraveno podle ref. [58].

Za normálních okolností je místem degradace hemu retikuloendoteliální systém sleziny a v malé míře kostní dřeň. Při intravaskulární hemolýze nebo po splenektomii je hemoglobin ve vazbě na haptoglobin a jeho degradace je zprostředkována Kupfferovými buňkami jater. Na ně je vázán prostřednictvím specifických receptorů CD163 [59], v případě kostní dřeně

se uplatňují makrofágy [54]. Při závažnější hemolýze, kdy se do cirkulace uvolní i samotný hem, vychytávají jaterní buňky přímo komplexy hem–hemopexin [60-62].

#### 1.4.1. Hemoxygenáza 1 (HMOX1)

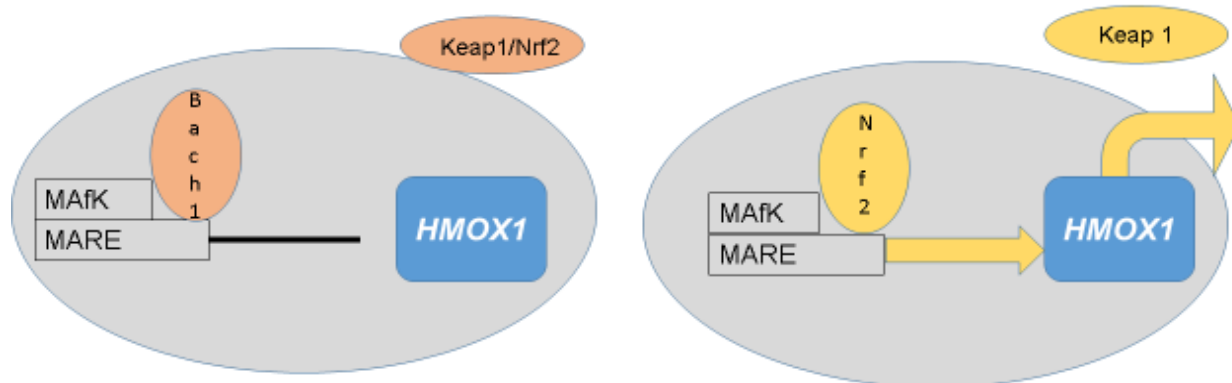
Enzym hemoxygenáza (HMOX) má 2 izoformy, HMOX1 (inducibilní) a HMOX2 (konstitutivní) [51, 62]. HMOX1 je běžně lokalizována v hladkém endoplazmatickém retikulu (C-terminální transmembránovou částí), kde je součástí celku, který je tvořen biliverdinreduktázou (BLVR), cytochrom P450 reduktázou a nikotinamid dinukleotidfosfátem (NADPH) [63, 64]. Aktivita HMOX1 byla zjištěna i v buněčném jádře, mitochondriích nebo plazmatické membráně. Na rozdíl od mitochondrií se v buněčném jádře vyskytuje varianta HMOX1, která je kratší o transmembránovou část a je v buněčném jádře zodpovědná za expresi genů, které se podílí na ochraně buňky před oxidačním stresem [65].

HMOX1 je indukovatelná oxidovaným hemoglobinem, ale i jinými vyvolávajícími faktory, podílejícími se na zvýšení oxidačního stresu. Mezi ně patří např. ultrafialové záření A (UVA), oxid dusnatý, ionty těžkých kovů, peroxid vodíku, cytokiny, růstové faktory, molekuly volných kyslíkových radikálů a medikamenty (kyselina acetylsalicylová, statiny a další) [62, 66, 67]. Nejvyšší aktivity HMOX1 jsou ve slezině a retikuloendoteliálních buňkách jater a kostní dřeni. Jinde jsou aktivity minimální, ale v případě působení oxidačního stresu dochází ke zvýšené expresi genu *HMOX1* (lokalizován na chromozomu *22q12*) [68]. Exprese *HMOX1* je regulována samotnou molekulou hemu. Při nadbytku hemu dochází ke změně cytosolových proteinů a jejich translokaci do jádra, a to zahajuje transkripci *HMOX1* [69] (Obr. 8). HMOX1 je schopná jisté autoregulace. Ta je možná uspořádáním purinových a pyrimidinových bází v oblasti promotoru genu *HMOX1*. Čím větší je počet repetice ( $\geq 28$  GT repetice), tím nižší je aktivita HMOX [70]. Tento poznatek lze najít i v klinických výstupech. Jako příklad uvádíme studii posuzující vznik ischemické choroby srdeční u diabetiků [71, 72], ale i nediabetických pacientů [72] nebo vzniku adenokarcinomu u kuřáků [73].

## Obr. 8: Regulace exprese *HMOX1*

a) fyziologický stav

b) indukce exprese při nadbytku hemu



**Obr. 8: Regulace exprese *HMOX1*.** a) Za normálních podmínek je transkripce *HMOX1* blokována přítomností represoru transkripce Bach 1, který je společně s Maf proteiny navázán na rozpoznávací element MARE.

b) Při nadbytku hemu je umožněna translokace transkripčního faktoru Nrf2 do jádra a jeho vazba na komplex Maf proteinů v oblasti MARE spouští transkripci *HMOX1*.

Legenda: Maf proteiny (MafF, MafG, MafK) – musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins [74], MARE - Maf-recognition element, Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Keap 1 – Kelch-like ECH Associated Protein 1. Upraveno podle ref. [75].

### 1.4.2. Hemoxygenáza 2 (HMOX2)

HMOX2 je konstitutivní forma tohoto enzymu [76]. Je přítomna prakticky ve všech tkáních, nicméně největší koncentrace dosahuje v mozkové tkáni [77]. Gen kódující HMOX2, je lokalizován na 16. chromozomu a jeho promotorová oblast obsahuje jen jednu regulační oblast, tzv. glucocorticoid response element (GRE). I přesto, že se jeví jako poměrně stabilní molekula, může být aktivita HMOX2 ovlivněna jak množstvím hemu [78], tak i molekulou oxidu dusnatého nebo ROS [79, 80].

### 1.4.3. Biliverdinreduktáza

BLVR je převážně cytozolový enzym, který byl objeven již u primitivních organismů, jako jsou řasy či sinice [81]. V lidském organismu je nejvíce zastoupen v tkáních s vysokou aktivitou HMOX, kde okamžitě redukuje vzniklý biliverdin na bilirubin (Obr. 7,9).

BLVR je unikátní v tom, že má dvojitý pH optimum. Patří mezi vzácné kinázy se specifickou serin/threonin/tyrozin kinázovou aktivitou [82], která se uplatňuje v buněčné signalizaci, stejně jako v modulaci exprese *HMOX1* [83-85]. V buněčné signalizaci díky aktivitě podobné proteinkináze B/Akt uvádí v činnost proteinkinázu C [86]. To poukazuje na možné využití katabolické dráhy hemu u onkologických onemocnění [87, 88].

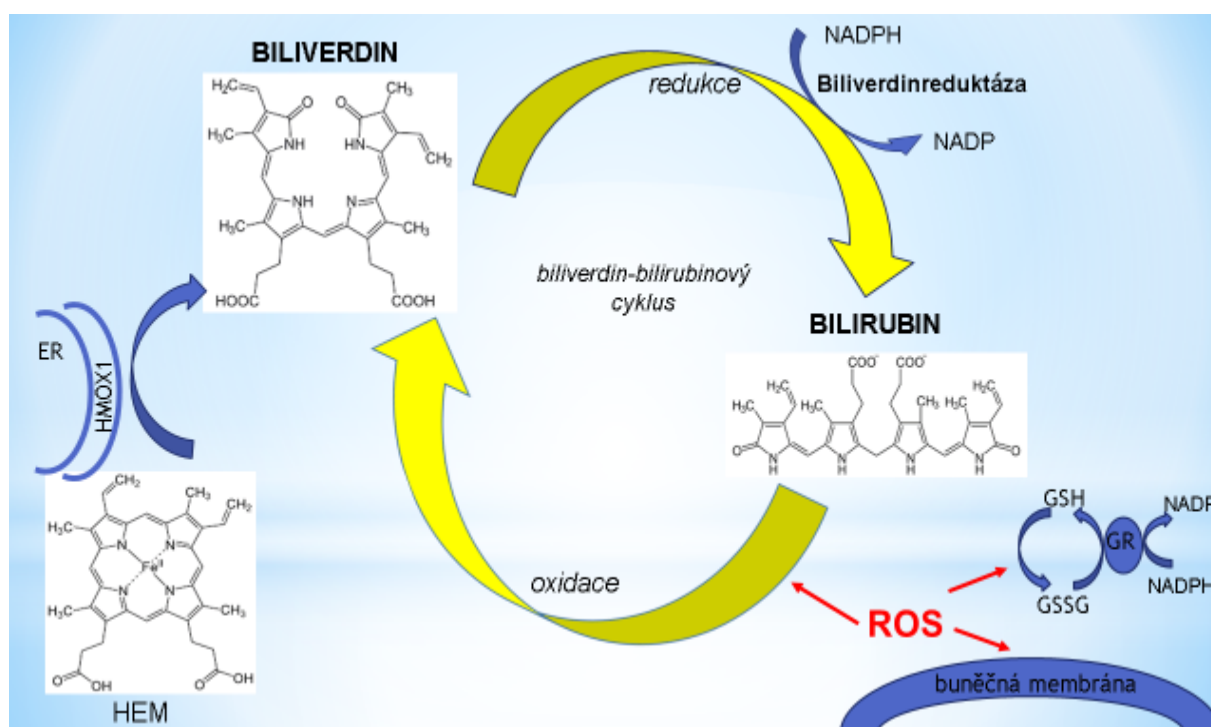
BLVR je lokalizována i na buněčném povrchu makrofágů. Biliverdin zprostředkovává buněčnou signalizaci přes PI3K/Akt dráhu a potlačuje tvorbu zánětlivých cytokinů [89]. BLVR je také schopna autofosforylace. Za podmínek zvýšeného oxidačního stresu zvyšuje svoji katalytickou aktivitu a vede k větší produkci bilirubinu [82, 90]. Tím poskytuje buněčným membránám antioxidační ochranu stejně jako glutathion či glutathionreduktáza [91].

Ačkoli je BLVR především cytosolový enzym, je možná i její translokace do buněčného jádra, kde působí jako transkripční faktor [92]. Některé experimentální práce poukazují na velký terapeutický potenciál tohoto enzymu. Například subkutánní podání BLVR potkanům vedlo ke zmírnění autoimunitní encefalomyelitidy, a to dokonce efektivněji než po podání tradičních enzymů, jako jsou např. superoxid dismutáza, kataláza, glutathionreduktáza [93]. Další práce prokázaly, že při buněčném deficitu BLVR došlo k významnému nárůstu ROS a snížení viability buněk až o 60 % [94]. Protektivní vliv BLVR byl popsán i v dalších experimentálních pracích na modelech nemocí gastrointestinálního traktu [95], ledvin [96] či nervového systému [97]. Využití katabolické dráhy hemu lze najít i u onkologických onemocnění [87, 88].

### 1.4.4. Biliverdin-bilirubinový cyklus

Tento cyklus přeměny tmavě zeleného pigmentu biliverdinu na bilirubin je pravděpodobně velmi starý. Biliverdin se nachází již u prvotních organismů, zatímco přítomnost bilirubinu zde chybí [98]. Biliverdin neprostupuje přes placentární bariéru, pokud by tomu tak bylo, mohlo by docházet k jeho akumulaci a toxickému poškození plodu [99, 100]. Naproti tomu bilirubin je transportu přes placentární bariéru schopen nejen prostou difúzí, ale i prostřednictvím specifických transportních mechanismů [101]. Vlivem vývoje došlo ke vzniku cyklu, který vykazuje významný oxidačně-redukční potenciál. Tím se vysvětluje spojitost mezi bilirubinem a eliminací volných kyslíkových radikálů [82, 91] (Obr. 9).

**Obr. 9: Biliverdin – bilirubinový cyklus**



**Obr. 9: Biliverdin-bilirubinový cyklus.** Při oxidačně redukční reakci dochází v prvním kroku prostřednictvím BLVR k redukci zeleného tetrapyrolu, biliverdinu na bilirubin. V další fázi následuje oxidace bilirubinu zpět na biliverdin. V této fázi do reakce vstupují i ROS, pro které je bilirubin donorem elektronů a tím neutralizuje jejich ničivé účinky na biologické struktury. I přesto, že biliverdin-bilirubinový cyklus obsahuje mikromolární množství substrátů, je důležitou oxidačně–redukční reakcí stejně jako je redukce ROS v rámci působení glutathionreduktázy. Legenda: ROS –reactive oxygen species, GSH–redukováný glutathion, GSSH –oxidovaný glutathion, ER –endoplazmatické retikulum, HMOX1 –hemoxygenáza 1. Upraveno podle ref. [82].

V cirkulaci se bilirubin vyskytuje v mikromolárních koncentracích. Za antioxidační účinky bilirubinu odpovídá jeho struktura, C10 methylenová skupina, která slouží ve tkáních a plazmě jako donor elektronů pro ROS [51, 57]. Současně je bilirubin i silným inhibitorem NADPH oxidázy. Enzym NADPH oxidáza je zdrojem oxidantů nejen ve fagocytárních, ale i nefagocytárních buňkách. V řadě studií prováděných *in vitro* či *in vivo* byl prokázán inhibiční vliv bilirubinu na NADPH oxidázu [102-104]. Protizánětlivé působení bilirubinu je komplexní. Díky své regeneraci v rámci biliverdin-bilirubinového cyklu, je schopen eliminovat až 10 000x větší množství peroxidu vodíku [82, 105].



U normobilirubinemických jedinců se bilirubin podílí asi na 10 % celkové antioxidační kapacity séra [106]. Ve studii u jedinců s Gilbertovým syndromem (GS) bylo prokázáno, že vyšší koncentrace nekonjugovaného bilirubinu v séru výrazně zvyšují antioxidační kapacitu séra [86, 107].

## 1.5. Bilirubin

Bilirubin, hlavní žlučový pigment, je v intravaskulárním kompartmentu konečným produktem metabolismu hemu. Po chemické stránce patří mezi lineární tetrapyrolové sloučeniny. Bilirubin byl dlouhou dobu považován za nebezpečnou látku, zejména z důvodu toxického poškození centrálního nervového systému (CNS) [108, 109]. Nový pohled na tuto molekulu přinesla práce, ve které byla poprvé zmíněna antioxidační vlastnost bilirubinu [51]. Další práce prokázaly, že mírná elevace sérových koncentrací bilirubinu má pro lidský organismus významný ochranný účinek [110]. Tento protektivní vliv se nejvíce uplatňuje u chorob spojených s vyšším oxidačním stresem, jako jsou nemoci kardiovaskulární [111], některé nádorové choroby [112, 113], onemocnění zánětlivá [114], revmatologická [115] či neuropsychiatrická [116].

Naopak nižší koncentrace bilirubinu jsou spojeny s vyšším rizikem vzniku chorob podmíněných zvýšeným oxidačním stresem. Podle teorie reverzní kauzality dochází u nemocí spojených s vysokým oxidačním stresem ke zvýšené spotřebě antioxidačně působících látek, včetně bilirubinu [117]. Kromě zvýšené spotřeby antioxidantů jsou sérové koncentrace bilirubinu určeny geneticky aktivitou UGT1A1 [118], částečně i aktivitou HMOX1 [119].

### 1.5.1. Historie

Slovo bilirubin je odvozeno od latinského slova *bilis* (žluč) a *ruber* (červený). První zmínku o struktuře bilirubinu publikoval v roce 1847 Rudolf Virchow [120]. V prokrvácených tkáních našel krystaly červeného pigmentu, které nazval hematoidinem. Až o téměř 20 let později, Gustav Städeler nazval tmavě červený pigment bilirubinem. Vyslovil hypotézu, že bilirubin vzniká z hemu a že žluté zbarvení kůže a sliznic u pacientů s jaterními chorobami je dáno zvýšenými koncentracemi bilirubinu. V roce 1883 byla nositelem Nobelovy ceny Paulem Ehrlichem popsána diazoreakce bilirubinu [121]. Na základě této reakce byla později van den Berghem a Müllerem potvrzena existence dvou frakcí bilirubinu. Nekonjugovaného bilirubinu, reagujícího s diazočínidlem za přítomnosti alkoholu, a bilirubinu konjugovaného, který reaguje v diazoreakci přímo [122].

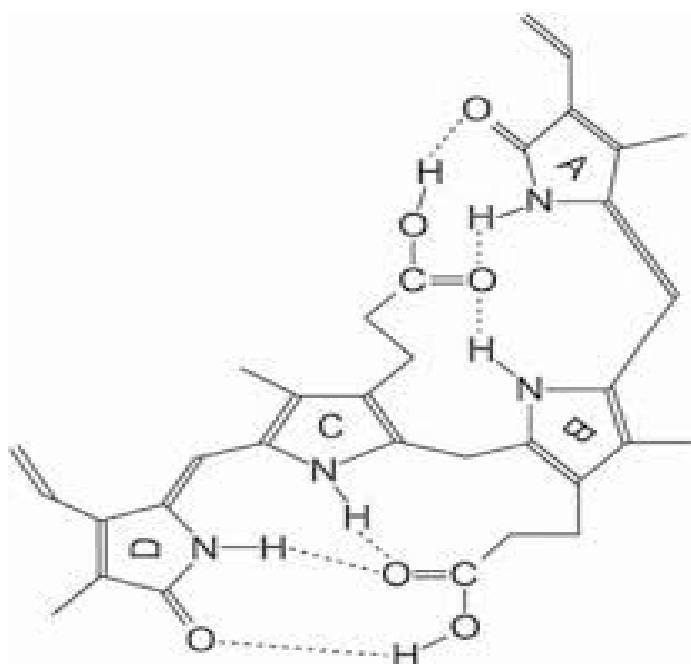
V roce 1933 určil laureát Nobelovy ceny Hans Fischer strukturu bilirubinu a později jej poprvé syntetizoval [123, 124]. Na dalším významném kroku se kromě kolegů R. Schmidta, B. Billingové podílel i brněnský vědec E. Talafant. Ti nezávisle na sobě popsali biotransformační proces bilirubinu v játrech, tzv. glukuronosylaci, konjugaci bilirubinu s kyselinou glukuronovou [125]. Později, v 70. letech minulého století, byl členem skupiny R. Schmidta R. Tenhunenem (1968) popsán zásadní enzym katabolické dráhy hemu, HMOX [126]. O dva roky později (v roce 1970) byl publikován článek o existenci BLVR [127]. Zásadní změnu ve vnímání degradačních produktů katabolické dráhy hemu přinesly až pozdější práce. Ty poukazují na možnosti využití těchto molekul v buněčné signalizaci [128] či jako potentní antioxidanty lidského séra [51]. Od té doby zkoumá řada světových laboratoří degradační dráhu hemu a vliv jejích produktů na fyziologické a patofyziologické procesy. Zde nesmíme opomenout důležitou osobnost české vědy prof. M. Jirsu staršího, který jako první publikoval chemickou strukturu konjugátu bilirubinu s taurinem [129].

### 1.5.2. Chemická struktura bilirubinu

Bilirubin se v lidském organismu vyskytuje v tzv. formě 4Z,15Z IX $\alpha$ . Ta je složena ze dvou dypyridinových podjednotek protoporfyrinu IX (dvojná vazba na uhlíku C4 a C15). Lipofilní charakter bilirubinu je dán jeho konformací tvořenou intramolekulárními vodíkovými můstky mezi kyselinou propionovou na pyrolových kruzích B a C a polárními skupinami pyrolových kruhů D a A (Obr. 10) [130].

Konstituční izomery bilirubinu IX  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  se od izomeru 4Z,15Z liší odlišným místem štěpení hemu. Ztrácí tím možnost tvorby vodíkových můstků a lipofilitu. Jsou tedy více polární a jejich exkrece je možná bez nutnosti konjugace s kyselinou glukuronovou [131]. Za nejpolárnější izoformu bilirubinu lze považovat jeho konfigurační izomery, které se vlivem fotooxidace mění na relativně stabilní molekuly (lumirubin). Této možnosti přeměny bilirubinu na polární molekulu se využívá i v klinické praxi, při fototerapii novorozenecké žloutenky [132].

### Obr. 10: Prostorové uspořádání bilirubinu



**Obr. 10: Prostorové uspořádání bilirubinu.** *Nejstabilnější uspořádání molekuly bilirubinu IXa, zobrazeny polární skupiny kruhů A a D, pyrrolové kruhy B a C s karboxylovými skupinami.*

V séru/plazmě můžeme rutinním laboratorním vyšetřením detekovat jednotlivé frakce bilirubinu. Podle toho, zda je již bilirubin po konjugaci s kyselinou glukuronovou jej lze dělit:

- Bilirubin nekonjugovaný** – je molekulou nepolární, k transportu do jater využívá vazbu nejčastěji s albuminem (viz dále). Jeho koncentrace je stanovena jako rozdíl celkového a přímého bilirubinu. Za nekonjugovaný bilirubin lze za běžných podmínek, kdy je v cirkulaci jen zanedbatelné množství konjugovaného bilirubinu, považovat koncentrace celkového bilirubinu.
- Bilirubin konjugovaný** - vzniká po konjugaci s kyselinou glukuronovou v hepatocytech, je molekulou polární a je sekretován do žluče. Za fyziologických podmínek jsou koncentrace v séru/plazmě zanedbatelné a i uváděné fyziologické meze do 5 % koncentrací celkového bilirubinu jsou dány většinou falešnou pozitivitou přímé diazoreakce [133, 134]. Konjugovaný bilirubin je tvořen diesterem bilirubinu s kyselinou glukuronovou, v menší míře jsou zastoupeny monoestery a dále estery s glukózou a s xylózou. Za podmínek déletrvající cholestázy se v cirkulaci vyskytuje i tzv. delta-bilirubin, který je vázán na albumin kovaletní vazbou. Vzniká transesterifikací glukuronosyl bilirubinu, nevylučuje se do moči a v diazoreakci reaguje přímo.

V rutinní klinické praxi je bilirubin stanovován na automatických analyzátoch využívajících fotometrické stanovení azoderivátu bilirubinu [135, 136]. Principem této metody, je reakce bilirubinu s diazotizovanou kyselinou sulfanilovou v kyselém prostředí, která probíhá v případě konjugovaného bilirubinu přímo, nebo v případě nekonjugovaného bilirubinu až po přidání akcelérátoru (nejčastěji alkohol, kofein, aceton) [137].

### 1.5.3. Koncentrace bilirubinu v krevním séru

Stanovení referenčních mezí rutinních analytů používaných v klinické medicíně má zcela zásadní diagnostický význam. I přes teoretické kvalitativní požadavky na kvalitu jsou referenční meze některých analytů opřeny o jen konsensuální rozhodnutí lékařských společností [138] nebo populační studie s otaznou validitou [139-141]. Koncentrace analytu se mění za různých podmínek (např. dětství, těhotenství, stáří, vliv životního stylu), ale liší se i v jednotlivých etnických skupinách či podle pohlaví a toto zcela platí i pro systémové koncentrace bilirubinu.

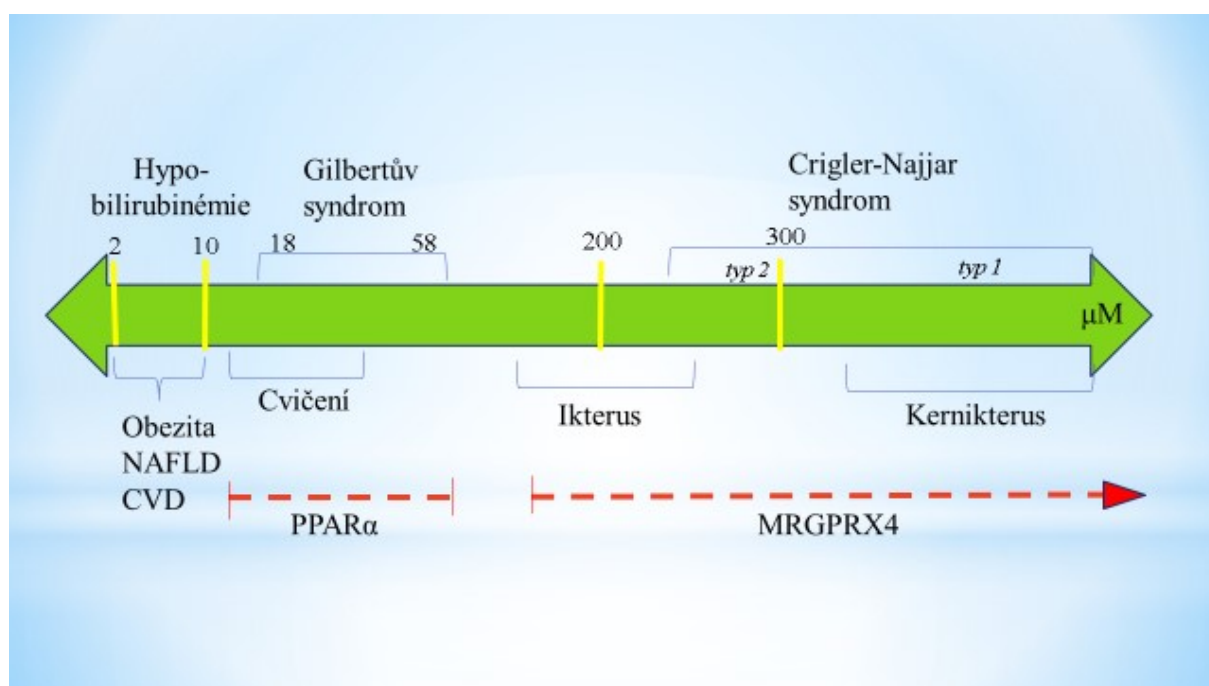
Systémové koncentrace bilirubinu jsou skutečně ovlivněny řadou proměnných. Například u žen jsou koncentrace bilirubinu až o 30 % nižší, což je dáno vlivem estrogenů, které snižují aktivitu enzymu bilirubin UDP-glukuronosyltransferázy (*UGT1A1*, *OMIM No. \*191740*) [112, 142, 143]). Ženy s prokázaným GS mají i nižší koncentrace nekonjugovaného bilirubinu oproti mužům s GS a některé skupiny žen by dokonce mohly být podle stávajících referenčních mezí klasifikovány jako normobilirubinemické, i proto by koncentrace bilirubinu měly být adjustovány na pohlaví [144]. Ve studiích by měl být kladen důraz i na věk (koncentrace bilirubinu se snižují s věkem [145]) a také etnický původ (nižší jsou koncentrace u evropské a americké populace, nejvyšší jsou v čínské populaci [141, 146]). Koncentrace se mohou měnit i během dne (odpolední měření jsou až o 30 % nižší než ranní vrchol bilirubinémie [147]) dokonce i v závislosti na ročním období (v japonské práci byly zaznamenány nižší koncentrace v zimě ve srovnání s létem [148]). Další faktory, které ovlivňují systémové koncentrace bilirubinu, mohou být spojeny se životním stylem. Jedná se např. o dietní zvyklosti [144, 149], příjem alkoholu [150], fyzickou aktivitu [151, 152], chronická onemocnění [58, 153], nebo kouření [154]. Ani vliv medikace není nevýznamný. Například léčba běžně dostupnými a často užívanými nesteroidními antirevmatiky nebo hypolipidemiky může u některých jedinců vést k mírné elevaci systémových koncentrací bilirubinu [144]. Opačný efekt byl zjištěn při léčbě hormonálními kontraceptivy, kde byl až 30 % pokles koncentrací bilirubinu [155]. V úvahu je nutné vzít i další faktory (preanalytické i analytické) [141].

Stanovení referenčních mezí pro bilirubin je tedy velmi složité. Řada klinických laboratoří proto vychází z doporučení, která jsou dána výrobcí jednotlivých testovacích sad [140]. Ty se ve svých manuálech opírají o data, která vychází z malých skupin testovaných (většinou cca 100-200 osob), ale bližší informace o metodice již k dispozici nejsou [156]. Dosud používané referenční meze by tedy měly být v mnoha případech znovu přehodnoceny, a to nejen pro jednotlivé populace, ale zvláště i muže a ženy.

Jaké jsou tedy fyziologické koncentrace bilirubinu v krevním séru/plazmě na základě dostupných dat? Rozložení bilirubinu má v populaci bimodální charakter, který je dán prevalencí GS [141, 157]. Obecně, je za medián systémových koncentrací bilirubinu považována koncentrace kolem 10  $\mu\text{mol/l}$ , průměrné koncentrace jsou mírně nižší [158]. Za fyziologické systémové koncentrace bilirubinu se běžně udává rozmezí 3–20  $\mu\text{mol/l}$ , koncentrace konjugovaného bilirubinu jsou v séru/plazmě za fyziologických podmínek zanedbatelné a neměly by přesahovat 3-5 % celkového bilirubinu [134]. Rozložení koncentrací bilirubinu včetně jejich výstupů v klinické praxi dobře ukazuje práce Creedona *et. al.*, (Obr. 11). Je zřejmé, že udávaná rozmezí koncentrací bilirubinu v krevním séru/plazmě jsou příliš široká, obzvláště když i jen mikromolární změna v koncentraci bilirubinu je spojena se změnou rizika nejen kardiovaskulárního ale i metabolického [159]. Toto dokládají i další studie, kdy například v britské studii zahrnující muže středního věku byly sérové koncentrace bilirubinu pod 7  $\mu\text{mol/l}$  spojeny s 30 % vzestupem relativního rizika koronární příhody v porovnání s muži, jejichž koncentrace bilirubinu byly mezi 8 a 9  $\mu\text{mol/l}$  [160]. Naopak vzestup koncentrací bilirubinu o 1  $\mu\text{mol/l}$  redukuje riziko rozvoje diabetes mellitus u mužů o 11 % [161].

V naší práci byly za referenční meze považovány koncentrace bilirubinu v krevním séru/plazmě 3-17  $\mu\text{mol/l}$ . Data se opírají o údaje užívané laboratoří Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (ÚLBLD 1. LF UK a VFN) [162]. Pojem bilirubin označuje v naší práci koncentrace bilirubinu v krevním séru/plazmě (součet konjugovaného a nekonjugovaného bilirubinu za předpokladu, že konjugovaný bilirubin nepřesáhl 5 % z celkové koncentrace bilirubinu – do studií tedy nebyli zařazeni jedinci s konjugovanou hyperbilirubinemií).

**Obr. 11: Koncentrace bilirubinu a klinické implikace**



**Obr. 11: Koncentrace bilirubinu.** Zleva doprava jsou znázorněny koncentrace bilirubinu a jejich možné biologické dopady na organismus. Koncentrace bilirubinu mezi 2-10  $\mu\text{mol/l}$  jsou označovány jako hypobilirubinémie a jsou asociovány s obezitou, NAFLD či kardiovaskulárními nemocemi. Fyzická aktivita může vést k elevaci koncentrací bilirubinu (14- 40  $\mu\text{mol/l}$ ). Bilirubin působí i jako hormonální látka, a to díky jeho vazbě na nukleární receptor  $\text{PPAR}\alpha$ , který aktivuje transkripci genů v hepatocytech (FGF21, CYP4A) a adipocytech (UCP1, ADRB3) s následnou aktivací mechanismů zprostředkujících  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Při vyšších koncentracích bilirubinu dochází k aktivaci MRGPRX4 receptoru se změnami neuromuskulárního dráždění, při koncentracích extrémních se pak uplatňují i účinky neurotoxické. Upraveno podle ref. [159].

Legenda:  $\text{PPAR}\alpha$  – peroxisome proliferator-activated receptor alfa, NAFLD – non-alcoholic fatty alcoholic liver disease, CVD – kardiovaskulární onemocnění, MRGPRX4- Mas-Related G-protein coupled member X4, FGF21 – fibroblast growth factor-21, CYP4A- cytochrome P 450 izoenzym 4A, UCP1- uncoupling protein 1, ADRB3- Beta-3 adrenergic receptor.

#### 1.5.4. Transport bilirubinu v systémovém řečišti

Jak je uvedeno výše, nekonjugovaný bilirubin je hydrofobní molekulou. Jeho transport v cirkulaci je umožněn vazbou na albumin [163]. Vazebnou schopnost bilirubinu mají i některé další molekuly jako jsou apolipoprotein D v molekule HDL lipoproteinu [164], nebo

$\alpha$ 1-fetoprotein (AFP) v časném neonatálním období [165]. Albumin je pro transport nekonjugovaného bilirubinu specificky vybaven. Na svém povrchu má celkem tři vazebná místa, na která je nekonjugovaný bilirubin vázán prostřednictvím  $\epsilon$ -aminoskupin dvou lysinů [166, 167]

Za fyziologických koncentrací v séru (kolem 40 g/l) je albumin schopen vázat nekonjugovaný bilirubin až do koncentrací 600  $\mu$ mol/l. Tato hodnota, mnohonásobně převyšuje fyziologické koncentrace nekonjugovaného bilirubinu v séru [168, 169]. Vazba mezi nekonjugovaným bilirubinem a albuminem není zcela specifická, bilirubin může z vazby albuminu relativně snadno disociovat. Vazebná místa albuminu mohou být obsazena jinými látkami (například mastnými kyselinami nebo lipofilními léky). Pevnost vazby mezi nekonjugovaným bilirubinem a albuminem klesá při acidóze nebo účinkem některých léků, sulfonamidů [163]. Vyvázání nekonjugovaného bilirubinu z molekuly albuminu vede k vzestupu koncentrace volné frakce (Bf, bilirubin free) [169]. Za fyziologických podmínek je množství volné frakce bilirubinu zcela zanedbatelné (méně než 0,01 % z celkové koncentrace bilirubinu). Tento volný bilirubin je schopen prostupovat do buněk a v nich alterovat fyziologické funkce. Z experimentálních prací vyplývá, že Bf ovlivňuje nejen dýchací řetězec mitochondrií, ale inhibicí kináz blokuje i intracelulární signalizační dráhy a spouští apoptózu buněk [170]. Nezanedbatelné jsou cytotoxické účinky na nervovou soustavu [171, 172].

### 1.5.5. Jaterní metabolismus bilirubinu

Po uvolnění nekonjugovaného bilirubinu z vazby na albumin je v dalším kroku transportován do hepatocytu. Tento přenos je umožněn aktivně prostřednictvím transportéru ze skupiny přenašečů pro organické ionty (OATP, organic anion transport proteins), konkrétně z rodiny OATP1A1 a OATP1B1 [173]. Předpokládá se, že tento aktivní transport je funkční při nízkých koncentracích Bf ( $\leq 40$ -50 nM). Pokud koncentrace Bf vzroste, je transport nekonjugovaného bilirubinu přes sinusoidální pól hepatocytů umožněn patrně i prostou difúzí [163, 174].

Hlavní postavení mezi OATP transportéry zaujímá přenašeč OATP1B1 (či také označován OATP2, SLCO1B1, OMIM No. \*604843) a OATP1B3 [175]. Tyto transportéry jsou kódovány geny *SLCO1A1* a *SLCO1B3* [176]. Právě mutace v obou alelách těchto genů zodpovídají za sníženou aktivitu transportních proteinů OATP1B1 a OATP1B3, což je molekulární podstatou Rotorova syndromu [177].

Tytéž transportéry se kromě transportu nekonjugovaného bilirubinu podílí i na clearance a detoxikaci jiných endogenních i xenogenních látek, jako jsou například nekonjugované

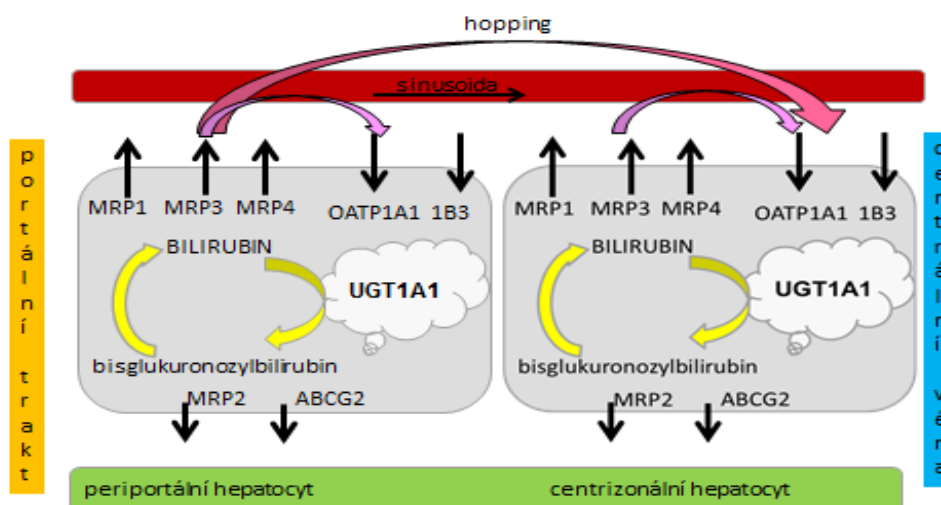
žlučové kyseliny [178], porfyriny [179, 180], steroidní hormony [180], radiofarmaka nebo thyroïdální hormony. Z řad medikamentů je nutné zmínit makrolidová antibiotika [181], statiny [182], metotrexát a jiné [183].

V experimentu bylo na myším modelu prokázáno, že proteiny OATP1B1/B3 jsou v hepatocytech zodpovědné také za zpětné vychytávání konjugátů bilirubinu, zatímco protein MRP3 zprostředkovává sekreci těchto konjugátů zpět do sinusoidální krve [177, 184]. Tento jaterní cyklus se odehrává jak v periportálních tak i v centrizonálních hepatocytech (Obr. 12). A stejným mechanismem dochází z periportálních do centrizonálních hepatocytů k přesunu nejen konjugovaného bilirubinu, ale i dalších, výše zmíněných substrátů [185].

Tento tzv. hopping bilirubinu je důležitý z několika důvodů:

1. zvyšuje celkovou sekreční kapacitu jater pro bilirubin
2. chrání periportální hepatocyty před toxickým účinkem endogenních látek i resorbovaných xenobiotik či jejich konjugátů [186].

**Obr. 12: Schéma jaterního cyklu konjugovaného bilirubinu**



**Obr. 12: Hepatocytární hopping konjugovaného bilirubinu.** Degradací hemu vzniká nekonjugovaný bilirubin, který je transportován portálním systémem ve vazbě na albumin. Po vstupu do hepatocytů dochází k jeho konjugaci s kyselinou glukuronovou. Mikroenzym UGT1A1 zprostředkovává přenos glukuronosylu z UDP-glukuronátu na bilirubin za vzniku mono či bisglukuronosyl bilirubinu, které jsou sekretovány do žluče. Tento transport je umožněn aktivně prostřednictvím transportéru MRP2 (multidrug resistance protein 2),



*v menší míře také transportérem ABCG2. Za fyziologických podmínek je podstatná část konjugovaného bilirubinu díky MRP3 transportéru navracena zpět do sinusoidální krve, odkud je znovu přenesena do hepatocytů po směru toku prostřednictvím transportních proteinů OATP1B1 a OATP1B3 (Oatp1a a Oatp1b u myši). Tato smyčka sekrece a zpětného vychytávání může zabránit saturaci biliární exkrece v periportálních hepatocytech, a tím zajistit účinnou biliární eliminaci a detoxikaci hepatocytů. Analogický proces platí pro mnoho léčiv konjugovaných v játrech. Upraveno podle ref. [187].*

### **1.5.6. Konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou**

Po přesunu do cytoplasmu hepatocytu je nekonjugovaný bilirubin navázán na intracelulární bílkoviny, označované jako proteiny Y (jaterní ligandin, patřící do skupiny glutathion-S transferáz) a Z (FABP1, fatty acid binding protein 1) [188]. Toto spojení zabraňuje zpětnému návratu nekonjugovaného bilirubinu do systémové cirkulace, stejně jako brání jeho vazbě na intracelulární membrány [189]. Protein Y přenáší nekonjugovaný bilirubin do hladkého endoplasmatického retikula, kde proběhne konjugace s kyselinou glukuronovou [190]. Transportní protein Z je jaterní izoformou cytoplasmatického proteinu FABP1, který hraje větší roli v metabolismu retinoidů a volných mastných kyselin než jako transportér nekonjugovaného bilirubinu [191, 192].

Nekonjugovaný bilirubin, asociovaný s endoplasmatickým retikulem, je stále molekulou nepolární. Aby byla umožněna jeho sekrece žlučí, je zapotřebí, aby byl transformován na polární formu. Této změny je dosaženo konjugací s kyselinou glukuronovou. Glukuronosylací se mění trojrozměrná struktura nekonjugovaného bilirubinu (uvolněním dvou vodíkových můstků a expozicí polárních skupin), na molekulu polární, ve vodě rozpustnou [193]. Konjugace nepřímého bilirubinu s kyselinou glukuronovou je katalyzována enzymem UGT1A1 [194]. Samotné konjugaci předchází enzymatická aktivace kyseliny glukuronové uridindifosfátem (UDP). Reakce probíhá na vnitřní straně endoplasmatického retikula, kde dochází k esterifikaci karboxylových skupin obou propionátů (C8 a C12). Celý proces od degradace hemu včetně konjugace je velmi rychlý a trvá přibližně 1-2 minuty. Výsledným produktem konjugační reakce je bisglukuronosyl bilirubin (cca 80 %). Za fyziologických podmínek tvoří hlavní formu konjugovaného bilirubinu ve žluči [195]. V malém množství vzniká monoglukosiduronát (10 %), jehož obsah ve žluči stoupá hlavně u kojenců, z důvodu nezralosti konjugačního systému [196], ale také u jedinců s GS (také viz dále) [197].

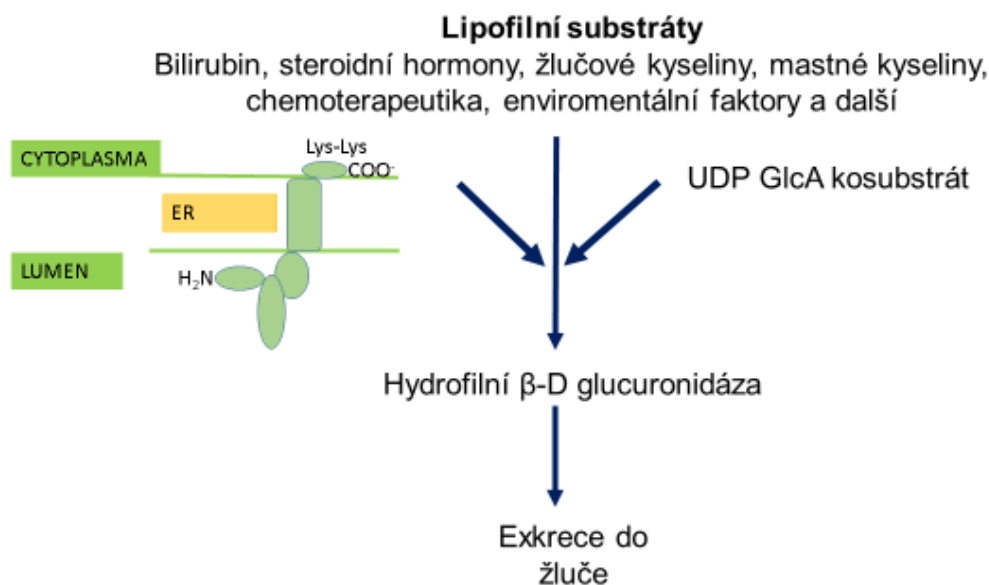
Ve stopových množstvích jsou ve žluči obsaženy i další konjugáty bilirubinu, jako například monoglukosidy, xylosidy a monoglukosyl-monoglukuronosidy.

#### 1.5.6.1. UDP–glukuronosyltransferázy

UDP-glukuronosyltransferázy (UGT) patří do skupiny konjugačních enzymů, které se podílí na konjugaci substrátu s kyselinou glukuronovou. Jedná se o fylogeneticky staré biotransformační enzymy [198], které byly nalezeny již u primitivních bakterií [199].

UGT jsou přítomny v hladkém endoplazmatickém retikulu, vzácněji je lze nalézt i v buněčném jádře. Nejvyšší koncentrace UGT se nachází v játrech, nezanedbatelné koncentrace byly popsány i v tenkém a tlustém střevě, v plicích, reprodukčních orgánech, mozku či ledvinách [200]. Jejich hlavním úkolem je transformace lipofilních molekul na polárnější sloučeniny, které jsou pak snáze eliminovány z organismu [200] (Obr. 13).

Obr. 13: Schéma glukuronosylace



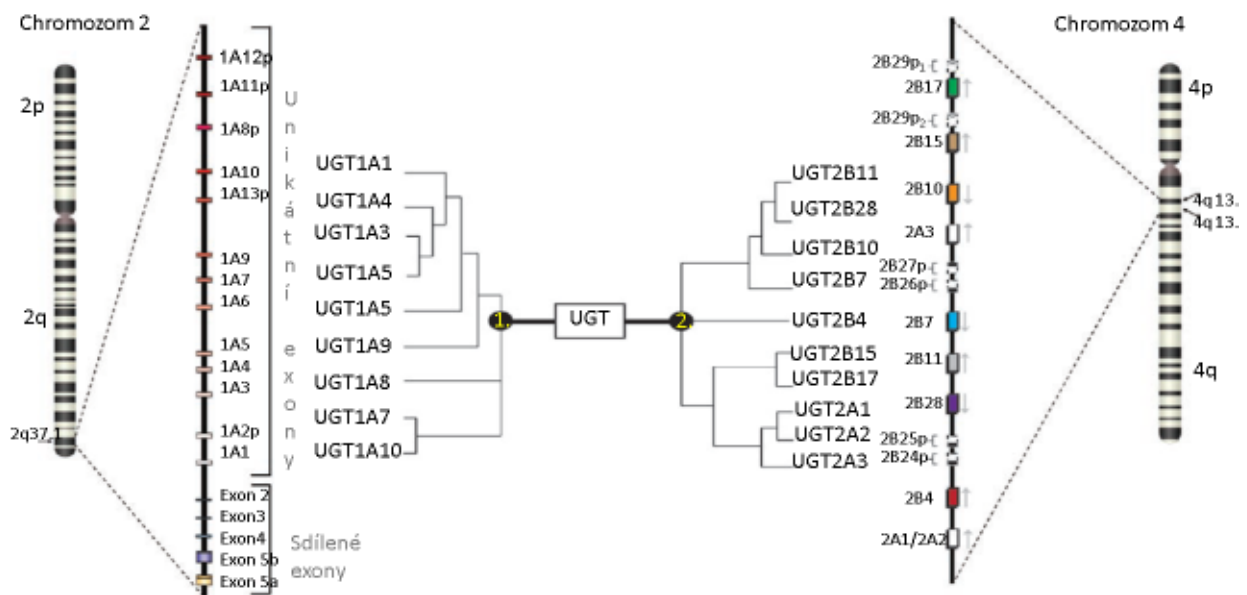
**Obr. 13: Konjugace s kyselinou glukuronovou.** UGT se podílí na eliminaci řady endogenních i exogenních látek. Enzymy jsou lokalizovány na vnitřní straně endoplazmatického retikula (ER). Konjugační reakce zahrnuje přenos kosubstrátu kyseliny UDP na hydrofobní molekulu vedoucí k tvorbě β-D-glukopyranosiduronových kyselin nebo derivátů glukuronidu. Vzniklá hydrofobní molekula je vyloučena do žluče. Upraveno podle ref. [200].

Genová superrodina UGT má svou nomenklaturu. Základem této nomenklatury je zkratka UGT, za kterou následuje číslo, které určuje příslušnost ke genové rodině. Další v pořadí je písmeno A nebo B, které patří podrodině. Následuje opět arabská číslice, která determinuje konkrétní gen [201]. UGT superrodinu je možné rozdělit do čtyř rodin – *UGT1*, *UGT2*, *UGT3*, *UGT8*, a ty se dělí na podrodiny: *UGT1A*, *UGT2A* a *UGT2B*, dále *UGT3A*, *UGT8A* [199]. Tyto podrodiny jsou kódovány více než 26 geny. Osmnáct z nich (zejména z podrodiny *UGT1A* a *UGT2*) kóduje funkční proteiny, zbytek tvoří pseudogeny.

### Rodina genu *UGT1*

Gen, který kóduje tuto podrodinu je vysoce polymorfní a nachází se na 2. chromozomu (*2q37.1*) [202-204]. Je složen celkem z pěti exonů. Jeden z nich je unikátní a další čtyři jsou touto skupinou sdíleny (Obr. 14) [205]. Do této skupiny patří celkem 13 genů.

**Obr. 14: Fylogram lidských proteinů *UGT1A* a *UGT2B* a uspořádání jejich genů na chromosomech 2 a 4**



*Upraveno podle ref. [205].*

Nejvíce prozkoumaným genem je *UGT1A1*, který se podílí na metabolismu bilirubinu. Dále se jedná o geny *UGT1A2P*, *UGT1A3-UGT10*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P*, *UGT1A13P*. Plně funkčních je jen 9 transkriptů, zbývající čtyři jsou pseudogeny (*UGT1A2P*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P* a *UGT1A13P*) [201].

## **Enzym UGT1A1**

Podílí se na biotransformaci celé řady endogenních i exogenních látek. Funkční mutace v genu *UGT1A1* mají za následek snížení aktivity enzymu UGT1A1 a vzestup koncentrací nekonjugovaného bilirubinu v séru [206, 207]. Do této skupiny familiárních nekonjugovaných hyperbilirubinemií se řadí Criglerův–Najjarův syndrom I. a II. typu, pro který je typické snížení či úplné vymizení aktivity UGT1A1 [208]. Jiná mutace v oblasti promotoru genu *UGT1A1* (tzv. TATA boxu) vede k dinukleotidové inzerci TA, což je molekulární podstatou GS v kavkazské populaci [111] (podrobněji viz níže).

### *Rodina genu UGT2*

Tato rodina se v genomu nachází na 4. chromozomu (*4q13*). Obsahuje 2 podrodiny – *UGT2A* (tři geny) a *UGT2B* (sedm genů a pět pseudogenů). Geny této rodiny obsahují celkem šest exonů. Jen vznik *UGT2A1* a *UGT2A2* se od zbytku rodiny liší [199].

### *Rodina genu UGT3*

Nachází se na 5. chromozomu (*5p13.2*) a skládá se ze dvou podrodin – *UGT3A1* a *UGT3A2*. Doposud nebyl zjištěn jejich klinický dopad [201].

### *Rodina UGT8*

Je zastoupena proteinem UDP-galaktosyltransferázou, která je kódována genem lokalizovaným na 4. chromozomu (*4q26*). Tento enzym katalyzuje vznik galaktosylceramidu [209].

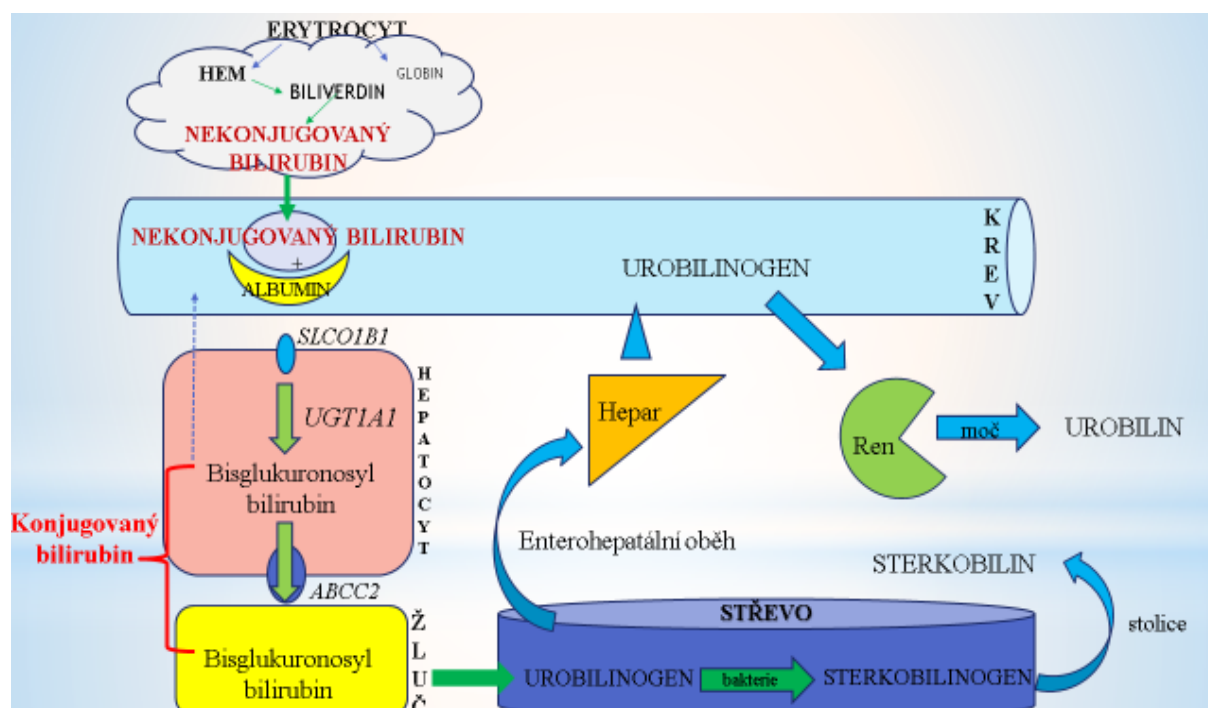
## **1.5.7. Sekrece bilirubinu do žluče**

Konjugovaný bilirubin je do žluče vylučován aktivně na kanalikulární membráně hepatocytů. Aktivní transport je umožněn prostřednictvím multispecifického transportéru organických aniontů ABCC2 (MRP2, multidrug resistance protein 2) [210] [207]. MRP2 se kromě sekrece konjugovaného bilirubinu podílí i na exkreci některých xenobiotik, organických iontů a glutathionu [175, 211]. Porucha tohoto transportního systému je příčinou konjugované hyperbilirubinémie. Jedná se o relativně vzácnou autosomálně recesivní poruchu metabolismu bilirubinu, která nese jméno podle svých objevitelů Dubina a Johnsona [212]. Ačkoliv zde nacházíme vyšší koncentrace nekonjugovaného bilirubinu, klinicky je Dubinův-Johnsonův syndrom považován za benigní a nevyžaduje žádnou léčbu. Dalším proteinem uplatňujícím se v transportu konjugovaného bilirubinu je i cytoskeletální protein radixin, který ukotvuje protein ABCC2 ke kanalikulární membráně [213].

### 1.5.8. Střevní metabolismus a exkrece bilirubinu

Hlavní eliminační cestou konjugovaného bilirubinu je trávicí trakt. Konjugovaný bilirubin se systémem intrahepatálních a extrahepatálních žlučovodů dostává do duodena. V oblasti tlustého střeva je dekonjugován enzymem  $\beta$ -glukuronidázou uvolněným z enterocytů a koliformních bakterií [214]. Vlivem působení střevních bakterií je nekonjugovaný bilirubin redukován na finální produkty tzv. urobilinoidy [215, 216]. Nejvýznamnější jsou urobilinogen a sterkobilinogen. Urobilinoidy podléhají další oxidaci a společně s nemetabolizovaným bilirubinem jsou vylučovány stolicí, které dodávají charakteristickou hnědo-oranžovou barvu. Za určitých podmínek je malé množství nekonjugovaného bilirubinu a částečně i urobilinoidů ze střevního lumen zpětně resorbováno a portálním oběhem transportováno zpět do jater a opětovně vyloučeno do žluče, hovoříme o tzv. enterohepatálním cyklu [169]. Denně se vyloučí u zdravého dospělého jedince stolicí přibližně 50 až 250 mg bilirubinu, což představuje 17-83 % jeho denní produkce [207, 217]. Schematické znázornění metabolismu bilirubinu je znázorněno na Obr. 15.

Obr. 15: Schéma metabolismu bilirubinu



Obr. 15: Schématické znázornění metabolismu bilirubinu. Uvolněný hem je prostřednictvím HMOX1 přeměněn na biliverdin, který je za přítomnosti BLVR katabolizován na bilirubin. Ten je molekulou nepolární a k transportu do jater využívá především vazby na albumin. OATP1B1 umožňuje vstup bilirubinu do hepatocytu, kde probíhá jeho konjugace s kyselinou glukuronou na polární molekulu. Konjugovaný bilirubin je transportérem MRP2 sekretován do žluče.

*V tlustém střevě je  $\beta$ -glukuronidázou dekonjugován a redukován na urobilinoidy. Upraveno podle ref. [218]*

### **1.5.9. Ikterus (žloutenka)**

Jako žloutenku označujeme stav, kdy dochází ke žlutému zbarvení sklér, kůže a sliznic. Příčinou je elevace sérových koncentrací bilirubinu nad 34  $\mu\text{mol/l}$ . Zvýšení hladin sérového bilirubinu nad 17  $\mu\text{mol/l}$  vede ke vzniku subikteru [219]. Jméno žloutenka bylo odvozeno od francouzského slova *jaundice*, které bylo poprvé užito u nemocných infikovaných virem žluté zimnice. Nesprávně se jako žloutenka označuje v běžné populaci virové onemocnění jater (hepatitida, „infekční žloutenka“), kde je ikterus důležitým symptomem.

Podle typu hyperbilirubinémie rozdělujeme poruchy metabolismu bilirubinu do třech skupin:

1. **nekonjugované hyperbilirubinémie** – nejčastěji v důsledku nadprodukce bilirubinu nebo jeho porušené konjugace v játrech
2. **konjugované hyperbilirubinémie** – v důsledku poruchy biliární sekrece konjugovaného bilirubinu nebo obstrukce žlučových cest
3. **smíšené hyperbilirubinémie** – kombinace obou přechodných typů (do této skupiny patří i hyperbilirubinémie z kardiálních příčin, např. při pravostranném srdečním selhávání)

Podle lokalizace poruchy metabolismu bilirubinu dělíme hyperbilirubinémie na prehepatální, hepatální a posthepatální [219].

#### *a) Prehepatální příčiny žloutenky*

Při tomto typu postižení dochází ke zvýšení sérových koncentrací nekonjugovaného bilirubinu. Nejčastější příčinou nadprodukce nekonjugovaného bilirubinu jsou hemolytické anémie, při kterých dochází ke zvýšenému rozpadu erytrocytů a degradaci hemu. Jedná se o membránové abnormality (např. sférocytóza) či enzymatické defekty erytrocytů, které zkracují dobu jejich životnosti (např. deficit glukóza-6-fosfátdehydrogenázy). K nekonjugované hyperbilirubinémii vedou nejen poruchy erytropoézy, ale také extravazace krve (např. velké hematomy). Menší množství nekonjugovaného bilirubinu vzniká

za normálních okolností i při rozpadu myoglobinu a cytochromů, za patologických okolností, např. při rhabdomyolýze může tento zdroj bilirubinu nabýt klinického významu.

#### b) *Hepatální příčina ikteru*

U tohoto typu poškození jaterní tkáně může docházet v krevním séru ke zvýšení konjugovaného i nekonjugovaného bilirubinu, eventuálně obou typů bilirubinu. Elevace nekonjugovaného bilirubinu je dána poruchou konjugace bilirubinu. Známý jsou tři typy vrozené nekonjugované hyperbilirubinémie způsobené deficiencí UGT1A1. Nejčastější z nich je GS (mutace v promotorové části genu *UGT1A1*), méně častěji diagnostikujeme Criglerův–Najjarův syndrom. Podle typu strukturální mutace některého z pěti exonů genu *UGT1A1* rozlišujeme typ I (prakticky nulová aktivita UGT1A1) či typ II (výrazný pokles enzymatické aktivity) [137]. Aktivita enzymu UGT1A1 může být snížena i vlivem jaterních zánětů, fibrózy nebo vlivem působení některých xenobiotik. Také u novorozenců je konjugací systém nezralý (viz níže). Méně častou příčinou tohoto typu bilirubinémie může být i porucha transportních přenašečů, zejména OATP1A1 a OATP1B1.

Konjugovaná, přímá, hyperbilirubinémie vzniká po konjugaci bilirubinu s kyselinou glukuronovou. Nelze opominout i méně časté, familiární příčiny poruchy konjugace, které jsou příčinou Rotorova a Dubinova-Johnsonova syndromu (viz výše).

#### c) *Posthepatální příčina ikteru*

Nejčastější příčinou je obstrukce žlučových cest. K obstrukci může dojít z příčin intrahepatálních ale i útlakem žlučovodů z okolních struktur. Nejčastěji je ikterus způsoben obturací toku žlučovými konkrementy, méně často tumorem. Z extrahepatálních příčin se jedná zejména o obstrukci v důsledku tumorů žlučových cest, žlučníku, hlavy pankreatu či edémem této oblasti při pankreatitidě.

### **1.5.9.1. Novorozenecká hyperbilirubinémie**

U novorozenců se v časném období běžně nacházejí vyšší koncentrace nekonjugovaného bilirubinu v séru, což se označuje termínem novorozenecká žloutenka. Koncentrace nekonjugovaného bilirubinu jsou v pupečnickové krvi kolem 30  $\mu\text{mol/l}$ , ale krátce po porodu (zpravidla třetí den) dochází k jejich elevaci a průměrně dosahují koncentrací kolem 100  $\mu\text{mol/l}$ . Za přibližně dva až tři dny dochází k poklesu nekonjugované bilirubinémie na poloviční koncentrace a 12. den jsou již srovnatelné s koncentracemi nekonjugovaného bilirubinu u dospělých [220-222].

Dle výsledků rozsáhlých epidemiologických studií se ukazuje, že hraniční, potenciálně toxickou hodnotou je u zralých a donošených novorozenců koncentrace nekonjugovaného bilirubinu 340  $\mu\text{mol/l}$  [221]. Při hodnotách vyšších se jedná o těžkou novorozeneckou hyperbilirubinémii [223]. Se zvyšujícími se koncentracemi nekonjugovaného bilirubinu stoupá i Bf, která je pro novorozence vysoce riziková. Bf proniká snadno do buněk, kde působí cytotoxicky. Významné nebezpečí představuje jeho průchod přes hematoencefalickou bariéru [170]. Postižení centrálního nervového systému (CNS) může vzniknout již krátce po narození. Během prvních týdnů se jedná o akutní bilirubinovou encefalopatii nebo vzniká postižení později při vleklém, chronickém zvýšení koncentrací nekonjugovaného bilirubinu. Nejzávažnějším typem postižení je tzv. jádrový ikterus (kernikterus), kdy dochází k ukládání nekonjugovaného bilirubinu do oblasti bazálních ganglií, hipokampu, mozečku a jader 4. mozkové komory. Klinicky se projevuje hypotonií, zvracením, hyperpyrexii a křečemi [224, 225]. Naštěstí je toto onemocnění v České republice velmi vzácné. Vyšší koncentrace Bf inhibují mitochondriální respiraci, blokují intracelulární signální dráhy a vedou k apoptóze buněk [226]. Podíl na toxických účincích má i množství albuminu. Nižší koncentrace albuminu vedou k nižší solubilizaci bilirubinu [174], a to vede ke zvýšení koncentrací potenciálně toxického Bf.

Z výsledků studií vyplývá, že novorozenci, u kterých byly zaznamenány vyšší koncentrace nekonjugovaného bilirubinu při nekomplikovaném průběhu žloutenky ( $\leq 340 \mu\text{mol/l}$ ) měli v neonatálním období v porovnání s novorozenci s nižší bilirubinémií snížený výskyt onemocnění spojených se zvýšeným oxidačním stresem [227, 228].

K léčbě novorozenecké žloutenky se využívá fotochemických vlastností molekuly bilirubinu. Při působení modrozeleného světla o vlnové délce 430-490 nm dochází k fotoizomerizaci nekonjugovaného bilirubinu na jeho polárnější izoformu 4Z,15E-bilirubin a následně lumirubin [229]. Lumirubin má poločas pouhé dvě hodiny a vylučuje se snadno do žluče a do moči, aniž by musel být konjugován s kyselinou glukuronovou. I přes široké použití této metody je potřeba opatrnosti, jelikož i fototerapie může mít i závažné nežádoucí účinky [230].



## 1.6. Biologické vlastnosti bilirubinu

První zmínka o antioxidačním vlivu bilirubinu se objevila již v roce 1954 [231]. Nicméně trvalo dalších 30 let, než byla tato teze definitivně přijata [51]. Dnes je bilirubin považován za jeden z nejdůležitějších antioxidantů lidského těla [232], který se významně podílí na celkové antioxidační kapacitě krevního séra [233, 234]. *In vitro* je jeho antioxidační vliv na oxidaci LDL v porovnání s vitamínem E až třicetkrát silnější [52, 235].

Mezi biologické účinky bilirubinu patří jeho supresivní vliv na imunitní systém [236], a to na všech úrovních: inhibuje činnost komplementu [6, 237], inhibuje funkci B-lymfocytů [238], ovlivňuje diferenciaci T regulačních lymfocytů [239]. Krom toho působí i protizánětlivě. Snižuje produkci prozánětlivě působících cytokinů, inhibicí Th lymfocytů vede ke snížení produkce TNF $\alpha$  [240]. Vyšší koncentrace bilirubinu negativně koreluje s hladinou C reaktivního proteinu (CRP) [241, 242], který má svůj význam i v procesu aterogeneze [243-245]. Důležitou úlohu hraje bilirubin i v endotelu. Prostřednictvím inhibice fosforylace intracelulárních signalizačních bílkovin a ovlivněním exprese endotelových adhezních molekul zabraňuje vzniku endoteliální dysfunkce [246, 247]. Významně redukuje oxidaci lipidů, včetně LDL cholesterolu [235, 248]. Podstatně zasahuje také do patogeneze nádorových [249], zánětlivých [250], autoimunitních chorob [251, 252]. Mechanismy anti-aterogenního působení bilirubinu jsou shrnuty v Tabulce 6.

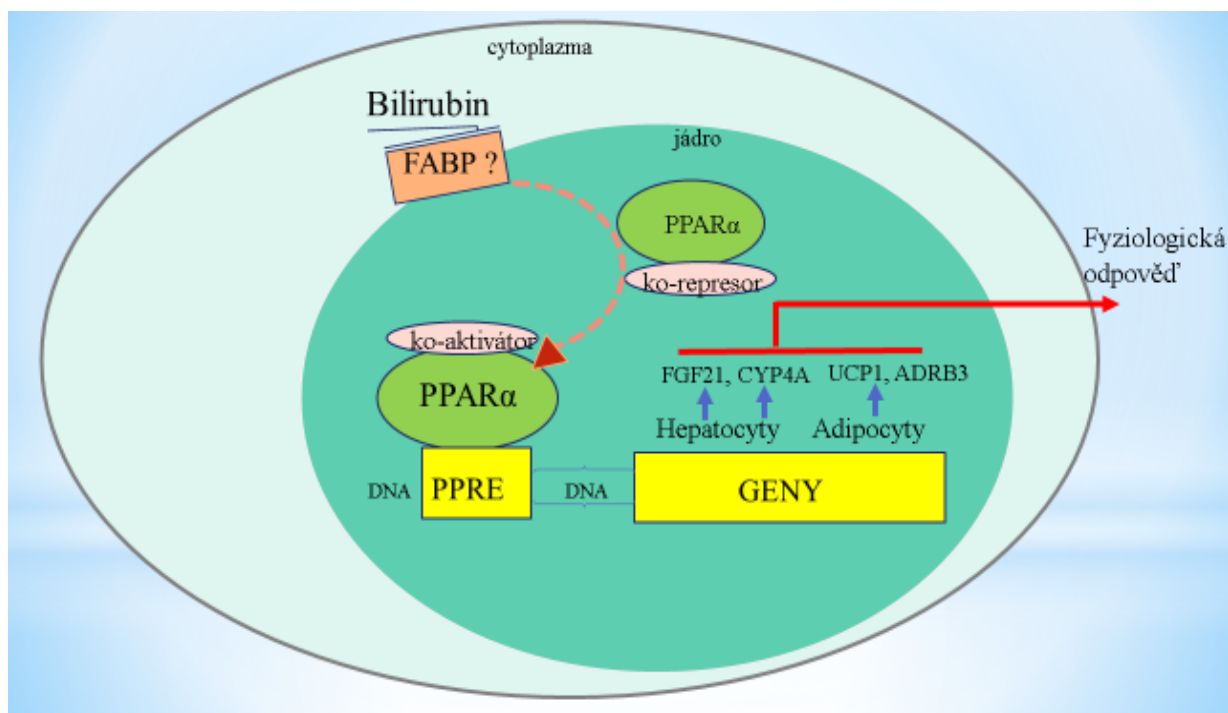
**Tab. 6: Biologické vlastnosti bilirubinu**

Místo působení	Účinek bilirubinu
<b>Cévní stěna</b>	↓ krevního tlaku ↑ arteriální elasticity ↑ koronární vazoreaktivitu
<b>Buněčná adheze</b>	↓ exprese VCAM-1/ICAM-1/E-selektinu ↓ transendotelové migrace leukocytů
<b>Metabolismus lipidů</b>	↓ LDL cholesterolu ↓ triacylglyceridů ↑ HDL cholesterolu
<b>Metabolismus sacharidů</b>	↑ inzulínové senzitivity ↓ inzulínové rezistence
<b>Hemostáza</b>	↓ aktivace a objemu trombocytů ↑ aPTT
<b>Oxidační stres</b>	↑ celkové antioxidační kapacity ↓ LDL oxidace a produkce AGEs
<b>Distribuce tuku</b>	↓ výskyt obezity a metabolického syndromu

*Upraveno podle ref. [253].*

Podle recentních dat se bilirubin podílí na intracelulární signalizaci a působí zde jako hormon (Obr. 16). Toto působení je umožněno jeho vazbou na specifický receptor v membráně hepatocytů. Poté, co je internalizován do jádra, aktivuje jako ligand specifické receptory, které se podílí na aktivaci transkripce specifických genů, které aktivují  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v mitochondriích. Jejich prostřednictvím dochází ke zlepšení inzulínové rezistence a redukci obezity [254, 255].

**Obr. 16: Schéma signalačního působení bilirubinu**

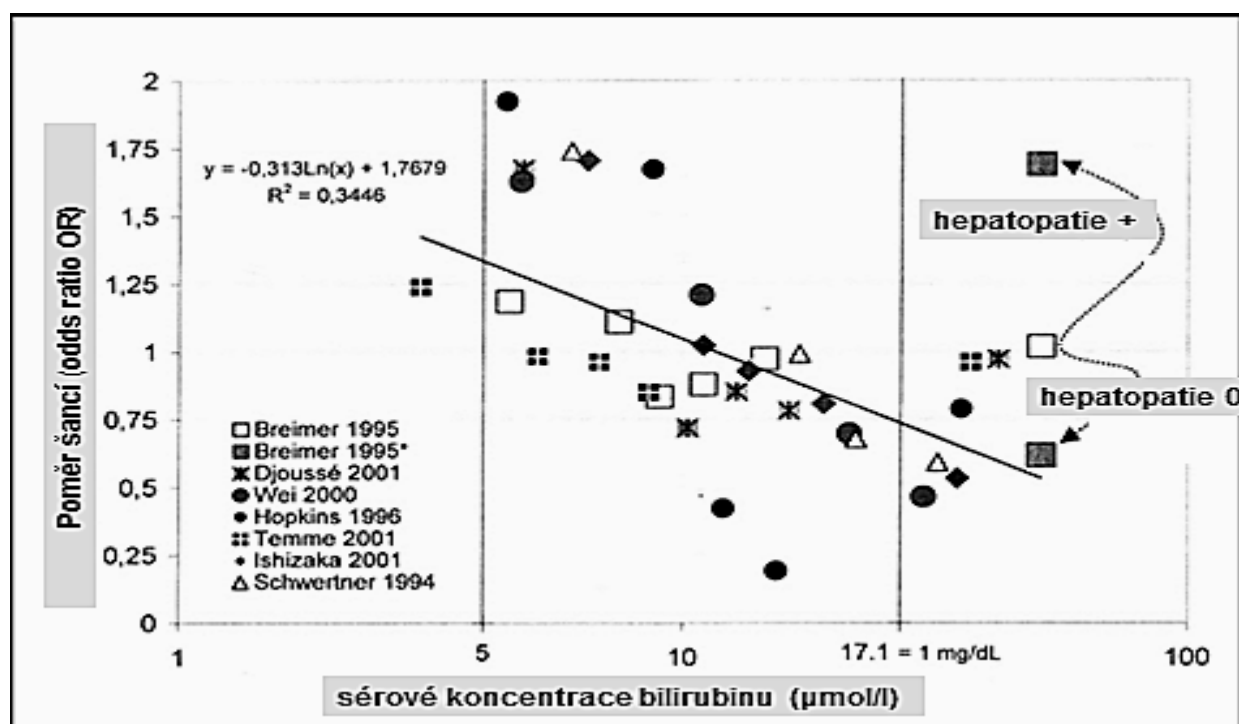


**Obr. 16: Buněčná signalizace bilirubinu.** Bilirubin vstupuje do jádra prostřednictvím jeho vazby na FABP receptor. V jádru dochází k jeho vazbě na PPAR $\alpha$  receptory a to vede ke změně ko-receptorových proteinů na ko-aktivátory a tím je umožněna vazba komplexu na rozpoznávací elementy v promotorové oblasti DNA příslušných genů. Tyto změny vedou v hepatocytech a adipocytech ke genové transkripci genů FGF21, CYP4A a UCP1 a ADRB3. Tyto geny aktivují „fat burning“ mechanismy v mitochondriích, dochází k aktivaci  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. Upraveno podle ref. [159]. Legenda: FGF21 –fibroblast growth factor 21, CYP4A- cytochrome P 450 izoenzym 4A, UCP1- uncoupling protein 1, ADRB3- beta-3 adrenergic receptor, PPAR $\alpha$ -peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , FABP- fatty acid binding protein, PPRE-peroxisome proliferator response elements, DNA-deoxyribonukleová kyselina.

### 1.6.1. Bilirubin a kardiovaskulární onemocnění

První studie, která poukázala na vztah mezi koncentracemi bilirubinu a koronární aterosklerózou, byla práce provedená na pilotech americké armády. Nízké koncentrace bilirubinu představovaly u těchto jedinců stejné riziko koronární nemoci jako nízké koncentrace HDL cholesterolu či vysoký krevní tlak [256]. Z výsledků rozsáhlé meta-analýzy vyplývá, že každé zvýšení koncentrací sérového bilirubinu o 1  $\mu\text{mol/l}$  je u mužů asociováno se snížením rizika vzniku kardiovaskulárních chorob až o 6,5 % (Obr. 17)[257]. Podobných výsledků bylo dosaženo také v prospektivně probíhající tchajwanské studii pacientů s mikrovaskulární anginou. U pacientů s nejnižšími sérovými koncentracemi bilirubinu byl vyšší výskyt nefatálního infarktu myokardu, ischemické cévní mozkové příhody či re-hospitalizace pro nestabilní anginu pectoris či nutnost intervenčního výkonu [258].

Obr. 17: Negativní vztah mezi sérovými koncentracemi bilirubinu a vznikem kardiovaskulárních chorob



Upraveno podle ref. [257].

Protektivní efekt mírně zvýšených koncentrací nekonjugovaného bilirubinu byl prokázán i u jedinců s GS, u kterých byla zjištěna nízká prevalence i 3-letá incidence ICHS, vyšší koncentrace HDL cholesterolu i celkové antioxidační kapacity krevního séra [234].

Ve shodě s těmito výsledky bylo v jiné studii zjištěno, že muži s velmi nízkými koncentracemi sérového bilirubinu (pod 7  $\mu\text{mol/l}$ ) mají až o 30 % vyšší kardiovaskulární riziko v porovnání s těmi, jejichž koncentrace bilirubinu jsou nad 10  $\mu\text{mol/l}$  [259].

Příčinou nízkých koncentrací může být genetická predispozice, nebo zvýšený oxidační stres, který vede ke konzumaci bilirubinu jako antioxidantu [244]. Nicméně je nutno zdůraznit, že protektivní vliv vyšších koncentrací bilirubinu se uplatňuje jen za splnění podmínky, že nejsou alterovány jaterní funkce. Vyšší koncentrace bilirubinu způsobené chronickými jaterními chorobami totiž žádnou protekci proti kardiovaskulárním onemocněním nepřinášejí, naopak jsou tato onemocnění prediktorem vyššího rizika aterosklerózy (Obr. 17) [260-262]. To je nutné brát v potaz nejen při posuzování epidemiologických studií, ale i při hodnocení individuálního rizika. Přestože většina provedených studií byla provedena převážně na mužské populaci (viz meta-analýza výše), protektivní vliv bilirubinu se uplatňuje, byť v menší míře, i u žen [263]. Příčinou jsou jednak fyziologicky nižší koncentrace sérového bilirubinu u ženské populace ale i nízký věk sledovaných jedinců ve studiích, s čímž souvisí kardiovaskulární riziko, neboť je známo, že u žen oproti mužům dochází k manifestaci kardiovaskulárních chorob spíše postmenopauzálně [263]. Protektivní vliv bilirubinu je tak mnohem lépe vyjádřen u mužů.

V odhadu rizika aterosklerotické kardiovaskulární příhody má role bilirubinu nezanedbatelný význam. V práci publikované v r. 2000 Schwertnerem a Fischerem bylo prokázáno, že pokud byly koncentrace celkového bilirubinu přidány do kombinace s koncentracemi lipidů, došlo ke zlepšení odhadu predikce aterosklerotické koronární příhody [264]. Bilirubin byl navržen jako doplňující rizikový faktor i do Framinghamského rizikového skóre [265] a tento algoritmus byl v roce 2005 patentován pro zpřesnění odhadu kardiovaskulárního rizika [266], nicméně v klinické praxi se tento vzorec neuplatnil. Vzhledem k limitacím tohoto skórovacího systému [267, 268] se dnes využívá více odhadu desetileté fatální aterosklerotické kardiovaskulární příhody podle tabulek SCORE, které jsou dnes designovány na jednotlivé populace (viz dříve) [269].

Protektivní účinek bilirubinu se nevztahuje jen na koronární řečiště. Negativní vztah mezi koncentracemi bilirubinu byl prokázán i u aterosklerotického postižení karotických tepen [158] či u pacientů trpících ischemickou chorobou dolních končetin [270]. Negativní trend je naznačen i u vzniku arytmií [271]. Další klinické důkazy poukazují na protektivní vliv bilirubinu s řadou zdánlivě heterogenních chorob, které jsou ale svými zánětlivými mechanismy spojeny s vysokým rizikem aterosklerotického postižení. Jedná se o chronickou

obstrukční pulmonální nemoc [272, 273], idiopatické střevní záněty [274], systémový lupus erythematodes [275], psoriázu [276] či preeklampsii [277].

### **1.6.2. Bilirubin a metabolický syndrom**

Koncentrace sérového bilirubinu vykazují negativní trend i s metabolickým syndromem. Tato spojitost byla prokázána jak na dospělé [278-282], tak i na dětské populaci [278]. Nízké koncentrace bilirubinu jsou prediktorem porušené inzulínové tolerance [283] včetně kardiovaskulárních komplikací [284, 285]. Nízké koncentrace bilirubinu byly u pacientů s diabetes mellitus 2. typu identifikovány jako důležitý prediktor kardiovaskulárních chorob [286]. Z rozsáhlé americké studie (NHANES) s téměř 16 000 jedinci vyplývá, že jedinci s koncentracemi bilirubinu nad 10  $\mu\text{mol/l}$  mají až o 20 % nižší riziko rozvoje diabetes mellitus, v porovnání s těmi, kteří mají koncentrace bilirubinu pod touto hranicí [287]. Na obdobné výsledky poukazuje i rozsáhlá korejská studie čítající 94 000 respondentů. Vyšší koncentrace bilirubinu byly spojeny s nižším rizikem diabetes mellitus a diabetické nefropatie [288], stejně tak diabetické retinopatie [289]. Podobný negativní vztah, existuje i mezi koncentracemi bilirubinu a výskytem abdominální obezity [278-280, 282]. Nicméně je nutné zdůraznit, že v případě úpravy životního stylu a při redukci hmotnosti dochází patrně v důsledku snížení oxidačního stresu k pozvolnému zvyšování koncentrací bilirubinu [290].

### **1.6.3. Bilirubin a nádorová onemocnění**

Bilirubin je důležitým prediktorem nádorové mortality [291]. Z výsledků experimentálních a také klinických prací vyplývá, že bilirubin má anti-mutagenní [292] a anti-genotoxické působení [293, 294].

Významná je v tomto ohledu rozsáhlá studie Zuckera *et al.*, která na populaci 177 milionů Američanů starších 17 let prokázala negativní vztah mezi koncentracemi bilirubinu a nedermatologickými nádory [145]. V této studii byly koncentrace nekonjugovaného bilirubinu nad 17  $\mu\text{mol/l}$  (odpovídající fenotypu GS) spojeny se čtyřnásobně nižším výskytem kolorektálního karcinomu [145]. Podobné výsledky ve vztahu bilirubinu a kolorektálního karcinomu prokázala i česká studie Jiráskové *et al.* [295]. Další významnou prací popisující protektivní vliv bilirubinu stran maligních tumorů je belgická retrospektivní studie na více než 11 000 jedincích obou pohlaví. Vyšší koncentrace sérového bilirubinu byly v této studii s nižší mortalitou na onkologická onemocnění, zejména u mužů [36]. Obdobná data pocházejí z Velké

Británie, kde na více než půlmilionovém vzorku britské populace byl prokázán negativní vztah bilirubinu ke vzniku bronchogenního karcinomu [296].

### 1.7. Gilbertův syndrom (syndrom benigní hyperbilirubinémie, GS)

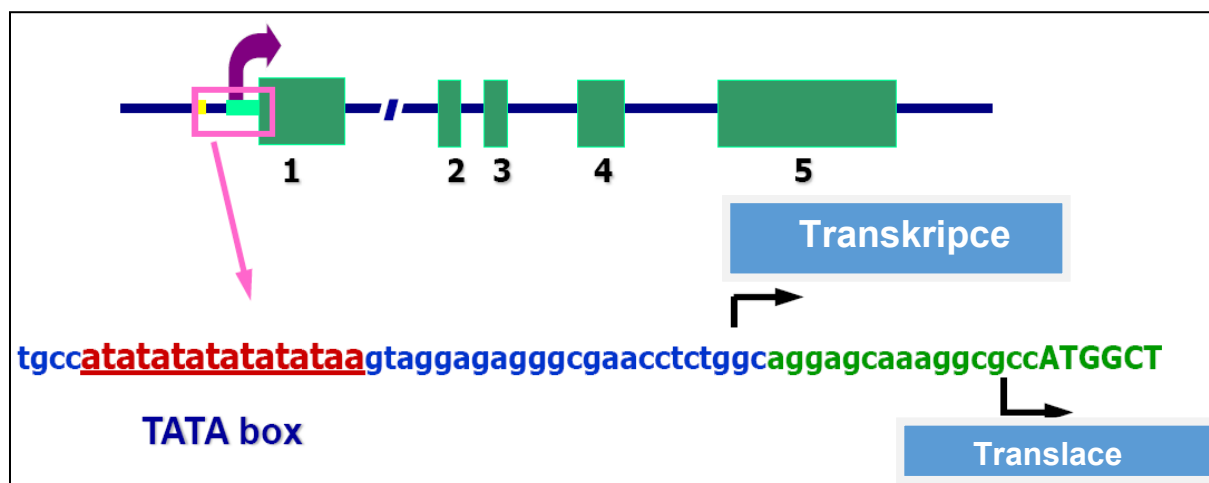
GS je autosomálně recesivní porucha metabolismu bilirubinu, pro kterou je charakteristické zvýšení sérových koncentrací nekonjugovaného bilirubinu. Poprvé byl termín chronická hyperbilirubinémie popsán francouzským lékařem Augustinem Gilbertem na počátku 20. století. V průběhu let se nomenklatura měnila, nicméně žádný z dalších názvů se neujal, a dnes je tedy benigní hyperbilirubinémie označována jako GS [297, 298].

Diagnóza GS je většinou prováděna *per exclusionem*. Musí platit, že příčinou nekonjugované hyperbilirubinémie ( $\geq 17 \mu\text{mol/l}$ ) není žádné jaterní poškození či hemolýza. Klinický význam GS je zejména diferenciatně diagnostický [298].

Laboratorně nalézáme vyšší sérové koncentrace nekonjugovaného bilirubinu nepřesahující  $70 \mu\text{mol/l}$ , které se mohou zvyšovat během fyzické aktivity, hladovění, psychického vypětí či vlivem užívání alkoholu. Klinický obraz je nespecifický, nicméně únava, bolesti v pravém podžebří či nejrůznější dyspeptické příznaky do klinického obrazu GS nepatří a jsou způsobeny koincidujícími příčinami. Prakticky jde o benigní metabolickou poruchu, která nevyžaduje žádnou terapii. Naopak jedincům s GS poskytují zvýšené koncentrace nekonjugovaného bilirubinu v krevním řečišti ochranu před rozvojem řady civilizačních onemocnění [58, 111, 299]. Je však také známo, že jedinci s GS mají vyšší výskyt pigmentové cholelithiázy, těžší průběh novorozenecké žloutenky či vyšší riziko lékových interakcí [300, 301].

Příčinou GS je v euro-americké a africké populaci specifická mutace v promotorové oblasti genu *UGT1A1* (Obr. 18). Tato mutace vede ke snížení aktivity enzymu UGT1A1, který se podílí na konjugaci bilirubinu s kyselinou glukuronovou (viz výše).

Obr. 18: Schéma genu *UGT1A1*



Použito s laskavým souhlasem prof. M. Jirsy, Institut klinické a laboratorní medicíny.

Promotorová oblast genu *UGT1A1* je označena podle repetitivních sekvencí nukleotidových bazí TA jako tzv. TATA box. Normální promotorová sekvence obsahuje 6 TA repetice (označováno také  $A(TA_6)TAA$ ). U jedinců s GS dochází v této promotorové oblasti k dinukleotidové inzerci TA. Tato promotorová oblast, neobsahuje ve vlastním TATA boxu obvyklých 6 TA repetice, ale na místo toho je TA repetice 7:  $A(TA_7)TAA$ . Tato alela se označuje jako gilbertovská alela, *UGT1A1*\*28 [204].

### 1.7.1. *UGT1A1*\*28 a kardiovaskulární onemocnění

V některých studiích byla zjištěna asociace mezi gilbertovskou alelou a snížením rizika vzniku kardiovaskulárních chorob [58, 111]. Poprvé na tento vztah poukázaly výsledky americké studie Framingham Offspring Study [263]. V ní bylo po dobu 24 let retrospektivně sledováno 1 780 jedinců. Přítomnost homozygotní formy alely *UGT1A1*\*28 byla asociována s o 1/3 nižším rizikem kardiovaskulárních onemocnění v porovnání s ostatními *UGT1A1* genotypy [263]. Jiné studie již tak konzistentní data nepodávají, což je pravděpodobně způsobeno nízkou penetrancí GS. Frekvence gilbertovské mutace je cca 10-16 %, nicméně prevalence GS je přibližně poloviční [204]. Předpokládá se, že musí existovat více faktorů, které se společně podílí na fenotypové manifestaci GS. Samotná mutace v promotorové oblasti genu *UGT1A1* má s ohledem na riziko vzniku kardiovaskulárních chorob jen minoritní význam. Zásadní význam mají vlastní koncentrace bilirubinu v krvi.

## 2. CÍL PRÁCE

S ohledem na zásadní a důležité postavení bilirubinu v lidském organismu a jeho asociaci s civilizačními nemocemi bylo cílem této disertační práce:

- a. Stanovit koncentrace systémového bilirubinu v české populaci.
- b. Určit prevalenci GS v reprezentativním vzorku české populace včetně stanovení frekvence gilbertovské alely (*UGT1A1*\*28) a jednotlivých polymorfismů genu *UGT1A1*.
- c. Určit koncentrace celkového bilirubinu, včetně polymorfismů genu *UGT1A1* u mužů s akutním infarktem myokardu.
- d. Stanovení celkové, kardiovaskulární a nádorové mortality v rámci prospektivně sledované kohorty rekrutované z rozsáhlé multicentrické polské větve studie HAPIEE (Health Alcohol, and Psychosocial factors in Eastern Europe).



### 3. BILIRUBIN A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

#### Cíle vycházející z této práce:

1. Stanovit koncentrace systémového bilirubinu v české populaci.
2. Určit prevalenci GS v reprezentativním vzorku české populace včetně stanovení frekvence gilbertovské alely (*UGT1A1*\*28) a jednotlivých polymorfismů genu *UGT1A1*.
3. Určit koncentrace celkového bilirubinu, včetně polymorfismů genu *UGT1A1* u mužů s akutním infarktem myokardu.

### **3.1. Metodika**

#### **Charakteristika populace**

Pro účely naší studie byla použita data získaná z české populační studie post-MONICA (MONItoring of Cardiovascular disease). Jednalo se o vyšetření 1 % náhodně vybraného vzorku české populace v devíti vybraných okresech za účelem zjištění rizikových faktorů aterosklerózy. Věkové rozložení jedinců bylo 25-64 let [302].

První skupina (kohorta A) pocházela z retrospektivní studie tvořené 717 jedinci (ve věkovém rozmezí 26-64 let, z toho 62 % mužů) rekrutovaných ze studie post-MONICA provedené mezi lety 1997-1998. Jedinci byli opětovně vyšetřeni mezi roky 2000-2001. Biologické vzorky byly ihned po svém získání (v roce 2000-2001) zmrazeny a uchovávány v předepsaných podmínkách -80 °C k dalšímu zpracování v budoucnu. Ze vzorků, odebraných z žilní krve mezi lety 2000-2001, byly nově v rámci této práce stanoveny systémové koncentrace bilirubinu, aktivity aspartátaminotranferázy (AST), alaninaminotranferázy (ALT) a gamaglutamyltransferázy (GGT) a provedena genetická analýza genů, podílejících se na metabolismu bilirubinu.

Druhou, rozsáhlejší skupinu (kohorta B), představoval 1 % náhodně vybraný vzorek české populace rekrutovaný z prospektivně probíhající studie post-MONICA konané mezi roky 2015- 2018. V této skupině byly koncentrace bilirubinu a aktivity aminotranferáz a GGT měřeny současně při komplexní analýze vzorků v průběhu studie. Kohorta B se skládala z 2 594 jedinců průměrného věku 25-64 let (z celkového počtu bylo 48 % mužů).

Protokol české studie post-MONICA byl prováděn v souladu s požadavky Etické komise Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a Thomayerovy nemocnice v Praze. Všichni pacienti byli plně informováni a podepsali při vstupu do studie informovaný souhlas.

#### **Pacienti s akutním koronárním syndromem**

Data o této skupině, čítající 741 jedinců, byla získána z pracoviště IKEM. Jednalo se o muže, kteří byli hospitalizováni na jednotce intenzivní péče od dubna 2006 do dubna 2014 [303, 304] pro primomaniestaci akutního koronárního syndromu, konkrétně infarktu myokardu (IM). U těchto jedinců byly pro účely naší studie použity koncentrace systémového bilirubinu odebrané ze žilního vzorku krve dle protokolu studie. Aktivity AST, ALT a GGT nebyly v naší studii hodnoceny, jelikož jejich aktivity jsou ovlivněny probíhajícím akutním koronárním syndromem. Všichni muži vstoupili do studie dobrovolně, plně informováni a podepsali

informované souhlasy. Studie byla provedena v souladu s etickou komisí nemocnice IKEM a mezinárodní Helsinskou dohodou.

### **Rizikové faktory a laboratorní analýzy**

U všech jedinců bylo provedeno biochemické vyšetření, konkrétně pro účely této studie byly využity sérové koncentrace lipidů (frakce HDL a LDL cholesterolu, triacylglycerolů). Na automatickém analyzátoru byly doměřeny koncentrace celkového bilirubinu a aktivity aminotransferáz a GGT (UniCel Dx C 800 Synchron Clinical Systems, Beckman Coulter, UK).

K měření koncentrace celkového bilirubinu je v tomto analyzátoru využito modifikované diazo metody podle Jendrassik-Grófa [135, 136]. Za horní limit fyziologických koncentrací celkového bilirubinu v běžné populaci byla považována koncentrace 17  $\mu\text{mol/l}$ , a to na základě referenčních mezí nastavených v laboratoři ÚLBD 1.LF UK a VFN v Praze [162].

Za abnormální aktivity aminotransferáz byly v naší studii považovány aktivity AST (aspartátaminotransferázy)  $\geq 0,72 \mu\text{kat/l}$ , ALT (alaninaminotransferáza)  $\geq 0,78 \mu\text{kat/l}$ , a GGT (gammaglutamyltransferáza)  $\geq 0,84 \mu\text{kat/l}$ . Aktivity alkalické fosfázy (ALP) nebyly stanoveny vzhledem k nestabilitě enzymu v zamražených vzorcích krevního séra [305]. Ačkoli v některých studiích byla prokázána asociace mezi aktivitou střevní izoformy ALP a GS [306], nebyly jsme schopni vzhledem k výše uvedeným důvodům tuto souvislost ověřit.

U všech jedinců byla odebrána anamnestická data včetně stanovení základních rizikových faktorů aterosklerózy [303, 304, 307]. Základní charakteristiky sledovaných populací uvádí Tabulka 7.

### **DNA analýza**

DNA byla získána ze vzorku nesrážlivé krve vysolovací metodou podle Millera [308]. Promotorové varianty genu *UGT1A1* jsme určili kapilární elektroforézou [309]. V rámci této metody je možné díky rozdílným velikostem fragmentů současně stanovit promotorové varianty genů *HMOX1* (dbSNP rs1805173) a *UGT1A1* (dbSNP rs81753472). Principem metody je duplexní polymerázová řetězová reakce (PCR) promotorových oblastí genů pomocí fluorescenčně značených primerů s následnou vícebarevnou kapilární elektroforézou s DNA sekvenací na automatizovaném laserovém sekvenátoru.

Amplifikační reakce byla prováděna v konečném objemu 25  $\mu\text{l}$ , který obsahoval 2,5  $\mu\text{l}$  reakčního pufru (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Kanada); dále 3  $\mu\text{l}$  (Fermentas), 0,5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP směsi (Fermentas); a 0,3  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  *UGT1A1* a dopředný a reverzní *UGT1A1* primer. Primery byly navrženy na základě sekvence tandemových repetit

v promotorových oblastech *UGT1A1* (přístupové číslo GenBank AY603772.1) pomocí programu Primer3 [310]:

*UGT1A1* vpřed: 5'-GAACTTGGTGTA TCG ATTGGTTTT TGC - 3';

*UGT1A1* vzad: 5'-CATCCA CTGGGATCAACAGTATCT TCC - 3'.

Reverzní primery byly na 5' konci značeny fluorescenčním barvivem: D2-PA, D3-PA nebo D4-PA WellRED (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Označené primery byly kvůli nevyváženým signálům barviv před každou reakcí zředěny příslušnými neznačenými primery (D2-*UGT1A1* vzad 1:1, D3-*UGT1A1* vzad 1:1, D4-*UGT1A1* reverzní 1:2). Reakce zahrnovala 0,35  $\mu$ l 2,5 U/ $\mu$ l Pfu DNA polymerázy (Fermentas) a 25 ng genomické DNA (gDNA). Reakce byly provedeny za použití termocykleru TC-512 Thermal Cycler (Techne, Burlington, NJ, USA). Vzorky byly oddělené kapilární elektroforézou na automatizovaném kapilárním sekvenátoru Sequencer DNA CEQ 8000 (Beckman Coulter) [309].

### **Statistické zpracování**

Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SD nebo medián a IQ rozmezí v závislosti na jejich distribuci. Rozdíly ve studovaných proměnných byly hodnoceny Studentovým t-testem nebo Mannovým–Whitneyovým testem (spojité proměnné), chi-kvadrátovým testem nebo Fisherovým exaktním testem (pro kategorické proměnné). Asociace mezi sérovými koncentracemi bilirubinu a genotypy promotoru *UGT1A1* byla testována pomocí Kruskalova- Wallisova testu s Dunnovou post hoc analýzou. K posouzení závislosti proměnných byly použity lineární a logistické regresní analýzy. Pro statistické analýzy byl použit počítačový program SigmaPlot 11.0. Všechny analýzy byly provedeny s hladinou významnosti nastavenou na 0,05. HW rovnováha byla vypočtena pomocí volně dostupného webového zdroje [311]. Pro kategorické proměnné byl použit chí-kvadrátový test [312] nebo Fisherův exaktní test.

### 3.2. Výsledky:

#### Cíl 1.) Koncentrace systémového bilirubinu v české populaci

Medián sérových koncentrací bilirubinu v reprezentativním vzorku české populace čítajícím více než 3 300 jedinců (kohorta A+B) byl pro jednotlivé kohorty 9,6 a 9,8  $\mu\text{mol/l}$  (Tabulka 8a). Jak bylo očekáváno, vyšší koncentrace bilirubinu v krevním séru jsme zaznamenali u mužů, a to u obou sledovaných podskupin (10,7  $\mu\text{mol/l}$  a 11,3  $\mu\text{mol/l}$ ). U žen byly koncentrace bilirubinu nižší, konkrétně 8,3  $\mu\text{mol/l}$  a 8,8  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p \leq 0,01$  (Tabulka 8a). V kohortě B, byl 95 % rozptyl koncentrací sérového bilirubinu širší, než bylo očekáváno, a to 4,3-23,6  $\mu\text{mol/l}$  (pro muže 5,5-27,5  $\mu\text{mol/l}$ , pro ženy 3,8- 19,9  $\mu\text{mol/l}$ ).

V porovnání s dalšími proměnnými bylo potvrzeno, že existuje významná závislost mezi sérovými koncentracemi bilirubinu a pohlavím. U žen byla koncentrace bilirubinu v systémové cirkulaci prokazatelně nižší ve srovnání s mužskou populací (Tab. 8a,c). Byla potvrzena asociace mezi koncentrací celkového bilirubinu a nikotinismem, kde měli kuřáci o 56 % nižší pravděpodobnost mít koncentrace sérového bilirubinu nad 9,6  $\mu\text{mol/l}$  (populační medián) v porovnání s nekuřáky (Tab. 8c). Podrobná analýza vlivu kouření na koncentrace bilirubinu ve všech sledovaných populacích odhalila trvale nižší sérové koncentrace bilirubinu u kuřáků (Tabulka 9,11b). Usus nikotinismu byl asociován s poklesem koncentrací bilirubinu v kohortě B až o 12 % oproti nekuřákům, konkrétně z 9,9  $\mu\text{mol/l}$  (7,3-13,4  $\mu\text{mol/l}$ ) na 8,7  $\mu\text{mol/l}$  (6,2- 1,7  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p \leq 0,001$ ). Nikotinismus nebyl spojen s nižšími systémovými koncentracemi bilirubinu u mužských pacientů s IM (Tabulka 9).

Dalším významným prediktorem sérových koncentrací bilirubinu je i hodnota body mass indexu (BMI). Každý vzestup BMI o 1 bod stupnice byl spojen s 2 % poklesem pravděpodobnosti mít koncentrace sérového bilirubinu nad 9,6  $\mu\text{mol/l}$  (populační medián), Tab. 8c. O tom, že bilirubin hraje významnou roli v rámci metabolického syndromu, svědčí i fakt, že jedinci, u kterých dochází ke zvýšení koncentrací glykovaného hemoglobinu o 1 % bod mají o 4 % nižší šanci mít bilirubin nad 9,6  $\mu\text{mol/l}$  (Tabulka 8c). Naopak sérové koncentrace bilirubinu nebyly v naší práci ovlivněny věkem a nezávisely ani na koncentracích LDL a HDL cholesterolu.

Důležitými prediktory kardiovaskulární morbidity a mortality jsou také zvýšené aktivity zejména ALT a GGT [313, 314]. V reprezentativním vzorku české populace, prezentovanou kohortou B, jsme zaznamenali zvýšení aktivity ALT, GGT nebo AST u 3,2-18,4 % jedinců. Zvýšení ve všech sledovaných parametrech (ALT, AST i GGT) bylo zjištěno u 20,7 % jedinců kohorty B (Tabulka 10). V porovnání mezi pohlavími byly aktivity aminotransferáz či GGT až trojnásobně vyšší u mužů (Tabulka 10). Prokázána byla také asociace mezi koncentracemi

celkového bilirubinu a aktivitou AST. Jedinci se zvýšenou aktivitou AST mají až 4x vyšší pravděpodobnost mít koncentrace bilirubinu nad stanoveným mediánem koncentrací bilirubinu studované kohorty (Tabulka 8c).

Nejčastěji byla ve zkoumané populaci zvýšena aktivita GGT (Tabulka 10). Pozitivní lineární vztah byl detekován mezi BMI vs. GGT ( $p < 0,001$ ), koncentrací HbA1c ( $p < 0,001$ ) a koncentracemi triacylglycerolů ( $p < 0,001$ ). Negativní asociace byla detekována pro hodnoty BMI a koncentrace HDL cholesterolu ( $p < 0,001$ ). Stejně jako je tomu u BMI, tak i koncentrace glykovaného hemoglobinu korelovaly s aktivitami GGT ( $p \leq 0,001$ ).

## **Cíl 2.) Prevalence GS, frekvence gilbertovské alely (*UGT1A1*\*28) a jednotlivých polymorfismů genu *UGT1A1***

U jedinců kohorty A byly stanoveny sérové koncentrace bilirubinu v rámci jednotlivých polymorfismů genu *UGT1A1*. Tabulka 11a ukazuje jednotlivé genderové rozdělení podle přítomnosti gilbertovské alely v promotorové oblasti genu *UGT1A1* ( $p \leq 0,01$  muži vs. ženy). Nejvyšší koncentrace sérového bilirubinu byly podle předpokladu zjištěny u homozygotů s gilbertovským genotypem *UGT1A1*\*28, a to u obou pohlaví. Sérové koncentrace bilirubinu jsou více ovlivněny pohlavím (vyšší hladiny u mužů než u žen). Samotná přítomnost alely *UGT1A1* má menší význam (Tabulka 11a,  $p \leq 0,001$ ).

Prevalence pravděpodobného GS (definovaná jako elevace sérových koncentrací nekonjugovaného bilirubinu nad  $17 \mu\text{mol/l}$ , bez přítomnosti zjevné hemolýzy či zvýšení jaterních enzymů) byla v reprezentativním vzorku české populace 8,9 % (11,6 % pro muže vs. 6,1 % pro ženy,  $p \leq 0,01$ , Tabulka 8b).

## **Cíl 3.) Koncentrace systémového bilirubinu, frekvence alely *UGT1A1* u mužů s akutním infarktem myokardu**

U mužů s akutním IM byly sérové koncentrace bilirubinu signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou mužů (7,7 vs. 10,7-11,3  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p \leq 0,01$ , Tabulka 8a). Distribuce genotypů *UGT1A1* byla mezi těmito dvěma skupinami plně srovnatelná (Tab. 11a).

Ačkoli existoval úzký vztah mezi polymorfismem genu *UGT1A1* a koncentrací bilirubinu v kontrolní populaci, taková asociace nebyla detekována u pacientů s IM (Tabulka 11a,b). Tento trend byl přítomen také při analýze koncentrací bilirubinu podle genotypu *UGT1A1* a samostatně i nikotinizmu (Tabulka 11b).

### 3.3. Diskuse

Koncentrace bilirubinu v systémové cirkulaci jsou významným prediktorem rizika jak kardiovaskulárních tak i dalších nemocí [218]. Jak bylo popsáno v úvodu, fyziologický rozsah systémových koncentrací bilirubinu je stále předmětem debaty, především proto, že koncentrace bilirubinu vykazují značný rozptyl [141]. O to více je kladen důraz na stanovení optimálních fyziologických mezí pro konkrétní populace [244].

V naší studii, provedené u relativně velkých populačních skupin, které představují 1 % náhodně vybraný vzorek české populace, jsme identifikovali medián systémových koncentrací bilirubinu 9,8  $\mu\text{mol/l}$  (kohorta A) a 9,6  $\mu\text{mol/l}$  (kohorta B). Vyšší koncentrace byly pozorované u mužů (10,7 a 11,3  $\mu\text{mol/l}$ ) v porovnání se ženami (8,3 a 8,8  $\mu\text{mol/l}$ ). Stanovené 95 % referenční intervaly pro systémové koncentrace bilirubinu byly mnohem širší a posunuly se k vyšším koncentracím, než jaké jsou v současnosti používány, s výraznými rozdíly mezi muži (95 % CI: 5,5-27,5  $\mu\text{mol/l}$ ) a ženami (95 % CI: 3,8-19,9  $\mu\text{mol/l}$ ). Současné referenční intervaly používané v laboratořích ÚLBD 1. LF UK a VFN v Praze jsou založeny na (nepublikovaných) referenčních datech Beckman Coulter získaných z americké populace a jsou běžně užívány většinou klinických laboratoří využívajících diagnostický materiál společnosti Beckman Coulter (viz dříve) [140]. Proto by současné fyziologické rozsahy koncentrací bilirubinu v systémové cirkulaci měly být přehodnoceny a upraveny pro jednotlivé populace, zvláště pro muže a pro ženy [141].

Zajímavé výsledky přináší i zhodnocení výskytu elevovaných aktivit GGT a aminotransferáz, které se nikterak nevymykají datům z velkých populačních studií. Například americká studie publikovaná v roce 2009, která se zabývala vztahem zvýšené aktivity GGT a mortality, prokázala výskyt elevace aktivit GGT u 13 % jedinců [315]. Zvýšené aktivity AST a ALT jsou dle výsledků dalších populačních studií také velmi vysoké, prevalence se pohybuje mezi 3-15 % [301-304]. V české populaci, reprezentované kohortou B, byla nejvyšší aktivita změřena u GGT (18,4 % jedinců). Pokud vyloučíme usus alkoholu, nejpravděpodobnější příčinou zvýšené aktivity GGT je nealkoholická steatóza jater (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) [316]. Zda se jedná o primární postižení či o důsledek metabolického syndromu není doposud jasné [317, 318]. Je dobře známo, že NAFLD je důležitým prediktorem kardiovaskulární morbidity a mortality [319, 320], dobře známá je i souvislost s diabetes mellitus 2. typu [321] a dalšími chorobami. Podobnou asociaci lze nalézt i ve vztahu kardiovaskulární morbidity a aktivity ALT, dalšího silného markeru NAFLD, pozitivně korelujícím s dalšími rizikovými faktory metabolického syndromu [322, 323].

Vysoký výskyt zvýšených aktivit AST, ALT a GGT ukazuje na vysoká kardiovaskulární a metabolická rizika české populace, což ostatně prokazují i poslední publikovaná epidemiologická data o stavu české populace, ve kterých dochází neustále k nárůstu prevalence obezity, zejména u mužské populace [324]. Z našich dat vyplývá, že koncentrace bilirubinu v cirkulaci klesá s nárůstem indexu hmotnosti a vzestupem koncentrace HbA1c.

Sérové koncentrace bilirubinu nad 17  $\mu\text{mol/l}$  byly v reprezentativním vzorku české populace zjištěny u 11,4 % jedinců. Vyšší hyperbilirubinémii jsme podle předpokladu detekovali u mužské populace, a to zhruba 2-3 násobně v porovnání se ženami. Po vyloučení jedinců s elevací aktivit aminotransferáz a GGT jsme získali údaje o prevalenci (pravděpodobného) GS, která činila v reprezentativním vzorku české populace 8,9 % (11,6 % u mužů a 6,1 % u žen).

U podskupiny jedinců s akutním IM, byly sérové koncentrace bilirubinu v porovnání se skupinou mužů kohorty A i B mnohem nižší. I přesto, že dvě recentní meta-analýzy prokázaly přechodné zvýšení koncentrací bilirubinu po akutním IM [325, 326], byl u naší kohorty zaznamenán pokles. Důvodem je pravděpodobně rozdílné časové okno, ve kterém byly koncentrace bilirubinu stanoveny. V našem případě docházelo k analýze v pozdější fázi IM než ve zmiňovaných studiích, kdy sérové koncentrace bilirubinu dosahují vrcholu (zpravidla během 18-21 hodin po IM) [327]. Ke zvýšení koncentrací bilirubinu v raných fázích IM dochází v důsledku jeho zvýšené produkce, která je dána indukcí aktivity HMOX1 [327]. Koncentrace celkového bilirubinu se také liší v závislosti na závažnosti koronární aterosklerózy [328, 329]. Nižší sérové koncentrace bilirubinu zjištěné i v naší kohortě nemocných s IM lze vysvětlit nejpravděpodobněji zvýšenou konzumpcí bilirubinu v rámci oxidačního stresu, který nastává během akutního koronárního syndromu. [111, 257].

Při podrobnějším zkoumání polymorfismů genů *UGT1A1* vyplývá, že v naší populaci je nejvíce zastoupena genová varianta polymorfismu *UGT1A1(TA)<sub>6/7</sub>*. Nebyl zjištěn výrazný rozdíl v četnosti těchto genových variant mezi muži a ženami (Tabulka 11a). Přítomnost gilbertovské alely (*UGT1A1(TA)<sub>7/7</sub>*) byla spojena s vyššími koncentracemi bilirubinu v systémové cirkulaci [330]. Nicméně jinak tomu bylo u kohorty pacientů s IM. U této podskupiny, byla přítomnost gilbertovské alely (*UGT1A1(TA)<sub>7/7</sub>*) asociována s nižšími sérovými koncentracemi bilirubinu. To je dáno patrně opět zvýšenou konzumpcí bilirubinu v rámci oxidačního stresu, podobně jako je uváděno výše pro celkové koncentrace bilirubinu bez ohledu na jednotlivé genotypy. Nadměrná produkce ROS vede k oxidaci bilirubinu na biliverdin [331] stejně jako na tri-, di- a monopyrrollické oxidační produkty bilirubinu [332]. V menší míře se na snížení sérových koncentrací bilirubinu podílí i genetická predispozice, nicméně v daleko menším rozsahu,



než se dříve předpokládalo. Roli zde pravděpodobně sehrává zhruba 50 % penetrace genu *UGT1A1(TA)<sub>7/7</sub>*, odpovědná za klinickou manifestaci GS [204]. Kouření nebylo ve skupině nemocných s IM spojeno s nižšími sérovými koncentracemi bilirubinu, což naznačuje, že manifestace samotné akutní koronární příhody měla podstatně vyšší vliv než kouření.

### 3.4. Příloha:

Tabulka 7: Základní charakteristika vyšetřovaných populací

Charakteristika vyšetřovaných populací				
	Kohorta A (n=717)	Kohorta B (n=2 594)	Kohorta A muži (n=442)	Kohorta s IM (n=741)
<b>Muži/Ženy</b>	1,61	0,91	-	-
<b>Věk (v letech)</b>	48,4±11	48±11	49±11	54,7±8*
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,1±4,8	28,3±5,5	28,4±3,9	28,8±4,5
<b>LDL cholesterol (mmol/l)</b>	3,54±1,2	3,16±0,9	3,64±1	3,57±1,1
<b>HDL cholesterol (mmol/l)</b>	1,31±0,4	1,49±0,4	1,22±0,4	1,16±0,3*
<b>Triacylglyceroly (mmol/l)</b>	1,77±1,1	1,34±1,0	2,01±1,2	1,85±1,7*
<b>Kouření (%)</b>	48,8	43,8	58,5	83,2*
<b>Arteriální hypertenze (%)</b>	41,7	40,1	47,1	49,9
<b>Diabetes mellitus (%)</b>	4,5	6,4	5	17,9*
<b>Glykémie nalačno (mmol/l)</b>	5,09±0,15	5,47±0,35	5,26±1,1	NS
<b>AST (μkat/l)</b>	0,24±0,1	0,38±0,30	0,25±0,12	NS
<b>ALT (μkat/l)</b>	0,18±0,08	0,38±0,35	0,19±0,1	NS
<b>GGT (μkat/l)</b>	0,53±1,2	0,62±0,01	0,74±1,47	NS

\*p<0.01, srovnání s mužskou populací kohorty A.

Data vyjádřena jako průměr ± SD.

AST, ALT, GGT měřeny ze zmražených vzorků z let 2000-2001. NS – nestanoveno.

**Tabulka 8:****a) Koncentrace celkového bilirubinu v reprezentativním vzorku české populace a u mužů s akutním infarktem myokardu**

<b>Koncentrace celkového bilirubinu (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>			
	<b>Kohorta A</b>	<b>Kohorta B</b>	<b>Kohorta s IM</b>
<b>Všichni</b>	9,8 (8-12,4) (n=717)	9,6 (6,6-13,2) (n=2 594)	
<b>Muži</b>	10,7(8,7-13,6) (n=442)	11,3 (8,4-15,2) (n=1 235)	7,7* (5,6-10,8) (n=741)
<b>Ženy</b>	8,8 (7,2-10,7) (n=275)	8,3 (6,1-11,1) (n=1 359)	

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl (QR). \* $p < 0,01$  srovnání s kontrolními skupinami A i B.

**b) Výskyt hyperbilirubinémie  $\geq 17 \mu\text{mol/l}$  ve studovaných populacích**

<b>Hyperbilirubinémie <math>\geq 17 \mu\text{mol/l}</math></b>				
	<b>Celá populace</b> (n=3 311)	<b>Kohorta A</b> (n=717)	<b>Kohorta B</b> (n=2 594)	<b>Kohorta s IM</b> (n=741)
<b>Všichni</b>	11,4 % (n=377)	6,9 % (n=50)	12,6 % (n=327)	
<b>Muži</b>	16,1 % (n=270)	9,7 % (n=43)	18,4 % (n=227)	3,6 %* (n=27)
<b>Ženy</b>	6,5 % (n=107)	2,5 % (n=7)	7,3 % (n=100)	

<b>Výskyt hyperbilirubinémie <math>\geq 17 \mu\text{mol/l}</math> u jedinců s nezvýšenými aminotransferázami a GGT</b>				
	<b>Celá populace</b> (n=3 311)	<b>Kohorta A</b> (n=717)	<b>Kohorta B</b> (n=2 594)	<b>Kohorta s IM</b> (n=741)
<b>Všichni</b>	8,9 % (n=295)	4,9 % (n=35)	10,0 % (n=260)	
<b>Muži</b>	11,6 % (n=195)	6,6 % (n=29)	13,4 % (n=166)	ND
<b>Ženy</b>	6,1 % (n=100)	2,2 % (n=6)	6,9 % (n=94)	

\* $p < 0,01$ , srovnáváno s celou populací.

Horní meze fyziologických aktivit aminotranferáz a GGT: AST=0,72  $\mu\text{kat/l}$ , ALT = 0,78  $\mu\text{kat/l}$ , GGT =0,84  $\mu\text{kat/l}$

*Legenda: IM – infarkt myokardu, ND nestanoveno z důvodu elevace myokardiálních enzymů ovlivňujících hodnoty jaterních enzymů*

### c) Faktory ovlivňující sérové koncentrace bilirubinu

Poměr šancí relevantních proměnných na ovlivnění sérových koncentrací celkového bilirubinu		
	OR (95% CI)	P hodnota
Pohlaví (ženy)	0,26 (0,22-0,32)	<0,001
Kouření	0,44 (0,31-0,61)	<0,001
BMI	0,98 (0,96-0,99)	0,024
HbA1c	0,96 (0,95-0,98)	<0,001
AST	4,18 (1,76-9,9)	0,01

Poměr šancí (OR) relevantních proměnných na ovlivnění sérových koncentrací celkového bilirubinu vztažených na medián koncentrací celé kohorty B (9,6  $\mu\text{mol/l}$ ).

V tabulce uvedeny statisticky významné výsledky.

*Legenda: BMI–body mass index,*

*HbA1c–glykovaný hemoglobin, AST–aspartátaminotransferáza*

**Tabulka 9: Koncentrace bilirubinu ve vztahu k nikotinismu**

Koncentrace bilirubinu ( $\mu\text{mol/l}$ )			
	Kuřáci	Nekuřáci	P hodnota
<b>Kohorta A</b>	9,7 (7,7-12,1) (n=350)	10,1 (8,2-12,9) (n=367)	0,03
<b>Kohorta B</b>	8,7 (6,2-11,7) (n=1 138)	9,9 (7,3-13,4) (n=1 448)	0,0001
<b>Kohorta A muži</b>	10,0 (8,1-12,6) (n=259)	11,5 (9,5-14,6) (n=183)	0,001
<b>Kohorta IM</b>	7,8 (5,7-10,8) (n=617)	7,9 (5,4-10,9) (n=115)	NS

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl. Exkuřáci nebyli do analýzy začleněni.

**Tabulka 10: Výskyt elevace aktivit aminotransferáz a GGT v české populaci**

Výskyt elevace aktivit aminotransferáz a GGT v české populaci			
KOHORTA B	Celkem (n=2 594)	Muži (n=1 235)	Ženy (n=1 359)
ALT	5,5 %	9,7 %	1,8 %
AST	3,2 %	4,7 %	1,8 %
GGT	18,4 %	28,9 %	8,9 %
ALT/AST/GGT	20,7 %	32,6 %	9,7 %

Horní meze fyziologických aktivit aminotranferáz a GGT:

AST = 0,72  $\mu$ kat/l, ALT = 0,78  $\mu$ kat/l, GGT = 0,84  $\mu$ kat/l.

**Tabulka 11:**

**a) Sérové koncentrace bilirubinu podle genotypu *UGT1A1*\*28**

<i>UGT1A1</i> genotyp	Kohorta A Všichni (n=717)		Kohorta A Muži (n=442)		Kohorta A Ženy (n=275)		Kohorta mužů s IM (n=741)	
	n	Bilirubin [ $\mu$ mol/l]	n	Bilirubin [ $\mu$ mol/l]	n	Bilirubin [ $\mu$ mol/l]	n	Bilirubin [ $\mu$ mol/l]
(TA) <sub>6/6</sub>	291	9,0 (7,3-11,0)	177 <sup>+</sup> (40 %)	9,9 (8,1-11,8)	114 <sup>+</sup> (41,5 %)	8,1 (6,5-9,3)	329 (44,3 %)	7,3 (5,3-10,1)*
(TA) <sub>6/7</sub>	327	9,9 (8,3-12,1)	201 (45,5 %)	10,8 (8,9-12,9)	126 (45,8 %)	9,1 (7,4-10,6)	315 (42,5 %)	8,4 (6,4-11,2)*
(TA) <sub>7/7</sub>	99	14,8 (11,2-18,3)	64 (14,5 %)	16,2 (12,4-19,7)	35 <sup>++</sup> (12,7 %)	11,8 (9,8-15,6)	97 (13,1 %)	7,2 (5,0-11,1)*
<b>P hodnota</b>		0,001		0,001		0,001		NS

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl.

\*P<0,01 – srovnáno s kohortou A muži

+ včetně jednoho jedince s genotypem (TA)<sub>5/6</sub>; ++ včetně 2 jedinců s genotypem (TA)<sub>7/8</sub>

**b) Sérové koncentrace bilirubinu podle genotypu *UGT1A1* u kuřáků a nekuřáků**

<i>UGT1A1</i> genotyp	Kohorta A všichni (n=717)				Kohorta mužů s IM (n=741)			
	Kuřáci		Nekuřáci		Kuřáci		Nekuřáci	
	n	Bilirubin [μmol/l]	n	Bilirubin [μmol/l]	n	Bilirubin [μmol/l]	n	Bilirubin [μmol/l]
<b>(TA)<sub>6/6</sub></b>	140	8,7 (7,0-10,9)	149	9,2 (7,8-11,3)	273	7,4 (5,3-10)	51	6,9 (5,1-10,6)
<b>(TA)<sub>6/7</sub></b>	161	9,7 (8,0-12,0)	167	10,2 (8,4-12,4)	259	8,5 (6,6-11,3)	53	8,4 (6,1-11,1)
<b>(TA)<sub>7/7</sub></b>	47	14,1 (10,4-18,2)	49	15,3 (11,6-19,4)	85	9,7 (8,0-12,0)	11	6,8 (4,7-10,9)
<b>P hodnota</b>		0,001		0,0001		0,01		NS

<i>UGT1A1</i> genotyp	Kohorta A Muži (n=442)				Kohorta A ženy (n=275)			
	Kuřáci		Nekuřáci		Kuřáci		Nekuřáci	
	n	Bilirubin [μmol/l]	n	Bilirubin [μmol/l]	n	Bilirubin [μmol/l]	n	Bilirubin [μmol/l]
<b>(TA)<sub>6/6</sub></b>	101	9,5 (7,3-11,3)	75	10,6 (8,9-13,6)	39	7,7 (6,1-9,3)	74	8,2 (6,8-9,4)
<b>(TA)<sub>6/7</sub></b>	122	10,1 (8,5-12,5)	80	11,4 (9,7-13,2)	39	9,0 (7,4-10,4)	87	9,1 (7,8-10,6)
<b>(TA)<sub>7/7</sub></b>	36	15,3 (10,5-18,4)	27	17,7 (14,2-24,4)	11	11,3 (9,5-15,6)	22	12,5 (8,6-15,5)
<b>P hodnota</b>		0,0001		0,0001		0,01		0,0001

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl. NS – nesignifikantní.

Exkuřáci nebyli do analýzy začleněni.

#### **4. BILIRUBIN A MORTALITA**

**Cíle práce:**

Stanovení celkové, kardiovaskulární a nádorové mortality v rámci prospektivně sledované kohorty rekrutované z rozsáhlé multicentrické polské větve studie HAPIEE (Health Alcohol, and Psychosocial factors in Eastern Europe).

## 4.1. Metodika

### Charakteristika populace

Data byla získána z polské větve multicentrické studie HAPIEE (Health, Alcohol, and Psychosocial factors in Eastern Europe) [333]. Jedná se o náhodně vybraný vzorek populace získaný mezi lety 2002-2005 ze čtyř okresů města Krakov (respondence 61 %, věk účastníků 45-69 let). Celkem bylo randomizováno 10 728 jedinců. U 8 860 byla provedena laboratorní analýza z odebraného vzorku nesrážlivé žilní krve (bilirubin byl tedy stanovován v krevní plazmě). Jelikož nebylo z finančních důvodů možné provést laboratorní analýzy u celé kohorty vybrané populace, vycházejí naše data z retrospektivně náhodně vybrané studie případů a kontrol, ve které byla stanovena koncentrace plazmatického bilirubinu a promotorové polymorfismy genu *UGT1A1* (celkem 1 870 jedinců) [334]. Jako případy jsou označeni jedinci, u kterých došlo mezi lety 2002-2010 k úmrtí z jakékoliv příčiny (n= 447), kontrolní skupina je náhodně vybraná skupina přeživších v době analýzy vzorků (n=1 423).

Všichni vyšetření jedinci podepsali informovaný souhlas. Studie byla provedena v souladu s pravidly etických komisí University College v Londýně a Jagelonské univerzity v Krakově. Celá studie probíhala v souladu s pravidly určenými mezinárodní Helsinskou deklarací.

### Analýza dat

Všichni účastníci (n=1 870) absolvovali osobní pohovor, během kterého byla odebrána základní anamnestická data včetně informací ohledně zdravého životního stylu, a poskytli vzorek žilní krve. Příčiny smrti byly stanoveny pomocí 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí (ICD): CVD (I00-I99), zhoubného nádorového onemocnění (C00-D48) nebo jiných příčin než výše uvedených (všechny ostatní kódy ICD). Doba sledování byla pro každého účastníka vypočtena jako doba mezi zapsáním do studie a datem buď úmrtí, nebo posledního kontaktu (pro ty, kteří nezemřeli); průměrná doba sledování činila 6,4 let. Střední doba sledování (IQR) byla 3,7 roku (2,1–5,1 roku).

### Laboratorní analýza

a) Ze zmrazených vzorků plazmy byly dodatečně stanoveny na automatickém analyzátoru (UniCel DxC 800Synchron Clinical Systems, Beckman Coulter, Velká Británie) koncentrace bilirubinu, ALT, GGT, močoviny a CRP, s použitím komerčně dostupných souprav a referenčních materiálů od společnosti Beckman Coulter na Wageningen University (Nizozemsko).



b) DNA byla izolována modifikovanou vysolovací metodou [308]. Promotorové nukleotidové varianty genu *UGT1A1* byly stanoveny technologií KASPTM (www.lgcgroup.com).

### Statistické zpracování

Vzájemný vztah plazmatických koncentrací bilirubinu a výsledků mortalitních dat byl analyzován v několika krocích prostřednictvím upravené multivariační logistické regrese. Koncentrace celkového bilirubinu jsme kategorizovali pomocí mezních hodnot 17 a 10  $\mu\text{mol/l}$ , aby výsledky byly aplikovatelné pro klinickou praxi a srovnatelné s předchozími studiemi. Hodnota 17  $\mu\text{mol/l}$  byla určena jako horní mez fyziologické koncentrace bilirubinu v systémové cirkulaci, zatímco koncentrace nižší než 10  $\mu\text{mol/l}$  byly navrženy v předchozích studiích jako potenciální rizikový faktor kardiovaskulárních chorob [335].

V modelu 1 byly vztahy upraveny podle věku a pohlaví účastníků. V modelu 2 byl poměr šancí (OR) upraven podle vzdělání, rodinného stavu, příjmu alkoholu, kouření, indexu tělesné hmotnosti, příjmu energie a poměru celkového/HDL cholesterolu (souvisí s expozicí bilirubinu) a mortality. V modelu 3 byly stanoveny OR pro plazmatické aktivity ALT a GGT, a koncentrace CRP a močoviny, jako potenciálních biomarkerů souvisejících s bilirubinem a mortalitou. Mortalitní data byla upravena podle věku a pohlaví a analyzována s jednotlivými genotypy genu *UGT1A1* (Model 1) a také se samotnými koncentracemi bilirubinu (Model 2).

Principu mendelovské randomizace bylo použito k testování potenciální příčinné souvislosti mezi fenotypem a chorobou, při níž byl použit genetický marker specifického fenotypu, tedy plazmatický bilirubin. Metoda mendelovské randomizace je považována za paralelu s randomizovanou kontrolovanou studií, a pokud jsou splněny její předpoklady, měla by poskytovat nezkreslené odhady mezi dvěma proměnnými [336, 337]. Interakce mezi pohlavím a koncentracemi bilirubinu, stejně jako mezi pohlavím a genotypem *UGT1A1*, a mortalitou byly testovány pomocí testu pravděpodobnosti, který porovnával modely s nebo bez multiplikační interakce. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné interakce s pohlavím v kterékoli ze zkoumaných skupin. Proto mohly být muži a ženy analyzováni společně. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí verze 13.1 statistického programu STATA (StataCorp, Texas, USA). Za hladinu významnosti  $\alpha$  byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ .

#### 4.2. Výsledky studie HAPIEE

Práce byla provedena na 1 870 jedincích, kteří byli vybráni ze studie HAPIEE. Tato skupina byla rozdělena na ty, kteří během sledování zemřeli (n=447, z toho 211 na nádorová onemocnění a 139 na CVD), ostatní jedinci sloužili jako kontrolní skupina (n=1 423, podrobněji Tab. 12). Medián plazmatických koncentrací bilirubinu byl 12,8  $\mu\text{mol/l}$ , s vyššími koncentracemi u mužů (13,5  $\mu\text{mol/l}$ ) oproti ženám (11,6  $\mu\text{mol/l}$ ). Kontrolní skupina měla vyšší koncentrace bilirubinu ve srovnání s mortalitní skupinou (Tabulka 12). Klinicky významné zvýšení aktivity ALT a GGT bylo zaznamenáno u 8,6 % respektive u 19,5 % jedinců.

Distribuce genotypů *UGT1A1* byla v souladu s HW rovnováhou ( $p=0,19$ ) a frekvence alel byla podobná ostatním bělošským populacím (Tab. 13) [204]. I v této studii byla dle předpokladu zjištěna souvislost mezi genotypy *UGT1A1* a plazmatickými koncentracemi bilirubinu; homozygoti alely 7/7 měli signifikantně vyšší plazmatické koncentrace bilirubinu ve srovnání s nosiči divoké alely 6 (Tab. 13). Ostatní biochemické parametry (ALT, GGT, CRP, močovina) byly distribuovány nezávisle na polymorfismu genu *UGT1A1*.

V další části analýzy byla studována asociace plazmatických koncentrací bilirubinu s mortalitou (Tab. 14). Analýza byla provedena na celé kohortě (Tab. 14), i v rámci jednotlivých pohlaví (Tab. 15). Po adjustaci na věk a pohlaví byla zjištěna silná negativní asociace plazmatických koncentrací bilirubinu s celkovou mortalitou i tou na nádorová onemocnění, nikoliv však s CVD mortalitou. Tato negativní asociace přetrvávala i po adjustaci na vliv vzdělání, socioekonomický status a další biochemické proměnné (CRP, ALT, BMI, lipidový profil). Jedinci s plazmatickým bilirubinem nad 17  $\mu\text{mol/l}$  měli o celých 59% nižší riziko úmrtí v porovnání s jedinci s koncentracemi bilirubinu pod 10  $\mu\text{mol/l}$  (OR 0,61; 95 % CI 0,42–0,87), u úmrtí na nádorová onemocnění byl tento efekt ještě výraznější (OR 0,39; 95 % CI 0,24–0,65). Tento efekt nebyl opět zaznamenán pro CVD mortalitu (OR 1,03; 95 % CI 0,58–1,83), (Tab. 14).

Po rozšíření adjustace na zvýšené aktivity ALT a GGT a na koncentrace CRP a urey v plazmě (model 3) zůstal účinek hyperbilirubinémie obdobný (Tab. 14).

Přítomnost alely *UGT1A1\*28* nebyla významně asociována s mortalitou, ačkoli byl zaznamenán podobný trend jako v případě koncentrací bilirubinu (Tabulka 16). I v této studii bylo prokázáno, že koncentrace bilirubinu v systémové cirkulaci mají na celkovou a nádorovou mortalitu větší vliv než genetická predispozice, která je determinována jednotlivými variantami v promotorové oblasti genu *UGT1A1*.

### 4.3. Diskuse

Tato studie prokázala negativní asociaci mezi plazmatickými koncentracemi bilirubinu a mortalitou, a to jak celkovou, tak zejména nádorovou.

Příznivé účinky bilirubinu na mortalitu prokázala i rozsáhlá belgická studie. V ní bylo po dobu deseti let retrospektivně sledováno více než 11 000 jedinců obou pohlaví. Vyšší koncentrace bilirubinu byly asociovány s nižší mortalitou na onkologická onemocnění, zejména u mužů. Překvapivě ani v této studii nebyla nalezena žádná souvislost s CVD mortalitou [36]. Další rozsáhlá studie, která zahrnovala téměř 2 miliony pojištěnců, zjistila negativní asociaci mezi celkovou mortalitou a systémovými koncentracemi bilirubinu [338]. Kardiovaskulární mortalita negativně korelovala s koncentracemi bilirubinu v americké studii na sportujících mužích [339] a podobně vyzněla ve prospěch protektivního vlivu bilirubinu na celkovou mortalitu i další rozsáhlá práce na více 130 000 jedincích [38]. V další publikaci se stejní autoři zaměřili na mortalitní data u jedinců s diagnostikovaným GS. V porovnání s kontrolní skupinou byla úmrtnost u jedinců s GS o polovinu menší [272]. Protektivní účinky bilirubinu na celkovou mortalitu byly zjištěny i u hemodialyzovaných pacientů. Jedinci s gilbertovským genotypem měli ve srovnání s nosiči divoké alely o čtvrtinu nižší úmrtnost [340].

Na druhou stranu je potřeba zmínit, že ne všechny studie prokazují negativní trend systémových koncentrací bilirubinu a celkové mortality. V práci Zuluse *et al.*, mírně zvýšené koncentrace bilirubinu zvyšovaly mortalitu [341]. Korelace mezi koncentracemi bilirubinu a mortalitou (CVD, nádorová a celková) neprokázala ani americká studie čítající 1 200 jedinců s diabetes mellitus 2. typu [342].

Z těchto dat vyplývá, že vyšší koncentrace bilirubinu vykazují jistý benefit ve vztahu k úmrtnosti, a to nejvíce v souvislosti s nádorovou mortalitou.

Naše výsledky jsou v souladu s většinou publikovaných dat. Rovněž jsme prokázali souvislost mezi koncentracemi bilirubinu v cirkulaci a celkovou mortalitou, zejména pak mortalitou nádorovou, zatímco u kardiovaskulárních úmrtí nebyla významná asociace pozorována. Svou roli zde může hrát především věk zkoumané populace (medián 61,6±6,5 let), ve kterém byla onkologická onemocnění hlavní příčinou úmrtnosti.

Asociace mezi polymorfismy promotorové části genu *UGT1A1* a mortalitou nedosahovala statistické významnosti (s největší pravděpodobností v důsledku nízké penetrance *UGT1A1*\*28 genotypu [204], také viz výše), nicméně i tak data vykazovala stejný trend jako v případě koncentrací bilirubinu.

Předchozí studie prokázaly nižší prevalenci onkologických chorob u osob s GS. Například ve studii sledující asociaci systémových koncentrací bilirubinu a kolorektálního karcinomu měli jedinci s fenotypovým GS 4x nižší riziko [112]. S obdobným závěrem přišla i česká práce Jiráskové a spol., ve které byly nízké sérové koncentrace celkového bilirubinu asociovány se zvýšeným rizikem karcinomu tlustého střeva a konečníku a to u obou pohlaví, přítomnost gilbertovské alely *UGT1A1\*28* představovala protekci [249]. Ve velké čínské studii na pacientech s kolorektálním karcinomem byla prevalence GS také velmi nízká, pouze 1,4 % [343]. Nízká prevalence gilbertovského genotypu byla nalezena i v další práci zkoumající vliv polymorfismu *UGT1A1\*28* na vznik kolorektálního karcinomu [344].

#### 4.4. Příloha:

**Tab. 12: Charakteristika populace HAPIEE**

<b>Charakteristika populace HAPIEE</b>			
	<b>Zemřelí</b> (n=447)	<b>Kontrolní skupina</b> (n=1 423)	<b>p-hodnota</b>
<b>Věk</b>	<b>61,6 (6,5)</b>	<b>60,8 (6,7)</b>	<b>0,048</b>
<b>Mužské pohlaví (%)</b>	305 (68,2)	971 (68,2)	0,999
<b>Kouření (%)</b>	<b>194 (43,4)</b>	<b>383 (26,9)</b>	<b>≤0,001</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,0 (5,1)	28,3 (4,3)	0,388
<b>Celkový cholesterol (mmol/l)</b>	5,7 (1,2)	5,8 (1,0)	0,173
<b>TAG (mmol/l)</b>	1,5 (1,1-2,1)	1,5 (1,1-2,1)	0,988
<b>Bilirubin (μmol/l)</b>	<b>12,0 (9,8-15,2)</b>	<b>12,9 (10,9-16,1)</b>	<b>≤0,001</b>
<b>ALT (μkat/l)</b>	<b>0,34 (0,26-0,45)</b>	<b>0,35 (0,28-0,46)</b>	<b>0,022</b>
<b>GGT (μkat/l)</b>	<b>0,36 (0,14-0,67)</b>	<b>0,26 (0,11-0,52)</b>	<b>≤0,001</b>
<b>CRP (mg/l)</b>	<b>2,5 (1,1-5,6)</b>	<b>1,7 (0,9-3,3)</b>	<b>≤0,001</b>
<b>Urea (mmol/l)</b>	<b>4,6 (3,7-5,8)</b>	<b>4,8 (4,0-5,8)</b>	<b>0,021</b>

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl (IQR). Tučně označeny statisticky významné výsledky.

Ve statistickém hodnocení byly použity chi-square test, T-test nebo Spearmanův korelační test.

*Legenda: BMI- body mass index, TAG – triacylglyceroly, ALT – alaninaminotransferáza, GGT- γ-glutamyltransferáza, CRP – C reaktivní protein.*

**Tabulka 13: Vztah genotypů *UGT1A1* k jednotlivým biochemickým markerům**

<i>UGT1A1</i> genotyp				
	Polymorfismy			p-hodnota
	6/6	6/7	7/7	
Celkem (n=1 870)	759 (40,6 %)	844 (45,1 %)	267 (14,3 %)	
<b>Bilirubin</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>11,7 (10,0-13,9)</b>	<b>13,0 (10,9-15,6)</b>	<b>19,1 (14,6-25,0)</b>	<b><math>\leq 0,001</math></b>
ALT ( $\mu\text{kat/l}$ )	0,35 (0,28-0,45)	0,34 (0,27-0,46)	0,34 (0,27-0,45)	0,519
GGT ( $\mu\text{kat/l}$ )	0,29 (0,12-0,57)	0,28 (0,12-0,56)	0,28 (0,12-0,51)	0,311
CRP (mg/l)	1,8 (0,9-3,6)	1,9 (0,9-3,9)	1,8 (0,9-3,8)	0,596
Urea (mmol/l)	4,9 (4,0-5,8)	4,7 (3,9-5,7)	4,8 (3,8-5,8)	0,105

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl. Tučně zobrazeny statisticky významné výsledky. P-hodnota určena Spearmanovým korelačním testem.

**Tabulka 14: Vztah plazmatických koncentrací bilirubinu k mortalitě**

Příčina úmrtí	Koncentrace bilirubinu (μmol/l)	Počet úmrtí (n)	Model 1		Model 2		Model 3		
			OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)	
<b>Všechny (n= 447)</b>	≤ 10	120	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)	
	10-17	253	<b>0,49</b>	<b>(0,37-0,64)</b>	<b>0,60</b>	<b>(0,45-0,79)</b>	<b>0,62</b>	<b>(0,47-0,82)</b>	
	≥ 17	74	<b>0,47</b>	<b>(0,33-0,66)</b>	<b>0,61</b>	<b>(0,42-0,87)</b>	<b>0,63</b>	<b>(0,43-0,92)</b>	
	p-hodnota pro trend			<b>≤0,001</b>		<b>0,004</b>		<b>0,010</b>	
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,659		0,746		0,795	
<b>CVD (n=139)</b>	≤ 10	30	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)	
	10-17	82	0,73	(0,47-1,13)	0,87	(0,55-1,37)	0,91	(0,58-1,44)	
	≥ 17	27	0,79	(0,45-1,38)	1,03	(0,58-1,83)	1,09	(0,61-1,95)	
	p-hodnota pro trend			0,407		0,923		0,793	
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,240		0,190		0,187	
<b>Nádorová onemocnění (n=211)</b>	≤ 10	68	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)	
	10-17	117	<b>0,44</b>	<b>(0,32-0,61)</b>	<b>0,52</b>	<b>(0,36-0,72)</b>	<b>0,54</b>	<b>(0,38-0,76)</b>	
	≥ 17	26	<b>0,32</b>	<b>(0,20-0,52)</b>	<b>0,39</b>	<b>(0,24-0,65)</b>	<b>0,41</b>	<b>(0,25-0,69)</b>	
	p-hodnota pro trend			<b>≤0,001</b>		<b>≤0,001</b>		<b>≤0,001</b>	
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,549		0,638		0,706	
<b>Ostatní (n=97)</b>	≤ 10	22	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)	
	10-17	54	0,69	(0,41-1,16)	0,86	(0,51-1,48)	0,87	(0,50-1,50)	
	≥ 17	21	0,85	(0,45-1,60)	1,08	(0,56-2,09)	1,00	(0,51-1,98)	
	p-hodnota pro trend			0,628		0,820		0,999	
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,251		0,183		0,158	

**Model 1:** Adjustováno na věk a pohlaví.

**Model 2:** Adjustováno na věk, pohlaví, socioekonomický status (vzdělání), příjem alkoholu, BMI, poměr celkového/HDL cholesterolu.

**Model 3:** K proměnným z modelu 2 přidány plazmatické aktivity ALT a GGT, a koncentrace CRP a urey.

Tučně zobrazeny statisticky významné výsledky.

**Tabulka 15: Vztah plazmatických koncentrací bilirubinu k mortalitě pro jednotlivá pohlaví**

**MUŽI**

Příčina úmrtí	Koncentrace bilirubinu (μmol/l)	Počet úmrtí (n)	Model 1		Model 2		Model 3	
			OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)
<b>Všechny (n= 305)</b>	≤ 10	71	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	173	<b>0,44</b>	<b>(0,31-0,62)</b>	<b>0,55</b>	<b>(0,39-0,8)</b>	<b>0,57</b>	<b>(0,40-0,83)</b>
	≥ 17	61	<b>0,42</b>	<b>(0,28-0,63)</b>	<b>0,58</b>	<b>(0,38-0,9)</b>	<b>0,59</b>	<b>(0,38-0,92)</b>
	p-hodnota pro trend			<b>≤0,001</b>		<b>0,024</b>		<b>0,031</b>
<b>CVD (n=98)</b>	≤ 10	21	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	55	0,55	(0,33-0,95)	0,65	(0,37-1,14)	0,72	(0,41-1,26)
	≥ 17	22	0,61	(0,33-1,16)	0,81	(0,41-1,56)	0,92	(0,46-1,79)
	p-hodnota pro trend			0,184		0,606		0,868
<b>Nádorová onemocnění (n=134)</b>	≤ 10	39	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	75	<b>0,37</b>	<b>(0,23-0,57)</b>	<b>0,44</b>	<b>(0,28-0,70)</b>	<b>0,45</b>	<b>(0,28-0,71)</b>
	≥ 17	20	<b>0,26</b>	<b>(0,15-0,47)</b>	<b>0,35</b>	<b>(0,19-0,64)</b>	<b>0,35</b>	<b>(0,19-0,64)</b>
	p-hodnota pro trend			<b>≤0,001</b>		<b>≤0,001</b>		<b>≤0,001</b>
<b>Ostatní (n=73)</b>	≤ 10	11	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	43	0,97	(0,49-1,92)	1,27	(0,62-2,60)	1,24	(0,60-2,58)
	≥ 17	19	1,16	(0,54-2,50)	1,51	(0,67-3,40)	1,31	(0,56-3,03)
	p-hodnota pro trend			0,641		0,316		0,560



## ŽENY

Příčina úmrtí	Koncentrace bilirubinu (μmol/l)	Počet úmrtí (n)	Model 1		Model 2		Model 3	
			OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)
<b>Všechny</b> (n= 142)	≤ 10	49	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	80	<b>0,57</b>	<b>(0,37-0,87)</b>	0,66	(0,43-1,03)	0,71	(0,45-1,11)
	≥ 17	13	<b>0,58</b>	<b>(0,29-1,16)</b>	0,61	(0,29-1,27)	0,63	(0,30-1,35)
	p-hodnota pro trend			<b>0,022</b>		0,078		0,128
<b>CVD</b> (n=41)	≤ 10	9	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	27	1,19	(0,54-2,60)	1,51	(0,67-3,41)	1,57	(0,69-3,59)
	≥ 17	5	1,37	(0,44-4,27)	1,58	(0,47-5,21)	1,57	(0,46-5,32)
	p-hodnota pro trend			0,568		0,356		0,348
<b>Nádorová onemocnění</b> (n=77)	≤ 10	29	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	42	<b>0,54</b>	<b>(0,32-0,91)</b>	<b>0,59</b>	<b>(0,34-1,01)</b>	0,63	(0,37-1,10)
	≥ 17	6	<b>0,48</b>	<b>(0,19-1,22)</b>	<b>0,49</b>	<b>(0,19-1,29)</b>	0,52	(0,19-1,40)
	p-hodnota pro trend			<b>0,025</b>		<b>0,05</b>		0,088
<b>Ostatní</b> (n=24)	≤ 10	11	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	11	0,39	(0,17-0,92)	0,45	(0,19-1,11)	0,48	(0,19-1,20)
	≥ 17	2	0,44	(0,10-2,06)	0,47	(0,10-2,34)	0,50	(0,10-2,57)
	p-hodnota pro trend			0,064		0,126		0,164

Tučně statisticky významné výsledky.

**Model 1:** Adjustováno na věk.

**Model 2:** Adjustováno na věk, socioekonomický status (vzdělání), příjem alkoholu, BMI, poměr celkového/HDL cholesterolu.

**Model 3:** K proměnným z modelu 2 přidány plazmatické aktivity ALT a GGT, a koncentrace CRP a urey.

**Tabulka 16: Vztah mezi jednotlivými polymorfismy promotorové oblasti genu *UGT1A1* a mortalitou**

Příčina úmrtí	<i>UGT1A1</i> genotyp	Počet úmrtí (n)	Model 1		Model 2	
			OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)
Všechny (n= 447)	6/6	191	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	6/7	198	0,91	(0,72-1,14)	0,97	(0,77-1,23)
	7/7	58	0,83	(0,59-1,16)	0,98	(0,67-1,43)
	p-hodnota pro trend			0,235		0,873
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,804		0,895
CVD (n=139)	6/6	59	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	6/7	55	0,83	(0,56-1,21)	0,85	(0,58-1,25)
	7/7	25	1,23	(0,75-2,01)	1,36	(0,78-2,39)
	p-hodnota pro trend			0,739		0,631
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,477		0,545
Nádorová onemocnění (n=211)	6/6	91	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	6/7	97	0,95	(0,70-1,29)	1,06	(0,77-1,44)
	7/7	23	0,70	(0,43-1,14)	0,98	(0,58-1,68)
	p-hodnota pro trend			0,208		0,889
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,734		0,693
Ostatní (n=97)	6/6	41	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	6/7	46	1,01	(0,65-1,56)	1,00	(0,64-1,55)
	7/7	10	0,66	(0,33-1,34)	0,57	(0,26-1,25)
	p-hodnota pro trend			0,374		0,293
	p-hodnota vztažena na pohlaví			0,581		0,571

Data zpracována logistickou regresí.

**Model 1:** Adjustováno na věk a pohlaví.

**Model 2:** Adjustováno na věk, pohlaví a plazmatické koncentrace bilirubinu.

## 5. KARDIOVASKULÁRNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY

Přestože je hlavním tématem této disertační práce postavení bilirubinu ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám a celkové mortalitě, předmětem studia byly i další rizikové faktory, které se podílí na kardiovaskulárním rizikovém profilu.

Přehled o vývoji a změnách v hlavních rizikových faktorech je podrobně popsán v naší další práci [324, 345]. Tato data vychází z výsledků epidemiologického šetření studie MONICA a následně Czech post-MONICA. Celý tento projekt je unikátní v délce svého sledování (od roku 1985-2018), a ukazuje na vývoj rizikového profilu obyvatelstva [345]. Na základě těchto výsledků byl mezi roky 1985-2007 vytvořen validovaný statistický model IMPACT, který přinesl vysvětlení o poklesu ischemické choroby srdeční v České republice [346].

Poslední studie post-MONICA byla provedena mezi lety 2015-2018. Opět šlo o vyšetření 1 % náhodně vybraného vzorku české populace (věk 24-62 let, 48 % mužů). Poslední výsledky této rozsáhlé analýzy přinesly zajímavé závěry. Ačkoliv došlo v řadě sledovaných parametrů ke zlepšení rizikového profilu obyvatelstva (např. pokles prevalence kouření u mužů z 45 % na 23,9 %,  $p \leq 0,01$ , pokles průměrných hodnot systolického a diastolického krevního tlaku, zlepšení cholesterolemie - u mužů z  $6,21 \pm 1,29$  na  $5,3 \pm 1,05$  mmol/l, u žen z  $6,18 \pm 1,26$  na  $5,31 \pm 1$  mmol/l,  $p \leq 0,001$ , průměrný pokles o 14 %), nadále přetrvává vysoká prevalence základních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění [324, 345, 347]. Jako dlouhodobý problém se jeví nárůst BMI, zejména u mužů ( $29,1 \pm 4,8$  kg/m<sup>2</sup> vs. ženy  $27,5 \pm 6,1$  kg/m<sup>2</sup>) [324]. Současně roste i prevalence obezity v mužské populaci (37,3 %), zatímco u žen se parametry během posledních 30 let významně nemění [348]. Ví se, že BMI je jedním z významných rizikových faktorů vzniku metabolického syndromu, který vede mimo jiné i k vychýlení z oxidačně-redoxní rovnováhy [345]. Z výsledku epidemiologické šetření také vyplývá i jisté zlepšení lipidového spektra, zejména u věkové skupiny nad 55 let, kde až ¼ respondentů přiznává pravidelné užívání hypolipidemické léčby, na rozdíl od mladších respondentů do 45 let, kde je léčba cholesterolemie spíše vzácná, pravděpodobně i v důsledku podcenění preventivních opatření v této mladší věkové skupině. Toto potvrzují i data o celkové respondenci, která byla právě ve skupině 25-34 let nejnižší [324].

Kromě konvenčních rizikových faktorů se epidemiologové opírají i o nové biochemické markery. Ty by měly být snadno reprodukovatelné a použitelné v rozsáhlé klinické praxi. Jedním z nich by mohla být nejen koncentrace bilirubinu (viz výše) ale i kyseliny močové [349].

Změna životního stylu vede v rozvinutých státech světa k nárůstu koncentrací kyseliny močové v séru [350, 351]. Patofyziologické mechanismy kyseliny močové vedou k endoteliální dysfunkci či zvýšené aktivitě reninu [352, 353]. Existují skutečně důkazy, že zvýšené sérové

koncentrace kyseliny močové mohou predikovat kardiovaskulární příhody [354, 355], na druhou stranu jiné práce ale tento vztah neprokázaly [355, 356]. O důležitosti tohoto markeru svědčí i fakt, že koncentrace kyseliny močové byly v roce 2018 zařazeny Evropskou kardiologickou společností a Evropskou společností pro hypertenzi na seznam základních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění a bylo doporučeno jejich rutinní stanovení u každého pacienta [2, 355]. Jako hranice hyperurikémie jsou stanoveny sérové koncentrace kyseliny močové 420  $\mu\text{mol/l}$  u mužů a 360  $\mu\text{mol/l}$  u žen.

Další prací, studující rizikové faktory aterosklerózy, na které jsem se spolupodílela, byla právě studie poukazující na vztah koncentrací kyseliny močové a kardiovaskulárního rizika v průběhu 10 let [357]. Do studie vycházející opět z populace rekrutované podle metodiky a etických pravidel studie Czech post-MONICA bylo rekrutováno celkem 3 505 (48,7 % mužů) a 2 302 (47,2 % mužů) jedinců z let 2006-2009 a 2015-2018. K odhadu 10 letého rizika kardiovaskulární mortality byl užít skórovací systém SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation), podle kterého byli jedinci rozděleni do 4 kategorií podle míry rizika.

Výsledky této práce poukazují na významnou prediktivní roli koncentrací kyseliny močové ve smyslu 10-letého rizika úmrtí na kardiovaskulární choroby, definovaného tabulkami SCORE, ale jen pro ženskou populaci. Každé zvýšení sérové koncentrace kyseliny močové o 10  $\mu\text{mol/l}$  bylo spojeno až s čtyřnásobným rizikem nárůstu kardiovaskulární mortality během 10 let ( $p \leq 0,01$ ). Hodnota pro ženy určující vysoké riziko stanovené skórovacím systémem SCORE je koncentrace kyseliny močové  $\geq 309 \mu\text{mol/l}$ . U mužů tento trend zaznamenán nebyl.

Genderově rozdílné výsledky jsou pravděpodobně dány rozdílným rizikovým profilem sledované populace. Skupina mužů vykazovala vyšší rizikový profil 10-letého přežití dle tabulek SCORE (29,4 % muži vs. 12,6 % ženy) již na začátku studie, a proto se pravděpodobně v adjustaci s dalšími rizikovými faktory koncentrace kyseliny močové v séru neprojevila jako možný prediktivní marker vysokého kardiovaskulárního rizika [357]. Podobné výsledky přinesly i výsledky studie NHANES I [354]. Naproti tomu u žen jsou koncentrace kyseliny močové silným prediktorem kardiovaskulární mortality, který je zcela nezávislý na hodnotách skórovacího systému SCORE a ostatních, konvenčních rizikových faktorech. Z výsledků evropských sledování se ukazuje, že SCORE systém vykazuje u žen ve zvýšeném kardiovaskulární riziku mnohem nižší senzitivitu oproti mužům (ženy 13-19 % vs. muži 60- 62 %) [358, 359]. Tabulky SCORE tak mohou u žen podhodnocovat globální kardiovaskulární riziko [360].

Sérové koncentrace kyseliny močové představují nezávislý rizikový faktor 10-letého kardiovaskulárního rizika u žen, ale ne u mužů. V porovnání se stávajícími platnými normami

koncentrací kyseliny močové v séru bylo vyšší kardiovaskulární riziko zaznamenáno již u mnohem nižších sérových koncentrací kyseliny močové (310-333  $\mu\text{mol/l}$ ). V budoucnu bude potřeba ještě dalších analýz k posouzení koncentrací kyseliny močové jako prediktoru u již existujícího vysokého kardiovaskulární rizika jak žen, tak zejména mužů.

## 6. ZÁVĚR

Bilirubin je potentním biomarkerem se silnými antioxidačními účinky. Na jeho homeostáze se podílí řada faktorů. Vzhledem k jejich vlivu na koncentrace bilirubinu v cirkulaci je i dnes velmi obtížné stanovit optimální referenční meze, které by reflektovaly skutečný stav dané populace. Z výsledků naší práce pro českou populaci vyplývá, že referenční meze, které jsou platné dnes, neodráží skutečné rozložení koncentrací bilirubinu. Referenční meze pro naši populaci jsou ve skutečnosti širší a v porovnání s těmi v současnosti užívanými se posunuly k vyšším koncentracím a patrně by měly být revidovány. Na distribuci koncentrací bilirubinu se v populaci podílí i výskyt GS, jehož prevalence je v České republice srovnatelná s okolními evropskými státy.

Koncentrace bilirubinu v cirkulaci jsou asociovány s dalšími biochemickými markery, zejména těmi, které se uplatňují v patogenezi metabolického syndromu. U podskupiny mužů s akutním koronárním syndromem byly zaznamenány nízké koncentrace sérového bilirubinu pravděpodobně v důsledku zvýšené konzumpce bilirubinu jako antioxidantu.

Dále jsme prokázali na reprezentativním vzorku evropské populace negativní asociaci mezi systémovými koncentracemi bilirubinu a mortalitou, zejména na onkologická onemocnění, zatímco vztah ke kardiovaskulární mortalitě nedosáhl statistické významnosti. Podobný trend byl pozorován i pro jednotlivé polymorfismy genu *UGT1A1* zodpovědné za manifestaci GS v kavkazské populaci.

V České republice zjišťujeme vysokou prevalenci základních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Ke snížení kardiovaskulárního rizika je nutná včasná sanace konvenčních rizikových faktorů i u mladších věkových skupin. K lepší stratifikaci rizika by mohly pomáhat i rutinně užívané biochemické markery. Jedním z nadějných biochemických markerů odhadu aterosklerotického kardiovaskulárního rizika se jeví koncentrace bilirubinu a kyseliny močové. V budoucnu bude potřeba ještě dalších analýz k posouzení nejen koncentrací kyseliny močové jako prediktoru kardiovaskulárního rizika ale i dalších potentních biomarkerů a jejich srovnání s konvenčními rizikovými faktory.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Timmis, A., et al., *Cardiovascular disease statistics from the European atlas: inequalities between high-and middle-income member countries of the ESC*. 2018.
3. [https://www.who.int/nmh/publications/fact\\_sheet\\_cardiovascular\\_en.pdf?ua=1](https://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_cardiovascular_en.pdf?ua=1).
4. database, W.m., [https://www.who.int/healthinfo/statistics/mortality\\_rawdata/en/](https://www.who.int/healthinfo/statistics/mortality_rawdata/en/).
5. Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., ... Townsend, N. (2017). *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*. Brussels: European Heart Network.
6. Wang, Y., O.K. Chun, and W.O. Song, *Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies*. *Nutrients*, 2013. **5**(8): p. 2969-3004.
7. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 801-809.
8. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2746-2753.
9. Grundy, S., *Cholesterol, atherosclerosis and coronary heart disease*. Slide Atlas of Lipid Disorders (Unit 1). New York: Gower Medical Publishing, 1991.
10. Cífková, R., et al., *Summary of the European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012)*. *Cor et Vasa*, 2014. **2**(56): p. e169-e189.
11. Mach, F., et al., *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS)*. *European Heart Journal*, 2020. **41**(1): p. 111-188.
12. Reiner, Ž., et al., *ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)*. *European Heart Journal*, 2011. **32**(14): p. 1769-1818.
13. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-1143.
14. Ross, R., *Atherosclerosis — An Inflammatory Disease*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **340**(2): p. 115-126.
15. Aviram, M., *Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1993. **98**(1): p. 1-9.
16. van Hinsbergh, V.W.M., et al., *Role of endothelial cells and their products in the modification of low-density lipoproteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1986. **878**(1): p. 49-64.
17. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1992. **13**(4): p. 341-390.
18. Cybulsky, M.I. and M. Gimbrone, *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. *Science*, 1991. **251**(4995): p. 788-791.
19. Edfeldt, K., et al., *Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions A possible pathway for plaque activation*. *Circulation*, 2002. **105**(10): p. 1158-1161.
20. Gerrity, R.G., *The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions*. *The American Journal of Pathology*, 1981. **103**(2): p. 181.
21. Kruth, H., *Macrophage foam cells and atherosclerosis*. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 2001. **6**: p. D429-55.

22. Aqel, N., et al., *Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques*. *Atherosclerosis*, 1984. **53**(3): p. 265-271.
23. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *Journal of Clinical Investigation*, 1994. **94**(6): p. 2493.
24. Johnson, B.D., et al., *Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women The National Heart, Lung, and Blood Institute–sponsored women’s ischemia syndrome evaluation (WISE)*. *Circulation*, 2004. **109**(6): p. 726-732.
25. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**(12): p. 1805-1812.
26. Tsukahara, H., *Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine*. *Current Medicinal Chemistry*, 2007. **14**(3): p. 339-51.
27. Davies, K.J., *Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(20): p. 9895-901.
28. J., R., <1999\_12\_774-780.pdf>. *Chemické listy*, 1998(774): p. 93.
29. Toledano, B.D.A.M.B., *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, October 2007. **8**(813-824).
30. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiological Reviews*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
31. Pláteník, J., *Volné radikály, antioxidanty a stárnutí*, in *Interní Medicína pro Praxi*. 2009. p. 30-33.
32. Fridovich, I., *The biology of oxygen radicals*. *Science*, 1978. **201**(4359): p. 875-80.
33. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. , , *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. *Biochemical Journal*, 1984. **219**(1): p. 1.-14.
34. Babior, B.M., *Superoxide: a two-edged sword*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1997. **30**(2): p. 141-55.
35. Štípek, S.a.k., *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing Avicenum, 2000. **ISBN 80-7169**: p. 704-4.
36. Temme, E.H., et al., *Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population*. *Cancer Causes & Control*, 2001. **12**(10): p. 887-894.
37. Hultqvist, M., et al., *The protective role of ROS in autoimmune disease*. *Trends in Immunology*, 2009. **30**(5): p. 201-8.
38. Horsfall, L.J., I. Nazareth, and I. Petersen, *Cardiovascular events as a function of serum bilirubin levels in a large, statin-treated cohort*. *Circulation*, 2012. **126**(22): p. 2556-2564.
39. Ratnam, D.V., et al., *Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective*. *Journal of Controlled Release : Official Journal of The Controlled Release Society*, 2006. **113**(3): p. 189-207.
40. Liochev, S.I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2013. **60**: p. 1-4.
41. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
42. Hsyue-Jen Hsieh, et al., *Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications*. *Journal of Biomedical Science*, 2014. **21**:3.



43. Rubbo, H., V. Darley-Usmar, and B.A. Freeman, *Nitric oxide regulation of tissue free radical injury*. Chemical Research in Toxicology, 1996. **9**(5): p. 809-20.
44. Karoui, H., et al., *Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies*. The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(11): p. 6000-9.
45. Gutteridge, J.M.C., *Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1986. **869**(2): p. 119-127.
46. Becker, B.F., *Towards the physiological function of uric acid*. Free Radical Biology and Medicine, 1993. **14**(6): p. 615-631.
47. Vitek, L., *Bilirubin a Interní Choroby*. 2009. Grada Publishing, as: Praha.
48. Mittler, R., *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends in Plant Science, 2002. **7**(9): p. 405-410.
49. MatĚs, J.M., C. Pérez-Gómez, and I.N. De Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clinical Biochemistry, 1999. **32**(8): p. 595-603.
50. Roche, M., et al., *The antioxidant properties of serum albumin*. FEBS Letters, 2008. **582**(13): p. 1783-1787.
51. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-1046.
52. Wu, T.W., K.P. Fung, and C.C. Yang, *Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox*. Life Sciences, 1994. **54**: p. 477-481.
53. Brown, S. and R. Troxler, *Heme degradation and bilirubin formation*, in *Bilirubin*. 2018, CRC Press. p. 1-38.
54. Poland, R.L. and G.B. Odell, *Physiologic jaundice: the enterohepatic circulation of bilirubin*. New England Journal of Medicine, 1971. **284**(1): p. 1-6.
55. Kutty, R.K. and M.D. Maines, *Oxidation of heme c derivatives by purified heme oxygenase. Evidence for the presence of one molecular species of heme oxygenase in the rat liver*. The Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(17): p. 9944-52.
56. Phelan, D., et al., *Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998. **357**(1): p. 155-163.
57. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **28**(2): p. 289-309.
58. Vitek, L. and H.A. Schwertner, *The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases*. Advances in Clinical Chemistry, 2007. **43**: p. 1-57.
59. Schaer, D.J., et al., *CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin*. Blood, 2006. **107**(1): p. 373-80.
60. Van den Steen, P.E., et al., *The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(27): p. 18626-18637.
61. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(3): p. 207-214.
62. Yoshida, T., et al., *Hmox-1 constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene*. Circulation, 2001. **103**(12): p. 1695-1701.

63. Yoshinaga, T., S. Sassa, and A. Kappas, *Purification and properties of bovine spleen heme oxygenase. Amino acid composition and sites of action of inhibitors of heme oxidation.* Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(13): p. 7778-7785.
64. Shibahara, S., et al., *Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(23): p. 7865-7869.
65. Dunn, L.L., et al., *New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1.* Antioxidants & Redox Signaling, 2014. **20**(11): p. 1723-1742.
66. Motterlini, R., et al., *NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium.* The American Journal of Physiology, 1996. **270**(1 Pt 2): p. H107-14.
67. Ono, K., T. Mannami, and N. Iwai, *Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women.* Journal of Hypertension, 2003. **21**(8): p. 1497-1503.
68. Choi, A. and J. Alam, *Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1996. **15**(1): p. 9-19.
69. Zenke-Kawasaki, Y., et al., *Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1.* Molecular and Cellular Biology, 2007. **27**(19): p. 6962-6971.
70. Yamada, N., et al., *Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema.* The American Journal of Human Genetics, 2000. **66**(1): p. 187-195.
71. Chen, Y.-H., et al., *Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients.* Human Genetics, 2002. **111**(1): p. 1-8.
72. Kaneda, H., et al., *Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002. **22**(10): p. 1680-1685.
73. Kikuchi, A., et al., *Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism.* Human Genetics, 2005. **116**(5): p. 354-360.
74. Katsuoka, F. and M. Yamamoto, *Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): history, structure and function.* Gene, 2016. **586**(2): p. 197-205.
75. Reichard, J.F., G.T. Motz, and A. Puga, *Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1.* Nucleic Acids Research, 2007. **35**(21): p. 7074-7086.
76. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1997. **37**: p. 517-54.
77. Sun, Y., M. Rotenberg, and M. Maines, *Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(14): p. 8212-8217.
78. McCoubrey, W.K., T. Huang, and M.D. Maines, *Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(19): p. 12568-12574.
79. Ding, Y., W.K. McCoubrey Jr, and M.D. Maines, *Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors: Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO?* European Journal of Biochemistry, 1999. **264**(3): p. 854-861.
80. Basuroy, S., et al., *Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF-*

- α-induced apoptosis*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. **300**(2): p. C256-C265.
81. Schluchter, W.M. and A.N. Glazer, *Characterization of cyanobacterial biliverdin reductase conversion of biliverdin to bilirubin is important for normal phycobiliprotein biosynthesis*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(21): p. 13562-13569.
  82. Barañano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(25): p. 16093-16098.
  83. Maines, M.D., et al., *Human biliverdin reductase, a previously unknown activator of protein kinase C βII*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(11): p. 8110-8122.
  84. House, C. and B.E. Kemp, *Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain*. Science, 1987. **238**(4834): p. 1726-1728.
  85. Lerner-Marmarosh, N., et al., *Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(20): p. 7109-7114.
  86. Maines, M.D., *New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling*. Physiology, 2005. **20**(6): p. 382-389.
  87. Gibbs, P.E., T. Miralem, and M.D. Maines, *Biliverdin reductase: a target for cancer therapy?* Frontiers in Pharmacology, 2015. **6**: p. 119.
  88. Nowis, D., et al., *Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity*. Oncogene, 2006. **25**(24): p. 3365-3374.
  89. Wegiel, B., et al., *Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via phosphatidylinositol 3-kinase and Akt*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(32): p. 21369-21378.
  90. Salim, M., B.A. Brown-Kipphut, and M.D. Maines, *Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(14): p. 10929-10934.
  91. Barañano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
  92. Kravets, A., et al., *Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(19): p. 19916-19923.
  93. Liu, Y., et al., *Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **40**(6): p. 960-967.
  94. Liu, Y., et al., *Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. Free Radical Biology & Medicine, 2006. **40**(6): p. 960-7.
  95. Colpaert, E.E., J.P. Timmermans, and R.A. Lefebvre, *Investigation of the potential modulatory effect of biliverdin, carbon monoxide and bilirubin on nitrergic neurotransmission in the pig gastric fundus*. European Journal of Pharmacology, 2002. **457**(2-3): p. 177-86.
  96. Maines, M.D., et al., *Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001. **296**(3): p. 1091-7.
  97. Magnusson, S., et al., *Heme oxygenase-1, heme oxygenase-2 and biliverdin reductase in peripheral ganglia from rat, expression and plasticity*. Neuroscience, 1999. **95**(3): p. 821-829.

98. Cornelis, P., *Iron Uptake and Homeostasis in Prokaryotic Microorganisms*. Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells, 2014. **2**: p. 303.
99. Stocker, R., et al., *Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and bilirubin*. Methods in Enzymology, 1990. **186**: p. 301-309.
100. Stocker, R., *Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress*. Free Radical Research Communications, 1990. **9**(2): p. 101-112.
101. Beuckmann, C.T., et al., *Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase*. Biochemistry, 1999. **38**(25): p. 8006-8013.
102. Datla, S.R., et al., *Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase-derived oxidative stress*. Hypertension, 2007. **50**(4): p. 636-642.
103. Kwak, J.Y., et al., *Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1991. **1076**(3): p. 369-373.
104. Pflueger, A., et al., *The hyperbilirubinemic Gunn rat is resistant to the pressor effects of angiotensin II*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005. **288**(3): p. F552-F558.
105. CLARK, J.E., et al., *Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress*. Biochemical Journal, 2000. **348**(3): p. 615-619.
106. Lingenhel, A., et al., *Serum bilirubin levels, UGT1A1 polymorphisms and risk for coronary artery disease*. Experimental Gerontology, 2008. **43**(12): p. 1102-1107.
107. Vitek, L., et al., *Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels*. Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 449-456.
108. Watchko, J.F. and C. Tiribelli, *Bilirubin-induced neurologic damage—mechanisms and management approaches*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(21): p. 2021-2030.
109. Watchko, J.F., *Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns*. Neuromolecular Medicine, 2006. **8**(4): p. 513-529.
110. Wagner, K.H., et al., *Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases*. Clinical Science (London, England : 1979), 2015. **129**(1): p. 1-25.
111. Schwertner, H.A. and L. Vitek, *Gilbert syndrome, UGT1A1\*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin*. Atherosclerosis, 2008. **198**(1): p. 1-11.
112. Zucker, S.D., P.S. Horn, and K.E. Sherman, *Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer*. Hepatology, 2004. **40**(4): p. 827-35.
113. Jiraskova, A., et al., *Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer*. International Journal of Cancer, 2012. **131**(7): p. 1549-55.
114. Lenicek, M., et al., *The relationship between serum bilirubin and Crohn's disease*. Inflammatory Bowel Diseases, 2014. **20**(3): p. 481-7.
115. Vitek, L., et al., *Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2010. **39**(6): p. 480-4.
116. Unsal, C., et al., *Detection of subclinical atherosclerosis and diastolic dysfunction in patients with schizophrenia*. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2013. **9**: p. 1531-7.
117. McArdle, P.F., et al., *Association between bilirubin and cardiovascular disease risk factors: using Mendelian randomization to assess causal inference*. BMC Cardiovascular Disorders, 2012. **12**(1): p. 1.

118. Lin, J.P., L. Vitek, and H.A. Schwertner, *Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease*. *Clinical Chemistry*, 2010. **56**(10): p. 1535-43.
119. Stocker, R. and M.A. Perrella, *Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases?* *Circulation*, 2006. **114**(20): p. 2178-89.
120. Cecil, J. *Historical review of bilirubin chemistry*. in *International Symposium on Chemistry and Physiology of Bile Pigments*. 1977. US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health.
121. Ehrlich, P., *Sulfodiazobenzol als reagens auf bilirubin*. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 1884. **23**(1): p. 275-276.
122. Billing, B.H., P. Cole, and G. Lathe, *The excretion of bilirubin as a diglucuronide giving the direct van den Bergh reaction*. *Biochemical Journal*, 1957. **65**(4): p. 774-784.
123. Fischer, H. and H. Orth, *The structural chemistry of the animal pigments*. *Annual Review of Biochemistry*, 1934. **3**(1): p. 410-424.
124. Fischer, H., *On haemin and the relationships between haemin and chlorophyll*. Nobel Lecture Dec, 1930. **11**.
125. Talafant, E., *Properties and composition of the bile pigment giving a direct diazo reaction*. 1956.
126. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1968. **61**(2): p. 748.
127. Tenhunen, R., et al., *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase. Partial purification and characterization*. *Biochemistry*, 1970. **9**(2): p. 298-303.
128. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987. **84**(24): p. 9265-9269.
129. Jirsa, M., B. Vecerek, and M. Ledvina, *Di- and mono-taurobilirubin similar to a directly reacting form of bilirubin in serum*. *Nature*, 1956. **177**: p. 895.
130. Bonnett, R., et al., *The structure of bilirubin*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 1978. **202**(1147): p. 249-268.
131. Blanckaert, N., K.P. Heirwegh, and Z. Zaman, *Comparison of the biliary excretion of the four isomers of bilirubin-IX in Wistar and homozygous Gunn rats*. *Biochemical Journal*, 1977. **164**(1): p. 229-236.
132. Mreihil, K., et al., *Early isomerization of bilirubin in phototherapy of neonatal jaundice*. *Pediatric Research*, 2010. **67**(6): p. 656-659.
133. Wang, X., J.R. Chowdhury, and N.R. Chowdhury, *Bilirubin metabolism: applied physiology*. *Current Paediatrics*, 2006. **16**(1): p. 70-74.
134. Fevery, J., et al., *Plasma bilirubin pigments in health and disease*. *Molecular Aspects of Medicine*, 1987. **9**(5): p. 391-404.
135. Garber, C.C., *Jendrassik-Grof analysis for total and direct bilirubin in serum with a centrifugal analyzer*. *Clinical Chemistry*, 1981. **27**(8): p. 1410-1416.
136. Jendrassik, L., *Vereinfachte photometrische methoden zur bestimmung des blutbilirubins*. *Biochem Z*, 1938. **297**: p. 81-89.
137. Bosma, P.J., *Inherited disorders of bilirubin metabolism*. *Journal of Hepatology*, 2003. **38**(1): p. 107-117.
138. Detection, N.C.E.P.E.P.o. and T.o.H.B.C.i. Adults, *Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III)*. 2002: The Program.

139. Eremiasova, L., et al., *Serum bilirubin in the Czech population—Relationship to the risk of myocardial infarction in males*. *Circulation Journal*, 2020. **84**(10): p. 1779-1785.
140. Friedberg, R.C., et al., *The origin of reference intervals: a College of American Pathologists Q-Probes study of “normal ranges” used in 163 clinical laboratories*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007. **131**(3): p. 348-357.
141. Vitek, L., *Bilirubin as a predictor of diseases of civilization. Is it time to establish decision limits for serum bilirubin concentrations?* *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019. **672**: p. 108062.
142. Stevenson, D.E., *Optimisation of UDP-glucuronyl transferase-catalysed synthesis of testosterone- $\beta$ -D-glucuronide by inhibition of contaminating  $\beta$ -glucuronidase*. *Biotechnology Techniques*, 1999. **13**(1): p. 17-21.
143. Weatherill, P.J. and B. Burchell, *The separation and purification of rat liver UDP-glucuronyltransferase activities towards testosterone and oestrone*. *Biochemical Journal*, 1980. **189**(2): p. 377.
144. Vitek, L., C. Bellarosa, and C. Tiribelli, *Induction of mild hyperbilirubinemia: hype or real therapeutic opportunity?* *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2019. **106**(3): p. 568-575.
145. Zucker, S.D., P.S. Horn, and K.E. Sherman, *Serum bilirubin levels in the US population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer*. *Hepatology*, 2004. **40**(4): p. 827-835.
146. Carlsson, L., L. Lind, and A. Larsson, *Reference values for 27 clinical chemistry tests in 70-year-old males and females*. *Gerontology*, 2010. **56**(3): p. 259-265.
147. Pocock, S., et al., *Diurnal variations in serum biochemical and haematological measurements*. *Journal of Clinical Pathology*, 1989. **42**(2): p. 172-179.
148. Miyake, K., et al., *Seasonal variation in liver function tests: a time-series analysis of outpatient data*. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2009. **46**(5): p. 377-384.
149. Gollan, J., C. Bateman, and B.H. Billing, *Effect of dietary composition on the unconjugated hyperbilirubinaemia of Gilbert's syndrome*. *Gut*, 1976. **17**(5): p. 335-340.
150. Chan-Yeung, M., et al., *The effects of age, smoking, and alcohol on routine laboratory tests*. *American Journal of Clinical Pathology*, 1981. **75**(3): p. 320-326.
151. Witek, K., et al., *Total bilirubin in athletes, determination of reference range*. *Biology of Sport*, 2017. **34**(1): p. 45.
152. Loprinzi, P.D. and S.E. Mahoney, *Association between flavonoid-rich fruit and vegetable consumption and total serum bilirubin*. *Angiology*, 2015. **66**(3): p. 286-290.
153. Fenclova, M., et al., *Poor chemical and microbiological quality of the commercial milk thistle-based dietary supplements may account for their reported unsatisfactory and non-reproducible clinical outcomes*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 1-12.
154. Schwertner, H.A., *Association of smoking and low serum bilirubin antioxidant concentrations*. *Atherosclerosis*, 1998. **136**(2): p. 383-387.
155. Schiele, F., et al., *Biological effects of eleven combined oral contraceptives on serum triglycerides,  $\gamma$ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase, bilirubin and other biochemical variables*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 1998. **36**(11): p. 871-878.
156. IOF, S., *ISO 15189 Medical laboratories--Requirements for quality and competence*. International Organization for Standardization, 2012.
157. Owens, D. and J. Evans, *Population studies on Gilbert's syndrome*. *Journal of Medical Genetics*, 1975. **12**(2): p. 152-156.
158. Vitek, L., et al., *The inverse association of elevated serum bilirubin levels with subclinical carotid atherosclerosis*. *Cerebrovascular Diseases*, 2006. **21**(5-6): p. 408-414.

159. Creeden, J.F., et al., *Bilirubin as a metabolic hormone: the physiological relevance of low levels*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2021. **320**(2): p. E191-E207.
160. Breimer, L.H., et al., *Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men*. Clinical Chemistry, 1995. **41**(10): p. 1504-1508.
161. Jirásková, A., et al., *Association of low bilirubin levels and promoter variations in UGT1A1 gene with diabetes mellitus type 2*. Hepatology International, 2011. **5**: p. 37.
162. Masopust, J., *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření část II*. 1998: Karolinum.
163. Jacobsen, J., *Binding of bilirubin to human serum albumin—determination of the dissociation constants*. The FEBS Letters, 1969. **5**(2): p. 112-114.
164. Goessling, W. and S.D. Zucker, *Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma*. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology, 2000. **279**(2): p. G356-65.
165. Hsia, J.C., et al., *alpha-fetoprotein binding specificity for arachidonate, bilirubin, docosahexaenoate, and palmitate. A spin label study*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **255**(9): p. 4224-4227.
166. Minomo, A., et al., *Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IXalpha revealed by phage display*. The FEBS Journal, 2011. **278**(21): p. 4100-11.
167. Jacobsen, C., *Lysine residue 240 of human serum albumin is involved in high-affinity binding of bilirubin*. The Biochemical Journal, 1978. **171**(2): p. 453-9.
168. Brodersen, R. and L. Stern, *Binding of bilirubin to albumin*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1980. **11**(4): p. 307-399.
169. Vitek, L. and J.D. Ostrow, *Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects*. Current Pharmaceutical Design, 2009. **15**(25): p. 2869-83.
170. Kapitulnik, J., *Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties*. Molecular Pharmacology, 2004. **66**(4): p. 773-779.
171. Davis, D.R. and R.A. Yeary, *Effects of sulfadimethoxine on tissue distribution of (14C)bilirubin in the newborn and adult hyperbilirubinemic Gunn rate*. Pediatric Research, 1975. **9**(11): p. 846-50.
172. Shapiro, S.M., *Bilirubin toxicity in the developing nervous system*. Pediatric Neurology, 2003. **29**(5): p. 410-421.
173. Keppler, D., *The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia*. Drug Metabolism and Disposition, 2014. **42**(4): p. 561-565.
174. Odell, G.B., *The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications*. The Journal of Pediatrics, 1959. **55**(3): p. 268-279.
175. Keppler, D., *The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(4): p. 561-5.
176. Lin, L., et al., *SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities*. Nature Reviews Drug Discovery, 2015. **14**(8): p. 543-560.
177. van de Steeg, E., et al., *Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver*. The Journal of Clinical Investigation, 2012. **122**(2): p. 519-528.
178. Tsuboyama, T., et al., *Hepatocellular carcinoma: hepatocyte-selective enhancement at gadoxetic acid-enhanced MR imaging—correlation with expression of sinusoidal and canalicular transporters and bile accumulation*. Radiology, 2010. **255**(3): p. 824-833.
179. Campbell, S., *The Role of Hepatic Transporters in the Uptake and Efflux of Porphyrins*. 2009.

180. Kalliokoski, A. and M. Niemi, *Impact of OATP transporters on pharmacokinetics*. British Journal of Pharmacology, 2009. **158**(3): p. 693-705.
181. Seithel, A., et al., *The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3*. Drug Metabolism and Disposition, 2007. **35**(5): p. 779-786.
182. Ieiri, I., S. Higuchi, and Y. Sugiyama, *Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2009. **5**(7): p. 703-729.
183. van de Steeg, E., et al., *Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(4): p. 821-832.
184. Meier, P.J. and B. Stieger, *Bile salt transporters*. Annual Review of Physiology, 2002. **64**(1): p. 635-661.
185. Sticova, E. and M. Jirsa, *New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications*. World Journal of Gastroenterology, 2013. **19**(38): p. 6398-407.
186. van de Steeg, E., et al., *Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs*. The Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(8).
187. Iusuf, D., E. Van De Steeg, and A. Schinkel, *Hepatocyte hopping of OATP1B substrates contributes to efficient hepatic detoxification*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2012. **92**(5): p. 559-562.
188. Gollan, J. and S. Zucker, *A new voyage of discovery: transport through the hepatocyte*. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 1996. **107**: p. 48.
189. Tipping, E., B. Ketterer, and L. Christodoulides, *Interactions of small molecules with phospholipid bilayers. Binding to egg phosphatidylcholine of some organic anions (bromosulphophthalein, oestrone sulphate, haem and bilirubin) that bind to ligandin and aminoazo-dye-binding protein A*. The Biochemical Journal, 1979. **180**(2): p. 327-37.
190. Wolkoff, A.W., et al., *Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver*. The American Journal of Physiology, 1979. **236**(6): p. E638-48.
191. Theilmann, L., et al., *Does Z-protein have a role in transport of bilirubin and bromosulphophthalein by isolated perfused rat liver?* Hepatology, 1984. **4**(5): p. 923-6.
192. Ono, T. and S. Odani, *Initial studies of the cytoplasmic FABP superfamily*. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences, 2010. **86**(3): p. 220-8.
193. Lathe, G. and M. Walker, *The synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver*. Biochemical Journal, 1958. **70**(4): p. 705.
194. Erlinger, S., I.M. Arias, and D. Dhumeaux, *Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences*. Gastroenterology, 2014. **146**(7): p. 1625-1638.
195. Fevery, J., et al., *Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease*. The Journal of Clinical Investigation, 1972. **51**(9): p. 2482-92.
196. Muraca, M., et al., *Unconjugated and conjugated bilirubin pigments during perinatal development. II. Studies on serum of healthy newborns and of neonates with erythroblastosis fetalis*. Biology of The Neonate, 1990. **57**(1): p. 1-9.
197. Kadakol, A., et al., *Interaction of coding region mutations and the Gilbert-type promoter abnormality of the UGT1A1 gene causes moderate degrees of unconjugated*



- hyperbilirubinaemia and may lead to neonatal kernicterus*. Journal of Medical Genetics, 2001. **38**(4): p. 244-249.
198. Court, M.H., *Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system*. Drug Metabolism Reviews, 2010. **42**(1): p. 209-224.
  199. Mackenzie, P.I., et al., *The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence*. Pharmacogenetics and Genomics, 1997. **7**(4): p. 255-269.
  200. Guillemette, C., *Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes*. The Pharmacogenomics Journal, 2003. **3**(3): p. 136-158.
  201. Mackenzie, P.I., et al., *Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily*. Pharmacogenetics and Genomics, 2005. **15**(10): p. 677-685.
  202. Lin, J.P., et al., *Evidence for a gene influencing serum bilirubin on chromosome 2q telomere: A genome-wide scan in the Framingham Offspring Study*. American Journal of Human Genetics, 2002. **71**(4): p. 215-215.
  203. Kronenberg, F., et al., *A genome scan for loci influencing anti-atherogenic serum bilirubin levels*. European Journal of Human Genetics, 2002. **10**(9): p. 539-546.
  204. Bosma, P.J., et al., *The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**: p. 1171-1175.
  205. Guillemette, C., et al., *UGT genomic diversity: beyond gene duplication*. Drug Metabolism Reviews, 2010. **42**(1): p. 24-44.
  206. Raijmakers, M.T., et al., *Association of human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene*. Journal of Hepatology, 2000. **33**(3): p. 348-351.
  207. Nathanson, M.H. and J.L. Boyer, *Mechanisms and regulation of bile secretion*. Hepatology, 1991. **14**(3): p. 551-566.
  208. Jansen, P., *Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome*. European Journal of Pediatrics, 1999. **158**(2): p. S089-S094.
  209. Marcus, J., J.L. Dupree, and B. Popko, *Myelin-associated glycoprotein and myelin galactolipids stabilize developing axo-glia interactions*. The Journal of Cell Biology, 2002. **156**(3): p. 567-577.
  210. Kamisako, T., et al., *Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2*. Hepatology, 1999. **30**(2): p. 485-490.
  211. Kanda, D., et al., *Novel large-scale deletion (whole exon 7) in the ABCC2 gene in a patient with the Dubin-Johnson syndrome*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2009. **24**(5): p. 464-8.
  212. Dubin, I. and F.B. JOHNSON, *Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells*. Medicine, 1954. **33**(3): p. 155-198.
  213. Kikuchi, S., et al., *Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes*. Nature Genetics, 2002. **31**(3): p. 320-325.
  214. Fan, X., A. Huang, and S. Chen, *Determination and comparison of beta-glucuronidase activity among strains of B. fragilis and E. coli*. Journal of West China University of Medical Sciences, 1991. **22**(2): p. 211-2.
  215. Midtvedt, T. and B.E. Gustafsson, *Microbial conversion of bilirubin to urobilins in vitro and in vivo*. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology, 1981. **89**(2): p. 57-60.

216. Vitek, L., et al., *The impact of intestinal microflora on serum bilirubin levels*. Journal of Hepatology, 2005. **42**(2): p. 238-43.
217. Esteller, A., *Physiology of bile secretion*. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2008. **14**(37): p. 5641.
218. Wagner, K.-H., et al., *Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases*. Clinical Science, 2015. **129**(1): p. 1-25.
219. Roche, S.P. and R. Kobos, *Jaundice in the adult patient*. American Family Physician, 2004. **69**(2): p. 299-304.
220. Maisels, M.J. and K. Gifford, *Normal serum bilirubin levels in the newborn and the effect of breast-feeding*. Pediatrics, 1986. **78**(5): p. 837-843.
221. Newman, T.B., et al., *Outcomes among newborns with total serum bilirubin levels of 25 mg per deciliter or more*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(18): p. 1889-1900.
222. Porter, M.L. and B.L. Dennis, *Hyperbilirubinemia in the term newborn*. American Family Physician, 2002. **65**(4).
223. Hsia, D.Y.-Y., et al., *Erythroblastosis fetalis: Studies of serum bilirubin in relation to kernicterus*. New England Journal of Medicine, 1952. **247**(18): p. 668-671.
224. McDonagh, A.F., L.A. Palma, and R. Schmid, *Reduction of biliverdin and placental transfer of bilirubin and biliverdin in the pregnant guinea pig*. The Biochemical Journal, 1981. **194**(1): p. 273-82.
225. Ostrow, J.D. and C. Tiribelli, *Bilirubin induced neurological damage: from the cell to the newborn*. Current Pharmaceutical Design, 2009. **15**(25): p. 2868.
226. Oktay, R., M. Satar, and A. Atici, *The risk of bilirubin encephalopathy in neonatal hyperbilirubinemia*. The Turkish Journal of Pediatrics, 1996. **38**(2): p. 199-204.
227. Gitto, E., et al., *Causes of oxidative stress in the pre-and perinatal period*. Neonatology, 2002. **81**(3): p. 146-157.
228. Monaghan, G., et al., *Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn*. The Journal of Pediatrics, 1999. **134**(4): p. 441-446.
229. Ennever, J.F., et al., *Phototherapy for neonatal jaundice: in vivo clearance of bilirubin photoproducts*. Pediatric Research, 1985. **19**(2): p. 205-208.
230. Xiong, T., et al., *The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do?* European Journal of Pediatrics, 2011. **170**(10): p. 1247-1255.
231. Bernhard, K., G. Ritzel, and K. Steiner, *Über eine biologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe. Bilirubin und Biliverdin als Antioxydantien für das Vitamin A und die essentiellen Fettsäuren*. Helvetica Chimica Acta, 1954. **37**(1): p. 306-313.
232. Stocker, R. and J.F. Keaney, *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiological Reviews, 2004. **84**(4): p. 1381-1478.
233. Frei, B., R. Stocker, and B.N. Ames, *Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(24): p. 9748-9752.
234. Vitek, L., et al., *Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels*. Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 449-456.
235. Neuzil, J. and R. Stocker, *Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(24): p. 16712-16719.
236. Jangi, S., L. Otterbein, and S. Robson, *The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2013. **45**(12): p. 2843-2851.

237. Basiglio, C.L., et al., *Complement activation and disease: protective effects of hyperbilirubinaemia*. *Clinical Science*, 2009. **118**(2): p. 99-113.
238. Nejedlá, Z., *The development of immunological factors in infants with hyperbilirubinemia*. *Pediatrics*, 1970. **45**(1): p. 102-104.
239. Rocuts, F., et al., *Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells*. *Cell Transplantation*, 2010. **19**(4): p. 443-451.
240. Mazzone, G.L., et al., *Bilirubin inhibits the TNF alpha-related induction of three endothelial adhesion molecules*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. **386**(2): p. 338-344.
241. Hwang, H.J., S.W. Lee, and S.H. Kim, *Relationship between bilirubin and C-reactive protein*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011. **49**(11): p. 1823-8.
242. Vitek, L., et al., *Relationship between serum bilirubin and markers of inflammation and oxidative stress*. *Journal of Gastroenterology And Hepatology*, 2007. **22**: p. A235.
243. Verma, S. and E.T. Yeh, *C-reactive protein and atherothrombosis-beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation*. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2003. **285**(5): p. R1253-6.
244. Vitek, L., *The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases*. *Frontiers in Pharmacology*, 2012. **3**: p. 55.
245. Verma, S. and E.T. Yeh, *C-reactive protein and atherothrombosis—beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2003. **285**(5): p. R1253-R1256.
246. Mazzone, G.L., et al., *Bilirubin inhibits the TNF $\alpha$ -related induction of three endothelial adhesion molecules*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. **386**(2): p. 338-344.
247. Hansen, T.W.R., S.B. Mathiesen, and S.I. Walaas, *Bilirubin has widespread inhibitory effects on protein phosphorylation*. *Pediatric Research*, 1996. **39**(6): p. 1072-1077.
248. Neuzil, J., S.R. Thomas, and R. Stocker, *Requirement for, promotion, or inhibition by  $\alpha$ -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997. **22**(1-2): p. 57-71.
249. Jirásková, A., et al., *Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer*. *International Journal of Cancer*, 2012. **131**(7): p. 1549-1555.
250. Sedlak, T.W. and S.H. Snyder, *Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle*. *Pediatrics*, 2004. **113**(6): p. 1776-1782.
251. Liu, Y., et al., *Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. *The Journal of Immunology*, 2008. **181**(3): p. 1887-1897.
252. Vitek, L. and H.A. Schwertner, *The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases*. *Advances in Clinical Chemistry*, 2007. **43**: p. 1-57.
253. Vitek, L., *Role of bilirubin in the prevention of cardiovascular diseases and cancer*. *Casopis Lekarů Ceskych*, 2016. **155**(2): p. 10-14.
254. Gordon, D.M., et al., *Bilirubin remodels murine white adipose tissue by reshaping mitochondrial activity and the coregulator profile of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* . *Journal of Biological Chemistry*, 2020. **295**(29): p. 9804-9822.
255. Gordon, D.M., et al., *RNA sequencing in human HepG2 hepatocytes reveals PPAR- $\alpha$  mediates transcriptome responsiveness of bilirubin*. *Physiological Genomics*, 2019. **51**(6): p. 234-240.

256. Schwertner, H.A., W.G. Jackson, and G. Tolan, *Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease*. *Clinical chemistry*, 1994. **40**(1): p. 18-23.
257. Novotny, L. and L. Vitek, *Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies*. *Experimental Biology and Medicine*, 2003. **228**(5): p. 568-571.
258. Huang, S.-S., et al., *Serum bilirubin predicts long-term clinical outcomes in patients with cardiac syndrome X*. *Heart*, 2010. **96**(15): p. 1227-1232.
259. Schwertner, H.A. and L. Vitek, *Gilbert syndrome, UGT1A1\* 28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin*. *Atherosclerosis*, 2008. **198**(1): p. 1-11.
260. Jansen, T. and A. Daiber, *Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase?* *Frontiers in Pharmacology*, 2012. **3**: p. 30.
261. Kwak, M.-S., et al., *Serum bilirubin levels are inversely associated with nonalcoholic fatty liver disease*. *Clinical and Molecular Hepatology*, 2012. **18**(4): p. 383.
262. Kumar, R., et al., *Unconjugated hyperbilirubinemia in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a favorable endogenous response*. *Clinical Biochemistry*, 2012. **45**(3): p. 272-274.
263. Lin, J.P., et al., *Association between the UGT1A1\*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2006. **114**(14): p. 1476-81.
264. Schwertner, H.A. and J.R. Fischer, Jr., *Comparison of various lipid, lipoprotein, and bilirubin combinations as risk factors for predicting coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2000. **150**(2): p. 381-7.
265. Schwertner, H.A. and J.R. Fischer Jr, *Comparison of various lipid, lipoprotein, and bilirubin combinations as risk factors for predicting coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2000. **150**(2): p. 381-387.
266. Schwertner, H.A. and J.R. Fischer Jr, *Combined cholesterol and bilirubin tests as risk predictors for coronary artery disease*. 2005, U.S. Patent No 6,869,802: Washington D.C.
267. Liu, J., et al., *Predictive Value for the Chinese Population of the Framingham CHD Risk Assessment Tool Compared With the Chinese Multi-provincial Cohort Study*. *JAMA*, 2004. **291**(21): p. 2591-2599.
268. Brindle, P., et al., *Predictive accuracy of the Framingham coronary risk score in British men: prospective cohort study*. *British Medical Journal*, 2003. **327**(7426): p. 1267.
269. Conroy, R.M., et al., *Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project*. *European Heart Journal*, 2003. **24**(11): p. 987-1003.
270. Wang, H.-Y., et al., *Serum bilirubin level is negatively correlated with disease progression of peripheral arterial disease: an observational cohort study*. *Angiology*, 2011: p. 0003319711425175.
271. Cüre, E., et al., *The effect of Gilbert's syndrome on the dispersions of QT interval and P-wave: an observational study/QT ve P dalga dispersiyonu üzerine Gilbert sendromunun etkisi: Gözlemsel bir çalışma*. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2013. **13**(6): p. 559.
272. Horsfall, L.J., et al., *Gilbert's syndrome and the risk of death: A population-based cohort study*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013. **28**(10): p. 1643-1647.
273. Ghoorah, K., A. De Soya, and V. Kunadian, *Increased cardiovascular risk in patients with chronic obstructive pulmonary disease and the potential mechanisms linking the two conditions: a review*. *Cardiology in Review*, 2013. **21**(4): p. 196-202.

274. Kayahan, H., et al., *Evaluation of early atherosclerosis in patients with inflammatory bowel disease*. Digestive Diseases and Sciences, 2012. **57**(8): p. 2137-2143.
275. Scalzi, L.V., et al., *Cardiovascular disease risk awareness in systemic lupus erythematosus patients*. Arthritis & Rheumatism, 2008. **58**(5): p. 1458-1464.
276. Balta, S., et al., *Bilirubin levels and their association with carotid intima media thickness and high-sensitivity C-reactive protein in patients with psoriasis vulgaris*. American Journal of Clinical Dermatology, 2014. **15**(2): p. 137-142.
277. Breslin, E., A. Kaufmann, and S. Quenby, *Bilirubin influences the clinical presentation of pre-eclampsia*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2013. **170**(1): p. 111-113.
278. Lin, L.-Y., et al., *Serum bilirubin is inversely associated with insulin resistance and metabolic syndrome among children and adolescents*. Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 563-568.
279. Wu, Y., et al., *Low serum total bilirubin concentrations are associated with increased prevalence of metabolic syndrome in Chinese*. Journal of Diabetes, 2011. **3**(3): p. 217-224.
280. Kwon, K.-M., et al., *Inverse association between total bilirubin and metabolic syndrome in rural Korean women*. Journal of Women's Health, 2011. **20**(6): p. 963-969.
281. Choi, S., K. Yun, and H. Choi, *Relationships between serum total bilirubin levels and metabolic syndrome in Korean adults*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2013. **23**(1): p. 31-37.
282. Bhuiyan, A.R., et al., *Association of serum bilirubin with pulsatile arterial function in asymptomatic young adults: the Bogalusa Heart Study*. Metabolism, 2008. **57**(5): p. 612-616.
283. Ko, G.T., et al., *Serum bilirubin and cardiovascular risk factors in a Chinese population*. Journal of Cardiovascular Risk, 1996. **3**(5): p. 459-463.
284. Inoguchi, T., et al., *Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes*. JaMa, 2007. **298**(12): p. 1396-1400.
285. Fukui, M., et al., *Relationship between serum bilirubin and albuminuria in patients with type 2 diabetes*. Kidney International, 2008. **74**(9): p. 1197-1201.
286. Fukui, M., et al., *Low serum bilirubin concentration in haemodialysis patients with Type 2 diabetes*. Diabetic Medicine, 2011. **28**(1): p. 96-99.
287. Cheriya, P., et al., *High total bilirubin as a protective factor for diabetes mellitus: an analysis of NHANES data from 1999-2006*. Journal of Clinical Medicine Research, 2010. **2**(5): p. 201-206.
288. Han, S.S., et al., *High serum bilirubin is associated with the reduced risk of diabetes mellitus and diabetic nephropathy*. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2010. **221**(2): p. 133-140.
289. Yasuda, M., et al., *High serum bilirubin levels and diabetic retinopathy: the Hisayama Study*. Ophthalmology, 2011. **118**(7): p. 1423-1428.
290. Andersson, C., et al., *Acute effect of weight loss on levels of total bilirubin in obese, cardiovascular high-risk patients: an analysis from the lead-in period of the Sibutramine Cardiovascular Outcome trial*. Metabolism, 2009. **58**(8): p. 1109-1115.
291. Vitek, L., et al., *Association between plasma bilirubin and mortality*. Annals of Hepatology, 2019. **18**(2): p. 379-385.
292. Bulmer, A.C., et al., *The anti-mutagenic properties of bile pigments*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2008. **658**(1): p. 28-41.
293. Wallner, M., et al., *Anti-genotoxic potential of bilirubin in vivo: damage to DNA in hyperbilirubinemic human and animal models*. Cancer Prevention Research, 2013. **6**(10): p. 1056-1063.

294. Mólzer, C., et al., *Interaction between TNF $\alpha$  and tetrapyrroles may account for their anti-genotoxic effects—a novel mechanism for DNA-protection*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2013. **17**(12): p. 1157-1166.
295. Jirásková, A., et al., *Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer*. International Journal of Cancer, 2012. **131**(7): p. 1549-1555.
296. Horsfall, L.J., et al., *Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death*. Jama, 2011. **305**(7): p. 691-697.
297. Vítek, L.P., *Bilirubin a interní choroby*. Grada Publishing, a.s. , 2009.
298. Jacob Atsmon, M., *Gilbert's Syndrome—Clinical and Pharmacological Implications*. 2001.
299. Vitek, L., *Impact of serum bilirubin on human diseases*. Pediatrics, 2005. **115**(5): p. 1411-2.
300. Krawczyk, M., et al., *Genetics of biliary lithiasis from an ethnic perspective*. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2013. **37**(2): p. 119-25.
301. del Giudice, E.M., et al., *Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis*. Blood, 1999. **94**(7): p. 2259-2262.
302. Cifkova, R., et al., *Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech Republic. Results of two nationwide cross-sectional surveys in 1997/1998 and 2000/2001, Czech Post-MONICA Study*. Journal of Human Hypertension, 2004. **18**(8): p. 571-579.
303. Hubacek, J., et al., *Gene variants at FTO, 9p21, and 2q36. 3 are age-independently associated with myocardial infarction in Czech men*. Clinica Chimica Acta, 2016. **454**: p. 119-123.
304. Hubacek, J.A., et al., *A FTO variant and risk of acute coronary syndrome*. Clinica Chimica Acta, 2010. **411**(15-16): p. 1069-1072.
305. McComb, R.B. and G.N. Bowers Jr, *Study of optimum buffer conditions for measuring alkaline phosphatase activity in human serum*. Clinical Chemistry, 1972. **18**(2): p. 97-104.
306. Lieverse, A., et al., *Familial increased serum intestinal alkaline phosphatase: a new variant associated with Gilbert's syndrome*. Journal of Clinical Pathology, 1990. **43**(2): p. 125-128.
307. Pitha, J., et al., *Genetic determination of the prognosis in survivors of acute coronary syndromes. Study design and rationale for a multicenter study*. Cor et Vasa, 2007. **49**(4): p. 134-137.
308. Miller, S., D. Dykes, and H. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Research, 1988. **16**(3): p. 1215.
309. Jiraskova, A., M. Lenicek, and L. Vitek, *Simultaneous genotyping of microsatellite variations in HMOX1 and UGT1A1 genes using multicolored capillary electrophoresis*. Clinical Biochemistry, 2010. **43**(7-8): p. 697-699.
310. <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.
311. <http://www.dr-petrek.eu/documents/HWE.xls>.
312. [http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/contingency\\_form.sh?nrow=2&ncolumn=3](http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/contingency_form.sh?nrow=2&ncolumn=3).
313. Kunutsor, S.K., T.A. Apekey, and H. Khan, *Liver enzymes and risk of cardiovascular disease in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Atherosclerosis, 2014. **236**(1): p. 7-17.

314. Kunutsor, S.K., et al., *Liver enzymes and risk of all-cause mortality in general populations: a systematic review and meta-analysis*. International Journal of Epidemiology, 2014. **43**(1): p. 187-201.
315. Ruhl, C.E. and J.E. Everhart, *Elevated serum alanine aminotransferase and  $\gamma$ -glutamyltransferase and mortality in the United States population*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 477-485. e11.
316. Vernon, G., A. Baranova, and Z. Younossi, *Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2011. **34**(3): p. 274-285.
317. Paschos, P. and K. Paletas, *Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome*. Hippokratia, 2009. **13**(1): p. 9.
318. Aller, R., et al., *Predictive factors of non-alcoholic steatohepatitis: relationship with metabolic syndrome*. Nutricion Hospitalaria, 2015. **31**(6): p. 2496-502.
319. Ndrepepa, G. and A. Kastrati, *Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease*. Annals of Translational Medicine, 2016. **4**(24).
320. Lee, D.S., et al., *Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(1): p. 127-133.
321. Kunutsor, S.K., A. Abbasi, and A.I. Adler, *Gamma-glutamyl transferase and risk of type II diabetes: an updated systematic review and dose-response meta-analysis*. Annals of Epidemiology, 2014. **24**(11): p. 809-816.
322. Mahady, S.E., et al., *Prevalence of elevated alanine transaminase in Australia and its relationship to metabolic risk factors: A cross-sectional study of 9,447 people*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2017. **32**(1): p. 169-176.
323. Ioannou, G.N., et al., *Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States*. Hepatology, 2006. **43**(5): p. 1145-1151.
324. Cífková, R., et al., *Prevalence hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění v české populaci v letech 2015-2018. Studie Czech post-MONICA*. Cor et Vasa, 2020. **62**(1): p. 6-16.
325. Lan, Y., et al., *Is serum total bilirubin a predictor of prognosis in arteriosclerotic cardiovascular disease? A meta-analysis*. Medicine, 2019. **98**(42).
326. Shen, H., et al., *Prognostic value of total bilirubin in patients with acute myocardial infarction: A meta-analysis*. Medicine, 2019. **98**(3).
327. Okuhara, K., et al., *Change in bilirubin level following acute myocardial infarction is an index for heme oxygenase activation*. Southern Medical Journal, 2010. **103**(9): p. 876-881.
328. Sahin, O., et al., *Bilirubin levels and the burden of coronary atherosclerosis in patients with STEMI*. Angiology, 2013. **64**(3): p. 200-204.
329. Canpolat, U., et al., *Association of serum total bilirubin levels with the severity, extent and subtypes of coronary atherosclerotic plaques detected by coronary CT angiography*. The International Journal of Cardiovascular Imaging, 2013. **29**(6): p. 1371-1379.
330. Liu, J.Y., et al., *Distribution of the UGT1A1\* 28 polymorphism in Caucasian and Asian populations in the US: a genomic analysis of 138 healthy individuals*. Anti-Cancer Drugs, 2007. **18**(6): p. 693-696.
331. Sedlak, T.W. and S.H. Snyder, *Messenger molecules and cell death: therapeutic implications*. Jama, 2006. **295**(1): p. 81-89.
332. Jašprová, J., et al., *A novel accurate LC-MS/MS method for quantitative determination of Z-lumirubin*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1-8.

333. Peasey, A., et al., *Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study*. BMC Public Health, 2006. **6**(1): p. 255.
334. Schöttker, B., et al., *Evidence for the free radical/oxidative stress theory of ageing from the CHANCES consortium: a meta-analysis of individual participant data*. BMC Medicine, 2015. **13**(1): p. 300.
335. Kundur, A.R., I. Singh, and A.C. Bulmer, *Bilirubin, platelet activation and heart disease: a missing link to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome?* Atherosclerosis, 2015. **239**(1): p. 73-84.
336. Hingorani, A. and S. Humphries, *Nature's randomised trials*. The Lancet, 2005. **366**(9501): p. 1906-1908.
337. Bennett, D.A. and M.V. Holmes, *Mendelian randomisation in cardiovascular research: an introduction for clinicians*. Heart, 2017. **103**(18): p. 1400-1407.
338. Fulks, M., R.L. Stout, and V.F. Dolan, *Mortality associated with bilirubin levels in insurance applicants*. Journal of Insurance Medicine (New York, NY), 2009. **41**(1): p. 49-53.
339. Ajja, R., et al., *Usefulness of serum bilirubin and cardiorespiratory fitness as predictors of mortality in men*. The American Journal of Cardiology, 2011. **108**(10): p. 1438-1442.
340. Chen, Y.-H., S.-C. Hung, and D.-C. Tarng, *Serum bilirubin links UGT1A1\* 28 polymorphism and predicts long-term cardiovascular events and mortality in chronic hemodialysis patients*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2011. **6**(3): p. 567-574.
341. Zulus, B., et al., *The UGT1A1\* 28 gene variant predicts long-term mortality in patients undergoing coronary angiography*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 2018. **56**(4): p. 560-564.
342. Cox, A.J., et al., *Association of SNPs in the UGT1A gene cluster with total bilirubin and mortality in the Diabetes Heart Study*. Atherosclerosis, 2013. **229**(1): p. 155-160.
343. Wang, Y., et al., *Distribution of uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A polymorphisms and their role in irinotecan-induced toxicity in patients with cancer*. Oncology Letters, 2017. **14**(5): p. 5743-5752.
344. Liu, C.Y., et al., *UGT1A1\* 28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma*. Cancer, 2008. **112**(9): p. 1932-1940.
345. Cífková, R., et al., *30-year trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population, Czech MONICA and Czech post-MONICA, 1985–2016/17*. PloS One, 2020. **15**(5): p. e0232845.
346. Bruthans, J., et al., *Explaining the decline in coronary heart disease mortality in the Czech Republic between 1985 and 2007*. European Journal of Preventive Cardiology, 2014. **21**(7): p. 829-839.
347. Cífková, R., et al., *Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA*. Atherosclerosis, 2010. **211**(2): p. 676-681.
348. 2017., O.f.E.C.-o.a.D.O.u., URL: <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf> (2017). Update.
349. Culleton, B.F., et al., *Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study*. Annals of Internal Medicine, 1999. **131**(1): p. 7-13.
350. Glynn, R.J., E.W. Champion, and J.E. Silbert, *Trends in serum uric acid levels*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1983. **26**(1): p. 87-93.



351. Zhu, Y., B.J. Pandya, and H.K. Choi, *Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008*. *Arthritis & Rheumatism*, 2011. **63**(10): p. 3136-3141.
352. Johnson, R.J., et al., *Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the National Kidney Foundation*. *American Journal of Kidney Diseases*, 2018. **71**(6): p. 851-865.
353. Krajcoviechova, A., et al., *The impact of blood pressure and visceral adiposity on the association of serum uric acid with albuminuria in adults without full metabolic syndrome*. *American Journal of Hypertension*, 2016. **29**(12): p. 1335-1342.
354. Fang, J. and M.H. Alderman, *Serum uric acid and cardiovascular mortality: the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992*. *Jama*, 2000. **283**(18): p. 2404-2410.
355. Bos, M.J., et al., *Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study*. *Stroke*, 2006. **37**(6): p. 1503-1507.
356. Wheeler, J.G., et al., *Serum uric acid and coronary heart disease in 9,458 incident cases and 155,084 controls: prospective study and meta-analysis*. *PLoS Med*, 2005. **2**(3): p. e76.
357. Krajčoviechová, A., et al., *Which serum uric acid levels are associated with increased cardiovascular risk in the general adult population?* *The Journal of Clinical Hypertension*, 2020. **22**(5): p. 897-905.
358. Cooney, M.T., et al., *How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators*. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 2009. **16**(3): p. 304-314.
359. Goh, L.G., et al., *Utility of established cardiovascular disease risk score models for the 10-year prediction of disease outcomes in women*. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2013. **11**(4): p. 425-435.
360. Selvarajah, S., et al., *Comparison of the Framingham Risk Score, SCORE and WHO/ISH cardiovascular risk prediction models in an Asian population*. *International Journal of Cardiology*, 2014. **176**(1): p. 211-218.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

BLVR, biliverdinreduktáza

CVD, kardiovaskulární nemoci

ICHS, ischemická choroba srdeční

IM, infarkt myokardu

AIM, akutní infarkt myokardu

CMP, cévní mozková příhoda

SCORE, Systematic Coronary Risk Evaluation

GS, Gilbertův syndrom

HMOX, hemoxygenáza

ROS, reactive oxygen species

NADPH, nikotinamid dinukleotidfosfát

GSH, redukovaný glutathion

GSSH, oxidovaný glutathion

ER, endoplazmatické retikulum

Bf, free bilirubin

OATP, organic anion transport proteins

FABP1, fatty acid binding protein

UDP, uridindifosfát

UGT, uridindifosfát glukuronosyltransferáza

UGT1A1, bilirubin uridindifosfát glukuronosyltransferáza

MRP2, multidrug resistance protein 2

CNS, centrální nervová soustava

TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alfa

IL, interleukin

ATP, adenosintrifosfát

NO, oxid dusnatý

CO, oxid uhelnatý

UVA, ultrafialové záření A

LDL, low density lipoproteins

HDL, high density lipoproteins

TATA box, promotorová oblast genu složená z nukleotidových repetitivních TA

*UGT1A1*\*28, A(TA<sub>7</sub>)TAA, Gilbertovská alela

DNA, deoxyribonukleová kyselina  
gDNA, genomická deoxyribonukleová kyselina  
AST, aspartátaminotransferáza  
ALT, alaninaminotransferáza  
GGT, gamaglutamyltransferáza  
Hb1Ac, glykovaný hemoglobin  
TAG, triacylglyceroly  
MK, mastné kyseliny  
SD, směrodatná odchylka  
IQ (QR), interkvartilový rozptyl  
OR, odds ratio  
HAPPIE, Health, Alcohol and Psychosocial factors in Eastern Europe  
CRP, C-reaktivní protein  
Post-MONICA, MONItoring of CARDiovascular Disease  
IKEM, Institut klinické a experimentální medicíny  
MARE, Maf-recognition element  
NRF2, nuclear factor erythroid 2–related factor 2  
KEAP 1, Kelch-like ECH Associated Protein 1  
NHANES, National Health and Nutrition Examination Survey  
PPAR $\alpha$  , peroxisome proliferator-activated receptor alfa,  
MRGPRX4, Mas-Related G-protein coupled member X4,  
FGF21, hepatic fibroblast growth factor-21,  
CYP4A, cytochrome P 450 izoenzym  
UCP1, Mitochondrial brown fat uncoupling protein 1  
ADRB3, Beta-3 adrenergic receptor

## 9. SEZNAM PUBLIKACÍ

### Podkladem disertace:

**Eremiasova, L.**, Hubacek, J. A., Danzig, V., Adamkova, V., Mrazova, L., Pitha, J., Lanska, V., Cífková, R., Vitek, L., *Serum bilirubin in the Czech population—relationship to the risk of myocardial infarction in males*. *Circulation Journal*, 2020. **84**(10): p. 1779-1785 **IF 2.970**

Vitek, L., Hubacek, J. A., Pajak, A., Doryńska, A., Kozela, M. **Eremiasova, L.**, Danzig, V., Stefler, D., & Bobak, M. *Association between plasma bilirubin and mortality*. *Annals of Hepatology*, 2019. **18**(2): p. 379-385. **IF 2.125**

Krajčoviechová, A., Wohlfahrt, P., Bruthans, J., Šulc, P., Lánská, V., **Eremiášová, L.**, Pudil, J., Linhart, A., Filipovský, J., Mayer, O., Widimský, J., Blaha, M., Borghi, C., & Cífková, R. (2020). *Which serum uric acid levels are associated with increased cardiovascular risk in the general adult population?* *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, **22**(5), 897–905. **IF 2.719**

Cífková R, Bruthans J, Wohlfahrt P, Krajčoviechová A, Šulc P, Jozifová M, **Eremiášová L**, Pudil J, Linhart A, Widimský J Jr, Filipovský J, Mayer O Jr, Škodová Z, Poledne R, Stávek P, Lánská V. *30-year trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population, Czech MONICA and Czech post-MONICA, 1985-2016/17*. *PLoS One*. 2020 May 11;15(5):e0232845. **IF 2.740**

Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Pavel Šulc, **Lenka Eremiášová**, Jan Pudil, Aleš Linhart, Jiří Widimský Jr., Jan Filipovský, Otto Mayer Jr., Věra Lánská, Rudolf Poledne, Petr Stávek (2020). *Prevalence hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění v české populaci v letech 2015-2018. Studie Czech post-MONICA*. *Cor et Vasa*, 62(1), 6-16.”

**Kadlckova, L.**, Danzig, V., Cífkova, R., Linhart, A., Hubacek, J. A., Galovcova, M., Vitek, L. (2014). *Prevalence of Gilbert syndrome and UGT1A1\* 28 status in the Czech population, and their relationship to ischemic heart disease*. *Atherosclerosis*, **235**(2), e285-e286. **Poster prezentovaný na EAS, IF 3.994**

**Bez vztahu k tématu disertace:**

Jirásková, A., Bortolussi, G., Dostálová, G., **Eremiášová, L.**, Golaň, L., Danzig, V., Linhart, A., Vitek, L. *Serum bilirubin levels and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 Genes in Patients with Fabry Disease.* Oxidative Medicine and Cellular Longevity, p. 9478946. 2017. **IF 4.936**

**Eremiasova L**, Kuchynka P, Lambert L, Palecek T. *Giant torturous left circumflex artery draining to the right atrium.* Echocardiography. 2017 Aug;34(8):1260-1261. **IF 1.197**

**Eremiášová, L.**, Marek, J., Paleček, T., Král, A., Aschermann, M., Linhart, A., Danzig, V. (2017). *Tako-tsubo kardiomyopatie u pacientky s esenciální trombocytemií léčené anagrelidem: kasuistika.* Cor et Vasa (2017).



## Serum Bilirubin in the Czech Population — Relationship to the Risk of Myocardial Infarction in Males —

Lenka Eremiasova, MD; Jaroslav A Hubacek, PhD; Vilém Danzig, MD, PhD;  
Věra Adamkova, MD, PhD; Lenka Mrazova, PhD; Jan Pitha, MD, PhD;  
Věra Lanska, MD, PhD; Renata Cífková, MD, PhD; Libor Vitek, MD, PhD

**Background:** The potential antiatherogenic role of bilirubin is generally acknowledged, so the aim of this study was to determine serum bilirubin concentrations and the prevalence of Gilbert syndrome (GS) in the Czech general population with particular reference to its relationship to the risk of myocardial infarction (MI).

**Methods and Results:** Biochemical markers were analyzed in 2 independent Czech post-MONICA studies (in total, n=3,311), and in 741 male MI patients. The *UGT1A1* promoter gene variant (rs81753472) was analyzed in these MI patients and in the first control population cohort (n=717). Medians of serum bilirubin concentrations in the 2 Czech general population cohorts were 9.6 and 9.8 μmol/L (10.7 and 11.3 μmol/L in males, and 8.3 and 8.8 μmol/L in females; P<0.01). The prevalence of GS was 8.9%, twice as high in males compared with females (11.6 vs. 6.1%; P<0.01). The *UGT1A1* (TA)<sub>n</sub> promoter repeats significantly influenced serum bilirubin concentrations in the controls, but not in the MI patients. Serum bilirubin concentrations were significantly lower in MI patients (7.7 vs. 10.7 μmol/L; P<0.01), with almost 5-fold lower prevalence of GS.

**Conclusions:** Serum bilirubin concentrations and the prevalence of GS were determined in the Czech general population. Significantly lower serum bilirubin concentrations were observed in male MI patients.

**Key Words:** Bilirubin; Cardiovascular diseases; Gilbert syndrome; Myocardial infarction; *UGT1A1* promoter gene variants

**D**espite admirable progress in prevention and treatment, cardiovascular diseases (CVD) remain the most common cause of mortality and morbidity in developed countries.<sup>1</sup>

In addition to the conventional cardiovascular risk factors, such as dyslipidemia, smoking, diabetes mellitus, hypertension and obesity, increased oxidative stress with impaired defense mechanisms has been recognized as an important factor contributing to the pathogenesis of CVD.<sup>2</sup> Among the natural endogenous antioxidants, bilirubin, a catabolic product of heme degradation in the intravascular compartment, is acknowledged as one of the most potent.<sup>3</sup> Bilirubin is also a potent anti-inflammatory,<sup>4</sup> or even a signaling molecule.<sup>5</sup>

Originally, bilirubin was considered only a nonfunctional product of heme catabolism. Although its antioxi-

dant activities had been described a long time ago, its role as a natural antioxidant was convincingly re-discovered in 1987.<sup>6</sup> Since then, bilirubin has been intensively discussed as a factor with potentially protective effects, mainly against cardiovascular<sup>7</sup> and cancer diseases,<sup>8</sup> particularly in males.

Similar to all other conventional cardiovascular risk factors, genetics play an important role in the systemic bilirubin concentration, but the number of participating genes seems to be rather low.<sup>9,10</sup> Among the environmental/non-genetic factors affecting serum/plasma bilirubin concentrations, sex, ethnicity, smoking and several dietary habits are of importance.<sup>11</sup>

Within heme degradation and bilirubin production, bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1 (*UGT1A1*), an enzyme responsible for bilirubin glucuronosylation in the liver tissue, plays a crucial role. In humans, this enzyme is

Received March 15, 2020; revised manuscript received June 16, 2020; accepted June 22, 2020; J-STAGE Advance Publication released online August 26, 2020 Time for primary review: 36 days

Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty General Hospital and 1st Faculty of Medicine (L.E., L.V.), 2nd Department of Internal Medicine, Faculty General Hospital and 1st Faculty of Medicine (L.E., V.D., R.C.), Center for Cardiovascular Prevention, 1st Faculty of Medicine and Thomayer Hospital (R.C.), 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine Faculty and General Hospital (L.V.), Charles University, Praha; Center for Experimental Medicine (J.A.H., L.M., J.P.), Department of Preventive Cardiology (V.A.), Medical Statistics Unit (V.L.), Institute for Clinical and Experimental Medicine, Praha, Czech Republic

The first two authors contributed equally to this work (L.E., J.A.H.).

Mailing address: Libor Vitek, MD, PhD, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Na Bojišti 3, Praha 2, 12000, Czech Republic. E-mail: vitek@cesnet.cz

All rights are reserved to the Japanese Circulation Society. For permissions, please e-mail: cj@j-circ.or.jp

ISSN-1346-9843



	<b>Cohort A (n=717)</b>	<b>Cohort B (n=2,594)</b>	<b>Cohort A Males (n=442)</b>	<b>MI cohort Males (n=741)</b>
M/F ratio	1.61	0.91	–	–
Age (years)	48.4±11	48±11	49±11	54.7±8*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.1±4.8	28.3±5.5	28.4±3.9	28.8±4.5
LDL cholesterol (mmol/L)	3.54±1.2	3.16±0.9	3.64±1	3.57±1.1
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31±0.4	1.49±0.4	1.22±0.4	1.16±0.3*
Triacylglycerols (mmol/L)	1.77±1.1	1.34±1.0	2.01±1.2	1.85±1.7*
Smoking (%)	48.8	43.8	58.5	83.2*
Arterial hypertension (%)	41.7	40.1	47.1	49.9
Diabetes mellitus (%)	4.5	6.4	5	17.9*

Data shown as mean±SD. \*P<0.01, compared with control cohort A male population.

coded by the *UGT1A1* gene (OMIM No. 191740). Based on genome-wide association studies,<sup>12</sup> *UGT1A1* is 1 of the major genetic determinants of systemic bilirubin concentrations.<sup>9,10</sup> The expression of *UGT1A1* is significantly influenced by functional (TA) repeat polymorphism (rs81753472) located within the ATATAA element in the gene promoter region. The longer allele (TA)<sub>n</sub> (known as the UGT1A1\*28 allele) is associated with lower gene expression, resulting, as a consequence, in increased systemic bilirubin concentrations. Bilirubin concentrations in (TA)<sub>n</sub>/n homozygotes, in particular in Caucasians, are significantly higher in comparison with individuals carrying at least 1 (TA)<sub>6</sub> allele.<sup>13</sup>

Increased serum bilirubin concentrations have been associated with reduced risk of CVD in both retrospective, as well as prospective clinical studies (for reviews see references 7, 8), although not all of them confirmed this association.<sup>14</sup> Physiological serum/plasma bilirubin concentrations have a wide range of 2–17 μmol/L (0.1–1 mg/dL), with substantial differences related to ethnicity, sex, age and other factors.<sup>11,15</sup> Because of the importance of bilirubin and the genes modulating its systemic concentrations, physiological concentrations should be defined more precisely, separately for men and women.<sup>15</sup> It is known that individuals with serum bilirubin concentrations <7 μmol/L have increased cardiovascular risk by 30% compared with those with bilirubin concentrations >10 μmol/L.<sup>16</sup> Based on these data, a significant improvement in the prediction of cardiovascular risk has been reported when bilirubin is included in the cardiovascular risk calculation algorithm.<sup>17</sup>

Surprisingly, data on serum/plasma bilirubin concentrations in general populations from Central Europe are missing, which complicates proposals for novel cardiovascular risk algorithms.

The aim of our study was thus to (1) assess the serum bilirubin concentrations in the Czech general population, (2) examine the prevalence of elevated liver function test (LFTs), important confounders of serum bilirubin concentrations and also predictors of cardiovascular morbidity, (3) examine the association of serum bilirubin concentrations with *UGT1A1* promoter gene polymorphisms, and (4) assess these factors as possible risk factors of acute myocardial infarction (MI) in Czech males.

## Methods

### Study Populations

**General Population** The Czech general population in

this study consisted of 2 cohorts. The first cohort (cohort A) was a retrospective consecutive subset (n=717, 62% of males, aged 26–64 years) of the Czech post-MONICA population first examined in 1997–1998 and re-examined in 2000–2001 with serum bilirubin concentrations analyzed and selected genes affecting bilirubin metabolism investigated. The samples of biological material were frozen at –80°C immediately after blood collection until later analysis for the purpose of this study.

The second, larger cohort of the Czech general population was used to confirm the bilirubin concentration data obtained from the first cohort. This second population subset (cohort B) was derived from the prospective Czech post-MONICA study conducted between 2015 and 2018 and consisted of 2,594 individuals randomly selected from the Czech general population (48% males, aged 25–64 years).

The protocols of the Czech post-MONICA studies were approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic (No. G 14-08-04). All participants provided informed consent.

### MI Patients

A total of 741 consecutive adult male patients who had suffered their first MI before age 65 (MI cohort) and were hospitalized in the Coronary Care Unit (CCU) of the Institute for Clinical and Experimental Medicine between April 2006 and April 2014<sup>18,19</sup> were included in this analysis. Blood samples collected within 24 h after admission to the CCU were analyzed for biochemical parameters.

All examined patients were self-reported Caucasians and voluntarily signed written informed consent to participate in the study. The study protocol was also in agreement with the Helsinki Declaration and approved by the institutional ethics committee.

### Risk Factors and Laboratory Analysis

Traditional atherogenic risk factors were defined as described in detail previously.<sup>18–20</sup>

Fasting serum concentrations of lipids (total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and triacylglycerols) were analyzed using conventional enzymatic methods (reagents from Boehringer Mannheim Diagnostics and Hoffmann-La Roche) and bilirubin as well as LFT activities were determined by automatic analyzer (UniCel DxC 800 Synchron Clinical Systems, Beckman Coulter, UK) using routine clinical chemistry methods. The upper limit of physiological bilirubin concentration was set as

(A) Serum bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cohort A	Cohort B	MI cohort
All	9.8 (8–12.4) (n=717)	9.6 (6.6–13.2) (n=2,594)	
Males	10.7 (8.7–13.6) (n=442)	11.3 (8.4–15.2) (n=1,235)	7.7 (5.6–10.8)* (n=741)
Females	8.8 (7.2–10.7) (n=275)	8.3 (6.1–11.1) (n=1,359)	–
(B) Hyperbilirubinemia >17 $\mu\text{mol/L}$		General population (n=3,311)	MI cohort (n=741)
All		11.4% (n=377)	
Males		16.8% (n=270)	3.6%* (n=27)
Females		6.5% (n=107)	
After exclusion of elevated LFT activities			
All		8.9% (n=295)	ND
Males		11.6% (n=195)	ND
Females		6.1% (n=100)	ND
(C)	OR (95% CI)	P value	
Sex (female)	0.26 (0.22–0.32)	<0.001	
Smoking (yes)	0.44 (0.31–0.61)	<0.001	
BMI (unit change)	0.98 (0.96–0.99)	0.024	
HbA1C (unit change)	0.96 (0.95–0.98)	<0.001	
AST (unit change)	4.18 (1.76–9.9)	0.01	

(A) Data shown as median and interquartile range. \* $P<0.01$ , compared with both control populations. (B) Concentrations expressed as median and interquartile range. \* $P<0.01$ , compared with the general population. (C) OR represents the odds of having a serum bilirubin concentration above the median of the total general population (9.6  $\mu\text{mol/L}$ , cohort B). AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CI, confidence interval; HbA1C, glycated hemoglobin; LFT, liver function test; MI, myocardial infarction; ND, not determined due to elevation of myocardial enzyme activities confounding the liver enzyme profile; OR, odds ratio.

17  $\mu\text{mol/L}$ . The following values of LFTs were considered abnormal: aspartate aminotransferase (AST) >0.72  $\mu\text{kat/L}$ , alanine aminotransferase (ALT) >0.78  $\mu\text{kat/L}$ , and  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) >0.84  $\mu\text{kat/L}$ .

The general characteristics of the all the examined study populations are given in Table 1.

#### DNA Analysis

DNA was isolated from the whole EDTA blood sample using a slightly modified method of Miller et al.<sup>21</sup> *UGT1A1* gene promoter variants were analyzed by multicolored capillary electrophoresis as described previously.<sup>22,23</sup>

#### Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SD or median and interquartile range depending on the distribution. The differences in studied variables were assessed by the Student's t-test or Mann-Whitney rank test (continuous variables), chi-square test or Fisher's exact test (for categorical variables). The association between serum bilirubin concentration and *UGT1A1* promoter genotype was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc analysis. Linear and logistic regression analyses were used to assess the dependence of the variables. SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., CA, USA) was used for statistical analyses. All analyses were performed with the significance level set to 0.05.

HW equilibrium ([www.dr-petrek.eu/documents/HWE.xls](http://www.dr-petrek.eu/documents/HWE.xls)) Chi square ([http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/contingency\\_form.sh?nrow=2&ncolumn=3](http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/contingency_form.sh?nrow=2&ncolumn=3)) was calculated using the freely available www tool. For categorical variables, chi-square test or Fisher's exact test was used.

## Results

### Serum Bilirubin Concentrations in the Czech General Population

The medians of serum bilirubin concentration in the Czech general population, based on our 2 cohort studies consisting of >3,300 subjects, were 9.6 and 9.8  $\mu\text{mol/L}$ , respectively (Table 2A). Substantially higher serum bilirubin concentrations were found in both cohorts of males compared with females (10.7 and 11.3 vs. 8.3 and 8.8  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P<0.01$ ) (Table 2A). The 95% reference interval for the whole population (defined as representing the 95% limits for the distribution of the values of the analyte measured in the reference population<sup>24</sup>), based on the larger cohort B, was 4.3–23.6  $\mu\text{mol/L}$ ; the same reference interval was 5.5–27.5  $\mu\text{mol/L}$  for males, and 3.8–19.9  $\mu\text{mol/L}$  for females.

Prevalence of Gilbert syndrome (GS; defined as unconjugated hyperbilirubinemia >17  $\mu\text{mol/L}$  with no signs of hemolysis or overt liver disease; normal LFTs were used as a surrogate marker) in our cohorts representing the Czech general population was 8.9% (11.6% in males, and 6.1% in females,  $P<0.01$ ) (Table 2B). Serum bilirubin concentrations were significantly affected by sex, smoking, body mass index (BMI), glycated hemoglobin (HbA1C) and AST, but not by age, ALT and GGT activities, or total, low-density lipoprotein (LDL) and HDL cholesterol concentrations (Table 2C). Females had the odds of having serum bilirubin concentrations above the median of the whole population lowered by 74%, while the same odds were lower in smokers by 56% (smoking was associated with a 12% decrease in serum bilirubin concentrations, from 9.9 (7.3–13.4) to 8.7 (6.2–11.7  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P<0.001$ ). Each single point increase of BMI was associated with a 2% decrease, and each 1%



	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )		P value
	Smokers	Nonsmokers	
Cohort A	Smokers (n=350) 9.7 (7.7–12.1)	Nonsmokers (n=367) 10.1 (8.2–12.9)	0.03
Cohort B	Smokers (n=1,138) 9.2 (6.6–12.7)	Nonsmokers (n=1,448) 9.9 (7.3–13.4)	0.0001
Cohort A males	Smokers (n=259) 10 (8.1–12.6)	Nonsmokers (n=183) 11.5 (9.5–14.6)	0.001
MI cohort	Smokers (n=617) 7.8 (5.7–10.8)	Nonsmokers (n=115) 7.9 (5.4–10.9)	NS

Data shown as median and interquartile range. Ex-smokers not included in the analysis. NS, not significant.

(A) UGT1A1 genotype	Cohort A (n=717)		Cohort A males (n=442)		Cohort A females (n=275)		MI cohort (n=741)	
	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )
(TA) <sub>9/6</sub>	291	9 (7.3–11)	177 <sup>+</sup> (40%)	9.9 (8.1–11.8)	114 <sup>+</sup> (41.5%)	8.1 (6.5–9.3)	329 (44.3%)	7.3 (5.3–10.1)*
(TA) <sub>9/7</sub>	327	9.9 (8.3–12.1)	201 (45.5%)	10.8 (8.9–12.9)	126 (45.8%)	9.1 (7.4–10.6)	315 (42.5%)	8.4 (6.4–11.2)*
(TA) <sub>7/7</sub>	99	14.8 (11.2–18.3)	64 (14.5%)	16.2 (12.4–19.7)	35 <sup>++</sup> (12.7%)	11.8 (9.8–15.6)	97 (13.1%)	7.2 (5–11.1)*
P for trend	0.001		0.001		0.001		NS	

(B) UGT1A1 genotype	Cohort A (n=717)		Cohort A males (n=442)		Cohort A females (n=275)		MI cohort (n=741)									
	Smokers		Nonsmokers		Smokers		Nonsmokers									
	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )								
(TA) <sub>9/6</sub>	140	8.7 (7.0–10.9)	149	9.2 (7.8–11.3)	101	9.5 (7.3–11.3)	75	10.6 (8.9–13.6)	39	7.7 (6.1–9.3)	74	8.2 (6.8–9.4)	273	7.4 (5.3–10)	51	6.9 (5.1–10.6)
(TA) <sub>9/7</sub>	161	9.7 (8.0–12.0)	167	10.2 (8.4–2.4)	122	10.1 (8.5–12.5)	80	11.4 (9.7–13.2)	39	9 (7.4–10.4)	87	9.1 (7.8–10.6)	259	8.5 (6.6–11.3)	53	8.4 (6.1–11.1)
(TA) <sub>7/7</sub>	47	14.1 (10.4–18.2)	49	15.3 (11.6–19.4)	36	15.3 (10.5–18.4)	27	17.7 (14.2–24.4)	11	11.3 (9.5–15.6)	22	12.5 (8.6–15.5)	85	9.7 (8–12)	11	6.8 (4.7–10.9)
P for trend	0.001		0.0001		0.0001		0.0001		0.01		0.0001		0.01		NS	

(A) Data shown as median and interquartile range. \* $P < 0.01$  compared with cohort A males. <sup>+</sup>Includes 1 individual with genotype (TA)<sub>9/6</sub>; <sup>++</sup>includes 2 individuals with genotype (TA)<sub>7/6</sub>. (B) Data shown as median and interquartile range. NS, not significant.

increase in HbA1C with a 4% decrease of the odds of having serum bilirubin concentrations below the median of the bilirubin concentrations of the total study population (Table 2C). Conversely, each elevation in AST activity by 1  $\mu\text{kat/L}$  was associated with a marked increase in serum bilirubin concentrations; thus, AST was most likely a marker of serious deterioration in hepatic function (Table 2C).

Detailed analysis of the role of smoking on serum bilirubin concentrations across all studied populations revealed consistently lower bilirubin levels in smokers in all cohorts representing the Czech general population (Table 3). However, smoking was not associated with lower serum bilirubin concentrations in the male patients suffering from MI (Table 3).

#### Frequency of the Gene Variants Affecting Serum Bilirubin Concentrations in the Czech General Population

No significant difference in the frequencies of UGT1A1 genotypes was found between males and females (Table 4A), although serum bilirubin concentrations were significantly higher in males than in females (10.7 vs. 8.8  $\mu\text{mol/L}$ ;  $P < 0.01$ , Table 2A). Within cohort A, representing the Czech general population at large, the UGT1A1 promoter gene variants were significantly associated with serum concentrations of

bilirubin ( $P < 0.01$ , Table 4A). The highest serum bilirubin concentration was found in TA<sub>7/7</sub> (UGT1A1\*28) homozygotes, both male and female (Table 4A).

#### Serum Bilirubin Concentrations, UGT1A1 Genotypes and Association With MI

In male patients suffering from acute MI, serum bilirubin concentrations were significantly lower compared with the control male population (7.7 vs. 10.7 and 11.3  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ , Table 2A). The distribution of UGT1A1 genotypes was fully comparable between these 2 groups (Table 4A).

Although there was a close relationship between UGT1A1 promoter gene polymorphism and the serum bilirubin concentrations in the control population, such an association was not detected in the MI patients (Table 4A) and this trend was also present when analyzing serum bilirubin concentrations according to UGT1A1 genotype separately according to smoking status (Table 4B).

#### Prevalence of Elevated LFTs in the Czech General Population

Because elevated activity of LFTs (in particular ALT and GGT) is an important predictor of increased overall as well as cardiovascular morbidity and mortality,<sup>25,26</sup> we were interested in the prevalence rates of elevated LFTs in the

	All (n=2,594)	Males (n=1,235)	Females (n=1,359)
ALT	5.5%	9.7%	1.8%
AST	3.2%	4.7%	1.8%
GGT	18.4%	28.9%	8.9%
ALT/AST/GGT	20.7%	32.6%	9.7%

The following LFT values were considered abnormal: aspartate aminotransferase (AST) >0.72  $\mu$ kat/L, alanine aminotransferase (ALT) >0.78  $\mu$ kat/L, and gamma-glutamyltransferase (GGT) >0.84  $\mu$ kat/L.

Czech general population. Thus, LFT activities were assessed in the large cohort B representing this population. Elevation of ALT, AST or GGT separately was observed in 3.2–18.4% of individuals and elevated values of any of these liver enzymes were found in as much as 20.7% of cohort B individuals (Table 5). Elevation of LFT activities was more than 3-fold greater in males compared with females, with GGT being most often elevated (Table 5).

A significant positive linear relationship was detected between BMI and GGT ( $P<0.001$ ), HbA1C ( $P<0.001$ ), and serum triacylglycerol concentrations ( $P<0.001$ ), and a negative association was detected for BMI and HDL cholesterol concentrations ( $P<0.001$ ). Similarly, HbA1C closely correlated with ALT, AST and GGT activities ( $P<0.001$ ).

## Discussion

The physiological range of systemic bilirubin concentrations is a matter of debate, with many factors affecting this parameter, including, in particular, sex and ethnicity.<sup>15</sup> Because serum bilirubin concentration has become recognized as an important risk predictor of cardiovascular as well as other diseases,<sup>8</sup> it is even more important to establish proper physiological ranges for particular populations. In our study performed in relatively large cohorts of Caucasians randomly selected from the Czech general population, we identified medians of serum bilirubin concentrations to be 9.6 (cohort A) and 9.8  $\mu$ mol/L (cohort B) for both sexes in total, with higher values observed in men (10.7–11.3  $\mu$ mol/L) compared with women (8.3–8.8  $\mu$ mol/L). Notably, our established 95% reference intervals for serum bilirubin concentrations were much wider and shifted to higher values compared with current reference intervals, with substantial differences between males and females.

The reference intervals for serum bilirubin in the Czech general population are within a range of 5–17  $\mu$ mol/L and come from 2 sources, both based on US populations and giving the same values: (1) data from the Massachusetts General Hospital in Boston published in a report by Kratz et al.<sup>27</sup> and (2) Beckman Coulter reference (unpublished) data for bilirubin determination. This is the usual approach that the majority of clinical chemistry laboratories follow.<sup>28</sup> Thus, current physiological ranges for serum bilirubin concentrations should be reconsidered, adjusting for individual populations and separately for males and females.<sup>15</sup> In addition, our study data showed the serum bilirubin concentrations decreasing with increasing BMI, and HbA1C and in smokers, all factors associated with the risk of atherosclerosis and metabolic syndrome.

The prevalence of GS (defined historically as unconjugated hyperbilirubinemia >17  $\mu$ mol/L in the absence of

hemolysis or overt liver disease) in the Czech general population was 8.9% (11.6% in males and 6.1% in females).

Serum bilirubin concentrations were much lower in acute MI patients, consistent with prevailing opinion regarding the atheroprotective effects of bilirubin.<sup>16,29</sup> However, 2 recent meta-analyses showed transient elevation of serum bilirubin concentrations following acute MI,<sup>30,31</sup> most likely related to a feedback increase of bilirubin production by stress-induced HMOX1 activity.<sup>32</sup> Our observation of substantially lower serum bilirubin concentrations in acute MI patients may be due to the fact that the blood samples for the bilirubin analysis were collected in the later phase of acute MI, because the peak of bilirubin elevation is reached within 18–21 h after heart attack.<sup>32</sup> Serum bilirubin concentrations also differ according to the severity of coronary atherosclerosis,<sup>33,34</sup> which may account for our observation as well.

Our results confirmed that the *UGT1A1* (TA)<sub>67T</sub> repeat polymorphism is an important determinant of serum bilirubin concentrations in the Czech general population, with no significant difference in this gene variant frequency between males and females (Table 5), consistent with data reported previously.<sup>35</sup> However, the association between *UGT1A1* (TA)<sub>67T</sub> repeat polymorphism and serum bilirubin concentrations was not observed in the male MI patients. In addition, the genotype distribution of the *UGT1A1* repeat polymorphism was almost identical to that in the controls. This somewhat surprising finding might be explained by the incomplete, approximately 50% penetrance of the *UGT1A1* (TA)<sub>7T</sub> promoter gene variant responsible for GS manifestation.<sup>9</sup> Therefore, it is likely that *UGT1A1* (TA)<sub>7T</sub> mutation carriers suffering from MI are those not previously presenting with the mildly elevated serum bilirubin concentrations typical of GS. Thus, the low systemic bilirubin concentrations in the male MI patients seemed to be a consequence of increased oxidative stress associated with atherosclerosis and diabetes present in these MI patients rather than due to genetic predisposition. Overproduction of reactive oxygen species leads to the oxidation of bilirubin to biliverdin,<sup>36</sup> as well as to a series of tri-, di- and monopyrrolic bilirubin oxidation products,<sup>37</sup> thus resulting in decreased serum bilirubin concentrations. Interestingly, smoking was not associated with lower serum bilirubin concentrations in this acutely sick cohort, suggesting that clinical factors mentioned earlier are probably more important in bilirubin homeostasis.

In addition, our study has provided data on the prevalence of elevated liver enzymes in the Czech general population. This is also an important finding because elevated activity of GGT is mostly due to underlying non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD),<sup>38</sup> being a strong predictor of cardiovascular morbidity and mortality,<sup>39</sup> as well as of diabetes<sup>40</sup> independently of alcohol intake.<sup>41</sup> A similar positive association with cardiovascular morbidity was also reported for elevated ALT activity,<sup>42</sup> another strong marker of NAFLD,<sup>43</sup> positively correlating with multiple metabolic risk factors.<sup>44</sup>

Increased activity of both aminotransferases (ALT, AST) in general populations is quite high, reaching 3–15% as reported in various epidemiological studies worldwide.<sup>43–48</sup> The same applies to GGT activity, elevations of which have been reported in 13% of the general population.<sup>46</sup> The data from our population study demonstrated substantially higher prevalence of elevated liver enzymes correlating positively with BMI, blood lipids and HbA1C,

especially in men, underlying the high risk of cardiovascular and metabolic diseases in these individuals.

### Study Limitations

The cross-sectional study design together with the fact that bilirubin was assessed in the acute phase of MI are the limitations of our study. On the other hand, we were able to compare the bilirubin data of these patients with those of a relevant and representative population sample.

In conclusion, we determined serum bilirubin concentrations and the prevalence of GS in the Czech general population, with a high prevalence of increased LFTs. Substantially lower serum bilirubin concentrations, but not specific *UGT1A1* genotypes, were observed in the male MI patients.

### Conflicts of Interest

The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

All authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

### Acknowledgment

The study was supported by grants No. 15-28895A, 15-27109A, IKEM IN 00023001 and RVO-VFN64165/2020 provided by the Ministry of Health of the Czech Republic and by grants PROGRES Q25/LF1 and SVV 260370-2020 provided by Charles University.

### IRB Information

The study was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic (No. G 14-08-04).

### References

1. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J* 2020; **41**: 12–85.
2. Wang Y, Chun OK, Song WO. Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: A review of human studies. *Nutrients* 2013; **5**: 2969–3004.
3. Gazzin S, Vitek L, Watchko J, Shapiro SM, Tiribelli C. A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease. *Trends Mol Med* 2016; **22**: 758–768.
4. Jangi S, Otterbein L, Robson S. The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; **45**: 2843–2851.
5. Vitek L. Bilirubin as a signaling molecule. *Med Res Rev* 2020; **40**: 1335–1351.
6. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; **235**: 1043–1046.
7. Vitek L. Bilirubin and atherosclerotic diseases. *Physiol Res* 2017; **66**: S11–S20.
8. Wagner KH, Wallner M, Molzer C, Gazzin S, Bulmer AC, Tiribelli C, et al. Looking to the horizon: The role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases. *Clin Sci (Lond)* 2015; **129**: 1–25.
9. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; **333**: 1171–1175.
10. Lin JP, Vitek L, Schwertner HA. Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease. *Clin Chem* 2010; **56**: 1535–1543.
11. Vitek L, Bellarosa C, Tiribelli C. Induction of mild hyperbilirubinemia: Hype or real therapeutic opportunity? *Clin Pharmacol Ther* 2019; **106**: 568–575.
12. Johnson AD, Kavousi M, Smith AV, Chen MH, Dehghan A, Aspelund T, et al. Genome-wide association meta-analysis for total serum bilirubin levels. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 2700–2710.
13. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (*UGT1A1*) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8170–8174.
14. Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Grande P, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated bilirubin and risk of ischaemic heart disease: Three Mendelian randomization studies and a meta-analysis. *J Intern Med* 2013; **273**: 59–68.
15. Vitek L. Bilirubin as a predictor of diseases of civilization: Is it time to establish decision limits for serum bilirubin concentrations? *Arch Biochem Biophys* 2019; **672**: 108062.
16. Novotny L, Vitek L. Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: A meta-analysis of published studies. *Exp Biol Med* 2003; **228**: 568–571.
17. Schwertner HA, Fischer JR Jr. Comparison of various lipid, lipoprotein, and bilirubin combinations as risk factors for predicting coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; **150**: 381–387.
18. Hubacek JA, Vrablik M, Dlouha D, Stanek V, Gebauerova M, Adamkova V, et al. Gene variants at *FTO*, *9p21*, and *2q36.3* are age-independently associated with myocardial infarction in Czech men. *Clin Chim Acta* 2016; **454**: 119–123.
19. Hubacek JA, Stanek V, Gebauerova M, Pilipincova A, Dlouha D, Poledne R, et al. A *FTO* variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2010; **411**: 1069–1072.
20. Pitha J, Hubacek JA, Poledne R, Stanek V, Aschermann M, Gebauerova M, et al. Genetic determination of the prognosis in survivors of acute coronary syndromes: Study design and rationale for a multicentric study. *Cor Vasa* 2007; **49**: 134–137.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
22. Jiraskova A, Lenicek M, Vitek L. Simultaneous genotyping of microsatellite variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes using multicolored capillary electrophoresis. *Clin Biochem* 2010; **43**: 697–699.
23. Jiraskova A, Novotny J, Novotny L, Vodicka P, Pardini B, Naccarati A, et al. Association of serum bilirubin and promoter variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes with sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012; **131**: 1549–1555.
24. Ceriotti F. Prerequisites for use of common reference intervals. *Clin Biochem Rev* 2007; **28**: 115–121.
25. Kunutsor SK, Apekey TA, Khan H. Liver enzymes and risk of cardiovascular disease in the general population: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Atherosclerosis* 2014; **236**: 7–17.
26. Kunutsor SK, Apekey TA, Seddoh D, Walley J. Liver enzymes and risk of all-cause mortality in general populations: A systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2014; **43**: 187–201.
27. Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, Lewandrowski KB. Case records of the Massachusetts General Hospital: Weekly clinicopathological exercises: Laboratory reference values. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1548–1563.
28. Friedberg RC, Souers R, Wagar EA, Stankovic AK, Valenstein PN, College of American Pathologists. The origin of reference intervals. *Arch Pathol Lab Med* 2007; **131**: 348–357.
29. Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, *UGT1A1\*28* allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis* 2008; **198**: 1–11.
30. Lan Y, Liu H, Liu J, Zhao H, Wang H. Is serum total bilirubin a predictor of prognosis in arteriosclerotic cardiovascular disease? A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019; **98**: e17544.
31. Shen H, Zeng C, Wu X, Liu S, Chen X. Prognostic value of total bilirubin in patients with acute myocardial infarction: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019; **98**: e13920.
32. Okuhara K, Kisaka T, Ozono R, Kurisu S, Inoue I, Soga J, et al. Change in bilirubin level following acute myocardial infarction is an index for heme oxygenase activation. *South Med J* 2010; **103**: 876–881.
33. Sahin O, Akpek M, Elcik D, Karadavut S, Simsek V, Tulmac M, et al. Bilirubin levels and the burden of coronary atherosclerosis in patients with STEMI. *Angiology* 2013; **64**: 200–204.
34. Canpolat U, Aytemir K, Yorgun H, Hazirolan T, Kaya EB, Sahiner L, et al. Association of serum total bilirubin levels with the severity, extent and subtypes of coronary atherosclerotic plaques detected by coronary CT angiography. *Int J Cardiovasc Imaging* 2013; **29**: 1371–1379.
35. Liu JY, Qu K, Sferruzza AD, Bender RA. Distribution of the *UGT1A1\*28* polymorphism in Caucasian and Asian populations in the US: A genomic analysis of 138 healthy individuals. *Anticancer Drugs* 2007; **18**: 693–696.
36. Sedlak TW, Snyder SH. Messenger molecules and cell death: Therapeutic implications. *JAMA* 2006; **295**: 81–89.
37. Jašprova J, Dvorak A, Vecka M, Lenicek M, Lacina O, Valaskova

- P, et al. A novel accurate LC-MS/MS method for quantitative determination of Z-lumirubin. *Sci Rep* 2020; **10**: 4411.
38. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **34**: 274–285.
  39. Ndrepepa G, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann Transl Med* 2016; **4**: 481.
  40. Kunutsor SK, Abbasi A, Adler AI. Gamma-glutamyl transferase and risk of type II diabetes: An updated systematic review and dose-response meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2014; **24**: 809–816.
  41. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: Analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 2729–2735.
  42. Ioannou GN, Weiss NS, Boyko EJ, Mozaffarian D, Lee SP. Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States. *Hepatology* 2006; **43**: 1145–1151.
  43. Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999–2002. *Am J Gastroenterol* 2006; **101**: 76–82.
  44. Mahady SE, Gale J, Macaskill P, Craig JC, George J. Prevalence of elevated alanine transaminase in Australia and its relationship to metabolic risk factors: A cross-sectional study of 9,447 people. *J Gastroenterol Hepatol* 2017; **32**: 169–176.
  45. Lee TH, Kim WR, Benson JT, Therneau TM, Melton LJ III. Serum aminotransferase activity and mortality risk in a United States community. *Hepatology* 2008; **47**: 880–887.
  46. Ruhl CE, Everhart JE. Elevated serum alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase and mortality in the United States population. *Gastroenterology* 2009; **136**: 477–485.e411.
  47. Hyun HJ, Shim JJ, Kim JW, Lee JS, Lee CK, Jang JY, et al. The prevalence of elevated alanine transaminase and its possible causes in the general Korean population. *J Clin Gastroenterol* 2014; **48**: 534–539.
  48. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 960–967.



Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Hepatology

journal homepage: [www.elsevier.es/annalsofhepatology](http://www.elsevier.es/annalsofhepatology)

Original article

## Association between plasma bilirubin and mortality

Libor Vitek<sup>a,\*</sup>, Jaroslav A. Hubacek<sup>b</sup>, Andrzej Pajak<sup>c</sup>, Agnieszka Doryńska<sup>c</sup>,  
Magdalena Kozela<sup>c</sup>, Lenka Eremiasova<sup>d</sup>, Vilem Danzig<sup>d</sup>, Denes Stefler<sup>e,1</sup>,  
Martin Bobak<sup>e,1</sup>

<sup>a</sup> Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, and 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Chair of Epidemiology and Population Studies, Institute of Public Health, Faculty of Health Sciences, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>d</sup> 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Epidemiology and Public Health, University College of London, UK



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 December 2018

Accepted 12 February 2019

Available online 18 April 2019

## Keywords:

UGT1A1

Cancer

Cardiovascular diseases

## ABSTRACT

**Introduction and aim:** It has been proposed that plasma concentration of bilirubin, an endogenous antioxidant, is protective against diseases mediated by increased oxidative stress, including cardiovascular diseases (CVD) and cancer. To examine this hypothesis, we investigated the relationship between plasma bilirubin concentrations and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase (*UGT1A1*) promoter gene variations (associated with increased bilirubin concentrations) with total/CVD and cancer mortality.

**Materials and methods:** A nested case-control study was conducted within the Polish arm of the HAPIEE cohort. At baseline in 2002–2005, participants were examined in detail. Mortality follow-up (median (IQR) between blood draw and death was 3.7 (2.1–5.1) years) was performed by linkage with regional and national death registers. Plasma biomarkers were analysed in all subjects who died from any cause (cases,  $n = 447$ ) and in a random subsample of survivors (controls,  $n = 1423$ ).

**Results:** There was a strong negative association between plasma bilirubin levels and total and cancer mortality, expressed more profoundly in men. The adjusted OR of deaths from all causes and cancer, comparing the highest vs. lowest plasma bilirubin categories were 0.61 (95% CI: 0.42–0.87) and 0.39 (0.24–0.65), respectively. There was no association of bilirubin with CVD mortality. The *UGT1A1*\*28 allele, a genetic marker of raised bilirubin, was also negatively associated with total/cancer mortality, although the associations were not statistically significant.

**Discussion:** Both the observational and genetic associations support the negative relationship between bilirubin and total mortality; this association appears to be driven by cancer mortality, while that with CVD mortality is not evident.

© 2019 Fundación Clínica Médica Sur, A.C. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The role of increased oxidative stress in the pathogenesis of cardiovascular disease (CVD) and cancer, and the associated effects of various antioxidants, have been intensively discussed in the literature [1,2]. In this context, bilirubin, the final product of the heme catabolic pathway in the intravascular compartment, is recognised as one of the most potent endogenous antioxidants. Elevated systemic concentrations of bilirubin were for decades

considered an ominous sign of liver diseases, but recent data suggest that mildly increased bilirubin concentrations might exert potent protective effects against oxidative stress-related diseases, including cardiovascular and cancer diseases [3–5], and this may result in lower risk of total mortality [3]. This protective relationship appears to be linear; it has been reported that each unit increase of systemic bilirubin concentrations has been associated with decrease in cardiovascular and cancer risk [6,7] while plasma bilirubin concentrations below  $10 \mu\text{mol/L}$ , although still within the current physiological range, appear to confer increased risks of a variety of oxidative stress-mediated diseases [8].

Bilirubin is metabolised in the liver tissue by the conjugation enzyme *UGT1A1* (bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1), whose gene (OMIM accession no. 191740) is the major genetic

\* Corresponding author at: Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Bojišti 3, 12000 Praha 2, Czech Republic.

E-mail address: [vitek@cesnet.cz](mailto:vitek@cesnet.cz) (L. Vitek).

<sup>1</sup> Joint last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.02.001>

1665-2681/© 2019 Fundación Clínica Médica Sur, A.C. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

determinant of its systemic bilirubin concentrations [9]. In fact, inherited mild deficiency of UGT1A1 is the basis of a Gilbert syndrome (OMIM accession no. 143500), also known as benign hyperbilirubinemia. In most of Caucasian subjects, Gilbert syndrome is caused by the functional (TA)<sub>6</sub> repeat variation located within the ATATAA element in the promoter UGT1A1 gene region. In comparison with the shorter wild-type (TA)<sub>6</sub> allele, the presence of the longer allele (TA)<sub>7</sub> (known also as UGT1A1\*28 allele) is associated with lower gene expression and bilirubin concentrations in (TA)<sub>7</sub> homozygotes are significantly higher than in carriers of at least one (TA)<sub>6</sub> allele [10]. It is important to stress, that the penetrance of Gilbert syndrome genotype is only 50% (virtually only ½ of these subjects manifest with mild unconjugated hyperbilirubinemia) [10], a phenomenon confounding results of studies evaluating the effect of UGT1A1 gene mutations on various phenotypes.

The aim of our study was thus to analyse the prospective associations between the plasma concentrations of bilirubin, the TA UGT1A1 promoter gene tandem repeat polymorphism, and total, cardiovascular and cancer mortality in a nested case–control study established within a large population-based cohort study in Poland.

## 1. Material and methods

### 1.1. Subjects in the cohort and in the nested case–control study

This study used data collected by the Polish arm of the multicentre HAPIEE (Health, Alcohol, and Psychosocial factors in Eastern Europe) cohort study [11,12]. At baseline in 2002–2005, the study examined a random sample of men and women aged 45–69 years living in 4 districts of the city of Krakow, Poland. A total of 10,728 individuals were recruited (response rate 61%), 8860 of whom provided a blood sample. All examined subjects were of self-reported Caucasian ethnicity. The study complied with the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Committees of University College London and the Jagiellonian University, Krakow. All subjects provided a written informed consent.

Since there was not sufficient funding for laboratory analyses of all blood samples, this report is based on a nested case–control study established within this cohort. The nested case–control has been described in detail elsewhere (including 3 other cohorts without bilirubin measurements cohort) [13]. Briefly, cases were all subjects who died from any cause during the follow-up (cases,  $n = 447$ ), and controls were a random subsample of survivors (controls,  $n = 1423$ ). Controls were chosen from participants who were alive at the time when the analytical sample was selected. The date of this was the 31st December 2010, which was, on average, 7 years after baseline data collection.

### 1.2. Measurements and mortality follow-up

Participants completed a face-to-face interview, covering their medical history, healthy behaviours and socio-demographic and psychosocial characteristics, underwent an examination and provided a venous blood sample. Local and national death registers in Krakow were used to identify mortality rates amongst the participants. Causes of death were determined using the 10th revision of the International Classification of Diseases (ICD): CVD (I00–I99), cancer (C00–D48) or causes other than those above (all other ICD codes). Follow-up time for each participant was calculated as the time between enrolment to the study and date of either death or the last contact (for those who did not die); the mean follow-up of subjects in the nested case–control study was 6.4 years. The median (IQR) follow-up time of cases was 3.7 years (2.1–5.1).

### 1.3. Laboratory analyses

Bilirubin, ALT, urea and CRP in frozen baseline plasma samples were determined on automatic analyser (UniCel Dx C 800 Synchron Clinical Systems, Beckman Coulter, UK) using commercially available kits and reference materials from Beckman Coulter at Wageningen University (The Netherlands). DNA has been isolated by a modified salting-out method [14]. TA repeat polymorphism within the UGT1A1 gene has been genotyped by the KASP™ technology custom assay ([www.lgcgroup.com](http://www.lgcgroup.com)). This method is unable to detect rare alleles obtaining the 5 and 8 repeats, but as these subjects represent less than 1% of the general population (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp-ref.cgi?rs=8175347>), they were neglected in the further analyses.

### 1.4. Statistical analyses

The associations of plasma bilirubin concentrations with mortality outcomes were analysed by multivariable adjusted logistic regression in several steps. We categorised plasma bilirubin concentrations using 17 and 10 µmol/L cut-offs in order to make the results more meaningful for clinical practice and comparable with previous studies (the value of 17 µmol/L is the upper limit of the normal bilirubin concentration, while levels lower than 10 µmol/L have been proposed by previous studies as a potential risk factor for cardiovascular mortality [15]).

In model 1, the relationships were adjusted for participants' age and sex (the basic confounders which are adjusted for in most epidemiological studies). In model 2, the odds ratios were further adjusted for education, marital status, alcohol intake, smoking, body mass index, energy intake and the ratio of total/HDL cholesterol (usually found to be related to the exposure (plasma bilirubin) or the outcome (mortality) in most studies and therefore considered as potential confounders). In model 3, odds ratios were further adjusted for plasma ALT, GGT, CRP and urea as potential biomarkers (which have also been shown to be related to bilirubin and mortality, in order to assess the strength of the associations independently of these factors). The analyses of mortality by the UGT1A1 genotype were adjusted for age and sex (model 1, as above) and additionally for bilirubin concentrations to assess whether the effect of genotype on mortality was explained by bilirubin, or whether there is another pathway linking the genotype with the outcome (model 2). This part of the analysis was a Mendelian randomisation study where a genetic marker of a specific phenotype (e.g. plasma bilirubin) is used to test a potential causal association between the phenotype and disease. The Mendelian randomisation method is often seen as a close parallel to randomised controlled trial and, if the assumptions are fulfilled, it should provide unbiased and unfounded estimates between the two variables [16,17].

The interaction between sex and bilirubin concentrations, as well as between sex and UGT1A1 genotype, were tested in the association with mortality by the likelihood ratio test which compared the nested models with or without multiplicative interaction term. There were no statistically significant interactions with sex in any of the examined associations. Therefore, men and women were analysed together.

All statistical analyses were carried out using the 13.1 version of the statistical software STATA (StataCorp, Texas, USA),  $p$ -values <0.05 were considered statistically significant.

## 2. Results

The nested case–control study consisted from 1870 individuals, of whom 447 were cases (i.e. they died from any cause, of which 139 were from CVD and 211 from cancer); the 1423 survivors served

**Table 1**  
Descriptive characteristics of the study sample.

	Cases (all deaths)	Controls	p-value <sup>a</sup>
Number of subjects	447	1423	
Age (years), mean (SD)	<b>61.6 (6.5)</b>	<b>60.8 (6.7)</b>	<b>0.048</b>
Males, n (%)	305 (68.2)	971 (68.2)	0.999
Current smoking, n (%)	<b>194 (43.4)</b>	<b>383 (26.9)</b>	<b>&lt;0.001</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean (SD)	28.0 (5.1)	28.3 (4.3)	0.388
Total cholesterol (mmol/L), mean (SD)	5.7 (1.2)	5.8 (1.0)	0.173
Triacylglycerols (mmol/L), median (IQR)	1.5 (1.1–2.1)	1.5 (1.1–2.0)	0.998
Bilirubin (μmol/L), median (IQR)	<b>12.0 (9.8–15.2)</b>	<b>12.9 (10.9–16.1)</b>	<b>&lt;0.001</b>
ALT (IU/L), median (IQR)	<b>20.1 (15.4–27.0)</b>	<b>21.1 (16.8–27.4)</b>	<b>0.022</b>
GGT (IU/L), median (IQR)	<b>21.3 (8.4–40.3)</b>	<b>15.7 (6.8–31.1)</b>	<b>&lt;0.001</b>
CRP (mg/L), median (IQR)	<b>2.5 (1.1–5.6)</b>	<b>1.7 (0.9–3.3)</b>	<b>&lt;0.001</b>
Urea (mmol/L), median (IQR)	<b>4.6 (3.7–5.8)</b>	<b>4.8 (4.0–5.8)</b>	<b>0.021</b>

SD – standard deviation, IQR – interquartile range.

<sup>a</sup> Calculated with chi-square test, t-test or Spearman's rank correlation, depending on the nature of the variable. Values in bold represent significant differences.**Table 2**  
Distribution of *UGT1A1* genotypes in the study sample (cases and controls combined) and values of bilirubin, ALT, GGT, CRP and urea by *UGT1A1* genotype.

	<i>UGT1A1</i> genotype			p-value <sup>a</sup>
	6/6	6/7	7/7	
Number of subjects (%)	759 (40.6)	844 (45.1)	267 (14.3)	
Bilirubin (μmol/L), median (IQR)	<b>11.7 (10.0–13.9)</b>	<b>13.0 (10.9–15.6)</b>	<b>19.1 (14.6–25.0)</b>	<b>&lt;0.001</b>
ALT (IU/L), median (IQR)	21.0 (16.7–27.0)	20.9 (16.5–27.9)	20.8 (16.2–26.9)	0.519
GGT (IU/L), median (IQR)	17.4 (7.1–34.1)	16.7 (7.0–33.7)	16.8 (7.0–30.3)	0.311
CRP (mg/L), median (IQR)	1.8 (0.9–3.6)	1.9 (0.9–3.9)	1.8 (0.9–3.8)	0.596
Urea (mmol/L), median (IQR)	4.9 (4.0–5.8)	4.7 (3.9–5.7)	4.8 (3.8–5.8)	0.105

<sup>a</sup> p-value for trend estimated by Spearman's rank correlation test. IQR, interquartile range.

Data expressed as medians and IQR. Values in bold represent significant differences.

as controls. Descriptive characteristics of subjects included in the nested case–control study are shown in Table 1. The median plasma bilirubin concentration in the overall sample was 12.8 μmol/L (13.5 μmol/L in men, 11.6 μmol/L in women). Compared to controls subjects who died had significantly lower plasma bilirubin concentrations (Table 1). Clinically important elevations of ALT and GGT activities were seen in 8.6% and 19.5% of subjects, respectively.

The distribution of *UGT1A1* genotypes was in agreement with HW equilibrium ( $p = 0.19$ ), and the allele frequencies were similar to the other Caucasian populations (Table 2) [10]. As expected, there was an association between the *UGT1A1* genotypes and plasma bilirubin concentrations; 7/7 homozygotes had significantly higher plasma bilirubin concentrations compared to carriers of at least one allele 6 (Table 2). Other biochemical and anthropometrical parameters of interest (ALT, GGT, CRP, urea) were distributed independently of the *UGT1A1* repeat polymorphism.

After controlling for age and sex, there was a strong negative association of plasma bilirubin categories with risk of death from all causes and cancer mortality but not from CVD (Table 3). These results remained significant even after adjusting for potential confounders, including age, education, marital status, alcohol intake, smoking, BMI, energy intake, total/HDL cholesterol ratio (model 2). In the adjusted model, the odds ratios in the highest vs. lowest bilirubin categories for death from all causes, cancer and CVD were 0.61 (95% CI: 0.42–0.87), 0.39 (0.24–0.65) and 1.03 (0.58–1.83), respectively (Table 3). After additionally adjusting for elevated plasma ALT, GGT activities, as well as CRP and urea concentrations

(model 3), the pattern of results remained similar, although the confidence intervals became wider due to loss of statistical power in the multivariable model. All the studies on the association between bilirubin and clinical outcomes published so far have paid extreme attention to gender with female sex having negligible relationship, whereas males almost always having benefits from higher bilirubin concentrations. For this reason we also conducted gender-specific analyses. In these additional analyses, investigated associations were stronger in men than women (Table 4), although the interactions between bilirubin and sex were not statistically significant.

The associations of the *UGT1A1*\*28 allele (a genetic marker of systemic bilirubin concentrations) with mortality risks showed similar patterns as plasma bilirubin concentrations, although the associations did not reach statistical significance (Table 5). Importantly, the adjustment for plasma bilirubin almost attenuated the (non-significant) associations of the polymorphism with all-cause and cancer mortality; indicating that the effect of genotype was, as hypothesised, driven predominantly by plasma bilirubin concentrations.

### 3. Discussion

This case–control study, nested in a population-based cohort in a Krakow urban population sample, found strong negative associations of plasma bilirubin with all-cause mortality driven predominantly by the effect on cancer but not CVD mortality. These observational associations were supported by the Mendelian

**Table 3**  
Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) of mortality by plasma bilirubin concentrations calculated with logistic regression models.

Cause of death	Plasma bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Deaths (n)	Model 1		Model 2		Model 3	
			OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	OR	(95% CI)
All causes (n = 447)	<10	120	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	10–17	253	<b>0.49</b>	<b>(0.37–0.64)</b>	<b>0.60</b>	<b>(0.45–0.79)</b>	<b>0.62</b>	<b>(0.47–0.82)</b>
	$\geq 17$	74	<b>0.47</b>	<b>(0.33–0.66)</b>	<b>0.61</b>	<b>(0.42–0.87)</b>	<b>0.63</b>	<b>(0.43–0.92)</b>
	p-value for trend			<b>&lt;0.001</b>		<b>0.004</b>		<b>0.010</b>
	Sex interaction p-value			0.659		0.746		0.795
CVD (n = 139)	<10	30	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	10–17	82	0.73	(0.47–1.13)	0.87	(0.55–1.37)	0.91	(0.58–1.44)
	$\geq 17$	27	0.79	(0.45–1.38)	1.03	(0.58–1.83)	1.09	(0.61–1.95)
	p-value for trend			0.407		0.923		0.793
	Sex interaction p-value			0.240		0.190		0.187
Cancer (n = 211)	<10	68	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	10–17	117	<b>0.44</b>	<b>(0.32–0.61)</b>	<b>0.52</b>	<b>(0.36–0.72)</b>	<b>0.54</b>	<b>(0.38–0.76)</b>
	$\geq 17$	26	<b>0.32</b>	<b>(0.20–0.52)</b>	<b>0.39</b>	<b>(0.24–0.65)</b>	<b>0.41</b>	<b>(0.25–0.69)</b>
	p-value for trend			<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>
	Sex interaction p-value			0.549		0.638		0.706
Other causes (n = 97)	<10	22	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	10–17	54	0.69	(0.41–1.16)	0.86	(0.51–1.48)	0.87	(0.50–1.50)
	$\geq 17$	21	0.85	(0.45–1.60)	1.08	(0.56–2.09)	1.00	(0.51–1.98)
	p-value for trend			0.628		0.820		0.999
	Sex interaction p-value			0.251		0.183		0.158

Model 1: Adjusted for age and sex.

Model 2: Additionally adjusted for education, marital status, alcohol intake, smoking, BMI, energy intake, total cholesterol/HDL ratio.

Model 3: Adjusted for all variables in model 2 and plasma ALT and GGT activities, and CRP and urea concentration.

Values in bold and italics are highlighting statistical significance of the results.

randomisation analyses; although non-significant, the patterns of associations of mortality with a genetic marker of raised bilirubin were similar to results of analyses using plasma bilirubin. In theory, with data available on bilirubin, genotypes and mortality outcomes in the same dataset, it would be possible to formally conduct a one sample Mendelian randomisation using a two-stage least squares regression analysis. However, a larger sample size and/or higher number of deaths would be necessary to achieve sufficient statistical power.

There is growing evidence from experimental and clinical studies [3,4] that mildly elevated systemic bilirubin concentrations have potent anti-atherogenic [5], anti-proliferative [7,18], and anti-ageing [19] effects. This association, however, seems to be valid only when the elevated bilirubin is not a consequence of an underlying liver disease [6]. Indeed, elevated liver enzyme activities predict cardiovascular events [20,21], thus underlying liver disease clearly eliminates the potential beneficial effects of bilirubin. It is important to note, that the prevalence of elevated liver enzymes in the general population is as high as 10–20% [22], which is exactly what we found in our current study.

The beneficial effects of bilirubin on mortality have been shown in several epidemiological studies. The first study, in 2001, a 10-year follow-up retrospective investigation of more than 11,000 Belgian men and women [23], reported a significant negative association of bilirubin with all-cause and cancer mortality in men but not in women; surprisingly, no association was found with CVD mortality. Another large study by Fulks et al., included almost 2 million insurance applicants, found an negative association between all-cause mortality and bilirubin levels [24]. Serum bilirubin levels had a strong and independent protective impact on the association with all-cause and CVD mortality in a study by Ajja et al. in a male population [25]. In a prospective study by Horsfall et al. [26] in a statin-treated population of approximately 130,000 participants, a negative relationship between bilirubin concentrations and all-cause mortality risk was observed, whereas the relationship between bilirubin and CVD/myocardial infarction events was U-shaped [26]. In a second report, the same group analysed mortality rates in participants diagnosed with Gilbert syndrome; these

subjects had half the mortality rate compared to controls [27]. Protective effects of bilirubin on overall mortality were reported also from a prospective study on haemodialysed patients by Chen et al. [28]. Importantly, subjects with Gilbert syndrome genotype (UGT1A1\*28 homozygosity) had one fourth the risk for all-cause mortality as compared to the wild-type allele carriers. A significant negative correlation between serum bilirubin and all-cause mortality was observed also in NHANES study on elderly population [29], although no detailed analysis was provided. Consistently, serum bilirubin concentrations below 10.5  $\mu\text{mol/L}$  were found to be a risk factor for cardiovascular mortality in a small Serbian older population [30].

On the other hand, no survival advantage of higher serum bilirubin concentrations was observed among older persons by Boland et al. [31] and, higher baseline bilirubin levels predicted slightly increased mortality in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study (although confusingly, a UGT1A1\*28 gene variant predicted lower overall mortality [32]). No significant associations between serum bilirubin and either all-cause, CVD or non-CVD mortality were observed in Diabetes Heart Study [33]. Similarly, bilirubin was not associated with cancer mortality in the EPIC-Heidelberg cohort [34]. Overall, although not completely consistent, most available studies suggest a beneficial effect of bilirubin on all-cause mortality, driven predominantly by the effect on cancer, but in some studies also on CVD.

Our results confirm data from previous studies since they are consistent with the majority of published reports. In our study, the association with all-cause mortality was driven mainly by cancer mortality, while that with cardiovascular mortality was not observed. One of the reasons for this observation may lie in the relatively young age of the examined population ( $61.6 \pm 6.5$  years), in which cancer was found a leading mortality cause.

The association between UGT1A1 promoter gene variations and mortality rates was not significant (most likely due to low penetrance of UGT1A1\*28 mutation [10]) but the direction of the association also suggests protective effects. The observation that the adjustment for bilirubin virtually eliminated the (non-significant) effect of the genotype is important because it confirms



**Table 4**  
Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) of mortality by plasma bilirubin concentrations by sex, calculated with logistic regression.

(a) men									
Causes of death	Plasma bilirubin (μmol/L)	Deaths(n)	Model 1		Model 2		Model 3		
			OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	
All cause (n = 305)	<10	71	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	173	<b>0.44</b>	<b>(0.31–0.62)</b>	<b>0.55</b>	<b>(0.39–0.80)</b>	<b>0.57</b>	<b>(0.40–0.83)</b>	
	≥17	61	<b>0.42</b>	<b>(0.28–0.63)</b>	<b>0.58</b>	<b>(0.38–0.90)</b>	<b>0.59</b>	<b>(0.38–0.92)</b>	
	p-value for trend			<b>&lt;0.001</b>		<b>0.024</b>		<b>0.031</b>	
CVD (n = 98)	<10	21	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	55	0.55	(0.33–0.95)	0.65	(0.37–1.14)	0.72	(0.41–1.26)	
	≥17	22	0.61	(0.33–1.16)	0.81	(0.41–1.56)	0.92	(0.46–1.79)	
	p-value for trend			0.184		0.606		0.868	
Cancer (n = 134)	<10	39	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	75	<b>0.37</b>	<b>(0.23–0.57)</b>	<b>0.44</b>	<b>(0.28–0.70)</b>	<b>0.45</b>	<b>(0.28–0.71)</b>	
	≥17	20	<b>0.26</b>	<b>(0.15–0.47)</b>	<b>0.35</b>	<b>(0.19–0.64)</b>	<b>0.35</b>	<b>(0.19–0.64)</b>	
	p-value for trend			<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>		<b>0.001</b>	
Other cause (n = 73)	<10	11	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	43	0.97	(0.49–1.92)	1.27	(0.62–2.60)	1.24	(0.60–2.58)	
	≥17	19	1.16	(0.54–2.50)	1.51	(0.67–3.40)	1.31	(0.56–3.03)	
	p-value for trend			0.641		0.316		0.560	
(b) Women									
Causes of death	Plasma bilirubin (μmol/L)	Deaths(n)	Model 1		Model 2		Model 3		
			OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	
All cause (n = 142)	<10	49	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	80	<b>0.57</b>	<b>(0.37–0.87)</b>	0.66	(0.43–1.03)	0.71	(0.45–1.11)	
	≥17	13	<b>0.58</b>	<b>(0.29–1.16)</b>	0.61	(0.29–1.27)	0.63	(0.30–1.35)	
	p-value for trend			<b>0.022</b>		0.078		0.128	
CVD (n = 41)	<10	9	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	27	1.19	(0.54–2.60)	1.51	(0.67–3.41)	1.57	(0.69–3.59)	
	≥17	5	1.37	(0.44–4.27)	1.58	(0.47–5.21)	1.57	(0.46–5.32)	
	p-value for trend			0.568		0.356		0.348	
Cancer (n = 77)	<10	29	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	42	<b>0.54</b>	<b>(0.32–0.91)</b>	<b>0.59</b>	<b>(0.34–1.01)</b>	0.63	(0.37–1.10)	
	≥17	6	<b>0.48</b>	<b>(0.19–1.22)</b>	<b>0.49</b>	<b>(0.19–1.29)</b>	0.52	(0.19–1.40)	
	p-value for trend			<b>0.025</b>		<b>0.050</b>		0.088	
Other cause (n = 24)	<10	11	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)	
	10–17	11	0.39	(0.17–0.92)	0.45	(0.19–1.11)	0.48	(0.19–1.20)	
	≥17	2	0.44	(0.10–2.06)	0.47	(0.10–2.34)	0.50	(0.10–2.57)	
	p-value for trend			0.064		0.126		0.164	

Model 1: Adjusted for age.

Model 2: Additionally adjusted for education, marital status, alcohol intake, smoking, BMI, energy intake, total cholesterol/HDL ratio.

Model 3: Adjusted for all variables in model 2 and plasma ALT and GGT activities, and CRP and urea concentration.

Values in bold and italics are highlighting statistical significance of the results.

that bilirubin is (1) strongly associated with the genotype, and (2) responsible for the protective effect of the UGT1A1\*28 gene variation.

Our findings are further supported by clinical studies of cancer morbidity. For example, in a large Chinese study on patients with colorectal cancer, the prevalence of Gilbert syndrome genotype was very low, reaching only 1.4% [35]. Similarly low prevalence of this Gilbert syndrome genotype (4.7%) was found in a study of colon cancer by Liu et al. [36]. Serum bilirubin concentrations were reported to be negatively associated with non-dermatological malignancies, and this effect was the most pronounced for colorectal cancer; subjects with Gilbert syndrome phenotype had 4-times lower risk compared to individuals with normal bilirubin levels [18]. Similarly, in our previous study low serum bilirubin levels were associated with an increased risk of colorectal cancer in both males and females, whereas UGT1A1\*28 allele carrier status was proved to be protective against the development of colorectal cancer in males [7].

The main limitation of our study is the relatively small number of events, particularly deaths from specific causes. The average

follow-up time of 6.4 years can also be considered short for the development of chronic diseases and may be partly responsible for some of the non-significant findings. Further limitation is the fact that site-specific cancer rates could not be assessed. Giving the large variation within this disease group in terms of risk factor profile, future analyses should explore the link between bilirubin and specific types of cancer. On the other hand, the prospective design minimises the reverse causation bias, and the extensive set of data on participants allows effective control for confounding. In addition, the combination of observational and Mendelian randomisation design, and the consistency of these two sets of findings, supports the validity of our findings.

In conclusion, our study is consistent with earlier reports that plasma bilirubin concentrations is negatively related to total mortality; in our data, this association was mostly driven by the effect on a cancer, rather than CVD. These findings were further supported by the (non-significant) pattern of associations between mortality and the UGT1A1 promoter gene polymorphism which was largely explained by plasma bilirubin. Larger epidemiological studies, presumably on older populations, are needed to confirm

**Table 5**  
Relationship between *UGT1A1* promoter gene status and mortality with logistic regression models.

Cause of death	<i>UGT1A1</i> genotype	Deaths (n)	Model 1		Model 2	
			OR	95% CI	OR	95% CI
All-causes (n=447)	6/6	191	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	6/7	198	0.91	(0.72–1.14)	0.97	(0.77–1.23)
	7/7	58	0.83	(0.59–1.16)	0.98	(0.67–1.43)
	<i>p</i> -value for trend			<i>0.235</i>		<i>0.873</i>
	Sex interaction <i>p</i> -value			<i>0.804</i>		<i>0.895</i>
CVD (n=139)	6/6	59	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	6/7	55	0.83	(0.56–1.21)	0.85	(0.58–1.25)
	7/7	25	1.23	(0.75–2.01)	1.36	(0.78–2.39)
	<i>p</i> -value for trend			<i>0.739</i>		<i>0.631</i>
	Sex interaction <i>p</i> -value			<i>0.477</i>		<i>0.545</i>
Cancer (n=211)	6/6	91	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	6/7	97	0.95	(0.70–1.29)	1.06	(0.77–1.44)
	7/7	23	0.70	(0.43–1.14)	0.98	(0.58–1.68)
	<i>p</i> -value for trend			<i>0.208</i>		<i>0.889</i>
	Sex interaction <i>p</i> -value			<i>0.734</i>		<i>0.693</i>
Other causes (n=97)	6/6	41	1.00	(ref)	1.00	(ref)
	6/7	46	1.01	(0.65–1.56)	1.00	(0.64–1.55)
	7/7	10	0.66	(0.33–1.34)	0.57	(0.26–1.25)
	<i>p</i> -value for trend			<i>0.374</i>		<i>0.293</i>
	Sex interaction <i>p</i> -value			<i>0.581</i>		<i>0.571</i>

Model 1: adjusted for age and sex.

Model 2: adjusted for age, sex and bilirubin concentrations.

Values in italics are highlighting statistical significance of the results.

our as well as previously published data on lacking relationship between bilirubin and CVD mortality, and to reveal the reasons for this phenomenon.

#### Abbreviations

CVD cardiovascular diseases  
*UGT1A1* bilirubin UDP-glucuronosyl transferase  
 HAPIEE Health, Alcohol, and Psychosocial factors in Eastern Europe  
 ICD International Classification of Diseases

#### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

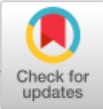
#### Acknowledgements

The study was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. 15-28895A. All rights reserved.

#### References

- [1] Wang Y, Chun OK, Song WO. Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies. *Nutrients* 2013;5:2969–3004.
- [2] Milkovic L, Siems W, Siems R, Zarkovic N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr Pharm Des* 2014;20:6529–42.
- [3] Wagner KH, Wallner M, Molzer C, Gazzin S, Bulmer AC, Tiribelli C, et al. Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases. *Clin Sci (Lond)* 2015;129:1–25.
- [4] Gazzin S, Vitek L, Watchko J, Shapiro SM, Tiribelli C. A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease. *Trends Mol Med* 2016;22:758–68.
- [5] Vitek L. Bilirubin and atherosclerotic diseases. *Physiol Res* 2017;66:S11–20.
- [6] Novotny L, Vitek L. Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies. *Exp Biol Med* 2003;228:568–71.
- [7] Jiraskova A, Novotny J, Novotny L, Vodicka P, Pardini B, Naccarati A, et al. Association of serum bilirubin and promoter variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes with sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012;131:1549–55.
- [8] Gazzin S, Masutti F, Vitek L, Tiribelli C. The molecular basis of jaundice: an old symptom revisited. *Liver Int* 2017;37:1094–102.
- [9] Lin JP, Vitek L, Schwertner HA. Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease. *Clin Chem* 2010;56:1535–43.
- [10] Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1171–5.
- [11] Peasey A, Bobak M, Kubinova R, Malyutina S, Pajak A, Tamosiunas A, et al. Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study. *BMC Public Health* 2006;6:255.
- [12] Hubacek JA, Pikhart H, Kubinova R, Peasey A, Malyutina S, Pajak A, et al. Lack of association between *NYD-SP18* variant and obesity. The health alcohol and psychosocial factors in Eastern Europe Study. *Ann Nutr Metab* 2016;68:244–8.
- [13] Schottker B, Brenner H, Jansen EH, Gardiner J, Peasey A, Kubinova R, et al. Evidence for the free radical/oxidative stress theory of ageing from the CHANCES consortium: a meta-analysis of individual participant data. *BMC Med* 2015;13:300.
- [14] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- [15] Kundur AR, Singh I, Bulmer AC. Bilirubin, platelet activation and heart disease: a missing link to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome? *Atherosclerosis* 2015;239:73–84.
- [16] Hingorani A, Humphries S. Nature's randomised trials. *Lancet* 2005;366:1906–8.
- [17] Bennett DA, Holmes MV. Mendelian randomisation in cardiovascular research: an introduction for clinicians. *Heart* 2017;103:1400–7.
- [18] Zucker SD, Horn PS, Sherman KE. Serum bilirubin levels in the US population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology* 2004;40:827–35.
- [19] Zelenka J, Dvorak A, Alan L, Zadinova M, Haluzik M, Vitek L. Hyperbilirubinemia protects against aging-associated inflammation and metabolic deterioration. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:6190609.
- [20] Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2729–35.
- [21] Ioannou GN, Weiss NS, Boyko EJ, Mozaffarian D, Lee SP. Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States. *Hepatology* 2006;43:1145–51.
- [22] Radcke S, Dillon JF, Murray AL. A systematic review of the prevalence of mildly abnormal liver function tests and associated health outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:1–7.
- [23] Temme EHM, Zhang J, Schouten EG, Kesteloot H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes Control* 2001;12:887–94.
- [24] Fulks M, Stout RL, Dolan VF. Mortality associated with bilirubin levels in insurance applicants. *J Insur Med* 2009;41:49–53.
- [25] Ajja R, Lee DC, Sui X, Church TS, Steven NB. Usefulness of serum bilirubin and cardiorespiratory fitness as predictors of mortality in men. *Am J Cardiol* 2011;108:1438–42.

- [26] Horsfall LJ, Nazareth I, Petersen I. Cardiovascular events as a function of serum bilirubin levels in a large, statin-treated cohort. *Circulation* 2012;126:2556–64.
- [27] Horsfall LJ, Nazareth I, Pereira SP, Petersen I. Gilbert's syndrome and the risk of death: a population-based cohort study. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1643–7.
- [28] Chen YH, Hung SC, Targn DC. Serum bilirubin links UGT1A1\*28 polymorphism and predicts long-term cardiovascular events and mortality in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:567–74.
- [29] Ong KL, Allison MA, Cheung BM, Wu BJ, Barter PJ, Rye KA. The relationship between total bilirubin levels and total mortality in older adults: the United States National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2004. *PLOS ONE* 2014;9:e94479.
- [30] Vasovic O, Lalic K, Trifunovic D, Milic N, Jevremovic I, Popovic L, et al. Prediction of cardiovascular mortality in functionally disabled elderly – a possible new score. *J Med Biochem* 2014;33:181–90.
- [31] Boland BS, Dong MH, Bettencourt R, Barrett-Connor E, Loomba R. Association of serum bilirubin with aging and mortality. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:1–7.
- [32] Zulus B, Grunbacher G, Kleber ME, Marz W, Renner W. The UGT1A1\*28 gene variant predicts long-term mortality in patients undergoing coronary angiography. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:560–4.
- [33] Cox AJ, Ng MCY, Xu J, Langefeld CD, Koch KL, Dawson PA, et al. Association of SNPs in the UGT1A gene cluster with total bilirubin and mortality in the Diabetes Heart Study. *Atherosclerosis* 2013;229:155–60.
- [34] Kuhn T, Sookthai D, Graf ME, Schübel R, Freisling H, Johnson T, et al. Albumin, bilirubin, uric acid and cancer risk: results from a prospective population-based study. *Br J Cancer* 2017;117:1572–9.
- [35] Wang Y, Yi C, Wang Y, Li H, Li B, Wang D, et al. Distribution of uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A polymorphisms and their role in irinotecan-induced toxicity in patients with cancer. *Oncol Lett* 2017;14:5743–52.
- [36] Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, et al. UGT1A1\*28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 2008;112:1932–40.



## Which serum uric acid levels are associated with increased cardiovascular risk in the general adult population?

Alena Krajčoviechová MD, PhD<sup>1</sup> | Peter Wohlfahrt MD, PhD<sup>1</sup> |  
Jan Bruthans MD, PhD, FESC<sup>1,4</sup> | Pavel Šulc MD<sup>1</sup> | Věra Lánská PhD<sup>2</sup> |  
Lenka Eremiášová MD<sup>3</sup> | Jan Pudil MD<sup>3</sup> | Aleš Linhart MD, PhD, FESC, FCMA<sup>3</sup> |  
Jan Filipovský MD, PhD<sup>4</sup> | Otto Mayer MD, PhD<sup>4</sup> | Jiří Widimský MD, PhD<sup>5</sup> |  
Milan Blaha MSc, PhD<sup>6</sup> | Claudio Borghi MD, PhD<sup>7</sup> | Renata Cífková MD, PhD, FESC<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Center for Cardiovascular Prevention, First Faculty of Medicine and Thomayer Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Medical Statistics Unit, Institute for Experimental and Clinical Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Medicine II, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Medicine II, Faculty of Medicine, Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Medicine III, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup>Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

<sup>7</sup>Department of Medical and Surgical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

### Correspondence

Alena Krajčoviechová, MD, PhD, Center for Cardiovascular Prevention, First Faculty of Medicine of Charles University and Thomayer Hospital, Videnska 800, 140 59 Prague 4, Czech Republic.  
Email: alena.krajcoviechova@email.cz

### Funding information

The study was supported by grant No. 15-27109A provided by the Ministry of Health of the Czech Republic.

### Abstract

Our aim was to determine the serum uric acid (SUA) levels associated with an increased risk of cardiovascular (CV) and all-cause death in the general adult population. We analyzed data obtained in two independent cross-sectional surveys performed in the Czech Republic in 2006-09 and 2015-18, involving 1% population random samples in nine districts, aged 25-64 years, stratified by age and gender. Ten-year mortality data were obtained in a cohort with examination in 2006-09. Final analyses included 3542 individuals (48.2% men) examined in 2006-09, and 2304 (47.4% men) examined in 2015-18. From a cohort examined in 2006-09, 122 men and 60 women were reported dead (33% and 27% from CV disease). In men, there was no association of baseline SUA levels with baseline SCORE category or 10-year mortality rates. In women, each 10  $\mu\text{mol/L}$  increase in baseline SUA levels was associated with an increase in baseline SCORE category ( $P < .001$ ). Receiver operating characteristic curve analyses in women identified the baseline SUA cutoff values discriminating: 1. between low/intermediate and high/very high SCORE categories (309  $\mu\text{mol/L}$ ), 2. CV mortality (325  $\mu\text{mol/L}$ ), and 3. all-cause mortality (298  $\mu\text{mol/L}$ ). After adjusting for confounders including SCORE, Cox regression analysis confirmed that the baseline SUA cutoffs of 309  $\mu\text{mol/L}$  and 325  $\mu\text{mol/L}$  were associated with 4-times ( $P = .010$ ) and 6-times ( $P = .036$ ) greater risk of CV mortality, whereas the cutoff of 298  $\mu\text{mol/L}$  was associated with 87% greater risk of all-cause mortality ( $P = .025$ ). In conclusion, the SUA cutoff value of 309  $\mu\text{mol/L}$  identified women at high/very high SCORE category and was associated with 4-times greater risk of observed CV mortality over 10 years.

## 1 | INTRODUCTION

Over the past few decades, a large number of studies have linked increased serum uric acid (SUA) levels with current and future arterial hypertension, chronic kidney disease (CKD), metabolic syndrome, and cardiovascular disease (CVD); however, it is still a matter of debate whether these associations are causal.<sup>1</sup> While the most convincing evidence exists for causal involvement of uric acid in arterial hypertension, its role in CVD remains controversial. Some epidemiological studies have reported that increased SUA levels predict cardiovascular (CV) events,<sup>2,3</sup> while others showed either no association or eliminated association after adjusting for conventional risk factors.<sup>4,5</sup>

Nevertheless, high SUA levels become increasingly recognized as a CV risk factor rather than a marker of underlying disease. Likewise, the 2018 European Society of Cardiology/European Society of Hypertension guidelines on the management of hypertension have included uric acid as a new CV risk factor and recommend routine SUA level measurement in patient workup.<sup>6</sup> However, two important questions have to be answered: (1) the upper limit of SUA reference range has not been clearly established.<sup>7</sup> Currently, the threshold for hyperuricemia is defined based on the distribution of SUA levels in a population without clinical evidence of gout (approx. 420  $\mu\text{mol/L}$  in men; 360  $\mu\text{mol/L}$  in women). However, the role of uric acid in the development of hypertension or CVD has been also documented with SUA levels below the upper limit of standard reference range.<sup>3,8</sup> Furthermore, over the past few decades, SUA levels have progressively increased in developed countries mainly due to increasing prevalence of obesity and detrimental lifestyle changes.<sup>9,10</sup> Thus, defining normouricemia according to a biological function of uric acid becomes a high priority; (2) there is growing evidence suggesting that there are gender disparities in SUA levels associated CV risk with a closer relationship consistently reported in women.<sup>3,11,12</sup>

The aim of this analysis was to evaluate which SUA levels were associated with an increased risk of CV and all-cause death in men and in women enrolled into the Czech post-MONICA Study in 2006-09 and in 2015-18. For that purpose, baseline estimated CV risk probabilities and observed CV and all-cause mortality data were evaluated.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Study population

The Czech MONICA and Czech post-MONICA studies deal with independent cross-sectional surveys for major CV risk factors in representative samples of the Czech adult population. The former was established in 1985 as a part of the World Health Organization MONICA Project (MONItoring trends and determinants in CARDIOvascular disease), and so far, there have been 7 independent cross-sectional surveys performed in the Czech Republic.<sup>13</sup> In the present study, we analyzed the data obtained from the last two independent cross-sectional surveys (The Czech post-MONICA study 2006-09 and 2015-18), with available SUA

levels and albumin creatinine ratio (ACR). For each screening, a 1% random sample of the general population of nine districts of the Czech Republic within an age range 25-64 years was selected from the General Health Insurance Company registry, as previously described elsewhere<sup>13,14</sup> and recently (2015-18) from registers of five major health insurance companies, covering 85% of the entire Czech population. By law, health insurance is mandatory for all Czech citizens.

All study participants were Caucasians. The study protocol was approved by the Joint Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, and all participants provided their written informed consent. In 2006-09, a total of 3612 individuals were examined (as previously reported), whereas, in 2015-18, a total of 2621 individuals were examined. The response rates were 63.1 and 44.8%, respectively.

### 2.2 | Examination and laboratory analysis

In each survey, the examination consisted of a physician-completed questionnaire focusing on demographic and socioeconomic data, lifestyle, disease history, and current use of medication. Post-menopausal status was defined as no menstrual periods for 12 consecutive months with no other identified biological causes. Anthropometric and blood pressure measurements were taken as described previously.<sup>13</sup> Fasting blood and an early morning spot urine samples were analyzed in a central laboratory (Department for Laboratory Methods, Institute for Clinical and Experimental Medicine).<sup>13-15</sup>

Hyperuricemia was defined as the level of SUA  $\geq 420 \mu\text{mol/L}$  in men and  $\geq 360 \mu\text{mol/L}$  in women.<sup>1</sup> Individuals with systolic blood pressure  $\geq 140 \text{ mm Hg}$  or diastolic blood pressure  $\geq 90 \text{ mm Hg}$  or current drug treatment for hypertension were considered to have arterial hypertension. Dyslipidemia was defined as total cholesterol level  $\geq 5 \text{ mmol/L}$  or high density lipoprotein-cholesterol  $< 1 \text{ mmol/L}$  in men and  $< 1.3 \text{ mmol/L}$  in women or serum triglycerides  $\geq 1.7 \text{ mmol/L}$  or current use of lipid-lowering medication. Diabetes mellitus was defined as fasting plasma glucose  $\geq 7 \text{ mmol/L}$  or current treatment with insulin or oral antidiabetic medication. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation was used to calculate estimated glomerular filtration rate (eGFR). Individuals with eGFR  $< 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  or ACR  $\geq 3 \text{ mg/mmol}$  were considered to have chronic kidney disease.<sup>16</sup> Cardiovascular disease was defined as a self-reported history of myocardial infarction, coronary artery bypass grafting, percutaneous coronary intervention, stroke, and other arterial revascularization or peripheral arterial disease.

### 2.3 | Systematic COronary Risk Evaluation (SCORE)

A 10-year risk of CV death was assessed using the SCORE system, and each person was allocated into one of the four SCORE categories: low ( $< 1\%$ ), intermediate ( $1-5\%$ ), high ( $\geq 5\% - < 10\%$ ), and very high ( $\geq 10\%$ ).<sup>6</sup> In individuals without CVD, eGFR  $< 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ,

diabetes mellitus, and marked elevation of a single risk factor, a 10-year risk of CV death was assessed using the SCORE charts calibrated for the Czech population aged 40–65 years with the use of country-specific mortality rates. In adults younger than 40 years, a 10-year risk of CV death was set to a zero unless otherwise stated. All individuals with clinical CVD, eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabetes mellitus, and marked elevation of a single risk factor were automatically considered to be at a high or a very high risk category.

## 2.4 | Mortality data

Mortality data including the date and cause of death till September 2018 were obtained for the cohort initially examined between 2006 and 2009. The cause of death was classified after the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (10th revision, 2016). Data were provided by the Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic.

## 2.5 | Statistical analysis

Continuous variables were tested for normality. The two-tailed *t* test for independent samples and Mann-Whitney *U* test were employed to evaluate the differences between genders in continuous variables, where applicable. The distribution of categorical variables between genders, as well as mortality rates in the first survey (2006–09) was compared by Pearson's chi-square test.

The univariate analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean SUA levels by the SCORE category. So as to evaluate the independent contribution of SUA levels to a SCORE category, multivariate generalized linear mixed (GLM) models with a SCORE category as an ordinal dependent variable were employed. The GLM models were adjusted for all unique factors significantly associated with a SCORE category in univariate analyses. To avoid overadjustment, only factors not already incorporated in the SCORE algorithm were considered.

The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to assess the discriminating capacity of baseline SUA levels (a) to distinguish individuals at high/very high baseline SCORE categories from those at low/intermediate SCORE categories in the pooled data, whereas the discriminating capacity of SUA levels for (b) observed CV mortality and (c) observed all-cause mortality was evaluated in the survey of 2006–09. The area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) was assessed using the method by DeLong et al. The cutoff values of SUA levels were defined according to the maximized sum of sensitivity and specificity. In order to evaluate all the newly defined cutoff values as independent predictors of the observed CV and all-cause mortality, multiple multivariate Cox proportional hazards regression models were employed, with all potential confounders and SUA levels above/below a respective cutoff being entered in a forward stepwise manner. A Holm-Bonferroni-corrected *P* value was reported to adjust for multiple testing.

All statistical analyses were performed separately by gender. Calculations were performed using SPSS 19 software (SPSS Inc). Unless otherwise stated, a significant difference was defined as a two-sided *P* value < .05.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Demographic and clinical characteristics; the Czech post- MONICA Studies 2006–09 and 2015–18

A total of 3505 (48.7% men) and 2302 (47.4% men) individuals examined in the surveys in 2006–09 and 2015–18, respectively, with determined SUA levels, SCORE category and the presence of CKD were included in the final analyses. The demographic and clinical characteristics of men and women by the year of survey are summarized in Table 1. Compared to women, men had higher body mass index, and there was a higher proportion of men with hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia. Overall, 27% of men and 12% of women were classified as being at high or very high 10-year risk of CV death.

### 3.2 | The relationship between baseline SUA levels and a baseline SCORE category; the Czech post- MONICA Studies 2006–09 and 2015–18

In ANOVA in women, mean SUA levels gradually increased with an increase in the SCORE category in the pooled analysis of the two surveys and in individuals without CVD, eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabetes mellitus, and markedly elevated single risk factors (Figure S1C,D). In univariate ANOVA in men, an increase in mean SUA levels with an increase in the SCORE category was less convincing in the pooled data and was not observed in individuals without CVD, eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabetes mellitus, and markedly elevated single risk factors (Figure S1A,B). The increase in mean SUA levels with an increase in the SCORE category was also observed in each survey separately in women, whereas only in the survey in 2006–09 in men (data not shown).

In multivariate GLM models, there was no association between SUA levels and SCORE category in men either in the pooled or subgroup analyses (Table 2). In women, for each 10-μmol/L increase in SUA levels, the SCORE category significantly increased in the pooled and also in each subgroup analysis. Of note, the use of xanthine-oxidase inhibitors, diuretics, losartan, and fenofibrate was not associated with SCORE category.

In the GLM model of the pooled data in women, including also post-menopausal status and the year of the survey as independent variables, in addition to SUA levels, waist circumference, education, ACR ≥ 3 mg/mmol, and the use of antihypertensive and lipid-lowering medication, there was an increase in the SCORE category (OR 0.02 [95% CI 0.01–0.04]; *P* = .001) for each 10-μmol/L increase in SUA levels.

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics by gender, the Czech post-MONICA studies 2006-09 and 2015-18

	Survey 2006-09			Survey 2015-18		
	Men n = 1707	Women n = 1798	P value	Men n = 1091	Women n = 1211	P value
Age, y	47.8 ± 11.5	46.7 ± 11.2	.004	48.3 ± 10.9	47.8 ± 10.9	ns
Current smoker, n (%)	605 (35.5)	492 (27.4)	<.001	290 (26.6)	281 (23.2)	ns
Education						
Basic, n (%)	68 (4.0)	174 (9.7)	<.001	18 (1.7)	55 (4.6)	<.001
Secondary without school leaving examination, n (%)	804 (47.1)	545 (30.4)		381 (35.3)	284 (23.6)	
Secondary with school leaving examination, n (%)	579 (33.9)	819 (45.6)		419 (38.8)	588 (48.8)	
University, n (%)	256 (15.0)	257 (14.3)		262 (24.3)	277 (23.0)	
Waist-to-height ratio, cm/cm	0.56 ± 0.07	0.53 ± 0.09	<.001	0.57 ± 0.07	0.54 ± 0.09	<.001
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	28.5 ± 4.6	27.2 ± 6.1	<.001	29.05 ± 4.7	27.4 ± 4.7	<.001
Hypertension, n (%)	780 (45.8)	612 (34)	<.001	527 (48.3)	384 (31.7)	<.001
Diabetes mellitus, n (%)	156 (9.2)	88 (4.9)	<.001	87 (8.0)	64 (5.3)	.011
Dyslipidemia, n (%)	1320 (77.3)	1301 (72.4)	.001	830 (76.1)	868 (71.7)	.018
SUA, μmol/L	344.7 ± 81.0	250.2 ± 73.8	<.001	374.5 ± 73.3	279.0 ± 66.2	<.001
Hyperuricemia, n (%)	280 (16.4)	138 (7.7)	<.001	274 (25.1)	131 (10.8)	<.001
CKD, n (%)	116 (6.8)	136 (7.6)	ns	39 (3.6)	58 (4.8)	ns
eGFR < 60 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> , n (%)	34 (2.0)	48 (2.7)	ns	13 (1.2)	27 (2.2)	ns
ACR ≥ 3 mg/mmol, n (%)	95 (5.6)	98 (5.5)	ns	28 (2.6)	36 (3.0)	ns
Use of xanthine-oxidase inhibitors, n (%)	84 (4.9)	21 (1.2)	<.001	64 (5.9)	26 (2.1)	<.001
Use of antihypertensive medication, n (%)	489 (28.7)	419 (23.3)	<.001	326 (29.9)	250 (20.6)	<.001
Use of diuretics, n (%)	168 (9.8)	174 (9.7)	ns	105 (9.6)	84 (6.9)	.022
Use of losartan, n (%)	64 (3.8)	59 (3.3)	ns	18 (1.6)	19 (1.6)	ns
Use of lipid-lowering medication, n (%)	215 (12.7)	160 (9)	<.001	150 (13.7)	120 (9.9)	.004
Use of fenofibrate, n (%)	47 (2.8)	24 (1.3)	.004	31 (2.8)	15 (1.2)	.007
Use of antidiabetic medication, n (%)	85 (5.1)	52 (2.9)	.001	63 (5.8)	49 (4.0)	ns
Post-menopausal status, n (%)	–	781 (43.6)	–	–	519 (42.9)	–
CVD, n (%)	122 (7.1)	43 (2.3)	<.001	49 (4.5)	19 (1.6)	<.001
SCORE, % <sup>a</sup>	0 [0.0-6.0]	0 [0.0-2.0]	<.001	0 [0.0-5.0]	0 [0.0-2.0]	<.001
SCORE category						
Low, n (%)	544 (31.9)	987 (54.9)	<.001	342 (31.3)	649 (53.6)	<.001
Intermediate, n (%)	662 (38.8)	585 (32.5)		475 (43.5)	427 (35.3)	
High, n (%)	269 (15.8)	124 (6.9)		162 (14.8)	80 (6.6)	
Very high, n (%)	232 (13.6)	102 (5.7)		112 (10.3)	55 (4.5)	

Note: Mean ± standard deviation are presented for the continuous variables, unless otherwise stated.

Median and 90-percent range are presented for SCORE (%).

Frequency and percentage are presented for categorical variables.

Abbreviations: ACR, albumin creatinine ratio; CKD, chronic kidney disease; CVD, cardiovascular disease; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ns, not significant; SCORE category: low (<1%), intermediate (1-5%), high (≥5%-<10%), very high (≥10%) 10-year risk of cardiovascular death; SCORE, Systematic COronary Risk Evaluation; SUA, serum uric acid.

<sup>a</sup>A SCORE was calculated using the SCORE charts in 1390 (81.4%) and 936 (85.8%) men examined in the surveys 2006-09 and 2015-18, respectively, while in 1602 (89.1%) and 1097 (90.6%) women examined in the surveys 2006-09 and 2015-18, respectively. Individuals with CVD, eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabetes mellitus, and markedly elevated single risk factors were automatically considered to be at high or very high risk category.<sup>6</sup>

A significant difference was defined as a two-sided P value < .05.

**TABLE 2** Gender-specific multivariate GLM models for SCORE category in the pooled analysis, for each survey separately, and in individuals without CVD, eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabetes mellitus, and markedly elevated single risk factors<sup>a</sup>

Men									
Variable	Pooled analysis n = 2798		Survey 2006-09 n = 1707		Survey 2015-18 n = 1091		Pooled analysis; SCORE (%) calculated <sup>a</sup> n = 2326		
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	
SUA, per 10 µmol/L increase	0.99 (0.98-1)	.061	0.99 (0.98-1.01)	.757	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>	
Waist circumference, cm	1.04 (1.03-1.05)	<.001	1.04 (1.03-1.05)	<.001	1.03 (1.02-1.04)	<.001	1.03 (1.02-1.04)	<.001	
Education <sup>c</sup>	1.24 (1.14-1.36)	<.001	1.23 (1.10-1.38)	<.001	1.26 (1.09-1.46)	<.001	1.20 (1.08-1.32)	<.001	
ACR ≥ 3 mg/mmol, yes-no	2.73 (1.92-3.90)	<.001	2.96 (1.95-4.49)	<.001	1.78 (0.89-3.57)	.102	1.68 (1.01-2.81)	.048	
Antihypertensive medication, yes-no	3.75 (3.13-4.50)	<.001	4.16 (3.29-5.24)	<.001	3.22 (2.41-4.30)	<.001	3.63 (2.92-4.51)	<.001	
Lipid-lowering medication, yes-no	2.72 (3.42-2.17)	<.001	2.84 (2.11-3.82)	<.001	2.73 (1.91-3.91)	<.001	1.44 (1.07-1.95)	.016	
Women									
Variable	Pooled analysis n = 3009		Survey 2006-09 n = 1798		Survey 2015-18 n = 1211		Pooled analysis; SCORE (%) calculated <sup>a</sup> n = 2699		
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	
SUA, per 10 µmol/L increase	1.03 (1.02-1.05)	<.001	1.03 (1.01-1.05)	<.001	1.04 (1.02-1.06)	<.001	1.02 (1.01-1.04)	.001	
Waist circumference, cm	1.04 (1.03-1.04)	<.001	1.04 (1.03-1.04)	<.001	1.03 (1.02-1.04)	<.001	1.03 (1.02-1.04)	<.001	
Education <sup>c</sup>	1.43 (1.31-1.58)	<.001	1.48 (1.31-1.67)	<.001	1.37 (1.17-1.60)	<.001	1.45 (1.32-1.63)	<.001	
ACR ≥ 3 mg/mmol, yes-no	1.85 (1.30-2.63)	.001	2.28 (1.51-3.42)	<.001	0.95 (0.47-1.91)	.893	1.20 (0.75-1.90)	.447	
Antihypertensive medication, yes-no	2.99 (2.46-3.63)	<.001	3.16 (2.38-3.92)	<.001	2.93 (2.15-3.99)	<.001	2.92 (2.32-3.67)	<.001	
Lipid-lowering medication, yes-no	3.29 (2.52-4.22)	<.001	3.16 (2.38-3.92)	<.001	4.90 (3.32-7.22)	<.001	3.39 (2.43-4.75)	<.001	

Abbreviations: ACR, albumin creatinine ratio; CI, confidence interval; CVD, cardiovascular disease; eGFR, estimated glomerular filtration rate; GLM models, generalized linear mixed models; NA, not available; OR, odds ratio; SCORE category: low (<1%), intermediate (1- $<$ 5%), high ( $\geq$ 5%- $<$ 10%), very high ( $\geq$ 10%) 10-year risk of cardiovascular death; SCORE, Systematic COronary Risk Evaluation; SUA, serum uric acid.

<sup>a</sup>SCORE (%) calculated in individuals without CVD, eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabetes mellitus, and markedly elevated single risk factors using SCORE charts calibrated for Czech population.<sup>6</sup>

<sup>b</sup>Not significantly associated with SCORE category in univariate analysis; only variables significantly associated with SCORE category in univariate analyses were included into the multivariate GLM model.

<sup>c</sup>University as a reference category.

A significant difference was defined as a two-sided *P* value < .05.

### 3.3 | The cutoff values of baseline SUA levels identifying women at a high/very high baseline SCORE category; the Czech post- MONICA Studies 2006-09 and 2015-18

Based on the ROC curve analysis of the pooled data, the cutoff value best distinguishing between low/intermediate and high/very high SCORE categories was 309 µmol/L (AUROC 0.72 [95% CI 0.70-0.73]; *P* < .0001; sensitivity 52.4%; specificity 81.2%) (Figure S2A).

### 3.4 | 10-year mortality in the Czech post- MONICA study 2006-09

Of the total of 1707 men and 1798 women examined in the Czech post- MONICA Study 2006-09 and included in this analysis, there were 122 reported deaths among men, whereas only 60 deaths among women over the period of 10 years; thus, men had approximately twice higher mortality rate compared to women (7.2% vs 3.3%; *P* < .001). About 43% and 55% of deaths were due to



malignancies, whereas 33% and 27% of deaths were due to CVD in men and women, respectively.

In multivariate Cox proportional hazards regression models, SUA levels did not predict CV and all-cause mortality in men (HR 1.02 [95% CI 0.98-1.06];  $P = .291$  and HR 1.01 [95% CI 0.99-1.03];  $P = .441$ , respectively). In women, each 10  $\mu\text{mol/L}$  increase in SUA levels was significantly associated with a 5% greater risk of CV mortality in the final forward stepwise Cox regression model, including SCORE category and the presence of CKD (HR 1.05 [95% CI 1.01-1.10];  $P = .021$ ). Contrarily, the association of each 10  $\mu\text{mol/L}$  increase in SUA levels with a 3% greater risk of all-cause mortality was not significant (HR 1.03 [95% CI 1.00-1.06];  $P = .069$ ).

### 3.5 | The cutoff values of baseline SUA levels for the observed CV and all-cause mortality; the Czech post- MONICA study 2006-09

The AUROC of baseline SUA levels did not differ from 0.5 either for CV or all-cause mortality in men (AUROC 0.55 [95% CI 0.44-0.65];  $P = .388$  and AUROC 0.54 [95% CI 0.48-0.54];  $P = .235$ , respectively). Contrarily, the AUROC of baseline SUA levels was significant for CV and all-cause mortality in women (Figure S2B,C). The cutoff value distinguishing women who survived from those who died due to CV causes was 325  $\mu\text{mol/L}$  (AUROC 0.84 [95% CI 0.72-0.96];  $P < .0001$ ; sensitivity 75.0%; specificity 86.2%), whereas the cutoff value distinguishing women who survived from those who died due to all causes was 298  $\mu\text{mol/L}$  (AUROC 0.70 [95% CI 0.63-0.78];  $P < .0001$ ; sensitivity 55.0%; specificity 79.2%).

### 3.6 | Prediction of the observed CV mortality by baseline SUA levels above the newly defined cutoff values in women; the Czech post- MONICA study 2006-09

As the next step, we compared 10-year cumulative CV mortality rates in women with baseline SUA levels above/below the newly defined cutoff values resulting from ROC curve analyses for the following: (a) a high/very high baseline SCORE category (309  $\mu\text{mol/L}$ ), and (b) observed CV mortality (325  $\mu\text{mol/L}$ ). The corresponding Kaplan-Meier curve analyses are shown in Figure 1A,B. In the parallel multivariate stepwise Cox regression models, SUA levels  $>309 \mu\text{mol/L}$  were associated with approximately four times greater risk of CV mortality, whereas SUA levels  $>325 \mu\text{mol/L}$  with approx. six times greater risk of CV mortality (Holm-Bonferroni corrected  $P$  value of .010, and .036, respectively) (Table 3). Each final stepwise Cox regression model included SCORE category and the presence of CKD. Of note, the use of xanthine-oxidase inhibitors, diuretics, losartan, and fenofibrate did not predict CV mortality.

### 3.7 | Prediction of the observed all-cause mortality by baseline SUA levels above the newly defined cutoff in women; the Czech post- MONICA study 2006-09

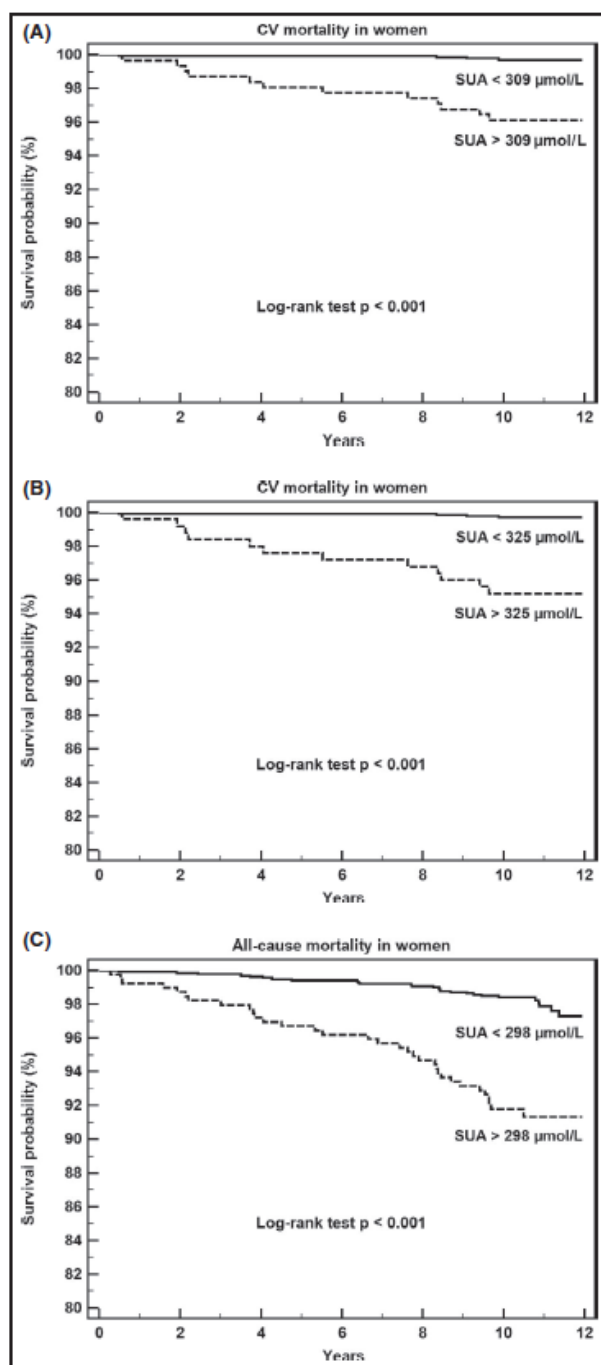
Finally, we compared a 10-year cumulative all-cause mortality rates in women with baseline SUA levels above/below the newly defined cutoff value of 298  $\mu\text{mol/L}$ . The corresponding Kaplan-Meier curve analysis is shown in Figure 1, C. In the final multivariate stepwise Cox regression model, women with SUA levels  $>298 \mu\text{mol/L}$  had an 87% greater risk of death from all causes (Table 3).

## 4 | DISCUSSION

This is the first study, to our knowledge, to assess the prognostic value of SUA levels in a central European population characterized by high CV mortality.<sup>17</sup> In a representative sample of the general population of the Czech Republic, we demonstrated an independent predictive value of increased baseline SUA levels for increased risk of CV death in women, but not in men. Firstly, we showed that the baseline SUA levels progressively increased with an increase in baseline estimated 10-year risk of CV death (assessed as SCORE) in women. Secondly, we determined the cutoff values of SUA levels that predicted 10-year CV and all-cause mortality independently of the baseline SCORE category in women. Interestingly, the cutoff value of 309  $\mu\text{mol/L}$  identified women at high/very high SCORE category and was associated with approximately four times greater risk of observed CV mortality. The evaluation of estimated 10-year risk of CV death alongside with mortality data in the large study population adds to the strength and is all pieces of novelty of our results.

To date, we are aware of only two studies evaluating the association between SUA levels and the estimated 10-year risk of CV death. In a post hoc analysis of the European Study on CV Risk Prevention and Management in Usual Daily Practice (EURIKA) study, SUA levels were independently associated with SCORE categories in individuals without CVD but with at least one CV risk factor.<sup>18</sup> These results were promptly confirmed in the general Chinese population.<sup>19</sup> However, no subgroup analyses by gender were reported in either study.<sup>18,19</sup>

Epidemiological evidence for the association of SUA levels with CV events remains conflicting partially due to multivariate adjustment of the results and gender disparities. In the Framingham Heart Study, SUA levels predicted CV mortality in women, but not in men, and the association was eliminated after adjusting for conventional CV risk factors.<sup>4</sup> In the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension (LIFE) study, baseline SUA levels were significantly associated with CV events only in women, and the association remained significant after adjustment for the Framingham risk score.<sup>12</sup> Likewise, SUA levels were an independent predictor of all forms of CV death in elderly Austrian women,<sup>20</sup> while in elderly Austrian men, SUA levels predicted stroke and chronic heart failure, but not coronary heart disease.<sup>21</sup> Overall, several studies reported



**FIGURE 1** Kaplan-Meier curve survival analyses for (A) CV mortality with SUA levels above/below 309  $\mu\text{mol/L}$ , (B) CV mortality with SUA levels above/below 325  $\mu\text{mol/L}$ , and (C) all-cause mortality with SUA levels above/below 298  $\mu\text{mol/L}$ . CV, cardiovascular; SUA, serum uric acid

either stronger or exclusive association between SUA levels and CV events in women<sup>3,12,22-24</sup> compared to men.<sup>25,26</sup>

In the present study, the association between SUA levels and SCORE category was eliminated after multivariate adjustment in

men. Of note, evaluation of causality between SUA levels and CVD is complicated due to the involvement of uric acid in the development of the conventional CV risk factors, such as hypertension, which might not be a true confounder but rather an intermediate factor, located in a causal pathway between high SUA levels and CV events.<sup>27,28</sup> However, when we further evaluated unadjusted data, ROC curve analyses showed that SUA levels had no discriminating capacity for either all-cause or CV mortality in men. Contrarily, in women, the ROC curve analyses yielded clearly defined cutoffs. In general, women have lower SUA levels than men due to the uricosuric effect of estrogens. However, adjustment for post-menopausal status did not alter our results.

A number of pathophysiological mechanisms by which uric acid may lead to CVD were described, including oxidative stress, endothelial dysfunction, increased plasma renin activity, and albuminuria.<sup>1,15</sup> A hypothetical explanation for gender-specific effect of uric acid on CV events could be due to activation of different pathways in men and women. A recently developed hyperuricemic mouse model provides support for this hypothesis. Knockout of the urate oxidase gene, encoding an enzyme degrading uric acid in rodents, leads to an alteration in glucose metabolism in male mice, but increases blood pressure and alters lipid metabolism in female mice.<sup>29</sup>

Another explanation for the gender-specific effect could be due to a higher proportion of men being already at high or very high SCORE category (29.4%) at baseline in 2006-09, compared to women (12.6%). It is likely that increased SUA levels might not have any predictive value beyond the conventional CV risk factors in high risk men. This explanation is in agreement with the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I), in which HR of high SUA levels for CV mortality were lower in men than in women, and no association between SUA levels and CV mortality was observed in men with one or more CV risk factors.<sup>3</sup> On the contrary, the HRs of high SUA levels for CV mortality remained significant in women regardless of the number of CV risk factors. This is in concordance with our findings showing the association between increased SUA levels and CV mortality to be independent of the SCORE category and conventional CV risk factors in women.

There is a growing need to improve CV risk prediction especially in women. In the pooled analysis of seven European cohort studies, the SCORE charts identified women at an increased risk of CV death with higher specificity but much lower sensitivity compared to men. For instance, the sensitivity of the SCORE charts to detect a high risk category was 60%-62% in men, but only 13%-19% in women.<sup>30,31</sup> Accordingly, SCORE models underestimated the risk in a general population of women from Asian regions with a high global CV risk.<sup>32</sup> Similar to increased SUA levels, it has been shown that other conditions characterized by increased intracellular oxidative stress, such as autoimmune diseases, diabetes, and obesity, represent CV risk factors with greater impact in women.<sup>33,34</sup> The novelty of our finding is that it provides further rationale for the development of CV risk prediction models with greater gender precision.

**TABLE 3** Multiple multivariate forward stepwise Cox proportional hazards regression models of the relationship of SUA levels above new cutoff values with 10-year CV and all-cause mortality in women, the Czech post-MONICA study, 2006–09

Variable	CV mortality				All-cause mortality	
	Model 1A <sup>a</sup>		Model 1B <sup>a</sup>		Model 2 <sup>b</sup>	
	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
SUA > 309 μmol/L, yes-no	4.42 (1.29-15.08)	.018 <sup>c</sup>	–	–	–	–
SUA > 325 μmol/L, yes-no	–	–	5.88 (1.71-20.21)	.005 <sup>d</sup>	–	–
SUA > 298 μmol/L, yes-no	–	–	–	–	1.87 (1.08-3.22)	.025

Note: Age, current smoking, education, waist circumference, hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, CKD, CVD, SCORE category, post-menopausal status, and the use of xanthine-oxidase inhibitors, diuretics, losartan, and fenofibrate were all considered as potential confounders. All potential confounders were included in a forward stepwise fashion in each model, and only significant ones were retained.

Abbreviations: CI, confidence interval; CKD, chronic kidney disease; CV, cardiovascular; CVD, cardiovascular disease; HR, hazard ratio; SCORE, Systematic COronary Risk Evaluation; SUA, serum uric acid.

<sup>a</sup>Final model adjusted for SCORE category and CKD.

<sup>b</sup>Final model adjusted for CKD, age, smoking, and hypertension.

<sup>c</sup>Holm-Bonferroni corrected P value of .036.

<sup>d</sup>Holm-Bonferroni corrected P value of .010.

A significant difference was defined as a Holm-Bonferroni corrected P value < .05.

Epidemiologic studies, including the Czech post-MONICA Study, report a gradual increase in mean SUA levels over the past decades.<sup>28</sup> In light of this evidence, defining hyperuricemia based on the distribution of SUA levels in the general population without gout appears to be weak. Our results are in agreement with previous studies showing that SUA levels ranging from 310 to 333 μmol/L are associated with increased CV mortality.<sup>3,8,28</sup>

The limitations of this study include a relatively low number of deaths, as young and middle-aged general population was examined. However, identical standardized protocol used in the two independent cross-sectional surveys, and the evaluation of estimated 10-year risk of CV death alongside with mortality data add to the strength of our results. Furthermore, detailed information on the number of potential confounders including medication use and post-menopausal status was available and thus enabling the adjustment for in the analyses.

In conclusion, in a general adult population characterized by a high global CV risk, increased SUA levels represent an independent prognostic factor in women, but not in men. The SUA levels predicting CV and all-cause mortality are substantially lower than the currently used cutoff values to define hyperuricemia in women. Despite the fact that increased SUA levels predict outcomes independently of the SCORE, further large prospective studies are needed to evaluate whether the inclusion of SUA levels has an added predictive value to the existing CV risk prediction models. Besides, our data represent a rationale for the development of the prediction models including also CV risk factors with greater impact in women.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this study would like to express their gratitude to all individuals participating voluntarily in the study.

#### CONFLICT OF INTEREST


The authors declare they have no conflict of interest.


#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

AK wrote the manuscript. RC designed the study. AK, PW, JB, and PŠ recruited the participants. AK, PW, JB, PŠ, LE, JP, and MB contributed to data acquisition. AK and VL carried out the statistical methods and analysis. AK, AL, JF, OM Jr, JW Jr, CB, MB, and RC interpreted the results. PW, AL, JF, OM Jr, JW Jr, CB, and RC critically reviewed the manuscript.


#### ORCID

Alena Krajčoviechová  <https://orcid.org/0000-0002-4436-5023>

Jan Bruthans  <https://orcid.org/0000-0002-4307-2202>

Věra Lánská  <https://orcid.org/0000-0002-2832-5689>

Aleš Linhart  <https://orcid.org/0000-0002-3372-7850>

Otto Mayer  <https://orcid.org/0000-0002-8023-3749>

Jiří Widimský  <https://orcid.org/0000-0001-8242-9705>

Claudio Borghi  <https://orcid.org/0000-0001-8039-8781>

Renata Cifková  <https://orcid.org/0000-0003-2765-3821>

#### REFERENCES

- Johnson RJ, Bakris GL, Borghi C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a Scientific Workshop Organized by the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis*. 2018;71:851-865.
- Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke*. 2006;37:1503-1507.
- Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality: the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2000;283:2404-2410.
- Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*. 1999;131:7-13.
- Wheeler JG, Juzwishin KD, Eiriksdottir G, Gudnason V, Danesh J. Serum uric acid and coronary heart disease in 9,458 incident cases and 155,084 controls: prospective study and meta-analysis. *PLoS Med*. 2005;2:e76.

6. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39:3021-3104.
7. Desideri G, Castaldo G, Lombardi A, et al. Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18:1295-1306.
8. Verdecchia P, Schillaci G, Reboldi G, Santeusano F, Porcellati C, Brunetti P. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension. The PIUMA study. *Hypertension*. 2000;36:1072-1078.
9. Glynn RJ, Campion EW, Silbert JE. Trends in serum uric acid levels 1961-1980. *Arthritis Rheum*. 1983;26:87-93.
10. Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008. *Arthritis Rheum*. 2011;63:3136-3141.
11. Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Sex differences in uric acid and risk factors for coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2001;87:1411-1414.
12. Hoiegggen A, Alderman MH, Kjeldsen SE, et al. The impact of serum uric acid on cardiovascular outcomes in the LIFE study. *Kidney Int*. 2004;65:1041-1049.
13. Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J, et al. Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008. *J Hypertens*. 2010;28:2196-2203.
14. Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*. 2010;211:676-681.
15. Krajcoviechova A, Tremblay J, Wohlfahrt P, et al. The impact of blood pressure and visceral adiposity on the association of serum uric acid with albuminuria in adults without full metabolic syndrome. *Am J Hypertens*. 2016;29:1335-1342.
16. Inker LA, Astor BC, Fox CH, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2014;63:713-735.
17. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016;252:207-274.
18. Borghi C, Rodriguez-Artalejo F, De Backer G, et al. Serum uric acid levels are associated with cardiovascular risk score: a post hoc analysis of the EURIKA study. *Int J Cardiol*. 2018;253:167-173.
19. Sun GZ, Wang HY, Chen YT, Sun YX. Serum uric acid levels positively correlates with 10-year cardiovascular risk score in the general population from China. *Int J Cardiol*. 2018;266:259.
20. Strasak AM, Kelleher CC, Brant LJ, et al. Serum uric acid is an independent predictor for all major forms of cardiovascular death in 28,613 elderly women: a prospective 21-year follow-up study. *Int J Cardiol*. 2008;125:232-239.
21. Strasak A, Ruttmann E, Brant L, et al. Serum uric acid and risk of cardiovascular mortality: a prospective long-term study of 83,683 Austrian men. *Clin Chem*. 2008;54:273-284.
22. Holme I, Aastveit AH, Hammar N, Jungner I, Walldius G. Uric acid and risk of myocardial infarction, stroke and congestive heart failure in 417,734 men and women in the Apolipoprotein MORTALITY RISK study (AMORIS). *J Intern Med*. 2009;266:558-570.
23. Li M, Hu X, Fan Y, et al. Hyperuricemia and the risk for coronary heart disease morbidity and mortality a systematic review and dose-response meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:19520.
24. Chen JH, Chuang SY, Chen HJ, Yeh WT, Pan WH. Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: a Chinese cohort study. *Arthritis Rheum*. 2009;61:225-232.
25. Reboldi G, Verdecchia P, Saladini F, et al. Added predictive value of high uric acid for cardiovascular events in the Ambulatory Blood Pressure International Study. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2019;21:966-974.
26. Storhaug HM, Norvik JV, Toft I, et al. Uric acid is a risk factor for ischemic stroke and all-cause mortality in the general population: a gender specific analysis from The Tromso Study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:115.
27. Krajcoviechova A, Marois-Blanchet FC, Troyanov S, et al. Uromodulin in a pathway between decreased renal urate excretion and albuminuria. *Am J Hypertens*. 2018;30:e2-e3.
28. Feig DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2008;359:1811-1821.
29. Lu J, Hou X, Yuan X, et al. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders. *Kidney Int*. 2018;93:69-80.
30. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, et al. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16:304-314.
31. Goh LG, Dhaliwal SS, Lee AH, Bertolatti D, Della PR. Utility of established cardiovascular disease risk score models for the 10-year prediction of disease outcomes in women. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013;11:425-435.
32. Selvarajah S, Kaur G, Haniff J, et al. Comparison of the Framingham Risk Score, SCORE and WHO/ISH cardiovascular risk prediction models in an Asian population. *Int J Cardiol*. 2014;176:211-218.
33. Frostegård J. Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1776-1785.
34. Cifkova R, Pitha J, Krajcoviechova A, Kralikova E. Is the impact of conventional risk factors the same in men and women? Plea for a more gender-specific approach. *Int J Cardiol*. 2019;286:214-219.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Krajcoviechová A, Wohlfahrt P, Bruthans J, et al. Which serum uric acid levels are associated with increased cardiovascular risk in the general adult population? *J Clin Hypertens*. 2020;22:897-905. <https://doi.org/10.1111/jch.13847>

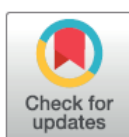
## RESEARCH ARTICLE

## 30-year trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population, Czech MONICA and Czech post-MONICA, 1985 – 2016/17

Renata Cífková<sup>1,2\*</sup>, Jan Bruthans<sup>1</sup>, Peter Wohlfahrt<sup>1</sup>, Alena Krajčoviechová<sup>1</sup>, Pavel Šulc<sup>1</sup>, Marie Jozífová<sup>1</sup>, Lenka Eremiášová<sup>2</sup>, Jan Pudil<sup>2</sup>, Aleš Linhart<sup>2</sup>, Jiří Widimský Jr<sup>3</sup>, Jan Filipovský<sup>4</sup>, Otto Mayer Jr<sup>4</sup>, Zdenka Škodová<sup>5</sup>, Rudolf Poledne<sup>6</sup>, Petr Stávek<sup>6</sup>, Věra Lánská<sup>7</sup>

**1** Center for Cardiovascular Prevention, First Faculty of Medicine and Thomayer Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **2** Department of Medicine II, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic, **3** Department of Medicine III, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic, **4** Department of Medicine II, Faculty of Medicine, Charles University, Pilsen, Czech Republic, **5** Department of Preventive Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, **6** Atherosclerosis Research Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, **7** Medical Statistics Unit, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

\* [renata.cifkova@ftn.cz](mailto:renata.cifkova@ftn.cz)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Cífková R, Bruthans J, Wohlfahrt P, Krajčoviechová A, Šulc P, Jozífová M, et al. (2020) 30-year trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population, Czech MONICA and Czech post-MONICA, 1985 – 2016/17. PLoS ONE 15(5): e0232845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845>

**Editor:** Tatsuo Shimosawa, International University of Health and Welfare, School of Medicine, JAPAN

**Received:** February 12, 2020

**Accepted:** April 22, 2020

**Published:** May 11, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845>

**Copyright:** © 2020 Cífková et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The data underlying the results presented in the study are available from <http://www.ftn.cz/data-monica-1117/>

## Abstract

## Background

Compared with Western Europe, the decline in cardiovascular (CV) mortality has been delayed in former communist countries in Europe, including the Czech Republic. We have assessed longitudinal trends in major CV risk factors in the Czech Republic from 1985 to 2016/17, covering the transition from the totalitarian regime to democracy.

## Methods

There were 7 independent cross-sectional surveys for major CV risk factors conducted in the Czech Republic in the same 6 country districts within the WHO MONICA Project (1985, 1988, 1992) and the Czech post-MONICA study (1997/98, 2000/01, 2007/08 and 2016/2017), including a total of 7,606 males and 8,050 females. The population samples were randomly selected (1%, aged 25–64 years).

## Results

Over the period of 31/32 years, there was a significant decrease in the prevalence of smoking in males (from 45.0% to 23.9%;  $p < 0.001$ ) and no change in females. BMI increased only in males. Systolic and diastolic blood pressure decreased significantly in both genders, while the prevalence of hypertension declined only in females. Awareness of hypertension, the proportion of individuals treated by antihypertensive drugs and consequently hypertension control improved in both genders. A substantial decrease in total cholesterol was seen

**Funding:** The study was supported by grant No. 15-27109A provided by the Ministry of Health of the Czech Republic.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

in both sexes (males: from  $6.21 \pm 1.29$  to  $5.30 \pm 1.05$  mmol/L;  $p < 0.001$ ; females: from  $6.18 \pm 1.26$  to  $5.31 \pm 1.00$  mmol/L;  $p < 0.001$ ).

## Conclusions

The significant improvement in most CV risk factors between 1985 and 2016/17 substantially contributed to the remarkable decrease in CV mortality in the Czech Republic.

## Introduction

Cardiovascular disease (CVD) remains the most common cause of death in the majority of countries worldwide [1]. During the past 40 years, there has been an increasing interest in geographical variations and time trends of total and cardiovascular (CV) mortality in Europe [2–6]. Death rates from coronary heart disease (CHD) and stroke have been generally higher in Central and Eastern Europe, in countries ruled by the totalitarian regimes for four decades after World War II, compared to Northern, Southern, and Western Europe, enjoying political freedom and free-market economy within the same period [7].

A decline in CVD mortality has been reported in most European countries, including the former communist countries in Central and Eastern Europe, however, the decline in CVD mortality in this part of Europe started substantially later. An analysis by Hartley et al. [5] has claimed that mortality started to decline only 5 years after the political changes occurred. The consequence has been a growing disparity in CVD mortality between Western and Eastern Europe.

Despite the significant decline in CVD mortality in the Czech Republic documented since 1985 (by more than 60% in both genders), the CVD mortality rates have remained high (with the latest available data for 2017: age-standardized mortality in males 334.2/100,000 population, in females 218.0/100,000 population) [8]. Data from the Czech MONICA and the Czech post-MONICA studies were used to develop the validated IMPACT mortality model to explain the decline in CHD mortality in the Czech Republic between 1985 and 2007 [9]. More than half (52%) of the substantial fall in CHD mortality was attributable to the reduction in major CV risk factors. The largest reduction in CHD death (39.5%) was explained by a substantial reduction in total cholesterol (from 6.1 mmol/l in 1985 to 5.1 mmol/l in 2007), predominantly due to lifestyle and dietary changes. Improvement in treatments accounted for approx. 43% of the CHD mortality decrease.

The aim of this analysis was to further assess the longitudinal trends in major CV risk factors in a representative Czech population sample from 1985 to 2016/2017. The study period included also the transition from the totalitarian regime to democracy, associated with socio-economic changes. In addition to our previous analysis [10], the results of the latest survey (2016/17) have been provided together with the longitudinal analysis by 10-year age groups for each of the risk factors.

## Methods

### Study population

There were seven independent cross-sectional surveys for major CV risk factors conducted in the Czech Republic in the same 6 country districts between 1985 and 2016/17. The first three surveys (1985, 1988, and 1992) were carried out within the WHO MONICA Project [11].

The study population was always randomly selected as a 1% population sample within each district, stratified by age and sex, within an age range of 25 to 64 years, either from the National Population Register (1985, 1988, and 1992; the Czech MONICA Study) or from the General Health Insurance Company registry (1997/98, 2000/01, and 2007/08; the Czech post-MONICA Study) keeping, by law, a list of all the insured individuals. Health insurance is mandatory for all Czech citizens and is paid for by the employer/employee or by the government for children, the retired and unemployed persons.

In the last survey, conducted in 2016/17, the random selection was performed from registers of five major health insurance companies operating in the Czech Republic and covering 85% of the total population.

The Czech MONICA and Czech post-MONICA studies were approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic. All participants provided their informed consent.

### Screening examination

The methods used were described in detail elsewhere [10]. In brief, the examination consisted of a physician-completed questionnaire. Currently prescribed drugs were recorded and verified (if possible) against drug containers.

Height and body weight were measured, BP measurement was performed consistently on the right arm (supported at the heart level), in the sitting position, after at least a 5-minute rest, using standard mercury sphygmomanometers and correctly sized cuffs. Blood pressure values were recorded to the nearest 2 mmHg. In 1985, 1988, and 1992, two consecutive BP measurements were performed with their mean values used for the longitudinal trend analysis. In 1997/98, 2000/01, 2007/08 and 2016/17 three consecutive BP measurements were obtained; however, for longitudinal trend analysis, only the mean of the first two readings was used.

A gentle venous blood sampling was performed in the sitting position after at least a 12-hour fast. The obtained samples were centrifuged at 1,500 G and frozen thereafter.

### Laboratory analysis

Lipid parameters in all the seven surveys were analyzed in the same Lipid Laboratory of the Institute for Clinical and Experimental Medicine, serving as the WHO Reference Laboratory throughout the WHO MONICA project. In 1985–1992, total cholesterol was determined using an enzymatic method and CHOD-PAP kits (Boehringer, Mannheim, Germany). HDL-cholesterol was also assessed by enzymatic methods after precipitation of serum apolipoprotein B-containing lipoproteins with sodium phosphotungstate. Since 1997, lipid parameters have been determined using a fully automated enzymatic method (COBAS MIRA S analyzer, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) with enzymatic kits produced by the same manufacturer.

Accuracy of analysis has been continuously monitored and tested by the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Georgia, USA); all analyses of total cholesterol and HDL-cholesterol were within the limit  $\pm 2\%$ .

### Definition of major risk factors

Smoking was assessed using the WHO definition, with a current smoker defined as smoking at least one cigarette per day. Obesity was defined as BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> for both sexes.

Hypertension was defined as a mean SBP  $\geq 140$  mmHg, and/or a mean DBP  $\geq 90$  mmHg, or current treatment with antihypertensive drugs. Awareness of hypertension was defined as an individual having reported a previous diagnosis of hypertension or current use of

antihypertensive medication. Treatment of hypertension was defined as current use of prescribed medication affecting BP. Hypertension control was defined as an individual receiving drug treatment for hypertension and achieving SBP <140 mmHg and DBP <90 mmHg.

Dyslipidemia was defined as total cholesterol  $\geq 5$  mmol/L (~190 mg/dL) or HDL-cholesterol <1 mmol/L (~40 mg/dL) in men and <1.2 mmol/L (~45 mg/dL) in women or use of lipid-lowering drugs [12].

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using JMP® 11.0.0 statistical software (2013, SAS Institute Inc.). Trends for means were tested by linear contrast in one-way ANOVA and trends for percentage by Cochran Armitage trend test of proportions. If necessary, Bonferroni correction for the adjustment of *p* values was applied. Three-way ANOVA and logistic regression were used to determine a possible influence of sex, age groups and the year(s) of examination on risk factors.

## Results

### Population sample characteristics and response rates

The total number in all seven independent cross-sectional surveys included 15,656 individuals of European descent, with consistently slightly higher response rates in women (Table 1).

There was a significant downward linear trend in the response rates in both sexes with a sharp decline between the last two surveys, particularly in the youngest age groups.

### Trends in cigarette smoking

Cigarette smoking declined significantly in males, by 21.1% (from 45.0 to 23.9%,  $p < 0.001$ ), between 1985 and 2016/17. There was a significant downward trend observed in all male age groups except the oldest one (aged 55–64 years with no significant change).

**Table 1. Survey sample sizes and response rates.**

	1985	1988	1992	1997/98	2000/01	2007/08	2016/17	<i>p</i> for trend
Total	2,570	2,768	2,343	1,990	2,055	2,246	1,684	
Mean age, yrs	44.9 ± 11.38	45.1 ± 11.26	44.7 ± 10.87	45.6 ± 10.64	46.2 ± 11.9	47.1 ± 11.46	47.8 ± 10.85	<0.001
Men	1,253	1,357	1,134	969	1,003	1,102	788	
Mean age, yrs	45.0 ± 11.39	45.3 ± 11.29	44.6 ± 10.76	45.8 ± 10.63	46.7 ± 11.07	47.9 ± 11.65	48.0 ± 10.83	<0.001
Response rate (%)	81.5	85.5	73.2	63.2	62.0	62.1	43.1	<0.001
Age group, n (%)								
25–34 yrs	307 (24.5)	322 (23.7)	246 (21.7)	194 (20.0)	187 (18.6)	208 (18.9)	116 (14.7)	<0.001
35–44 yrs	296 (23.6)	323 (23.8)	350 (30.9)	230 (23.7)	230 (22.9)	251 (22.8)	198 (25.1)	ns
45–54 yrs	334 (26.7)	361 (26.6)	310 (27.3)	332 (34.3)	295 (29.4)	231 (21.0)	210 (26.7)	ns
55–64 yrs	316 (25.2)	351 (25.9)	228 (20.1)	213 (22.0)	291 (29.0)	412 (37.4)	264 (33.5)	ns
Women	1,317	1,411	1,209	1,021	1,052	1,144	896	
Mean age, yrs	44.9 ± 11.38	44.9 ± 11.24	44.9 ± 10.97	45.3 ± 10.65	45.8 ± 11.10	46.4 ± 11.23	47.6 ± 10.88	<0.001
Response rate (%)	85.0	88.4	76.7	66.4	63.8	63.1	48.6	<0.001
Age group, n (%)								
25–34 yrs	322 (24.4)	342 (24.2)	266 (22.0)	212 (20.8)	213 (20.2)	235 (20.5)	147 (16.4)	<0.001
35–44 yrs	340 (25.8)	369 (26.2)	356 (29.4)	266 (26.1)	276 (26.2)	284 (24.8)	204 (22.8)	ns
45–54 yrs	343 (26.0)	360 (25.5)	311 (25.7)	326 (31.9)	285 (27.1)	299 (26.1)	282 (31.5)	ns
55–64 yrs	312 (23.7)	340 (24.1)	276 (22.8)	217 (21.3)	278 (26.4)	326 (28.5)	263 (29.4)	ns

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845.t001>



There was no change in the overall proportion of female smokers over the analyzed period, varying from 20.9 to 25.9%. A significant decrease in cigarette smokers was observed in the two younger female age groups (25–44 years), while the group 45–54 years did not change their smoking habits and the oldest female group (55–64 years) showed a significant increase in the prevalence of smoking (from 9.3 to 20.3%;  $p < 0.001$ ) (Table 2).

Employing logistic regression, the interaction between the year of examination and age groups as well as between sex and the year of examination was found to be significant ( $p < 0.001$ ; Fig 1A).

Daily consumption of cigarettes decreased significantly only in males (from  $17.8 \pm 7.8$  to  $14.8 \pm 8.3$ ;  $p < 0.05$ ).

### Trends in anthropometric parameters

A significant upward trend in height and body weight was observed in both genders, whereas BMI increased only in males over the period of 30 years (Table 3). The increase in body weight in males was alarming (from  $81.7 \pm 12.8$  to  $92.1 \pm 16.8$  kg;  $p < 0.001$ ) and consistent across all the age groups. Contrarily, in women, there was no change in the entire group and even a significant decline of BMI in the age group 45–54 years (from  $28.6 \pm 4.9$  to  $27.4 \pm 5.6$  kg;  $p = 0.007$ ). Using three-way ANOVA, the interaction between sex and age groups as well as between sex and the year of examination was found to be significant ( $p < 0.001$ ; Fig 1B).

### Trends in blood pressure and in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension

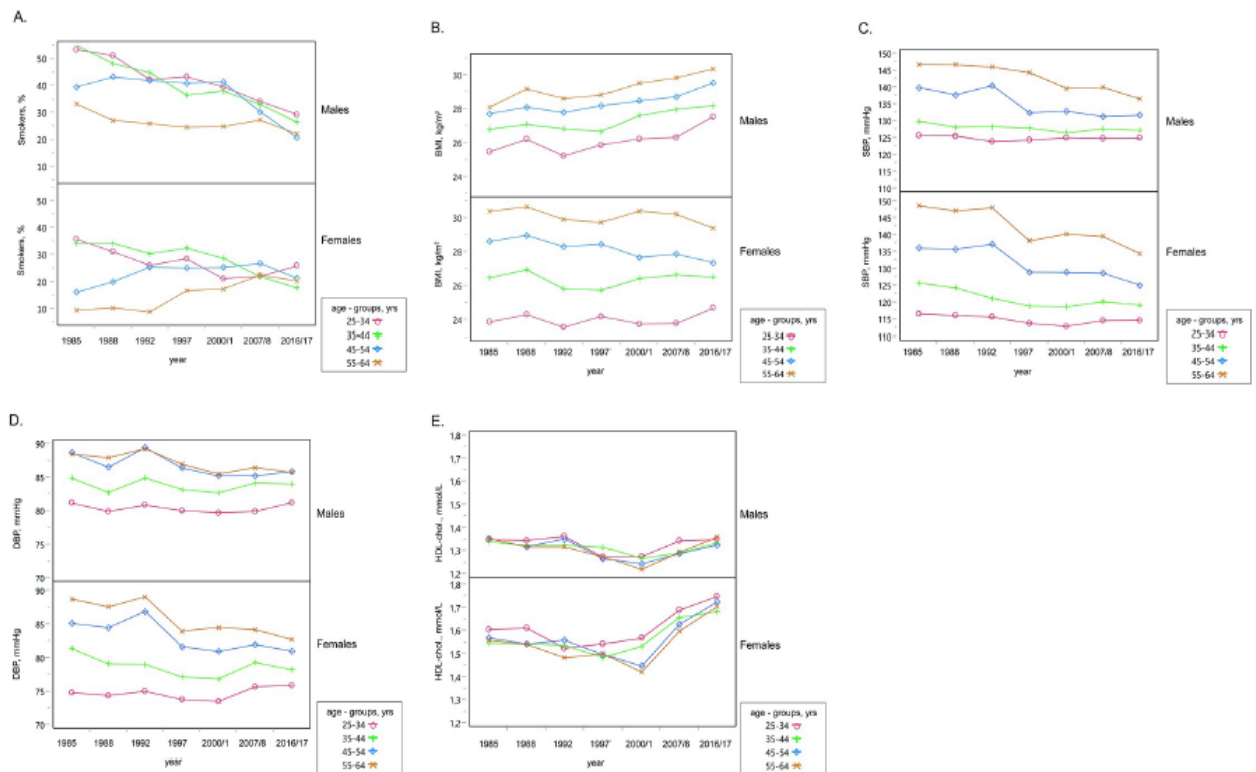
A downward trend in SBP and DBP was observed in both genders with a greater decline in females (males: from  $135.8 \pm 19.2/85.9 \pm 11.0$  to  $131.1 \pm 14.9/84.7 \pm 9.1$  mmHg;  $p < 0.001$ ; females: from  $131.6 \pm 20.9/82.5 \pm 11.3$  to  $124.8 \pm 16.9/80.0 \pm 9.4$  mmHg;  $p < 0.001$ ) (Table 4). In males, significant changes both in SBP and DBP were found only in individuals aged over

**Table 2. Smoking habits between 1985 and 2016/17 in six districts of the Czech Republic.**

	1985	1988	1992	1997/98	2000/01	2007/08	2016/17	<i>p</i> for trend
<b>Males</b>								
Smokers, %								
Total, 25–64 yrs	564 (45.0)	572 (42.2)	450 (39.7)	356 (36.8)	355 (35.5)	336 (30.5)	187 (23.9)	<0.001
25–34 yrs	164 (53.4)	165 (51.2)	104 (42.3)	84 (43.3)	74 (39.6)	71 (34.1)	34 (29.3)	<0.001
35–44 yrs	163 (55.1)	156 (48.3)	157 (44.9)	84 (36.5)	87 (38.0)	83 (33.1)	52 (26.4)	<0.001
45–54 yrs	132 (39.5)	156 (43.2)	130 (41.9)	136 (41.0)	122 (41.4)	70 (30.3)	43 (20.7)	<0.001
55–64 yrs	105 (33.2)	95 (27.1)	59 (25.9)	52 (24.5)	72 (24.8)	112 (27.2)	58 (22.1)	ns
Nr. of cig., %	$17.8 \pm 7.8$	$15.4 \pm 7.4$	$15.8 \pm 7.5$	$16.6 \pm 9.0$	$17.2 \pm 8.5$	$15.2 \pm 8.9$	$14.8 \pm 8.3$	<0.030
<b>Females</b>								
Smokers, %								
Total, 25–64 yrs	315 (23.9)	339 (24.0)	280 (23.2)	264 (25.9)	244 (23.2)	267 (23.3)	187 (20.9)	ns
25–34 yrs	115 (35.7)	106 (31.0)	69 (26.0)	60 (28.4)	45 (21.1)	52 (22.0)	38 (25.9)	<0.001
35–44 yrs	116 (34.1)	126 (34.2)	108 (30.3)	86 (32.3)	79 (28.6)	62 (21.9)	36 (17.7)	<0.001
45–54 yrs	55 (16.0)	72 (20.0)	79 (25.4)	82 (25.2)	72 (25.3)	80 (26.8)	60 (21.3)	ns
55–64 yrs	29 (9.3)	35 (10.3)	24 (8.7)	36 (16.7)	48 (17.3)	73 (22.4)	53 (20.3)	<0.001
Nr. of cig., %	$11.0 \pm 6.3$	$10.2 \pm 5.4$	$10.4 \pm 5.7$	$11.1 \pm 6.1$	$11.4 \pm 6.5$	$9.9 \pm 5.9$	$8.9 \pm 5.3$	ns

Please note the numbers for the survey population may differ slightly from those given in Table 1 as the information about smoking habits was not available for all individuals.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845.t002>



**Fig 1.** A. Smoking habits by age groups and gender between 1985 and 2016/17 in 6 districts of the Czech Republic. B. Body mass index (BMI) by age groups and gender between 1985 and 2016/17 in 6 districts of the Czech Republic. C. Systolic blood pressure (SBP) by age groups and gender between 1985 and 2016/17 in 6 districts of the Czech Republic. D. Diastolic blood pressure (DBP) by age groups and gender between 1985 and 2016/17 in 6 districts of the Czech Republic. E. HDL-cholesterol by age groups and gender between 1985 and 2016/17 in 6 districts of the Czech Republic.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845.g001>

45 years, whereas in females, all the changes were significant except for DBP in the youngest age group. Using three-way ANOVA, the interaction between sex and age groups as well as between sex and the year of examination was found to be significant (Fig 1C and 1D).

Over the period of 30 years, the prevalence of hypertension declined in the entire study population (from 47.1% in 1985 to 41.5% in 2016/17;  $p < 0.001$ ) due to the declining prevalence in females (from 42.5% in 1985 to 33.5% in 2016/17;  $p < 0.001$ ; the decline was significant in all age groups, except for the youngest group). There was no change in the prevalence of hypertension in the overall male population, achieving 50.6% during the last survey. There was, however, a significant decline in the prevalence of hypertension in the two male middle-aged groups (35–44 and 45–54 years) (Table 4).

Awareness of hypertension increased in both genders, remaining higher in females over the entire study period (males: from 41.4% in 1985 to 74.6% in 2016/17;  $p < 0.001$ ; females: from 58.9% in 1985 to 77.7% in 2016/17;  $p < 0.001$ ). Furthermore, the increase in awareness of hypertension was found in both genders in all age groups except for the youngest groups.

The number of individuals treated by antihypertensive drugs increased significantly in both genders, again showing consistently higher rates in females (males: from 21.1 to 60.9%;  $p < 0.001$ ; females: from 38.9 to 64.8%;  $p < 0.001$ ) (Table 4). The proportion of individuals treated by antihypertensive drugs increased significantly in all age groups, with the exception of the youngest groups, in both genders.

Table 3. Anthropometric parameters between 1985 and 2016/17 in six districts of the Czech Republic.

	1985	1988	1992	1997/98	2000/01	2007/08	2016/17	p for trend
<b>Males</b>								
Height, cm	173.8 ± 6.8	174.3 ± 7.0	174.8 ± 7.1	175.6 ± 7.1	175.3 ± 7.0	177.6 ± 7.0	177.7 ± 7.3	<0.001
Body weight, kg	81.7 ± 12.8	84.2 ± 12.8	82.8 ± 12.8	84.8 ± 13.1	86.5 ± 14.6	90.0 ± 15.8	92.1 ± 16.8	<0.001
BMI, kg/m <sup>2</sup>								
Total, 25–64 yrs	27.0 ± 4.0	27.7 ± 3.8	27.1 ± 3.8	27.5 ± 3.8	28.1 ± 4.4	28.5 ± 4.6	29.2 ± 5.1	<0.001
25–34 yrs	25.5 ± 3.4	26.2 ± 3.3	25.2 ± 3.2	25.9 ± 3.2	26.2 ± 4.3	26.3 ± 4.3	27.5 ± 4.9	0.011
35–44 yrs	26.8 ± 3.8	27.1 ± 3.7	26.8 ± 3.6	26.7 ± 3.3	27.6 ± 3.9	28.0 ± 4.5	28.2 ± 4.8	<0.001
45–54 yrs	27.7 ± 3.8	28.1 ± 3.7	27.8 ± 3.6	28.2 ± 3.9	28.5 ± 4.2	28.7 ± 4.4	29.5 ± 5.0	<0.001
55–64 yrs	28.1 ± 4.3	29.2 ± 3.9	28.6 ± 4.1	28.8 ± 3.8	29.5 ± 4.6	29.8 ± 4.6	30.4 ± 5.3	<0.001
BMI ≥ 30, kg/m <sup>2</sup> (%)	246 (19.7)	343 (25.3)	225 (19.9)	244 (25.2)	295 (29.5)	370 (33.6)	297 (37.7)	<0.001
<b>Females</b>								
Height, cm	161.2 ± 6.3	161.5 ± 6.4	162.2 ± 6.4	162.5 ± 6.4	162.7 ± 6.3	164.6 ± 6.4	164.4 ± 6.0	<0.001
Body weight, kg	70.8 ± 13.6	72.1 ± 13.8	70.7 ± 13.9	71.5 ± 14.2	72.1 ± 15.0	74.1 ± 16.2	73.8 ± 16.3	<0.001
BMI, kg/m <sup>2</sup>								
Total, 25–64 yrs	27.3 ± 5.4	27.7 ± 5.4	26.9 ± 5.3	27.1 ± 5.5	27.3 ± 5.7	27.3 ± 5.7	27.3 ± 6.0	ns
25–34 yrs	23.9 ± 4.1	24.3 ± 3.9	23.6 ± 4.0	24.2 ± 4.6	23.8 ± 4.1	23.8 ± 4.8	24.7 ± 5.4	ns
35–44 yrs	26.5 ± 4.7	26.9 ± 4.9	25.8 ± 4.9	25.8 ± 4.9	26.4 ± 5.5	26.6 ± 5.7	26.5 ± 6.0	ns
45–54 yrs	28.6 ± 4.9	29.0 ± 5.0	28.3 ± 5.5	28.4 ± 5.6	27.7 ± 5.1	27.9 ± 5.7	27.4 ± 5.6	0.007
55–64 yrs	30.4 ± 5.4	30.7 ± 5.4	29.9 ± 5.1	29.7 ± 5.0	30.4 ± 5.9	30.2 ± 5.9	29.4 ± 6.2	ns
BMI ≥ 30, kg/m <sup>2</sup> (%)	367 (28.0)	423 (30.0)	308 (25.5)	270 (26.5)	292 (27.8)	344 (28.1)	247 (27.6)	ns

BMI, body mass index

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845.t003>

Overall hypertension control increased significantly over the period of 30 years (from 3.9 to 32.9%;  $p < 0.001$ ), being consistently more effective in females. The improvement in hypertension control was consistent across all the age groups in both genders except for the youngest one in females.

### Trends in lipid parameters

Over the period of 31/32 years, a significant downward trend in total cholesterol was found in both genders (males: from  $6.21 \pm 1.29$  to  $5.30 \pm 1.05$ ;  $p < 0.001$ ; females: from  $6.18 \pm 1.26$  to  $5.31 \pm 1.00$  mmol/L;  $p < 0.001$ ) (Table 5). Over the same period, there was also a small but significant decline in HDL-cholesterol in males (from  $1.35 \pm 0.36$  to  $1.34 \pm 0.36$  mmol/L;  $p < 0.001$ ) and no significant overall change in females (from  $1.57 \pm 0.36$  to  $1.71 \pm 0.43$  mmol/L; ns). Nevertheless, a significant increase in HDL-cholesterol was observed in the two youngest female age groups. All the main effects (sex, age groups, year of examination) were found significant (Fig 1E; three-way ANOVA). There was also a significant decrease in non-HDL-cholesterol (males: from  $4.86 \pm 1.35$  to  $3.96 \pm 1.09$  mmol/L;  $p < 0.001$ ; females:  $4.61 \pm 1.29$  to  $3.60 \pm 1.03$  mmol/L;  $p < 0.001$ ) and in the total to HDL-cholesterol ratio (males: from  $4.94 \pm 1.83$  to  $4.25 \pm 1.55$ ;  $p < 0.001$ ; females: from  $4.14 \pm 1.32$  to  $3.30 \pm 1.12$ ;  $p < 0.001$ ) in both genders (Table 5).

The information on lipid-lowering drugs was only available since the fourth survey (1997/98), indicating a significant increase in their use in both genders (males: from 4.8% in 1997/1998 to 14.6% in 2016/17;  $p < 0.0001$ ; females: from 4.3% in 1997/1998 to 10.0% in 2016/17;  $p < 0.0001$ ). Fibrates were the most frequently used lipid-lowering drugs (accounting for 81.1% of all the lipid-lowering drugs) in 1997/98, while statins have been the most prescribed ones nowadays (78.8%).

**Table 4. Blood pressure (mean ± SD), prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension between 1985 and 2016/17 in six districts of the Czech Republic.**

	1985	1988	1992	1997/98	2000/01	2007/08	2016/17	p for trend
<b>Males</b>								
<b>SBP, mmHg</b>								
Total, 25–64 yrs	135.8 ± 19.2	134.9 ± 19.2	134.2 ± 20.0	132.3 ± 16.9	131.9 ± 16.8	132.5 ± 17.3	131.1 ± 14.9	<0.001
25–34 yrs	125.7 ± 14.6	125.5 ± 13.6	123.9 ± 13.4	124.3 ± 11.4	125.0 ± 15.3	124.8 ± 11.7	124.9 ± 12.6	ns
35–44 yrs	129.9 ± 15.7	128.1 ± 15.5	128.2 ± 15.4	127.9 ± 13.7	126.4 ± 13.9	127.6 ± 13.9	127.1 ± 13.1	ns
45–54 yrs	139.9 ± 18.9	137.7 ± 19.1	140.5 ± 20.1	132.4 ± 15.9	132.8 ± 16.0	131.3 ± 16.6	131.6 ± 14.2	<0.001
55–64 yrs	146.7 ± 19.4	146.7 ± 19.9	146.0 ± 22.8	144.3 ± 19.1	139.7 ± 17.1	139.9 ± 18.7	136.5 ± 15.6	<0.001
<b>DBP, mmHg</b>								
Total, 25–64 yrs	85.9 ± 11.0	84.4 ± 11.0	86.1 ± 11.4	84.5 ± 10.0	83.7 ± 9.7	84.4 ± 10.1	84.7 ± 9.1	<0.001
25–34 yrs	81.1 ± 10.0	79.9 ± 10.3	80.8 ± 9.7	80.0 ± 8.7	79.7 ± 9.7	79.9 ± 8.5	81.2 ± 9.6	ns
35–44 yrs	84.8 ± 9.8	82.7 ± 10.3	84.9 ± 10.1	83.2 ± 9.5	82.7 ± 9.2	84.1 ± 10.4	84.0 ± 8.5	ns
45–54 yrs	88.7 ± 11.2	86.5 ± 11.1	86.4 ± 11.4	86.4 ± 9.6	85.2 ± 9.2	85.2 ± 8.9	85.8 ± 9.2	<0.001
55–64 yrs	88.5 ± 11.2	87.9 ± 10.4	89.3 ± 11.7	87.0 ± 10.8	85.5 ± 9.6	86.5 ± 10.6	85.7 ± 8.9	<0.001
<b>Prevalence of HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	650 (51.9)	639 (47.1)	508 (44.8)	408 (42.1)	457 (45.6)	553 (50.2)	399 (50.6)	ns
25–34 yrs	85 (27.7)	67 (20.8)	46 (18.7)	35 (18.0)	34 (18.2)	43 (20.7)	26 (22.4)	ns
35–44 yrs	123 (41.6)	119 (36.8)	126 (36.0)	61 (26.5)	69 (30.0)	82 (32.7)	66 (33.3)	0.049
45–54 yrs	208 (62.3)	198 (54.9)	186 (60.0)	161 (48.5)	147 (49.8)	122 (52.8)	107 (51.0)	0.009
55–64 yrs	234 (74.1)	255 (72.7)	150 (65.8)	151 (70.9)	207 (71.1)	306 (74.3)	200 (75.8)	ns
<b>Awareness of HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	269 (41.4)	320 (50.1)	232 (45.7)	230 (56.4)	284 (62.1)	378 (68.4)	290 (74.6)	<0.001
<b>Medication for HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	137 (21.1)	197 (30.8)	123 (24.2)	151 (37.0)	191 (41.8)	322 (58.2)	241 (60.9)	<0.001
<b>Control of HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	18 (2.8)	33 (5.2)	14 (2.8)	50 (12.3)	60 (13.1)	135 (24.4)	119 (29.8)	<0.001
<b>Females</b>								
<b>SBP, mmHg</b>								
Total, 25–64 yrs	131.6 ± 20.9	130.7 ± 20.9	130.2 ± 22.0	125.2 ± 18.1	125.9 ± 18.8	126.7 ± 19.2	124.8 ± 16.9	<0.001
25–34 yrs	116.6 ± 13.7	116.0 ± 12.2	115.6 ± 13.3	113.7 ± 9.9	112.9 ± 11.0	114.5 ± 12.2	114.7 ± 12.4	0.004
35–44 yrs	125.8 ± 15.8	124.3 ± 16.0	121.1 ± 16.0	118.9 ± 14.6	118.7 ± 12.7	120.1 ± 15.5	119.2 ± 13.4	<0.001
45–54 yrs	136.0 ± 19.1	135.7 ± 18.4	137.1 ± 21.0	129.0 ± 17.9	128.9 ± 17.8	128.6 ± 17.0	125.1 ± 16.3	<0.001
55–64 yrs	148.6 ± 19.9	147.1 ± 21.7	148.0 ± 21.2	138.2 ± 18.3	140.2 ± 19.1	139.5 ± 20.2	134.4 ± 17.0	<0.001
<b>DBP, mmHg</b>								
Total, 25–64 yrs	82.5 ± 11.3	81.4 ± 11.2	82.5 ± 12.1	79.3 ± 9.8	79.3 ± 9.8	80.6 ± 9.6	80.0 ± 9.4	<0.001
25–34 yrs	74.8 ± 9.2	74.4 ± 8.7	75.0 ± 9.1	73.8 ± 7.7	73.5 ± 7.9	75.7 ± 8.5	75.9 ± 9.3	ns
35–44 yrs	81.4 ± 9.9	79.1 ± 10.1	79.0 ± 10.5	77.1 ± 9.0	76.9 ± 8.8	79.3 ± 8.8	78.2 ± 9.0	<0.001
45–54 yrs	85.1 ± 10.7	84.5 ± 10.5	86.9 ± 11.9	81.7 ± 10.0	80.9 ± 8.8	82.0 ± 9.3	81.0 ± 9.2	<0.001
55–64 yrs	88.7 ± 10.3	87.6 ± 10.6	89.1 ± 11.5	83.9 ± 8.8	84.5 ± 10.0	84.2 ± 9.3	82.6 ± 8.8	<0.001
<b>Prevalence of HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	560 (42.5)	552 (39.1)	460 (38.0)	323 (31.6)	347 (33.0)	426 (37.3)	300 (33.5)	<0.001
25–34 yrs	30 (9.3)	27 (7.9)	22 (8.3)	7 (3.3)	10 (4.7)	16 (6.8)	7 (4.8)	ns
35–44 yrs	98 (28.8)	88 (23.9)	67 (18.8)	41 (15.4)	37 (13.4)	62 (21.9)	26 (12.8)	<0.001
45–54 yrs	186 (54.2)	180 (50.0)	166 (53.4)	134 (41.1)	110 (38.6)	124 (41.5)	111 (39.4)	<0.001
55–64 yrs	246 (78.9)	257 (75.6)	205 (74.3)	141 (65.0)	190 (68.4)	224 (68.7)	156 (59.3)	<0.001
<b>Awareness of HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	330 (58.9)	330 (59.8)	255 (55.4)	221 (68.4)	256 (73.8)	304 (71.4)	233 (77.7)	<0.001
<b>Medication for HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	218 (38.9)	233 (42.2)	159 (34.6)	187 (57.9)	205 (59.1)	251 (58.9)	193 (64.8)	<0.001
<b>Control of HT, %</b>								
Total, 25–64 yrs	29 (5.2)	51 (9.2)	28 (6.1)	70 (21.7)	77 (22.2)	106 (24.9)	111 (37.0)	<0.001

p = statistical significance for linear trend

SBP, systolic blood pressure, DBP, diastolic blood pressure, HT, hypertension

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845.t004>

Table 5. Lipid parameters between 1985 and 2016/17 in six districts of the Czech Republic.

	1985	1988	1992	1997/98	2000/01	2007/08	2016/17	P for trend
<b>Males</b>								
TC, mmol/L								
Total, 25–64 yrs	6.21 ± 1.29	6.29 ± 1.21	5.98 ± 1.30	5.65 ± 1.15	5.88 ± 1.08	5.29 ± 1.10	5.30 ± 1.05	<0.001
25–34 yrs	5.71 ± 1.33	5.87 ± 1.14	5.31 ± 1.03	5.15 ± 1.10	5.26 ± 1.00	4.88 ± 0.90	4.84 ± 0.81	<0.001
35–44 yrs	6.34 ± 1.34	6.20 ± 1.11	6.03 ± 1.17	5.70 ± 1.11	5.85 ± 1.08	5.38 ± 1.03	5.39 ± 0.98	<0.001
45–54 yrs	6.39 ± 1.18	6.60 ± 1.30	6.34 ± 1.38	5.77 ± 1.10	6.13 ± 1.06	5.43 ± 1.15	5.50 ± 1.22	<0.001
55–64 yrs	6.37 ± 1.17	6.42 ± 1.15	6.15 ± 1.37	5.86 ± 1.15	6.06 ± 1.01	5.37 ± 1.16	5.29 ± 1.00	<0.001
HDL-C, mmol/L								
Total, 25–64 yrs	1.35 ± 0.36	1.33 ± 0.32	1.34 ± 0.49	1.28 ± 0.32	1.25 ± 0.33	1.30 ± 0.34	1.34 ± 0.36	<0.001
25–34 yrs	1.35 ± 0.31	1.34 ± 0.31	1.36 ± 0.37	1.27 ± 0.29	1.27 ± 0.35	1.34 ± 0.34	1.35 ± 0.34	ns
35–44 yrs	1.34 ± 0.35	1.32 ± 0.32	1.32 ± 0.37	1.32 ± 0.32	1.27 ± 0.35	1.29 ± 0.33	1.34 ± 0.35	ns
45–54 yrs	1.35 ± 0.38	1.32 ± 0.30	1.35 ± 0.62	1.27 ± 0.32	1.24 ± 0.33	1.29 ± 0.32	1.33 ± 0.38	0.014
55–64 yrs	1.35 ± 0.38	1.32 ± 0.33	1.32 ± 0.56	1.28 ± 0.33	1.22 ± 0.31	1.29 ± 0.36	1.36 ± 0.37	0.006
Non HDL-C, mmol/L	4.86 ± 1.35	4.96 ± 1.26	4.65 ± 1.33	4.36 ± 1.16	4.63 ± 1.11	3.97 ± 1.10	3.96 ± 1.09	<0.001
TC/HDL-C	4.94 ± 1.83	5.01 ± 1.65	4.83 ± 1.66	4.66 ± 1.46	5.01 ± 1.53	4.32 ± 1.39	4.25 ± 1.55	<0.001
Dyslipidemia*, % (N/T)*	87.5 (1,093/1,249)	89.3 (1,208/1,352)	83.5 (945/1,132)	77.6 (751/968)	85.0 (853/1,003)	73.8 (804/1,089)	74.8 (589/787)	<0.001
<b>Females</b>								
TC, mmol/L								
Total, 25–64 yrs	6.18 ± 1.26	6.22 ± 1.21	5.95 ± 1.29	5.53 ± 1.21	5.82 ± 1.13	5.30 ± 1.06	5.31 ± 1.00	<0.001
25–34 yrs	5.46 ± 1.13	5.58 ± 1.01	5.15 ± 0.92	4.76 ± 0.83	5.01 ± 0.88	4.68 ± 0.86	4.73 ± 0.86	<0.001
35–44 yrs	5.93 ± 1.06	5.94 ± 1.05	5.55 ± 1.08	5.23 ± 1.04	5.53 ± 0.93	5.02 ± 0.91	4.94 ± 0.82	<0.001
45–54 yrs	6.53 ± 1.18	6.48 ± 1.15	6.26 ± 1.17	5.73 ± 1.13	6.00 ± 1.00	5.55 ± 1.05	5.48 ± 0.95	<0.001
55–64 yrs	6.78 ± 1.22	6.89 ± 1.22	6.87 ± 1.26	6.36 ± 1.23	6.51 ± 1.14	5.77 ± 1.05	5.73 ± 1.00	<0.001
HDL-C, mmol/L								
Total, 25–64 yrs	1.57 ± 0.36	1.56 ± 0.34	1.53 ± 0.46	1.50 ± 0.36	1.49 ± 0.38	1.64 ± 0.38	1.71 ± 0.43	ns
25–34 yrs	1.60 ± 0.35	1.61 ± 0.34	1.52 ± 0.39	1.54 ± 0.35	1.57 ± 0.38	1.69 ± 0.35	1.75 ± 0.39	<0.05
35–44 yrs	1.55 ± 0.34	1.54 ± 0.33	1.54 ± 0.38	1.49 ± 0.36	1.53 ± 0.39	1.66 ± 0.40	1.68 ± 0.41	0.006
45–54 yrs	1.57 ± 0.36	1.54 ± 0.32	1.56 ± 0.64	1.50 ± 0.36	1.45 ± 0.37	1.63 ± 0.42	1.72 ± 0.45	ns
55–64 yrs	1.56 ± 0.39	1.54 ± 0.36	1.48 ± 0.35	1.50 ± 0.38	1.43 ± 0.38	1.60 ± 0.36	1.70 ± 0.46	ns
Non HDL-C, mmol/L	4.61 ± 1.29	4.66 ± 1.25	4.44 ± 1.32	4.03 ± 1.24	4.33 ± 1.18	3.65 ± 1.12	3.60 ± 1.03	<0.001
TC/HDL-C	4.14 ± 1.32	4.18 ± 1.27	4.16 ± 1.39	3.89 ± 1.30	4.17 ± 1.38	3.42 ± 1.15	3.30 ± 1.12	<0.001
Dyslipidemia*, % (N/T)	87.7 (1,152/1,314)	88.0 (1,239/1,408)	80.6 (974/1,209)	70.4 (718/1,020)	80.1 (843/1,052)	66.0 (737/1,117)	69.9 (626/895)	<0.001

TC, total cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol; N/T, number of individuals with dyslipidemia over the survey population

Dyslipidemia was defined as total cholesterol  $\geq 5$  mmol/L ( $\sim 190$  mg/dL) or HDL-cholesterol  $< 1$  mmol/L ( $\sim 40$  mg/dL) in men and  $< 1.2$  mmol/L ( $\sim 45$  mg/dL) in women or use of lipid-lowering drugs.

Please note the numbers for the survey population may differ slightly from those given in Table 1 as lipid analysis was not available for all individuals.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845.t005>

Overall, the prevalence of dyslipidemia (for definition, see [Methods](#)) was very high in both genders throughout the entire 30-year survey period with a significant decrease in both genders (males: from 87.5 to 74.8%;  $p < 0.001$ ; females: from 87.7 to 69.9%;  $p < 0.001$ ).

## Discussion

This has been the first study monitoring the trends in major CV risk factors in a representative sample of the Czech population over a period of more than 30 years, using standardized

methods originally developed by the WHO MONICA Project [13]. Similar longitudinal population data have been—to our knowledge—available only in Sweden [14], Lithuania [16] and Finland [15]. Continuous favorable changes in smoking habits in males, an overall significant decrease in BP and total cholesterol values, as well as a rise in the awareness, treatment and control of hypertension in both genders were found. However, within the same period, there was no change in smoking habits in females, whereas obesity increased significantly in males.

### Response rates

There was a significant downward linear trend in the response rates in both sexes with a sharp decline between the last two surveys. The overall response rate varied from 43.1 to 88.4%. The response rate in our last survey was 43.1% in males and 48.6% in females which may seem to be low, yet similar to other more recent or ongoing epidemiological studies in various parts of the world [17,18]. However, a possible selection bias due to the increased participation of healthier and more health-conscious individuals in the later surveys could not have been eliminated.

### Trends in cigarette smoking

The Czech MONICA and post-MONICA studies showed a decline in smoking prevalence only in males (from 45% in 1985 to 23.9% in 2016/17), and no change in females (varying from 20.9–25.9%). The latest, still very high smoking rates have substantially contributed to the continuously high cardiovascular morbidity and mortality in the Czech Republic. On the other hand, the US National Health Interview Survey reported only 15.5% of adults as current smokers (17.5% in males and 13.5% in females) in 2016. [19]. Worldwide in 2015, the age-standardized prevalence of daily smoking was 25.0% in men and 5.4% in women, representing 28.4% and 34.4% reductions, respectively, since 1990 [20]. Overall, 41.2% of CVDs were attributable to smoking in 2015.

In Europe, since the 1980s, the prevalence of smoking in men has decreased in almost all European countries with available data, except for Latvia and Russia where the rates have risen to more than 50%. Within the same period, the prevalence of smoking in women has also decreased in most European countries but less than in males. The most recently available statistics on smoking in Europe reported higher overall prevalence in adult men (27.1%) than in adult women (18.5%) [2]. The prevalence of smoking in men was the highest in Eastern Europe and in the former Soviet Union countries. Contrarily, the smoking rates in women were very low in most former Soviet Union countries, except the Russian Federation (16.3%), however, Central and Eastern European countries displayed the rates comparable to Northern, Western, and Southern Europe, mostly around 20%.

### Trends in anthropometric parameters

A significant increase in body height and weight was observed in both genders of the representative Czech population sample over the entire study period. However, the weight gain was more pronounced in men (+10.4 vs +3.0 kg), consequently increasing their body mass index (BMI) (from  $27.0 \pm 4.0$  kg/m<sup>2</sup> in 1985 to  $29.2 \pm 5.1$  kg/m<sup>2</sup> in 2016/17;  $p < 0.001$ ). Over the past century, adult height has changed variably across countries, experiencing a steady gain in most of them [21]. Changes in the population mean height did not correlate with the changes in mean BMI in men and a weak inverse correlation was found for women [22]. Consistent with the NCD Risk factor Collaboration analysis [21], the Czech men were ~12–13 cm taller than the Czech women; this difference remained constant over the period of 31/32 years.

There are several measures of body fatness available, however, most robust data refer to BMI. This index is used to define body weight categories [23]. Increased BMI is generally caused by long-term energy imbalance between calories consumed and calories expended. Over the past 50 years, obesity prevalence has increased worldwide, achieving pandemic dimensions [24]. Changes in the global food system together with an increased sedentary lifestyle seem to be the main driving forces of the obesity pandemic, with overnutrition becoming a greater health threat than undernutrition.

Czech consumption data have continuously shown a significant decrease in the consumption of meat (substantially reducing beef consumption and increasing consumption of poultry), sausage, eggs, and milk and dairy products since 1989. Animal dietary fats have been largely replaced by vegetable fat and oils. There has been also a significant increase in fresh fruit and vegetable consumption [25]. The food consumption data were supported by three studies based on the household budget survey conducted in 1991, 1994 and 1997, confirming positive changes in eating patterns [26].

Paradoxically, despite the favorable changes in food consumption and eating patterns in the Czech population after 1989, there was no change in BMI in women, and even a significant increase occurred in men (from  $27.0 \pm 4.0 \text{ kg/m}^2$  in 1985 to  $29.2 \pm 5.1 \text{ kg/m}^2$  in 2016/17;  $p < 0.001$ ) across all the age groups. Consequently, there was an immense increase in obesity in Czech males with its prevalence almost doubled (from 19.7% in 1985 to 37.7% in 2016/17;  $p < 0.001$ ). The proportion of overweight males also increased significantly, whereas in women the proportion of obese and overweight individuals remained more or less stable, nevertheless, high over the entire period (the overall prevalence of obesity in women ranging from 25.5 to 30.0%). The increase in obesity in the Czech males may have been partly attributed to quitting smoking, a pattern observed in many countries [27].

The NCD Risk Factor Collaboration investigators detected substantial regional differences in BMI changes over time, with a faster increase observed in South and Southeast Asia, the Caribbean and Southern America [22]. Similarly, there were substantial regional differences observed in the prevalence of obesity, varying from 3.7% in Japan to 38.2% in the USA [28].

A systematic review of representative studies published from 1990 to 2008, reporting obesity prevalence in Europe, had already identified the Czech Republic as one of the countries with the highest prevalence of obesity (i.e. >25%) [29].

Mean BMI increased in all European countries in men and almost in all of the women except for Belarus, Belgium, Bulgaria, Croatia, Czech Republic and Estonia [7]. The prevalence of obesity was higher in individuals with lower education, and with low physical activity. Overweight and obesity were more prevalent in males in the majority of European countries, including the Czech Republic.

### Trends in blood pressure, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension

A significant documented decline in the population mean SBP and DBP over a period of 31/32 years definitely contributed to a substantial decrease in CHD and stroke mortality in the Czech population. All BP changes were more pronounced in females and in age groups of 45–64 years. The population mean BP is generally affected by lifestyle changes and drug treatment of hypertension. As drug treatment of hypertension increased particularly in individuals over 45 years, it is likely that the BP changes in the age group 45–64 years were more closely related to drug treatment while the younger individuals were possibly more susceptible to lifestyle changes. In the Czech Republic, similarly to other high-income countries, the decline in BP was observed despite the increase in BMI, an otherwise established risk factor for hypertension

[22]. Other dietary factors related to lower BP include a higher intake of dietary fiber and potassium as well as a decrease in the consumption of saturated fats [30]. The Czech consumption data have documented a daily increase in the consumption of fruit and vegetables by ~30–35% since 1985 [25], which is—together with a reduced consumption of meat and sausages—an indirect evidence of reduced salt intake. On the other hand, these favorable BP changes might have been slowed down by the elevated alcohol consumption, with the Czech Republic belonging to the top three countries in the consumption of alcohol in Europe, and insufficient physical activity, reported by 28% of Czech males and 35% of Czech females in 2016 [1].

The overall prevalence of hypertension decreased only in females but not in males; a detailed analysis by age groups showed a significant decline in males in the age group 35–44 years and 45–54 years even though their BMI increased significantly. Nevertheless, the prevalence of hypertension in both genders remained very high. Our prevalence rates were in agreement with the findings of NCD Risk Factor Collaboration [31] and with the systematic analysis of population-based studies from 90 countries [32], indicating a persistently high prevalence of hypertension in Central and Eastern Europe.

Awareness, treatment, and control of hypertension improved significantly in both genders over a period of more than 30 years. As to the awareness and treatment of hypertension, our rates were slightly better than the overall data for high-income countries in 2010 [32], and much better than the USA data for the white population in 2011–2016 [19]. Thus the major problem in our population seems to be ineffective treatment of hypertension, resulting in poor control of hypertension (29.8% in men and 37.0% in women) despite the rise in combination therapy.

### Trends in lipid parameters

A significant decrease in total and non-HDL cholesterol together with the decrease of prevalence of dyslipidemia has been observed in a representative sample of the Czech population since 1985. The IMPACT model attributed the largest reduction in CHD death (39.5%) in the Czech Republic to the reduction in total cholesterol [9] which was predominantly induced by favorable dietary changes. The use of lipid-lowering drugs in the Czech general population was still rather low (14.6% in males and 10.0% in females) and did contribute to an improvement in lipid profile mostly in patients with manifest cardiovascular disease.

The decline in total cholesterol in most Western countries was the net effect of an increase in HDL-cholesterol and a decline in non-HDL-cholesterol [33]. Contrarily, our 30-year data showed just a small increase in HDL-cholesterol in younger females (aged 25–44 years) and even a small decrease in HDL-cholesterol in males. This may be due to the fact that healthy lifestyle, including recommended physical activity and refraining from smoking, has been mostly adopted by the younger female population.

### Strengths and limitations

All seven cross-sectional surveys were conducted in the same six districts of the Czech Republic, consistently respecting the seasonal variation. The methods used were standardized, originally developed by the WHO MONICA Project [13]. All lipid parameters were analyzed in the same lipid laboratory, formerly serving as the WHO reference laboratory for the MONICA Project. The blood pressure measurement technique did not change throughout the entire period, using a gold standard mercury sphygmomanometer. Moreover, the study period covered the transition from the totalitarian regime to democracy in the Czech Republic, associated with substantial socio-economic changes and their consequent impact.

A potential study limitation is the decline in the response rate which may have resulted in a population sample with different social characteristics, such as a higher level of education,



usually associated with a higher degree of health consciousness, thus making the results more favorable compared with the total general population. Nevertheless, most recent epidemiological studies worldwide have reported a response rate below 40%.

## Conclusions

There was a significant improvement in most major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2016/17. This period covered the transition from the totalitarian regime to democracy associated with socio-economic changes. Decreases in total cholesterol, the population mean BP and smoking rates in males most likely contributed to the significant decrease in cardiovascular mortality. On the other hand, there was no change in smoking habits in females, moreover, obesity increased substantially in males.

Our results, obtained from a representative population sample, have provided a valuable source of information about the population health, allowing for extrapolation to the entire Czech population. The analysis of longitudinal trends in CVD risk factors should help to analyze the trends in cardiovascular morbidity and mortality, which is of utmost importance for health care planning, particularly now, when there are data using the IMPACT model to explain the decline of CHD mortality in the Czech Republic providing evidence that more than 50% of the fall in CHD mortality have been attributable to the reduction in major CV risk factors [9].

## Supporting information

**S1 Data.**  
(PDF)

**S1 File.**  
(ZIP)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová, Věra Lánská.

**Data curation:** Renata Cífková, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová, Petr Stávek, Věra Lánská.

**Formal analysis:** Renata Cífková, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Jan Pudil, Aleš Linhart, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová, Rudolf Poledne, Petr Stávek, Věra Lánská.

**Funding acquisition:** Renata Cífková, Jiří Widimský, Jr.

**Investigation:** Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Pavel Šulc, Lenka Eremiášová, Jan Pudil, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr.

**Methodology:** Renata Cífková, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Aleš Linhart, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová, Petr Stávek, Věra Lánská.

**Project administration:** Renata Cífková, Jiří Widimský, Jr, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová.

**Resources:** Renata Cífková.

**Software:** Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Aleš Linhart, Otto Mayer, Jr, Věra Lánská.

**Supervision:** Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Pavel Šulc, Marie Jozífová, Lenka Eremiášová, Aleš Linhart, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr.

**Validation:** Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Pavel Šulc, Marie Jozífová, Lenka Eremiášová, Jiří Widimský, Jr, Otto Mayer, Jr, Rudolf Poledne, Petr Stávek, Věra Lánská.

**Writing – original draft:** Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Pavel Šulc, Marie Jozífová, Lenka Eremiášová, Jan Pudil, Aleš Linhart, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová, Rudolf Poledne, Petr Stávek, Věra Lánská.

**Writing – review & editing:** Renata Cífková, Jan Bruthans, Peter Wohlfahrt, Alena Krajčoviechová, Pavel Šulc, Marie Jozífová, Lenka Eremiášová, Jan Pudil, Aleš Linhart, Jiří Widimský, Jr, Jan Filipovský, Otto Mayer, Jr, Zdenka Škodová, Rudolf Poledne, Petr Stávek, Věra Lánská.

## References

1. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, et al European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J.* 2020; 41(1): 12–85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859> PMID: 31820000
2. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J.* 1997; 18(12): 1231–48. PMID: 9508543
3. Müller-Nordhorn J, Rosnagel K, Mey W, Willich SN. Regional variation and time trends in mortality from ischaemic heart disease: East and West Germany 10 years after reunification. *J Epidemiol Community Health.* 2004; 58(6): 481–485. <https://doi.org/10.1136/jech.2003.013367> PMID: 15143116
4. Helis E, Augustincic L, Steiner S, Chen L, Turton P, Fodor JG. Time trends in cardiovascular and all-cause mortality in the 'old' and 'new' European Union countries. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011; 18(3):347–59. <https://doi.org/10.1177/1741826710389361> PMID: 21450659
5. Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkil MB, Maruthappu M, Shalhoub J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation.* 2016; 133(20):1916–26. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018931> PMID: 27006480
6. Mensah GA, Goff DC, Gibbons GH. Cardiovascular mortality differences—place matters. *JAMA.* 2017; 317(19): 1955–1957. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.4168> PMID: 28510660
7. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels, 2017.
8. Czech Health Statistics Yearbook 2017. Prague: Health Information and Statistics Institute of the Czech Republic; 2018.
9. Bruthans J, Cífková R, Lánská V, O'Flaherty M, Critchley JA, Holub J, et al. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in the Czech Republic between 1985 and 2007. *Eur J Prev Cardiol.* 2014; 21(7):829–39. <https://doi.org/10.1177/2047487312469476> PMID: 23180867
10. Cífková R, Skodová Z, Bruthans J, Adámková V, Jozífová M, Galovcová M, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. *Czech MONICA and Czech post-MONICA. Atherosclerosis.* 2010; 211(2): 676–81. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.007> PMID: 20471016
11. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P for the WHO MONICA (MONItoring trends and determinants in Cardiovascular disease) Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. *Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. Lancet.* 1999; 353(9164):1547–57. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)04021-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)04021-0) PMID: 10334252
12. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cífková R, et al. European Society of Cardiology (ESC); European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (EACPR); Council on Cardiovascular Nursing; European Association for Study of Diabetes (EASD); International Diabetes Federation Europe (IDF-Europe); European Stroke Initiative (EUSI); Society of Behavioural Medicine (ISBM); European Society of Hypertension (ESH); WONCA Europe (European Society of General

- Practice/Family Medicine); European Heart Network (EHN); European Atherosclerosis Society (EAS). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007; 14(Suppl 2):S1–113.
13. Tolonen H, Dobson A, Kulathinal S. Assessing the quality of risk factor survey data: lessons from the WHO MONICA Project. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006 Feb; 13(1):104–14. <https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000185974.36641.65> PMID: 16449873
  14. Zhong Y, Rosengren A, Fu M, Welin L, Welin C, Caidahl K, et al. Secular changes in cardiovascular risk factors in Swedish 50-year-old men over a 50-year period: The study of men born in 1913, 1923, 1933, 1943, 1953 and 1963. *Eur J Prev Cardiol*. 2017; 24(6):612–620. <https://doi.org/10.1177/2047487316676905> PMID: 27794107
  15. Borodulin K, Vartiainen E, Peltonen M, Jousilahti P, Juolevi A, Laatikainen T, et al. Forty-year trends in cardiovascular risk factors in Finland. *Eur J Public Health*. 2015; 25(3): 539–46. <https://doi.org/10.1093/eurpub/cku174> PMID: 25422363
  16. Tamosiunas A, Klumbiene J, Petkeviciene J, Radisauskas R, Vikhireva O, Luksiene D, et al. Trends in major risk factors and mortality from main non-communicable diseases in Lithuania, 1985–2013. *BMC Public Health*. 2016; 16: 717. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3387-0> PMID: 27492379
  17. Leenen FH, Dumais J, McInnis NH, Turton P, Stratyckuk L, Nemeth K, et al. Results of the Ontario survey on the prevalence and control of hypertension. *CMAJ*. 2008; 178(11): 1441–9. <https://doi.org/10.1503/cmaj.071340> PMID: 18490640
  18. Vollenweider P. Setting up the CoLaus study. *BMC Proceedings* 2013; 7(suppl. 5):O6.
  19. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019; 139(10): e56–e528. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659> PMID: 30700139
  20. GBD 2015 Tobacco Collaborators. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990–2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2017; 389(10082):1885–1906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30819-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30819-X) PMID: 28390697
  21. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). A century of trends in adult human height. *eLife*. 2016 Jul 26; 5. pii: e13410. <https://doi.org/10.7554/eLife.13410> PMID: 27458798
  22. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. 2016; 387(10026): 1377–1396. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X) PMID: 27115820
  23. Poirier P, Alpert MA, Fleisher LA, Thompson PD, Sugerman HJ, Burke LE, et al. American Heart Association Obesity Committee of Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardio-pulmonary Perioperative and Critical Care, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Nursing, and Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. Cardiovascular evaluation and management of severely obese patients undergoing surgery: a science advisory from the American Heart Association. 2009; 120(1): 86–95. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192575> PMID: 19528335
  24. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15(5): 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8> PMID: 30814686
  25. Food consumption data released by the Czech Statistical Office at: <http://www.czso.cz; table 03.02: Food consumption and non-alcoholic beverages in 1989–2018>. [https://www.czso.cz/documents/10180/91917746/32018119\\_0302.pdf/356ce8ab-1ede-4e5a-98c4-090ab2c8a542?version=1.1](https://www.czso.cz/documents/10180/91917746/32018119_0302.pdf/356ce8ab-1ede-4e5a-98c4-090ab2c8a542?version=1.1).
  26. Dofkova M, Kopriva V, Resova D, Rehurkova I, Ruprich J. The development of food consumption in the Czech Republic after 1989. *Public Health Nutr*. 2001; 4(5): 999–1003. <https://doi.org/10.1079/phn2001169> PMID: 11784413
  27. Williamson DF, Madans J, Anda RF, Kleinman JC, Giovino GA, Byers T. Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort. *N Engl J Med*. 1991; 324(11): 739–45. <https://doi.org/10.1056/NEJM199103143241106> PMID: 1997840
  28. Organisation for Economic Co-operation and Development. Obesity update 2017. OECD <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf> (2017).
  29. Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health BMC Public Health*. 2008; 8: 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-8-200> PMID: 18533989

30. Ascherio A, Hennekens C, Willett WC, Sacks F, Rosner B, Manson J, et al. Prospective study of nutritional factors, blood pressure, and hypertension among US women. *Hypertension*. 1996; 27(5): 1065–72. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.27.5.1065> PMID: 8621198
31. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet*. 2017; 389(10064): 37–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5) PMID: 27863813
32. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global disparities of hypertension prevalence and control: A systematic analysis of population-based studies from 90 countries. *Circulation*. 2016; 134(6): 441–50. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912> PMID: 27502908
33. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). National trends in total cholesterol obscure heterogeneous changes in HDL and non-HDL cholesterol and total-to-HDL cholesterol ratio: a pooled analysis of 458 population-based studies in Asian and Western countries. *Int J Epidemiol*. 2020; 49(1): 173–192. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz099>

# Prevalence hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění v české populaci v letech 2015–2018. Studie Czech post-MONICA

(The prevalence of major cardiovascular risk factors in the Czech population in 2015–2018. The Czech post-MONICA study)

Renata Cífková<sup>a,b</sup>, Jan Bruthans<sup>a</sup>, Peter Wohlfahrt<sup>a</sup>, Alena Krajčoviechová<sup>a</sup>, Pavel Šulc<sup>a</sup>, Lenka Eremiášová<sup>b</sup>, Jan Pudil<sup>b</sup>, Aleš Linhart<sup>b</sup>, Jiří Widimský Jr.<sup>c</sup>, Jan Filipovský<sup>d</sup>, Otto Mayer Jr.<sup>d</sup>, Věra Lánská<sup>e</sup>, Rudolf Poledněf, Petr Stávek<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Centrum kardiovaskulární prevence, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Thomayerova nemocnice s poliklinikou, Praha

<sup>b</sup> II. interní klinika kardiologie a angiologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

<sup>c</sup> III. interní klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

<sup>d</sup> II. interní klinika, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Plzeň

<sup>e</sup> Oddělení lékařské statistiky, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

<sup>f</sup> Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

## INFORMACE O ČLÁNKU

Historie článku:

Vložen do systému: 4. 2. 2020

Přijato: 4. 2. 2020

Dostupný online: 6. 2. 2020

Klíčová slova:

BMI

Celkový cholesterol

Hypertenze

Kardiovaskulární onemocnění

Kouření

Krevní tlak

Náhodně vybraný populační vzorek

## SOUHRN

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou hlavní příčinou úmrtí v České republice. Pokles úmrtnosti na KVO, který je u nás pozorován od roku 1985, může být způsoben poklesem incidence nebo letality. Letalita onemocnění souvisí především s úrovní léčebné péče, zatímco incidence KVO je ovlivněna rizikovým profilem obyvatelstva. Cílem této práce bylo zjistit prevalenci základních rizikových faktorů u reprezentativního vzorku české populace.

**Metodika:** Byl proveden 1% náhodný výběr vzorku populace devíti okresů České republiky ve věku 25–64 let. Vyšetření sestávalo z vyplnění standardního dotazníku, získání základních antropometrických údajů, opakovaného měření krevního tlaku a odběru krve.

**Výsledky:** V období 2015–2018 bylo vyšetřeno celkem 2 621 osob (1 250 mužů, průměrný věk 48,3 ± 10,9 roku a 1 371 žen, průměrný věk 47,7 ± 11,0 roku;  $p < 0,001$ ); response 44,8 %. Průměrná hodnota indexu tělesné hmotnosti (BMI) u námi vyšetřené populace činila 29,1 ± 4,8 kg/m<sup>2</sup> u mužů a 27,15 ± 6,1 kg/m<sup>2</sup> u žen ( $p < 0,001$ ). Obezita byla zjištěna u 37,3 % mužů a 28,2 % žen. Mezi vyšetřenými muži 24,8 % uvedlo, že jsou pravidelnými kuřáky, zatímco kouření u žen bylo zjištěno u 21,6 % ( $p < 0,001$ ). Nalezli jsme vysokou prevalenci hypertenze (48,6 % u mužů a 32,4 % u žen;  $p < 0,001$ ); 74,3 % hypertoniků ví o svém onemocnění, 61,5 % je medikamentózně léčeno a pouze 33,9 % dosahuje cílových hodnot krevního tlaku < 140/90 mm Hg. Průměrná hodnota celkového cholesterolu u námi vyšetřené populace byla téměř identická pro muže i ženy (muži 5,26 ± 1,03 mmol/l; ženy 5,28 ± 1,00 mmol/l). Hypolipidemiky bylo léčeno 13,9 % mužů a 10,2 % žen ( $p < 0,001$ ). Diabetes byl zjištěn u 8,2 % mužů a 4,6 % žen ( $p < 0,001$ ). Prevalence všech základních rizikových faktorů výrazně narůstala s věkem u obou pohlaví ( $p$  pro trend < 0,001).

**Závěr:** U reprezentativního náhodně vybraného vzorku české populace středního věku byla nalezena vysoká prevalence základních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění, které jsou příčinou stále vysoké mortality z kardiovaskulárních příčin v České republice.

© 2020, ČKS.

**Adresa pro korespondenci:** Prof. MUDr. Renata Cífková, CSc., Centrum kardiovaskulární prevence, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Thomayerova nemocnice s poliklinikou, Vídeňská 800, 140 59 Praha 4, e-mail: renata.cifkova@ftn.cz

DOI: 10.33678/cor.2020.010

Tento článek prosím citejte takto: Cífková R, Bruthans J, Wohlfahrt P, et al. Prevalence hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění v české populaci v letech 2015–2018. Studie Czech post-MONICA. Cor Vasa 2020;62:6–15.

## ABSTRACT

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of death in the Czech Republic. The decline in CVD mortality observed in our country since 1985 may be due to a decrease in its incidence or case fatality. Case fatality is mostly related to the standard of health care whereas the incidence of CVD is associated with the risk profile of the population. The aim of this study was to determine the prevalence of major CVD risk factors in a representative Czech population sample.

**Methods:** A 1% population sample aged 25–64 years was randomly selected from nine districts of the Czech Republic. The examination consisted of completing a standard questionnaire, obtaining major anthropometric data, repeated blood pressure measurements, and blood sampling.

**Results:** A total of 2621 individuals (1250 males, mean age  $48.3 \pm 10.9$  years, and 1371 females, mean age  $47.7 \pm 11.00$  years;  $p < 0.001$ ) were screened in 2015–2018 (response rate, 44.8%). Mean BMI in our population was  $29.1 \pm 4.8$  kg/m<sup>2</sup> in males and  $27.5 \pm 6.1$  kg/m<sup>2</sup> in females ( $p < 0.001$ ). Obesity was found in 37.3% of males and 28.2% of females. Among the males, 24.8% reported to be regular smokers whereas smoking was found in 21.6% females ( $p < 0.001$ ). There was a high prevalence of hypertension (48.6% of males and 32.4% of females;  $p < 0.001$ ); 74.3% of hypertensives were aware of their disease, 61.5% were drug treated, however, only 33.9% were controlled (blood pressure  $< 140/90$  mmHg). The mean total cholesterol in our population was almost identical in males and females ( $5.26 \pm 1.03$  mmol/L and  $5.28 \pm 1.00$  mmol/L, respectively). Lipid-lowering drugs were used by 13.9% of males and 10.2% of females ( $p < 0.001$ ). Diabetes was found in 8.2% of males and 4.6% of females ( $p < 0.001$ ). The prevalence of all major risk factors increased significantly with age in both sexes ( $p$  for trend  $< 0.001$ ).

**Conclusion:** A high prevalence of major cardiovascular risk factors was found in a representative Czech population sample, which is the cause of continuing high cardiovascular mortality in the Czech Republic.

**Keywords:**

Blood pressure

BMI

Cardiovascular disease

Hypertension

Population random sample

Smoking

Total cholesterol

**Úvod**

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou hlavní příčinou úmrtí v České republice a podle zatím posledních statistických údajů, které jsou k dispozici za rok 2017, byla KVO zodpovědná za 44,3 % všech úmrtí.<sup>1</sup> Podle údajů Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) a Evropské kardiologické společnosti patří Česká republika mezi státy vykazující vysokou úmrtnost na KVO.

Mortalita na kardiovaskulární onemocnění klesá ve většině evropských zemí, výraznější pokles je patrný v zemích severní, západní a jižní Evropy v porovnání se zeměmi střední a východní Evropy.<sup>2</sup>

V České republice pozvolna klesala úmrtnost na KVO od poloviny 80. let. Výrazný pokles nastal po roce 1990 a trvá dosud. V roce 2017 standardizovaná úmrtnost na KVO u nás dosahovala 334,2 u mužů a 218,1 u žen na 100 000 obyvatel, což je v porovnání s ostatním zeměmi EU stále vysoká hodnota.<sup>1,2</sup>

Pokles úmrtnosti na KVO může být obecně způsoben poklesem incidence nebo letality (case-fatality). Letalita onemocnění souvisí především s úrovní léčebné péče, zatímco incidence KVO je ovlivněna rizikovým profilem obyvatelstva. Nejasností v příčinách snižování úmrtnosti na KVO byly podnětem pro realizaci mezinárodního projektu MONICA (MONItoring of trends and determinants in CARDiovascular disease) koordinovaného Světovou zdravotnickou organizací.<sup>3</sup> K ověření těchto hypotéz byla v rámci projektu získána rozsáhlá databáze ve 37 centrech 26 zemí obsahující podrobné údaje o úmrtnosti, incidenci a léčbě akutních koronárních příhod a o prevalenci rizikových faktorů KVO v období deseti let.<sup>4</sup>

Studie INTERHEART<sup>5</sup> zkoumala vliv potenciálně modifikovatelných rizikových faktorů na riziko infarktu myokardu v 52 zemích. Kouření, zvýšený poměr apolipoproteinu B (ApoB)/ApoA1, hypertenze, diabetes, abdominální obezita, psychosociální faktory, denní konzumace ovoce

a zeleniny, pravidelná konzumace alkoholu a pravidelná fyzická aktivita byly ve významném vztahu k rozvoji infarktu myokardu. Těchto devět rizikových faktorů bylo zodpovědné za 90 % rizika rozvoje infarktu myokardu u mužů a 94 % u žen.

Studie MONICA probíhala i v České republice a v rámci této studie byla v šesti okresech provedena v letech 1985, 1988 a 1992 tři nezávislá průřezová šetření základních rizikových faktorů. V letech 1997/1998, 2000/2001, 2006–2009 a 2015–2018 jsme navázali na studii MONICA a provedli další čtyři nezávislá průřezová šetření u 1 % náhodně vybraného vzorku populace devíti okresů ve věku 25–64 let (studie Czech post-MONICA). Šest (Benešov, Cheb, Chrudim, Jindřichův Hradec, Pardubice, Praha-východ) z těchto devíti okresů již dříve participovalo ve studii MONICA. Jednalo se o okresy převážně venkovského charakteru a s výjimkou Pardubic bez přítomnosti větších městských celků. Hlavním důvodem pro zahrnutí dalších tří okresů (Kroměříž, Litoměřice, Plzeň-město) byla snaha o získání reprezentativnějšího populačního vzorku (rozšířením počtu okresů a zahrnutím větší městské populace – okres Plzeň-město). Souhrnně lze konstatovat, že těchto devět okresů zaujímá 11,2 % území České republiky a je obýváno přibližně 10 % celkové populace. Získané údaje tak lze interpretovat jako výsledky národní studie.

Výsledky studie Czech MONICA a Czech post-MONICA byly použity pro vytvoření validovaného statistického modelu IMPACT vysvětlujícího pokles úmrtnosti na ischemickou chorobu srdeční (ICHS) v České republice mezi roky 1985–2007.<sup>6</sup> Pokles úmrtnosti na ICHS lze u nás z více než poloviny (52 %) vysvětlit příznivým ovlivněním hlavních rizikových faktorů, z nichž největší měrou přispěl pokles průměrné cholesterolemie v populaci (z 6,1 mmol/l v roce 1985 na 5,1 mmol/l v roce 2007), vyvolaný především změnou stravovacích zvyklostí.<sup>7</sup> Změnou léčebných postupů, včetně intervenčních výkonů a operací, lze vysvětlit 43 % poklesu úmrtnosti na ICHS v České republice.

Cílem této práce bylo zjistit prevalenci základních rizikových faktorů KVO u reprezentativního vzorku české populace v letech 2015–2018. Výsledky mohou sloužit jako podklad pro plánování zdravotnických služeb.

## Metodika

### Soubor vyšetřených

Byl proveden 1% náhodný výběr vzorku populace devíti okresů ČR (Benešov, Cheb, Chrudim, Jindřichův Hradec, Kroměříž, Litoměřice, Pardubice, Píseň-město, Praha-východ) ve věku 25–64 let, stratifikovaný podle věku a pohlaví. Náhodný výběr obyvatel prováděla Všeobecná zdravotní pojišťovna (VZP) z registru všech pojištěnců, který ze zákona spravuje. Na projektu odmítla spolupracovat Vojenská zdravotní pojišťovna, kontingent jejích pojištěnců byl nahrazen pojištěnci VZP. Pro ostatní spolupracující zdravotní pojišťovny (Oborová zdravotní pojišťovna, Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra ČR, Česká průmyslová zdravotní pojišťovna a v okrese Kroměříž Revírní bratrská pokladna) VZP poskytla pouze obecné charakteristiky vybraných osob (věk a pohlaví) a vlastní náhodný výběr byl prováděn příslušnými zdravotními pojišťovnami.

První informace vybraným osobám zaslaly jejich zdravotní pojišťovny a další kontakt byl možný pouze v případě souhlasu probanda. Studie byla schválena Etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny a Fakultní Thomayerovy nemocnice. U všech vyšetřených osob byl získán informovaný souhlas.

### Vyšetření

Screeningové vyšetření sestávalo z vyplnění standardního dotazníku, získání základních antropometrických údajů (tělesná výška a hmotnost, změření obvodu pasu a boků), opakovaného měření krevního tlaku a odběru krve. Standardní dotazník vyplňoval vždy lékař. Dotazník obsahoval základní demografické a socioekonomické údaje, rodinnou a osobní anamnézu, údaje o přítomnosti rizikových faktorů KVO a informace o současné farmakoterapii.

Tělesná výška a hmotnost byly měřeny u pacienta vstaje bez bot a těžkých vrchních částí oděvu. Index tělesné hmotnosti (BMI) byl vypočítán jako hmotnost v kg dělená druhou mocninou výšky v metrech ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) jako ukazatel relativní hmotnosti.

Krevní tlak byl měřen třikrát na pravé paži, vsedě, minimálně po pěti minutách klidu, klasickým rtuťovým tonometrem (Baumanometer, W.A. Baum Co., Inc., New York, USA). Vyšetřovaná osoba měla pravou ruku podepřenou ve výšce srdce, důraz byl kladen na volbu správné šířky manžety, v závislosti na obvodu paže měřené krejčovským metrem uprostřed vzdálenosti mezi acromiem a olecranem. Systolický krevní tlak byl odečítán jako první Korotkovova ozva, diastolický krevní tlak byl odečítán jako pátá Korotkovova ozva; při nemizejících ozvách byl diastolický krevní tlak odečítán jako čtvrtá Korotkovova ozva (tj. zeslabení zvuků).

Odběr venózní krve byl prováděn u sedící osoby po 12hodinovém lačnění, optimálně bez zaškrcení nebo jen s krátkodobým zaškrcením paže. Vzorky venózní krve byly centrifugovány při 1 500 G a následně zmrazeny.

Vzorek venózní krve na stanovení glykovaného hemoglobinu ( $\text{HbA}_{1c}$ ) byl odebíráán do zkumavky s  $\text{K}_3\text{EDTA}$  a byl uchováván při teplotě 2–8 °C nejdéle čtyři dny.

### Laboratorní vyšetření

Všechny analýzy lipidových parametrů byly prováděny pomocí autoanalyzátoru COBAS MIRA S (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) za použití enzymatických kitů stejné provenience v Lipidové laboratoři IKEM, která v době trvání projektu MONICA sloužila jako referenční lipidová laboratoř Světové zdravotnické organizace. HDL-cholesterol byl stanoven stejnou metodou po vysrážení sérových lipoproteinů fosfowolframanem sodným a chlořidem hořečnatým. LDL-cholesterol byl vypočítán podle Friedewaldovy rovnice. Glykemie byla stanovena enzymatickou metodou (reagencie Lachema, Brno).

Stanovení  $\text{HbA}_{1c}$  provádělo Oddělení klinické biochemie Thomayerovy nemocnice z nesrážlivé krve metodou HPLC (iontově výměnná chromatografie, analyzátor D-10, Bio-rad, California, USA).

Vzorky byly analyzovány za podmínek důsledné interní i externí kontroly kvality práce s následnou kontrolou všech vysokých i nízkých hodnot. Externí kontrola kvality analýzy lipidových parametrů byla provedena v Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Georgia, USA).

### Definice základních rizikových faktorů KVO

*Obezitu* jsme definovali v souladu s WHO jako hodnoty  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ . Hodnoty BMI v rozmezí 25,0–29,99  $\text{kg}/\text{m}^2$  jsme považovali za nadváhu.

Pro definici *kouření* jsme použili definici WHO a za pravidelného kuřáka jsme považovali osobu, která kouří pravidelně nejméně jednu cigaretu denně. Jako příležitostného kuřáka jsme označili osobu, která v současnosti kouří příležitostně, tj. méně než jednu cigaretu denně. Za bývalého kuřáka považujeme osobu, která v minulosti kouřila a v současné době nekouří, za nekuřáka osobu, která nikdy nekouřila.

*Hypertenze* byla definována jako systolický krevní tlak  $\geq 140 \text{ mm Hg}$  nebo diastolický krevní tlak  $\geq 90 \text{ mm Hg}$  (průměr 2. a 3. měření) nebo užívání antihypertenziv. Kontrola hypertenze byla definována jako dosažení krevního tlaku  $< 140/90 \text{ mm Hg}$ .

*Dyslipidemii* jsme definovali jako koncentraci celkového cholesterolu  $\geq 5,0 \text{ mmol}/\text{l}$  nebo HDL-cholesterolu  $< 1,0 \text{ mmol}/\text{l}$  u mužů nebo  $< 1,2 \text{ mmol}/\text{l}$  u žen, nebo koncentraci LDL-cholesterolu  $\geq 3,0 \text{ mmol}/\text{l}$  nebo triglyceridů  $\geq 1,7 \text{ mmol}/\text{l}$  nebo užívání hypolipidemik.<sup>8</sup>

Pro *diabetes* jsme použili dvě různé definice. Za diabetiky jsme považovali (1) osoby s glykemií nalačno  $\geq 7,0 \text{ mmol}/\text{l}$  nebo osoby léčené perorálními antidiabetiky nebo inzulinem;

(2) osoby s  $\text{HbA}_{1c} \geq 48 \text{ mmol}/\text{l}$  nebo osoby léčené perorálními antidiabetiky nebo inzulinem.<sup>9</sup>

### Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno za použití programu SYSTAT® (Chicago, Illinois, USA). Pro analýzu spojitých veličin byla použita analýza rozptylu (ANOVA). Analýza trendů byla provedena metodou lineárního kontrastu. Diskrétní veličiny byly analyzovány pomocí  $\chi^2$  testu v kon-

tingenčních tabulkách. Pro spojitě veličiny byly vypočítány průměry a směrodatné odchylky, pro diskrétní veličiny byly vypočítány absolutní a relativní četnosti. Všechny testy byly dvoustranné, hladina významnosti byla zvolena 0,05. Prevalence diabetu na základě dvou různých definic byla porovnávána pomocí kapa statistiky.

## Výsledky

### Soubor vyšetřených

V devíti okresech České republiky bylo celkem vyšetřeno 2 621 osob ve věku 25–64 let. Z celkového počtu vyšetřených bylo 1 250 mužů (průměrný věk  $48,3 \pm 10,9$  roku) a 1 371 žen (průměrný věk  $47,7 \pm 11,0$  roku;  $p < 0,001$ ). Počty vyšetřených v jednotlivých věkových skupinách jsou uvedeny v tabulce 1. Celková responzivita ve všech devíti okresech činila 44,8 %, byla výrazně horší u mladších osob, zejména v nejmladší věkové skupině 25–34 let.

Poměrné zastoupení mužů a žen ve věkových skupinách bylo stejné s výjimkou věkové skupiny 55–64 let, ve které bylo výrazně vyšší zastoupení mužů ( $p < 0,001$ ).

### Index tělesné hmotnosti

Průměrná hodnota BMI u námi vyšetřené populace činila  $29,1 \pm 4,8$  kg/m<sup>2</sup> u mužů a  $27,5 \pm 6,1$  kg/m<sup>2</sup> u žen ( $p < 0,001$ ). Průměrné hodnoty BMI stoupají s věkem ( $p$  pro trend  $< 0,001$ ) a vzestup je výraznější u žen ( $p < 0,001$ ), které mají výrazně příznivější hodnoty BMI pro mladší věkové kategorie (tabulka 2). Obezitou trpí 37,3 % mužů a 28,2 % žen (obr. 1). Nadváha se vyskytuje u 44,9 % mužů a 32,2 % žen. Žádoucí hodnoty BMI ( $< 25,0$  kg/m<sup>2</sup>) má pouze 17,8 % mužů a 39,6 % žen. Proporcionální zastoupení nadváhy a žádoucích hodnot BMI se liší mezi pohlavími a je příznivější u žen ( $p < 0,001$ ).

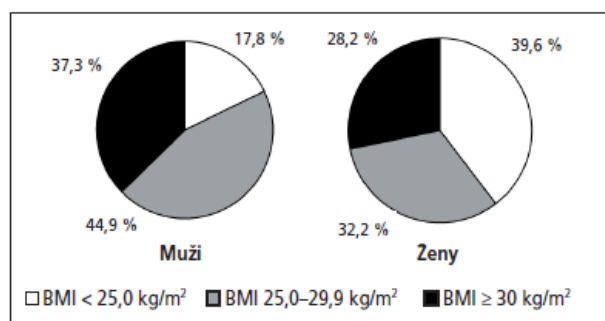
### Kouření

Mezi vyšetřenými muži 24,8 % uvedlo, že jsou pravidelnými kuřáky, zatímco kouření u žen bylo zjištěno u 21,6 % ( $p < 0,001$ ), ostatní kategorie kuřáků a nekuřáků jsou uvedeny v tabulce 3. Procentuální zastoupení kuřáků, nekuřáků, exkuřáků a příležitostných kuřáků podle věkových skupin a pohlaví je uvedeno na obrázku 2.

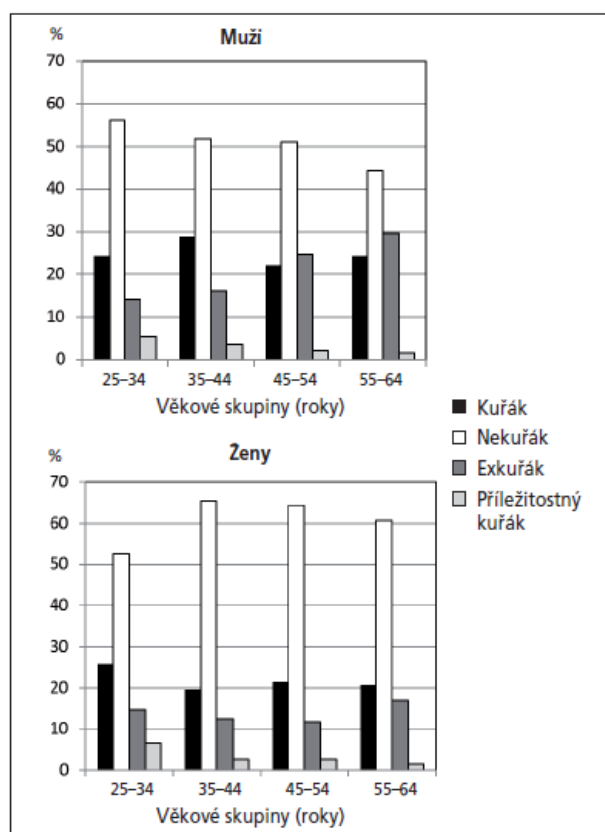
### Krevní tlak

Průměrné hodnoty systolického i diastolického krevního tlaku výrazně narůstaly s věkem u obou pohlaví ( $p$  pro trend  $< 0,001$ ); nárůst byl výraznější u žen ( $p < 0,001$ ) (tabulka 4). Prevalence hypertenze rovněž narůstala s věkem ( $p < 0,001$ ) (obr. 3). V námi vyšetřené populaci jsme našli hypertenzi ve všech věkových skupinách častěji u mužů. Prevalence hypertenze v naší populaci ve věkovém rozmezí 25–64 let je velmi vysoká (48,6 % u mužů a 32,4 % u žen;  $p < 0,001$ ). Ženy, ačkoliv mají nižší prevalenci hypertenze a je u nich tendence k lepší znalosti hypertenze ( $p = 0,0918$ ), jsou přibližně stejně často medikamentózně léčeny, avšak dosahování cílových hodnot krevního tlaku ( $< 140/90$  mm Hg) je u nich stejně neuspokojivé jako u mužů (obr. 4).

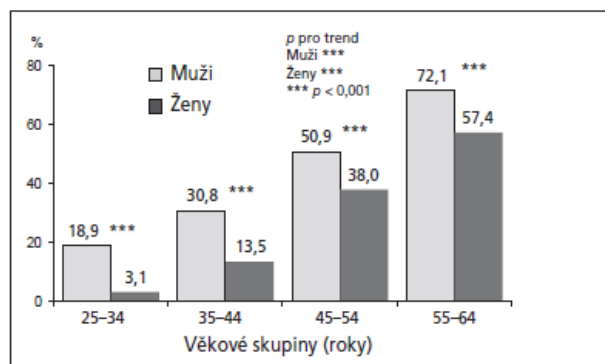
Podstatná část populace (74,3 %), u které jsou při screeningovém vyšetření opakovaně naměřeny hodnoty



Obr. 1 – Rozložení kategorií BMI v české populaci, 2015–2018

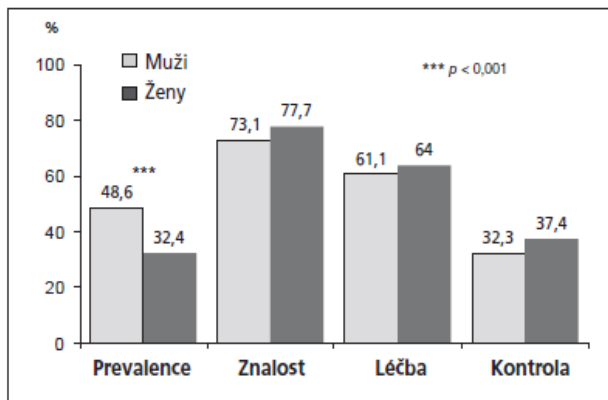


Obr. 2 – Prevalence kuřáků, nekuřáků, exkuřáků a příležitostných kuřáků podle věkových skupin a pohlaví v české populaci, 2015–2018

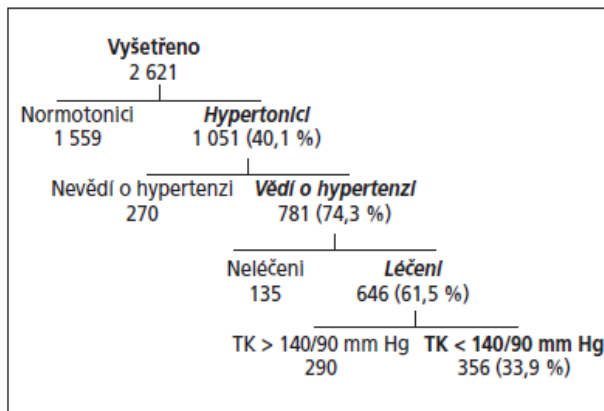


Obr. 3 – Prevalence hypertenze podle věkových skupin a pohlaví v české populaci, 2015–2018

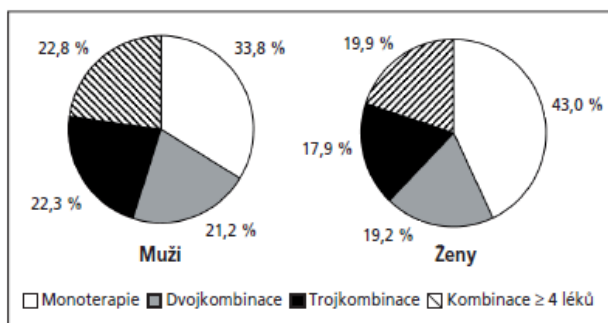




Obr. 4 – Prevalence, znalost, léčba a kontrola hypertenze v české populaci, 2015–2018



Obr. 5 – Výsledky screeningu hypertenze v české populaci, 2015–2018



Obr. 6 – Medikamentózní léčba hypertenze (monoterapie vs. kombináční léčba) v české populaci, 2015–2018

krevního tlaku  $\geq 140/90$  mm Hg, o svém onemocnění ví; medikamentózní léčbu pro hypertenzi užívá 61,5 % hypertoniků, cílových hodnot krevního tlaku ( $< 140/90$  mm Hg) dosahuje pouze 33,9 % populace (obr. 5).

Poměrně vysoké procento hypertoniků v české populaci je stále léčeno monoterapií (33,8 % mužů a 43,0 % žen). Kombinace dvou, tří, čtyř a více antihypertenziv jsou přibližně rovnoměrně zastoupeny u obou pohlaví (obr. 6).

Tabulka 1 – Počty vyšetřených osob podle věkových skupin a pohlaví

	Muži	Ženy
Celkem	1 250	1 371
Průměrný věk, roky	48,3 ± 10,9	47,7 ± 11,0
<b>Věkové skupiny, n (%)</b>		
25–34	185 (14,8)	224 (16,3)
35–44	300 (24,0)	312 (22,8)
45–54	332 (26,6)	420 (30,6)
55–64	433 (34,6)	415 (30,3)

Tabulka 2 – Průměrné hodnoty BMI podle věkových skupin a pohlaví

	Muži	Ženy
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>		
25–34	27,2 ± 4,6	24,5 ± 5,2
35–44	28,3 ± 4,6	26,6 ± 6,3
45–54	29,7 ± 4,7	27,6 ± 5,6
55–64	30,1 ± 4,8	29,6 ± 6,2
Celkem, 25–64	29,1 ± 4,8	27,5 ± 6,1

BMI – Index tělesné hmotnosti.

Tabulka 3 – Prevalence kuřáctví podle pohlaví

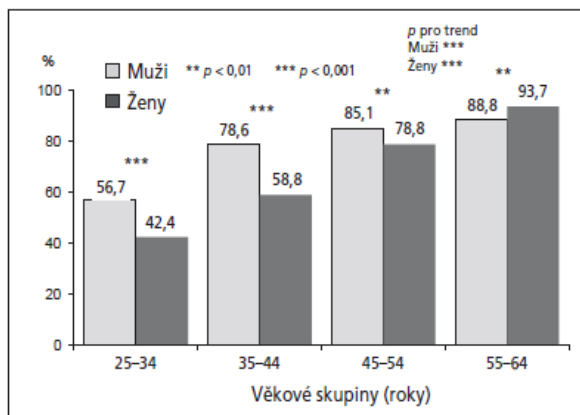
	Muži	Ženy
Současný kuřák, n (%)	309 (24,8)	295 (21,6)
Nekuřák, n (%)	618 (49,7)	843 (61,6)
Exkuřák, n (%)	283 (22,8)	191 (14,0)
Příležitostný kuřák, n (%)	34 (2,7)	40 (2,9)

Tabulka 4 – Průměrné hodnoty systolického a diastolického krevního tlaku podle věkových skupin a pohlaví

	Muži	Ženy
<b>Systolický TK, mm Hg</b>		
25–34	122,7 ± 11,4	112,9 ± 11,7
35–44	125,6 ± 12,7	117,8 ± 14,5
45–54	130,9 ± 14,8	124,7 ± 16,6
55–64	136,0 ± 16,1	132,9 ± 16,7
Celkem, 25–64	130,2 ± 15,2	123,7 ± 17,1
<b>Diastolický TK, mm Hg</b>		
25–34	80,8 ± 8,3	74,8 ± 8,7
35–44	83,8 ± 8,7	78,1 ± 9,2
45–54	85,7 ± 9,4	80,7 ± 9,3
55–64	85,5 ± 9,0	82,3 ± 8,8
Celkem, 25–64	84,5 ± 9,1	79,6 ± 9,4

### Lipidové parametry

Průměrné hodnoty celkového, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a triglyceridů podle věkových skupin a pohlaví uvádí tabulka 5. Hodnoty lipidových parametrů s výjim-



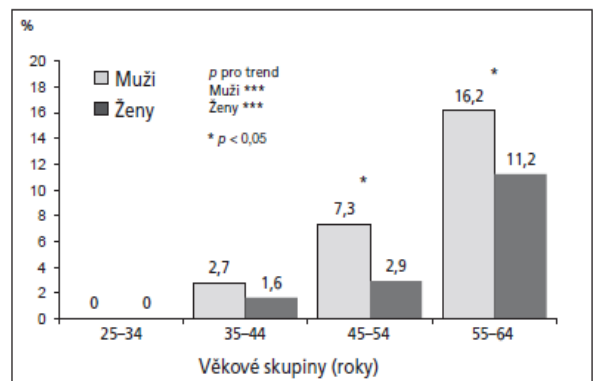
Obr. 7 – Prevalence dyslipidemie podle věkových skupin a pohlaví v české populaci, 2015–2018

kou HDL-cholesterolu rostou s věkem ( $p < 0,001$ ). Vzestup celkového cholesterolu s věkem byl výraznější u žen.

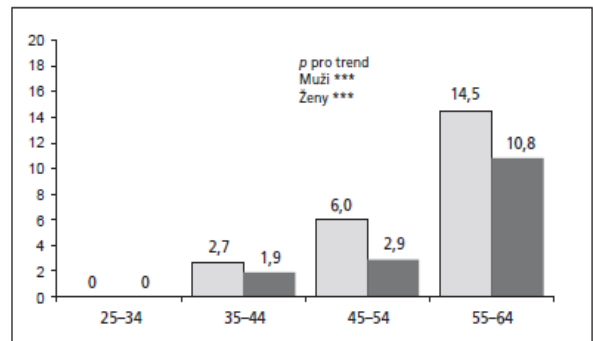
Dyslipidemií podle námi zvolené definice (viz oddíl Metodika) trpí 80,5 % mužské a 72,7 % ženské populace ( $p < 0,001$ ). U obou pohlaví je patrný výrazný nárůst s věkem ( $p$  pro trend  $< 0,001$ ) (obr. 7); v nejstarší věkové skupině se dyslipidemie vyskytuje u více než 90 % jedinců.

Tabulka 5 – Průměrné hodnoty celkového, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a triglyceridů podle věkových skupin a pohlaví

	Muži	Ženy
<b>Celkový cholesterol, mmol/l</b>		
25–34	4,83 ± 0,86	4,68 ± 0,86
35–44	5,34 ± 0,96	4,94 ± 0,84
45–54	5,47 ± 1,13	5,45 ± 0,91
55–64	5,24 ± 1,00	5,69 ± 1,04
Celkem, 25–64	5,26 ± 1,03	5,28 ± 1,00
<b>HDL-cholesterol, mmol/l</b>		
25–34	1,34 ± 0,33	1,70 ± 0,39
35–44	1,30 ± 0,36	1,65 ± 0,39
45–54	1,31 ± 0,37	1,70 ± 0,43
55–64	1,34 ± 0,37	1,64 ± 0,45
Celkem, 25–64	1,32 ± 0,36	1,67 ± 0,42
<b>LDL-cholesterol, mmol/l</b>		
25–34	2,92 ± 0,76	2,55 ± 0,76
35–44	3,31 ± 0,84	2,83 ± 0,78
45–54	3,39 ± 0,92	3,25 ± 0,83
55–64	3,21 ± 0,93	3,44 ± 0,96
Celkem, 25–64	3,24 ± 0,90	3,09 ± 0,91
<b>Triglyceridy, mmol/l</b>		
25–34	1,27 ± 0,89	0,93 ± 0,52
35–44	1,65 ± 1,38	1,00 ± 0,54
45–54	1,74 ± 1,66	1,14 ± 0,78
55–64	1,53 ± 0,83	1,36 ± 0,78
Celkem, 25–64	1,58 ± 1,25	1,14 ± 0,71



Obr. 8 – Prevalence diabetu podle věkových skupin a pohlaví v české populaci, 2015–2018. Diabetes definován jako glykémie nalačno  $\geq 7,0$  mmol/l nebo léčba perorálními antidiabetiky nebo inzulinem.



Obr. 9 – Prevalence diabetu podle věkových skupin a pohlaví v české populaci, 2015–2018. Diabetes definován jako HbA<sub>1c</sub>  $\geq 48$  mmol/l nebo léčba perorálními antidiabetiky nebo inzulinem

Hypolipidemiky bylo léčeno celkem 12,0 % námi vyšetřené populace (13,9 % mužů a 10,2 % žen;  $p < 0,001$ ). Hypolipidemická léčba byla podávána zcela ojediněle osobám ve věku do 45 let, naproti tomu v nejstarší věkové skupině (55–64 let) čtvrtina vyšetřených osob uvedla, že užívá hypolipidemika. Z hypolipidemik jednoznačně převažovaly statiny (77,4 %), následované fibráty.

### Diabetes mellitus

Prevalenci diabetu v námi vyšetřené české populaci ukazují obrázky 8 a 9. Podle námi již dříve použité definice byl diabetes nalezen u 8,2 % mužů a 4,6 % žen ( $p < 0,001$ ).<sup>10</sup> Prevalence diabetu výrazně narůstala s věkem ( $p$  pro trend  $< 0,001$ ), významný rozdíl v prevalenci diabetu mezi oběma pohlavími byl nalezen pouze v předposlední věkové dekádě (7,3 % u mužů a 2,9 % u žen;  $p < 0,001$ ) (obr. 8). Prevalenci diabetu na základě definice obsahující místo glykémie nalačno HbA<sub>1c</sub> ukazuje obrázek 9. Mezi oběma definicemi byla nalezena dobrá shoda (kappa koeficient 0,904 pro muže a 0,874 pro ženy).

### Diskuse

#### Response

Response ve všech devíti okresech činila 44,8 %. V rámci studie MONICA (1985–1992) bylo v České repub-

lice sice dosahováno vyšší response (73,2–88,4 %),<sup>11</sup> v poslední době je však u nás i v zahraničí patrný významný pokles response v epidemiologických studiích.<sup>12,13</sup> Nejnižší response byla v nejmladší věkové skupině 25–34 let, která patrně podceňuje význam prevence kardiovaskulárních onemocnění.

### Obezita

Průměrná hodnota BMI v námi vyšetřené populaci ( $29,1 \pm 4,8$  kg/m<sup>2</sup> u mužů a  $27,5 \pm 6,1$  kg/m<sup>2</sup> u žen) je velmi vysoká a odpovídá průměrné hodnotě BMI, se kterou se setkáváme ve velkých klinických studiích u hypertoniků. Původní studie WHO MONICA našla v 38 populacích u mužů průměrnou hodnotu BMI  $26,6$  kg/m<sup>2</sup> a  $26,5$  kg/m<sup>2</sup> u žen.<sup>14</sup> Většina východoevropských center byla nad tímto průměrem, čeští muži dokonce zaujímali první místo (průměrný BMI  $27,6$  kg/m<sup>2</sup>) a české ženy (průměrný BMI  $27,8$  kg/m<sup>2</sup>) byly předstihány pouze centry v Novosibirsku, Kaunasu a Tarnobrzegu.

V důsledku vysoké průměrné hodnoty BMI je v české populaci i vysoká prevalence obezity a nadváhy. Žádoucí hodnoty BMI (< 25,0 kg/m<sup>2</sup>) dosahuje pouze 17,8 % mužů a 39,6 % žen. Proporcionální zastoupení nadváhy a žádoucích hodnot BMI je příznivější u žen. Průřezová data jsou tak v souladu s longitudinálními trendy, kde u mužů stoupá průměrná hodnota BMI a prevalence obezity, zatímco u žen se tyto parametry nemění.<sup>15</sup>

Světová zdravotnická organizace poskytuje údaje o prevalenci obezity a nadváhy standardizované na věk v jednotlivých evropských zemích. V roce 2014 se prevalence nadváhy a obezity pohybovala mezi 61 % (Rakousko) a 70 % (Česká republika) u mužů a mezi 45 % (Rakousko) a 60 % (Malta) u žen.<sup>2</sup> Prevalence obezity v naší mužské populaci (37,3 %) je srovnatelná s alarmujícími daty ze Spojených států amerických (38,2 %).<sup>16</sup>

Hodnoty BMI významně stoupají v posledních padesáti letech na celém světě. Jednou z příčin je zvýšený kalorický příjem, který není dostatečně kompenzován zvýšenou fyzickou aktivitou.<sup>17</sup> Kuřáci mají obvykle nižší tělesnou hmotnost a zanechání kouření je spojeno s určitým nárůstem hmotnosti. Signifikantní pokles prevalence kuřáctví u naší mužské populace (z 45,0 % v roce 1985 na 24,8 % v letech 2015–2018;  $p < 0,001$ ) by mohl částečně vysvětlit nárůst BMI. Prevalence kuřáctví klesla v řadě zemí a je provázána nárůstem hmotnosti.<sup>18</sup>

Vysoká prevalence obezity v naší populaci u obou pohlaví je patrně zodpovědná za vysokou prevalenci hypertenze, dyslipidemie a diabetu. Obezita významně zvyšuje riziko KVO, artrózy, Alzheimerovy choroby, deprese a některých typů nádorů (karcinom prsu, ovaria, prostaty, jater, ledvin a tlustého střeva).

Dlouho se vedly diskuse, zda obezita je skutečným rizikovým faktorem KVO nebo zda působí pouze prostřednictvím svého negativního vlivu na krevní tlak, lipidy a glukózový metabolismus.<sup>19</sup> Světová federace obezity (World Obesity Federation) prohlásila v roce 2017 obezitu za chronické progredující onemocnění, jednoznačně odlišené od pouhého rizikového faktoru pro ostatní onemocnění.<sup>20</sup>

V řadě prospektivních studií byl vztah mezi BMI a kardiovaskulární morbiditou a mortalitou z kardiovaskulárních příčin po adjustaci na tyto parametry oslaben nebo

zmizel úplně. Snížení tělesné hmotnosti je provázáno zlepšením zmíněných metabolických parametrů.<sup>21,22</sup>

### Kouření

Prevalence kuřáctví je u nás (24,8 % mužů a 21,6 % žen) ve srovnání s vyspělými západními zeměmi vysoká a zcela nepochybně významně přispívá k vysoké kardiovaskulární morbiditě a mortalitě z kardiovaskulárních příčin v České republice. Celosvětově se odhaduje, že 41,2 % kardiovaskulárních onemocnění lze připsat na vrub kouření.<sup>23</sup>

Výsledky posledního průřezového šetření v USA z roku 2016 ukazují, že kouří 17,5 % mužů a 18,3 % žen.<sup>24</sup> Podle posledních dostupných údajů se prevalence kuřáctví u mužů ve střední a západní Evropě pohybuje mezi 15 a 30 %.<sup>2</sup> Více kuřáků je obecně mezi muži ve východní Evropě a zvláště v bývalém Sovětském svazu (Ruská federace 55 %, Lotyšsko 52 %, Moldavsko 51 %). Situace je opačná u žen, kde je stále velmi nízká prevalence kuřáctví v bývalém Sovětském svazu (Kyrgyzstán 1,7 %, Uzbekistán 0,9 %) s výjimkou Ruské federace (16,3 %). Prevalence kuřáctví u žen ve střední a východní Evropě je v současné době podobná jako u žen v severní, západní a jižní Evropě a pohybuje se kolem 20 %.

Riziko kouření je závislé na dávce i expozici (tzn. počtu vykouřených cigaret za den a době, po kterou daná osoba kouřila). Riziko KVO je obzvláště vysoké, pokud kuřák začne kouřit ve věku do 15 let. Škodlivé účinky kouření se projevují u mužů i žen. Mohou být poněkud více vyjádřeny u žen, u nichž kouření, podobně jako diabetes, eliminuje jejich nižší vulnerabilitu ke kardiovaskulárním chorobám.<sup>25</sup> Dopad kouření na progresi aterosklerózy je větší u diabetiků a hypertoniků.<sup>26</sup>

Od roku 1980 klesla prevalence kuřáctví u mužů ve většině evropských zemí s výjimkou Lotyšska a Ruské federace, kde prevalence stoupla a dosahuje více než 50 %. Ve stejném období klesla prevalence kuřáctví u žen ve většině evropských zemí, ale méně než u mužů. Poslední dostupné statistiky uvádějí průměrnou prevalenci kuřáctví v Evropě 27,1 % u mužů a 18,5 % u žen.<sup>2</sup>

### Krevní tlak

Studie MONICA<sup>14</sup> našla průměrné hodnoty systolického krevního tlaku ve východoevropských zemích vyšší než průměr všech 38 populací (muži:  $133 \pm 5$  mm Hg; ženy:  $129 \pm 6$  mm Hg). U mužů byl nalezen nejvyšší průměrný systolický krevní tlak v bývalém východním Německu ( $141$  mm Hg), následovaném bývalým Československem a Lotyšskem (obě země shodně  $137$  mm Hg). Obdobná situace byla i u žen. Nejvyšší hodnoty průměrného systolického krevního tlaku byly nalezeny v NDR, Novosibirsku a Jugoslávii ( $137$  mm Hg).

Systematická metaanalýza populačních studií z 90 zemí našla průměrnou prevalenci hypertenze u dospělé populace v roce 2010 31,1 % s nejvyššími hodnotami v Evropě a Střední Asii.<sup>27</sup>

V české populaci od roku 1985 výrazně klesá průměrná hodnota systolického i diastolického krevního tlaku, což zcela nepochybně přispívá k poklesu úmrtnosti na KV onemocnění, zejména na cévní mozkové příhody.<sup>28</sup>

Vysoká prevalence hypertenze v naší populaci nepochybně souvisí s vysokou prevalencí obezity. Špatné stravovací zvyklosti a nízká fyzická aktivita zásadním způsobem

bem přispívají k vysoké prevalenci obezity a hypertenze. Příjem soli přispívá k rozdílům v hodnotách krevního tlaku mezi populacemi.<sup>29</sup> Metaanalýza kontrolovaných studií ukázala, že restrikce sodíku vede k poklesu krevního tlaku, i když pokles krevního tlaku vykazuje značnou variabilitu.<sup>30–32</sup> Studie DASH prokázala, že strava bohatá na ovoce a zeleninu, s nízkým obsahem tuků (zvláště satureovaných) vede k výraznému poklesu krevního tlaku.<sup>33</sup>

Na vysoké prevalenci hypertenze, zvláště u mužů, se v naší populaci může podílet i vysoká konzumace alkoholu, zejména piva. Konzumace piva byla u nás stabilní v letech 1997–2005 a pohybovala se kolem 160 litrů na osobu, od roku 2006 je pozorován setvalý mírný pokles (144,3 l v roce 2017).<sup>7</sup> V konzumaci alkoholu uvedenou jako množství čistého alkoholu v litrech na osobu za rok se řadí Česká republika se 14,4 l na třetí místo v Evropě!<sup>34</sup> V populacích konzumujících alkohol je spotřeba alkoholu na druhém místě za obezitou jako faktor predisponující k hypertenzi.<sup>35</sup> Osoby konzumující tři a více standardních alkoholických nápojů za den mají 2–3x vyšší prevalenci mírné hypertenze ve srovnání s těmi, kteří konzumují maximálně jeden alkoholický nápoj denně. Účinek alkoholu na krevní tlak může být vyšší u kuřáků a má aditivní účinky na obezitu. Pravidelná konzumace alkoholu může zvýšit potřebu antihypertenzní léčby.

V české populaci v období 31/32 let významně klesá průměrný systolický i diastolický krevní tlak, přestože hodnota BMI se buď nemění (u žen), nebo dokonce stoupá (u mužů).<sup>15</sup> Může se na tom podílet snížená konzumace satureovaných tuků a soli, protože spotřební data vykazují výrazné snížení konzumace živočišných tuků a výrazný nárůst spotřeby čerstvého ovoce a zeleniny.<sup>7</sup>

K poklesu průměrného tlaku v naší populaci patrně přispívá i nárůst počtu osob užívajících antihypertenziva. V současné době je v celé populaci středního věku zhruba 25 % osob, které jsou medikamentózně léčeny pro hypertenzi.

Znalost hypertenze je u nás zcela srovnatelná s vysokopříjmovými zeměmi (high-income countries, klasifikace podle World Bank, 2014), kde zhruba dvě třetiny hypertoniců vědí o svém onemocnění.<sup>36</sup> Zásadním problémem zůstává nedostatečná kontrola hypertenze. I v tomto směru jsou však naše výsledky lepší než průměr vysokopříjmových zemí (muži 24,6 %, ženy 32,2 %). V populační studii v kanadské provincii Ontario bylo dosahováno cílových hodnot krevního tlaku < 140/95 mm Hg u 65 % populace.<sup>12</sup> Jednou z příčin neuspokojivého stavu kontroly hypertenze u nás je nepochybně málo agresivní antihypertenzní léčba, protože monoterapií je léčeno 33,8 % mužů a 43,0 % žen.

Výsledky velkých klinických studií přitom ukazují, že zhruba 80 % hypertoniců potřebuje k dosažení cílových hodnot krevního tlaku kombinační léčbu. Metaanalýza 42 studií ukázala, že kombinace dvou účinných látek ze dvou různých skupin antihypertenziv navodí větší pokles krevního tlaku než zdvojnásobení dávky jednoho z antihypertenziv.<sup>37</sup> V souladu s tím poslední evropské guidelines pro diagnostiku a léčbu hypertenze doporučují zahajovat farmakoterapii hypertenze fixní dvojkombinací.<sup>38</sup> Jinou příčinou špatné kontroly hypertenze v populaci je nízká compliance pacienta, kterému mnohdy není řádně vysvětlena nezbytnost nejspíše celoživotní léčby. V tomto

směru je přínosem léčba fixními kombinacemi, která znamená snížení počtu užívaných tablet a zvýšení adherence k léčbě.<sup>39</sup>

### Lipidové parametry

Studie MONICA našla v letech 1990–1995 průměrnou hodnotu celkového cholesterolu 5,8 mmol/l ( $\pm 0,4$  mmol/l u mužů,  $\pm 0,3$  mmol/l u žen).<sup>14</sup> Česká republika tehdy patřila k zemím s nejvyšší průměrnou hodnotou celkového cholesterolu. Vyšší průměrné hodnoty u mužů byly tehdy nalezeny překvapivě v obou švýcarských centrech a v jugoslávském Novém Sadu. V ženské populaci byla vyšší průměrná hodnota celkového cholesterolu než v České republice nalezena pouze v Brémách, Kaunasu, Ticinu a Novém Sadu.

Od roku 1985 významně klesla průměrná cholesterolemie v české populaci (u mužů z  $6,21 \pm 1,29$  na  $5,30 \pm 1,05$  mmol/l, u žen z  $6,18 \pm 1,26$  na  $5,31 \pm 1,00$  mmol/l;  $p < 0,001$ ; průměrný pokles 14 %). Je velmi pravděpodobné, že tohoto poklesu bylo dosaženo především nefarmakologickou cestou, protože hypolipidemiky bylo při posledním průřezovém šetření léčeno 13,9 % mužů a 10,2 % žen. Obdobného poklesu průměrné cholesterolemie bylo dosaženo ve Finsku v období 1972–1992.<sup>40</sup> Pokles celkového cholesterolu v naší populaci se zásadní měrou podílí na poklesu mortality z kardiovaskulárních příčin a zejména mortality z koronárních příčin v České republice.<sup>6</sup>

### Diabetes mellitus

Světová zdravotnická organizace odhaduje, že diabetes je třetím nejzávažnějším rizikovým faktorem předčasné úmrtnosti.<sup>41</sup> Diabetici mají zhruba dvojnásobné riziko rozvoje KVO, riziko je vyšší u žen a u mladších diabetiků.<sup>42</sup> Epidemiologické studie ukazují lineární vztah mezi narůstající glykemií a rizikem rozvoje KVO i v rozmezí normálních hodnot. To platí jak pro hodnoty postprandiální (dvě hodiny po podání 75 g glukózy), tak glykemie nalačno. Abnormální hodnoty za dvě hodiny po standardním orálním glukózovém tolerančním testu ( $> 11,1$  mmol/l) jsou lepším prediktorem celkové a kardiovaskulární morbidity a mortality z kardiovaskulárních příčin než hodnota glykemie nalačno.<sup>43</sup>

Provádění orálního glukózového tolerančního testu je v epidemiologických studiích poněkud obtížné. V roce 1997 bylo doporučeno definovat diabetes pomocí glykemie nalačno jako hodnoty  $\geq 7$  mmol/l.<sup>44</sup> Světová zdravotnická organizace tuto definici později převzala.<sup>45</sup> V obou případech je v epidemiologických studiích akceptována jediná hodnota glykemie nalačno.<sup>46</sup> Mezinárodní výbor expertů doporučil v roce 2009 jako jednu z možností pro diagnostiku diabetu HbA<sub>1c</sub>.<sup>47</sup> Americká diabetologická asociace (American Diabetes Association, ADA) uvádí jako další diagnostické kritérium pro diabetes hodnotu HbA<sub>1c</sub>  $\geq 48$  mmol/mol.<sup>9</sup>

Prevalence diabetu v obecné populaci bývala nejčastěji uváděna kolem 5 %. To byl také případ americké populace ve věku nad 20 let vyšetřené v rámci NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994). Vyšetření glykemie nalačno zvýšilo prevalenci diabetu o 2,8 %.<sup>48</sup> Prevalence diabetu v americké populaci významně narůstala s věkem a byla o něco vyšší u mužů (prevalence standardizovaná na věk: muži 8,4 %;

ženy 7,7 %). Naše výsledky jsou podobné, i když jsme nepoužili zcela stejnou definici diabetu. Použití dvou různých definic diabetu v naší studii zásadně neovlivnilo prevalenci diabetu a mezi oběma definicemi byla nalezena dobrá shoda.

Americká populační studie NHANES 2013–2016 našla u bělošské populace starší 20 let prevalenci diabetu 9,4 % u mužů a 7,3 % u žen. Prevalence diabetu byla výrazně vyšší u černošské populace (14,7 % u mužů; 13,4 % u žen) a u Hispánců (15,1 % u mužů a 14,1 % u žen).<sup>24</sup>

Od roku 1980 byl ve většině zemí světa prokázán vzestup prevalence diabetu (u mužů ze 4,3 % na 9,0 %; u žen z 5,0 % na 7,9 %).<sup>49</sup>

## Závěr

U reprezentativního náhodně vybraného vzorku české populace středního věku byla nalezena vysoká prevalence základních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění, které jsou příčinou stále vysoké mortality z kardiovaskulárních příčin v České republice.

### Prohlášení autorů o možném střetu zájmů

Žádný střet zájmů.

### Financování

Práce byla podpořena grantem AZV 15-27109A MZ ČR.

## Literatura

- Zemfeli 2017, ÚZIS, ČR, 2018.
- Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels, 2017.
- WHO MONICA Project Principal Investigators: The World Health Organization MONICA project (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): A major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988;41:105–114.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasma K, Mähönen M, et al., for the WHO MONICA (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Project. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *Lancet* 1999;353:1547–1557.
- Yusuf S, Hawken S, Öunpuu S, et al. and INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. *Lancet* 2004;364:937–952.
- Bruthans J, Cífková R, Lánská V, et al. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in the Czech Republic between 1985 and 2007. *Eur J Prev Cardiol* 2014;21:829–839.
- Food consumption data released by the Czech Statistical Office at: [https://www.czso.cz/table/03.02:Food consumption and non-alcoholic beverages in 1989-2018](https://www.czso.cz/table/03.02:Food%20consumption%20and%20non-alcoholic%20beverages%20in%201989-2018). [https://www.czso.cz/documents/10180/91917746/32018119\\_0302.pdf/356ce8ab-1ede-4e5a-98c4-090ab2c8a542?version=1.1](https://www.czso.cz/documents/10180/91917746/32018119_0302.pdf/356ce8ab-1ede-4e5a-98c4-090ab2c8a542?version=1.1).
- Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(Suppl 2):S1–S88.
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2019. *Diabetes Care* 2019;42(Suppl. 1):S13–S28.
- Cífková R, Bruthans J, Adámková V, et al. Prevalence základních kardiovaskulárních rizikových faktorů v české populaci v letech 2006–2009. Studie Czech post-MONICA. *Cor Vasa* 2011;53:220–229.
- Cífková R, Skodová Z, Bruthans J, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. *Czech MONICA and Czech post-MONICA. Atherosclerosis* 2010;211:676–681.
- Leenen FH, Dumais J, McInnis NH, et al. Results of the Ontario survey on the prevalence and control of hypertension. *CMAJ* 2008;178:1441–1449.
- Vollenweider P. Setting up the CoLaus study. *BMC Proceedings* 2013;7(suppl. 5):O6.
- Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, et al.; for the WHO MONICA Project. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 2000;355:675–687.
- Cífková R, Bruthans J, Wohlfahrt P, et al. Major cardiovascular risk factors in the Czech population: 30-year trends between 1985 and 2016/17. *Czech MONICA and Czech post-MONICA, odesláno do tisku*.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. Obesity update 2017. OECD <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf> (2017).
- Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:288–298.
- Williamson DF, Madans J, Anda RF, et al. Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort. *N Engl J Med* 1991;324:739–745.
- Krauss RM, Winston M, Fletcher BJ, Grundy SM. Obesity : Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation* 1998;98:1472–1476.
- Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, World Obesity Federation. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev* 2017;18:715–723.
- Eckel RH. Obesity and heart disease. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1997;96:3248–3250.
- Dengel DR, Galeckim AT, Hagberg JM, Pratley RE. The independent and combined effects of weight loss and aerobic exercise on blood pressure and oral glucose tolerance in older men. *Am J Hypertens* 1998;11:1405–1412.
- GBD 2015 Tobacco Collaborators. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990–2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2017;389:1885–1906.
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019;139:e56–e528.
- Cífková R, Pitha J, Krajcoviechova A, Kralikova E. Is the impact of conventional risk factors the same in men and women? Plea for a more gender-specific approach. *Int J Cardiol* 2019;286:214–219.
- Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, et al. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *JAMA* 1998;279:119–124.
- Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation* 2016;134:441–450.
- Cífková R, Skodová Z, Bruthans J, et al. Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008. *J Hypertens* 2010;28:2196–2203.
- Elliott P, Stamler J, Nichols R, et al.; for the Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt revisited: further

- analyses of 24-hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. *BMJ* 1996;312:1249–1253.
30. Law MR, Frost CD, Wald NJ. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? Analysis of data from trials of salt reduction. *BMJ* 1991;302:819–824.
  31. Cutler JA, Follmann D, Alender PS. Randomized trials of sodium reduction: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997;65:643S–651S.
  32. Midgley JP, Matthev AG, Greenwood CMT, Logan AG. Effect of reduced dietary sodium on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1996;275:1590–1597.
  33. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, et al.; for the DASH-sodium Collaborative Research Group. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Eng J Med* 2001;344:3–10.
  34. Timmis A, Townsend N, Gale CP, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J* 2020;41:12–85.
  35. Puddey IB, Beilin LJ, Rakic V. Alcohol, hypertension and the cardiovascular system: a critical appraisal. *Addiction Biol* 1997;2:159–170.
  36. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation* 2016;134:441–450.
  37. Wald DS, Law M, Morris JK, et al. Combination therapy versus monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11,000 participants from 42 trials. *Am J Med* 2009;122:290–300.
  38. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology: ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2018;36:2284–2309.
  39. Conn VS, Ruppar TM, Chase JA, et al. Interventions to improve medication adherence in hypertensive patients: systematic review and meta-analysis. *Curr Hypertens Rep* 2015;17:94.
  40. Vartiainen E, Puska P, Pekkanen J, et al. Changes in risk factors explain changes in mortality from ischaemic heart disease in Finland. *BMJ* 1994;309:23–27.
  41. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva (Switzerland), World Health Org. 2016.
  42. Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentrations, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010;26;375:2215–2222.
  43. The DECODE Study Group on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group: Glucose tolerance and Cardiovascular Mortality. Comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 2001;161:397–404.
  44. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183–1197.
  45. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva (Switzerland), World Health Org. 1999.
  46. World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO consultation/IDF Consultation. Geneva (Switzerland), World Health Org. 2006.
  47. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *International Expert Committee. Diabetes Care* 2009;32:1327–1334.
  48. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in US adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Diabetes Care* 1998;21:518–524.
  49. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 2016;387:1513–1530.

**71 - Risk factors, epidemiology, prevention and treatment of cardiovascular diseases: Miscellaneous**

**EAS-0529.**

**PREVALENCE OF GILBERT SYNDROME AND UGT1A1\*28 STATUS IN THE CZECH POPULATION, AND THEIR RELATIONSHIP TO ISCHEMIC HEART DISEASE**

L. Kadlickova<sup>a</sup>, V. Danzig<sup>a</sup>, R. Gifkova<sup>a</sup>, A. Linhart<sup>a</sup>, J.A. Hubacek<sup>b</sup>, M. Galovcova<sup>b</sup>, J. Belohoubek<sup>b</sup>, V. Adamkova<sup>b</sup>, A. Jiraskova<sup>c</sup>, L. Vitek<sup>d</sup>

<sup>a</sup>2nd Dept Int Med, 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague, Prague 2, Czech Republic; <sup>b</sup>Center of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 4, Czech Republic; <sup>c</sup>Inst Med Chem Lab Med, 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague, Prague 2, Czech Republic; <sup>d</sup>4th Dept Int Med, 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague, Prague 2, Czech Republic

**Objectives:** Bilirubin belongs to the main endogenous antioxidants and its systemic levels are regulated by bilirubin UDP-glucuronosyl transferase

(UGT1A1). Mild deficiency of UGT1A1 known as Gilbert syndrome (GS) has been associated with a lower risk of ischemic heart disease (IHD). The aim of the present study was to assess the prevalence of GS and UGT1A1\*28 status in the Czech population, and their possible relationship to incident IHD.

**Methods:** The study was performed in 717 individuals (median age=48.5 years) recruited from the Czech post-MONICA study in 2000-2001 (M=442, F=275); 669 individuals attended a re-examination 6 years later. Routine laboratory tests were performed in all subjects in 2000-2001; dinucleotide (TA)<sub>n</sub> variants of UGT1A1 promoter were determined by fragment analysis. Standard statistical analyses were used to compare variables and to assess factors affecting bilirubin levels as well as IHD manifestation.

**Results:** The median of serum bilirubin concentration in the Czech population was 9.8 μmol/L [IQ range: 8-12.4 μmol/L] with higher levels in men compared to women (10.7 [8.7-13.6] vs. 8.8 [7.2-10.7] μmol/L,  $p < 10^{-6}$  for males and females, respectively). The prevalence of GS (defined as serum bilirubin >17.1 μmol/L) was 6.7%, UGT1A1\*28 allele homozygosity was found in 13.8%, and UGT1A1\*28 allele frequency was 59.4%. Serum bilirubin levels were dependent on sex, UGT1A1 genotype, and smoking ( $p < 10^{-6}$  for all variables). Over the 6-year follow-up period, 37 (5.5%) individuals reported to have developed IHD. The major predictors of incident IHD were age (OR 1.09; 95%CI 1.05-1.13), and sex (OR for female gender 0.47; 95%CI 0.17-0.97), with serum bilirubin also contributing negatively, but to a lesser extent (OR 0.93; 95%CI 0.84-1.03).

**Conclusion:** The prevalence of GS and frequency of GS genotypes were determined in a representative Czech population sample. In addition, serum bilirubin levels were found to have a potential for predicting incident IHD.