

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Studium nových rizikových faktorů kardiovaskulárních
onemocnění**

MUDr. Lenka Eremiášová

2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: **Biochemie a patobiochemie**

Předseda oborové rady: **prof. MUDr. Libor Vítek, PhD., MBA**

Školící pracoviště: **Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky**

1. LF UK a VFN v Praze

Školitel: **doc. MUDr. Vilém Danzig, PhD.**

OBSAH

1	ABSTRAKT	3
2	ABSTRACT	4
3	ÚVOD	5
	3.1. Koncentrace bilirubinu v krevním séru	5
	3.2. Biologické vlastnosti bilirubinu	6
4	CÍL PRÁCE	8
	4.1. Bilirubin a kardiovaskulární onemocnění	9
	4.2. Bilirubin a mortalita	14
5	KARDIOVASKULÁRNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY	18
6	ZÁVĚR	20
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	22
8	SEZNAM PUBLIKACÍ	26

1. 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 zjistili v české populaci 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. Potentním biomarkerem se jeví i koncentrace kyseliny močové.

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

2. 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 is particularly alarming. In addition to 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

3. ÚVOD

Bilirubin, hlavní žlučový pigment, je v intravaskulárním kompartmentu konečným produktem metabolismu hemu. Po chemické stránce patří mezi lineární tetrapyrolové sloučeniny. Dlouhou dobu byl považován za nebezpečnou látku, zejména z důvodu toxického poškození centrálního nervového systému [1, 2]. Nový pohled na tuto molekulu přinesla práce, ve které byla poprvé zmíněna antioxidační vlastnost bilirubinu [3]. Další práce prokázaly, že mírná elevace sérových koncentrací bilirubinu má pro lidský organismus významný ochranný účinek [4]. Tento protektivní vliv se nejvíce uplatňuje u chorob spojených s vyšším oxidačním stresem, jako jsou nemoci kardiovaskulární [5], některé nádorové choroby [6, 7], onemocnění zánětlivá [8], revmatologická [9] či neuropsychiatrická [10].

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 [11]. Kromě zvýšené spotřeby antioxidantů jsou sérové koncentrace bilirubinu určeny geneticky aktivitou UGT1A1 [12], částečně i aktivitou HMOX1 - klíčových enzymů katabolické dráhy hemu [13].

3.1. Koncentrace bilirubinu v krevním séru

Sérové koncentrace bilirubinu jsou ovlivněny aktivitou enzymů, zejména uridin difosfo-glukuronosyltransferasy 1A1 (UDP-glukuronosyltransferáza 1A1, UGT1A1), která je kódována genem *UGT1A1* [12, 14, 15]. 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 [16]. Obecně, je za medián systémových koncentrací bilirubinu považována

koncentrace kolem 10 $\mu\text{mol/l}$, průměrné koncentrace jsou mírně nižší [17]. Bilirubin má v populaci bimodální rozložení, které je dáno výskytem GS [18, 19]. Vyšší koncentrace nekonjugovaného bilirubinu nepředstavují pro tyto nositele významnější riziko [20]. Systémové koncentrace bilirubinu jsou ovlivněny řadou proměnných, a proto je velmi obtížné stanovit optimální referenční meze [19]. Například u žen nacházíme v důsledku inhibice UDP-glykuronosyltransferázy estrogény nižší koncentrace sérového bilirubinu [6] [21, 22], s věkem systémové koncentrace bilirubinu také klesají [23]. Dále se systémové koncentrace bilirubinu liší u jednotlivých etnik [24], stejně jako se mění během dne [25], fyzické aktivity [26]či vlivem životního stylu [27, 28].

3.2. Biologické vlastnosti bilirubinu

Bilirubin je jedním z nejdůležitějších antioxidantů lidského těla [29] a významně se podílí na celkové antioxidační kapacitě séra [30, 31]. Biologické vlastnosti bilirubinu zobrazuje Tab. 1.

Podle recentních dat se bilirubin podílí i na intracelulární signalizaci a působí jako hormon. Tato buněčná signalizace bilirubinu je umožněna jeho vazbou na specifický receptor v membráně hepatocytů. Po internalizaci do jádra, aktivuje jako ligand specifické receptory a tím spouští transkripci specifických genů, které vedou k aktivaci β -oxidace mastných kyselin v mitochondriích. Prostřednictvím této signalační dráhy dochází ke zlepšení inzulínové rezistence a redukci obezity [32, 33].

Tabulka 1: Biologické vlastnosti bilirubinu

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

Upraveno podle ref.[34].

4. CÍL PRÁCE

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

Část 1: Bilirubin a kardiovaskulární onemocnění

- 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.

Část 2: Bilirubin a mortalita

- 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).

4.1. Bilirubin a kardiovaskulární onemocnění

Metodika: Použita byla data získaná z české populační studie post-MONICA (MONItoring of CARDiovascular disease) [35]. První skupina (kohorta A) pocházela z retrospektivní studie tvořené 717 jedinci (z toho 62 % mužů) rekrutovaných ze studie post-MONICA provedené mezi lety 1997-1998. Jedinci byli opětovně vyšetřeni mezi roky 2000-2001. Vzorky žilní krve byly po svém získání zmrazeny a uchovány v předepsaných podmínkách. V rámci této práce byly z těchto vzorků dodatečně stanoveny systémové koncentrace bilirubinu, aktivity aminotransferáz a gamaglutamyltransferázy (GGT), včetně genetické analýzy genů, podílejících se na metabolismu bilirubinu. Druhou skupinu (kohorta B, n=2 594, 48 % mužů), představuje vzorek české populace získaný z prospektivně probíhající studie post-MONICA (2015-2018). Koncentrace bilirubinu, aktivity aminotransferáz a GGT byly stanoveny ze vzorku žilní krve v průběhu studie. Data jedinců s akutním koronárním syndromem (n=741), byla získána z Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM). Jednalo se o muže, hospitalizované na jednotce intenzivní péče od dubna 2006 do dubna 2014 [36, 37] pro primomanifestaci akutního koronárního syndromu, konkrétně infarktu myokardu. U těchto jedinců byly pro účely naší studie použity koncentrace systémového bilirubinu odebrané ze žilního vzorku krve dle protokolu studie. Aktivity AST (aspartátaminotransferázy), ALT (alaninaminotransferázy) a GGT nebyly v naší studii hodnoceny, z důvodu alterace aktivit probíhajícím akutním koronárním syndromem (Tab. 2).

Za horní limit fyziologických koncentrací sérového bilirubinu byla stanovena koncentrace 17 $\mu\text{mol/l}$ [38]. Za abnormální aktivity aminotranferáz byly považovány aktivity $\text{AST} \geq 0,72 \mu\text{kat/l}$, $\text{ALT} \geq 0,78 \mu\text{kat/l}$, $\text{GGT} \geq 0,84 \mu\text{kat/l}$. DNA analýza získána ze vzorku nesrážlivé krve vysolovací metodou podle Millera [39]. Promotorové varianty genu *UGT1A1* stanoveny kapilární elektroforézou [40].

Výsledky:

Tab. 2: Základní charakteristiky sledovaných populací

Charakteristika vyšetřovaných populací				
	Kohorta A (n=717)	Kohorta B (n=2 594)	Kohorta A muži (n=442)	Kohorta IM (n=741)
Muži/Ženy	1,61	0,91	-	-
Věk (v letech)	48,4±11	48±11	49±11	54,7±8*
BMI (kg/m²)	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*
TAG (mmol/l)	1,77±1,1	1,34±1,0	2,01±1,2	1,85±1,7*
Kouření (%)	48,8	43,8	58,5	83,2*
Arteriální hypertenze (%)	41,7	40,1	47,1	49,9
Diabetes mellitus (%)	4,5	6,4	5	17,9*
Glykémie nalačno (mmol/l)	5,09±0,2	5,47±0,4	5,26±1,1	NS
AST (μkat/l)	0,24±0,1	0,38±0,3	0,25±0,1	NS
ALT (μkat/l)	0,18±0,1	0,38±0,4	0,19±0,1	NS
GGT (μkat/l)	0,53±1,2	0,62±0,1	0,74±1,5	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. Legenda: TAG-triacylglyceroly

Výsledky:**Cíl a) Tab. 3:****A) Koncentrace celkového bilirubinu v reprezentativním vzorku české populace a u mužů s akutním infarktem myokardu**

Koncentrace celkového bilirubinu ($\mu\text{mol/l}$)			
	Kohorta A	Kohorta B	Kohorta s IM
Všichni	9,8 (8-12,4) (n=717)	9,6 (6,6-13,2) (n=2 594)	
Muži	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)
Ženy	8,8 (7,2-10,7) (n=275)	8,3 (6,1-11,1) (n=1 359)	

Koncentrace bilirubinu jsou u ženského pohlaví nižší než u mužů. Data vyjádřena jako QR. * $p < 0.01$ srovnání s kontrolními skupinami A i B.

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

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

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

Horní meze fyziologických aktivit aminotransferáz 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 nestanovenou důvodu elevace myokardiálních enzymů ovlivňujících aktivity aminotransferáz.

C) 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, majících vliv na sérové koncentrace bilirubinu vztahených na medián koncentrací celé kohorty B (9,6 $\mu\text{mol/l}$). Legenda: BMI-body mass index, HbA1c-glykovaný hemoglobin

Nejčastější zvýšenou enzymatickou aktivitou byla aktivita GGT (Tab. 4). Významný pozitivní lineární vztah byl detekován mezi BMI vs. GGT ($p<0,001$), HbA1c ($p<0,001$) a sérovými koncentracemi triacylglycerolů ($p<0,001$). Negativní asociace GGT byla detekována pro hodnoty BMI a koncentrace HDL cholesterolu ($p<0,001$).

Tabulka 4: Výskyt elevace aktivit aminotransferáz a GGT v české populaci

KOHORTA B	Všichni (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 %

Aktivity považované nad normu $AST\geq 0,72\mu\text{kat/l}$, $ALT\geq 0,78\mu\text{kat/l}$, $GGT\geq 0,84\mu\text{kat/l}$.

Cíl b) Prevalence GS, včetně frekvence gilbertovské alely (*UGT1A128) a jednotlivých polymorfismů genu *UGT1A1***

Sérové koncentrace bilirubinu jsou ovlivněny pohlavím (vyšší koncentrace jsou u mužů než u žen, Tab. 3A, $p \leq 0,01$). Samotná přítomnost alely *UGT1A1* má menší význam. Pravděpodobnost výskytu GS byla ve vybraném populačním vzorku 8,9 % (11,6 % pro muže vs. 6,1 % pro ženy, $p \leq 0,01$, Tabulka 3B).

Cíl c) Sérové koncentrace bilirubinu, frekvence alely *UGT1A128 u mužů s akutním infarktem myokardu**

Koncentrace sérového bilirubinu byly u mužů s AIM signifikantně nižší oproti kontrolní skupině (7,7 vs. 10,7-11,3 $\mu\text{mol/l}$, $p \leq 0,01$, Tab. 3A). Distribuce genotypů *UGT1A1* byla mezi těmito dvěma skupinami plně srovnatelná.

Diskuse: Medián koncentrací bilirubinu v séru byl 9,8 $\mu\text{mol/l}$ (kohorta A) a 9,6 $\mu\text{mol/l}$ (kohorta B). Vyšší koncentrace byly pozorovány 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, s nezanedbatelnými rozdíly mezi muži (95 % CI:5,5-27,5 $\mu\text{mol/l}$) a ženami (95 % CI:3,8-19,9 $\mu\text{mol/l}$). Nejčastější genová varianta v české populaci je *UGT1A1(TA)_{6/7}*, bez podstatného rozdílu mezi muži a ženami. Koncentrace bilirubinu v séru byly u pacientů s akutním IM mnohem nižší, pravděpodobně v důsledku zvýšené konzumpce bilirubinu v rámci oxidačního stresu. Nižší systémové koncentrace bilirubinu nacházíme u kuřáků (medián 8,7 $\mu\text{mol/l}$ vs. nekuřáci 9,9 $\mu\text{mol/l}$, $p \leq 0,001$). Významným prediktorem sérových koncentrací bilirubinu je hodnota BMI, stejně jako koncentrace HbA1c (Tab 3C). Zvýšené aktivity aminotransferáz a GGT ukazují na vysoké kardiovaskulární a metabolické riziko české populace. Nejčastěji byla zjištěna elevace aktivit GGT (18,4 %, Tab. 4), jejíž příčinou je pravděpodobně (po vyloučení usu alkoholu) nealkoholická steatóza jater (NAFLD) [41]. Zda se

jedná o primární postižení či o důsledek metabolického syndromu není doposud jasné [42, 43].

4.2. Bilirubin a mortalita

Metodika: Data byla získána z polské větve multicentrické studie HAPIEE (Health, Alcohol, and Psychosocial factors in Eastern Europe) [44]. Práce byla provedena na 1 870 jedincích ze studie HAPIEE. Tato skupina byla rozdělena na ty, kteří během sledování zemřeli (n=447, z toho 211 na nádorová onemocnění a 139 na kardiovaskulární onemocnění (CVD), ostatní subjekty sloužily jako kontrolní skupina (n=1 443, podrobněji Tab. 5). Ze zmrazených vzorků plazmy byly dodatečně stanoveny koncentrace bilirubinu, aktivita ALT, koncentrace močoviny a CRP. DNA byla izolována modifikovanou vysolovací metodou [39]. Promotorové nukleotidové varianty genu *UGT1A1* byly stanoveny použitím technologie KASPTM technology (www.lgcgroup.com). Vzájemný vztah plazmatických koncentrací bilirubinu a výsledků mortalitních dat byl analyzován v několika krocích prostřednictvím upravené multivariační logistické regrese.

Výsledky: 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 medián koncentrací bilirubinu ve srovnání s mortalitní skupinou (Tab. 5).

Tabulka 5: Charakteristika populace studie HAPIEE

	Zemřelí (n=447)	Kontrolní skupina (n=1 423)	p- hodnota
Věk	61,6 (6,5)	60,8 (6,7)	0,048
Muži (%)	305 (68,2)	971 (68,2)	0,999
Kouření (%)	194 (43,4)	383 (26,9)	≤0,001
BMI (kg/m²)	28,0 (5,1)	28,3 (4,3)	0,388
Celkový cholesterol (mmol/l)	5,7 (1,2)	5,8 (1,0)	0,173
TAG (mmol/l)	1,5	1,5	0,988
Bilirubin (μmol/l)	12,0 (9,8-15,2)	12,9 (10,9-16,1)	≤0,001
ALT (μkat/l)	0,34 (0,26-0,45)	0,35 (0,28-0,46)	0,022
GGT (μkat/l)	0,36 (0,14-0,67)	0,26 (0,11-0,52)	≤0,001
CRP (mg/l)	2,5 (1,1-5,6)	1,7 (0,9-3,3)	≤0,001
Urea (mmol/l)	4,6 (3,7-5,8)	4,8 (4,0-5,8)	0,021

Data vyjádřena jako medián a interkvartilový rozptyl. Tučně jsou označeny statisticky významné výsledky.

Statistika: Použit byl chi-square test, T-test a Spearmanův korelační test.

Legenda: BMI-body mass index, TAG-triacylglyceroly;

ALT-alaninaminotransferáza;

GGT-gamaglutamyltransferáza; CRP-C reaktivní protein.

Distribuce genotypů *UGT1A1* a frekvence alel byla v souladu s HW rovnováhou ($p=0,19$, Tab. 6) [14]; homozygoti alely 7/7 měli signifikantně vyšší plazmatické koncentrace bilirubinu ve srovnání s nosiči divoké alely 6 (Tab. 6). Ostatní biochemické parametry (ALT, GGT, CRP, močovina) byly distribuovány nezávisle na polymorfismu genu *UGT1A1*.

Tab. 6: Vztah genotypů *UGT1A1* k jednotlivým biochemickým markerům

	Polymorfismy			p-hodnota
	6/6	6/7	7/7	
Celkem (n=1 870)	759 (40,6 %)	844 (45,1 %)	267 (14,3 %)	
Bilirubin (μmol/l)	11,7 (10,0-13,9)	13,0 (10,9-15,6)	19,1 (14,6-25,0)	≤0,001
ALT (μkat/l)	0,35 (0,28-0,45)	0,34 (0,27-0,46)	0,34 (0,27-0,45)	0,519
GGT (μkat/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

P-hodnota určena Spermanovým korelačním testem. Data uvedena jako medián a interkvartilové rozmezí.

V další části analýzy jsme přistoupili k adjustaci plazmatických koncentrací bilirubinu k dalším proměnným (Tab. 7). Analýza byla provedena na celé kohortě (Tab. 7), ale i v rámci jednotlivých pohlaví.

V **modelu 1** (vztaženo na věk a pohlaví) byla zjištěna silná negativní asociace plazmatických koncentrací bilirubinu s celkovou mortalitou a také v podskupině úmrtí na nádorová onemocnění, nikoliv u úmrtí na CVD. Tatáž spojitost existovala i u **modelu 2** (adjustace na věk, pohlaví a také na vliv vzdělání, socioekonomický status a biochemické markery - CRP, ALT, BMI, lipidový profil). Podíl CVD na úmrtí byl opět statisticky nevýznamný 1,03 (95 % CI: 0,58–1,83). V **modelu 3** (adjustace model 2 + aktivity ALT, GGT, koncentrace CRP a urey) zůstal poměr šancí (OR) obdobný, i když intervaly pravděpodobnosti se rozšířily, a to kvůli ztrátě statistické síly v multivariačním modelu.

Tabulka 7: Vztah plazmatických koncentrací bilirubinu k mortalitě

Příčina úmrtí	Plazmatické koncentrace bilirubinu (μmol/l)	Počet úmrtí (n)	Model 1		Model 2		Model 3	
			OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)	OR	(95 % CI)
Všechny (n= 447)	≤ 10	120	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	253	0,49	(0,37-0,64)	0,60	(0,45-0,79)	0,62	(0,47-0,82)
	≥ 17	74	0,47	(0,33-0,66)	0,61	(0,42-0,87)	0,63	(0,43-0,92)
	p-hodnota pro trend		≤0,001		0,004		0,010	
	p-hodnota vztažena na pohlaví		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)
	≥ 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	
Onkologická onemocnění (n=211)	≤ 10	68	1,00	(ref)	1,00	(ref)	1,00	(ref)
	10-17	117	0,44	(0,32-0,61)	0,52	(0,36-0,72)	0,54	(0,38-0,76)
	≥ 17	26	0,32	(0,20-0,52)	0,39	(0,24-0,65)	0,41	(0,25-0,69)
	p-hodnota pro trend		≤0,001		≤0,001		≤0,001	
	p-hodnota vztažena na pohlaví		0,549		0,638		0,706	
Ostatní (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)
	≥ 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	

Asociace alely *UGT1A1**28, jako genetického markeru systémových koncentrací bilirubinu, nedosáhly statistické významnosti. Ukazuje se, že plazmatické koncentrace bilirubinu mají na celkovou mortalitu větší vliv než genetická predispozice genu *UGT1A1*.

Diskuse: Tato studie prokázala negativní asociaci mezi koncentracemi plazmatického bilirubinu a mortalitou, a to jak celkovou, tak zejména mortalitou na nádorová onemocnění. Z dat vyplývá, že vyšší plazmatické koncentrace bilirubinu vykazují benefit ve vztahu k úmrtnosti, a to nejvíce ve spojitosti s onkologickými nemocemi [45, 46]. Důvodem může být věk zkoumané populace (medián věku = $61,6 \pm 6,5$ let). Asociace mezi polymorfismy promotorové části genu *UGT1A1* a mortalitou nedosáhla statistické významnosti (s největší pravděpodobností v důsledku nízké penetrance *UGT1A1**28 genotypu [14]), nicméně i tak data poukazují určitý protektivní charakter. Prevalence onkologických chorob je u osob s diagnostikovaným GS nižší [6, 47].

5. KARDIOVASKULÁRNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY

Přestože je hlavním tématem této disertační práce postavení bilirubinu ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám a celkové mortalitě, nelze zde opomenout ani 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 [48, 49]. 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 [48].

Poslední studie post-MONICA byla provedena mezi lety 2015-2018. 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 $5,30 \pm 1,05$ mmol/l vs. ženy z $6,18 \pm 1,26$ na $5,31 \pm 1,00$ mmol/l, $p \leq 0,001$, průměrný pokles o 14 %), nadále přetrvává vysoká prevalence základních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění [48-50]. Dlouhodobým problémem je nárůst BMI, a to zejména u mužů ($29,1 \pm 4,8$ kg/m² vs. ženy $27,5 \pm 6,1$ kg/m²) [49], a prevalence obezity v mužské populaci (37,3 %). U žen se parametry během posledních 30 let významně nemění [51]. Jisté zlepšení lipidového metabolismu lze pozorovat u věkové skupiny nad 55 let, kde až ¼ respondentů přiznává pravidelné užívání hypolipidemické léčby, na rozdíl od respondentů do 45 let, kde je léčba cholesterolemie spíše vzácností. Tato mladá věková skupina pravděpodobně podceňuje význam prevence. Toto tvrzení by potvrzovala i data o celkové respondenci, která byla právě ve skupině 25-34 let mnohem nižší [49].

Data poukazující na vztah koncentrací kyseliny močové a kardiovaskulárního rizika v průběhu 10 let předkládáme v mé další, spoluautorské práci [52]. Výsledky této práce poukazují na významnou prediktivní roli sérových 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 4. násobným rizikem nárůstu kardiovaskulární mortality během 10 let ($p \leq 0,01$). 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 $\mu\text{mol/l}$). 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 neprojeví jako možný prediktivní marker vysokého kardiovaskulárního rizika [52]. Nicméně v budoucnu bude potřeba ještě dalších analýz k posouzení koncentrací kyseliny močové jako prediktoru u již existujícího vysokého kardiovaskulárního 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. 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.
2. Watchko, J.F., *Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns*. Neuromolecular Medicine, 2006. **8**(4): p. 513-529.
3. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-1046.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Lenicek, M., et al., *The relationship between serum bilirubin and Crohn's disease*. Inflammatory Bowel Diseases, 2014. **20**(3): p. 481-7.
9. Vitek, L., et al., *Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2010. **39**(6): p. 480-4.
10. Unsal, C., et al., *Detection of subclinical atherosclerosis and diastolic dysfunction in patients with schizophrenia*. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2013. **9**: p. 1531-7.
11. 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.
12. 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.
13. Stocker, R. and M.A. Perrella, *Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases?* Circulation, 2006. **114**(20): p. 2178-89.
14. 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.

15. Johnson, A.D., et al., *Genome-wide association meta-analysis for total serum bilirubin levels*. Human Molecular Genetics, 2009. **18**(14): p. 2700-2710.
16. Fevery, J., et al., *Plasma bilirubin pigments in health and disease*. Molecular Aspects of Medicine, 1987. **9**(5): p. 391-404.
17. 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.
18. Owens, D. and J. Evans, *Population studies on Gilbert's syndrome*. Journal of Medical Genetics, 1975. **12**(2): p. 152-156.
19. 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.
20. Burchell, B. and M. Coughtrie, *Genetic and environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation*. Environmental Health Perspectives, 1997. **105**(Suppl 4): p. 739.
21. Stevenson, D.E., *Optimisation of UDP-glucuronyl transferase-catalysed synthesis of testosterone- β -D-glucuronide by inhibition of contaminating β -glucuronidase*. Biotechnology Techniques, 1999. **13**(1): p. 17-21.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Pocock, S., et al., *Diurnal variations in serum biochemical and haematological measurements*. Journal of Clinical Pathology, 1989. **42**(2): p. 172-179.
26. Witek, K., et al., *Total bilirubin in athletes, determination of reference range*. Biology of Sport, 2017. **34**(1): p. 45.
27. 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.
28. Schwertner, H.A., *Association of smoking and low serum bilirubin antioxidant concentrations*. Atherosclerosis, 1998. **136**(2): p. 383-387.
29. Stocker, R. and J.F. Keaney, *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiological Reviews, 2004. **84**(4): p. 1381-1478.

30. 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.
31. Vitek, L., et al., *Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels*. Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 449-456.
32. Gordon, D.M., et al., *Bilirubin remodels murine white adipose tissue by reshaping mitochondrial activity and the coregulator profile of peroxisome proliferator-activated receptor α* . Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(29): p. 9804-9822.
33. Gordon, D.M., et al., *RNA sequencing in human HepG2 hepatocytes reveals PPAR- α mediates transcriptome responsiveness of bilirubin*. Physiological Genomics, 2019. **51**(6): p. 234-240.
34. Vitek, L., *Role of bilirubin in the prevention of cardiovascular diseases and cancer*. Casopis Lekarů Ceských, 2016. **155**(2): p. 10-14.
35. 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.
36. 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.
37. Hubacek, J.A., et al., *A FTO variant and risk of acute coronary syndrome*. Clinica Chimica Acta, 2010. **411**(15-16): p. 1069-1072.
38. Masopust, J., *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření část II*. 1998: Karolinum.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Paschos, P. and K. Paletas, *Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome*. Hippokratia, 2009. **13**(1): p. 9.
43. Aller, R., et al., *Predictive factors of non-alcoholic steatohepatitis: relationship with metabolic syndrome*. Nutricion Hospitalaria, 2015. **31**(6): p. 2496-502.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 2017., O.f.E.C.-o.a.D.O.u., URL: <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf> (2017). Update.
52. 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.

8. 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, Jozífová 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.

Kadlcikova, 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 prezentován na EAS, IF 3.994**

Bez vztahu k tématu disertace:

Jirásková, A., Bortolussi, G., Dostálová, G., **Eremiášová, L.**, Golaň, L., Danzig, V., Linhart, A., Vítek, 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).